

**Zn(II) FİTALOSİYANİNİN KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN K562 HÜCRE
HATTI KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NIJAT NOVRUZLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NANOTEKNOLOJİ ve İLERİ MALZEMELER
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
2019**

**Zn(II) FİTALOSİYANİNİN KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN K562 HÜCRE
HATTI KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NIJAT NOVRUZLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

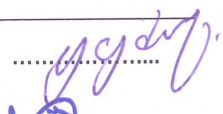
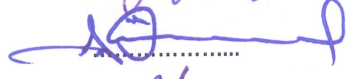
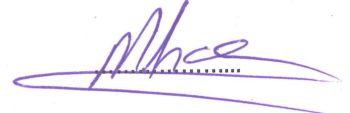
**NANOTEKNOLOJİ VE İLERİ MALZEMELER
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. BİRGÜL MAZMANCI**

**MERSİN
2019**

ONAY

Nijat NOVRUZLU tarafından Prof. Dr. Birgül MAZMANCI danışmanlığında hazırlanan "Zn(II) Fitalosiyanınin Kronik Miyeloid Lösemi Üzerine Etkisinin K562 Hücre Hattı Kullanılarak Araştırılması" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 23/12/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Birgül MAZMANCI	
Üye	Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN	
Üye	Doç. Dr. Mine İnce OCAKOĞLU	

Yukarıdaki jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun ^{24.12.2020} /... tarih ve ^{2020/154/04} /... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

22/01/2019

İmza / Signature



Nijat NOVRUZLU

ÖZET

Zn(II) FİTALOSİYANİNİN KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN K562 HÜCRE HATTI KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

Günümüzde kanser tedavisi için kullanılan bir çok yöntemlerin (radyasyon, ameliyat, kemoterapi dahil) zararlı yan etkileri bulunmaktadır. Fotodinamik tedavi (FDT) günümüzde klinikte kanser veya kanser olmayan lezyonların tedavisinde fotosensörlerin kullanıldığı tedavi yöntemidir. Fotosensör (FS) olarak fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle fitalosiyaninlerin geniş kapsamlı kullanım alanları vardır. Bunlar 600-700 nm arasında değişen ışığı çok iyi absorblama yeteneği sergileyerek singlet oksijen üretiminde yüksek kuantum verimi göstermektedir. Bu çalışmada çinko merkezli üretilen fitalosiyanin kronik miyeloid kanser hücre hattında (K562) ışıklı ve ışısız ortamdaki etkinliği test edilmiştir. Bu amaçla fitalosiyaninin 12,5 µM; 25 µM; 50 µM dozlarının 12, 24 ve 48 saatlik etkisi sitotoksik ve genotoksik testlerle araştırılmıştır. Fitalosiyaninin ışıklı ve ışısız ortamda 50 µM dozun sitotoksik etkisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. En düşük canlılık ortalaması ışısız ortamda 12. saatte belirlenmiştir. Sitotoksik etki bulgularına göre yapılan KOMET testi sonucunda hasarlı hücreler tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fotodinamik Terapi, Zn (II) Fitalosiyanin, K562, Sitoksisite, Genotoksisite.

Danışman: Prof. Dr. Birgül MAZMANCI, Mersin Üniversitesi, Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

Investigation of Zn (II) phthalocyanine effects using by K562 Chronic Myeloid Leukemia Cell Line

Nowadays, many methods used for cancer treatment including radiation, surgery, chemotherapy have harmful side effects. Photodynamic therapy (PDT) is currently the treatment of photosensitizers in the treatment of cancerous or non-cancerous lesions in the clinic. Phthalocyanines are widely used as photosensitizers because of their physical and chemical properties advantage. They exhibit a very good absorbing ability of light ranging from 600-700 nm, showing high quantum efficiency in singlet oxygen production. In this study, effect of zinc center phthalocyanine was evaluated in chronic myeloid cancer cell line (K562). Light and dark toxicity of phthalocyanine was determined. For this purpose, phthalocyanine 12.5 μM ; 25 μM ; Doses of 50 μM were used. The effects of 12, 24 and 48 hours were investigated by cytotoxic and genotoxic tests. Highest cytotoxic effects of phthalocyanine were determined in the 50 μM dose group. The lowest average viability is dark conditions at the 12th hour. According to cytotoxic effects, COMET was applied and damaged cells were detected.

Keywords: Zn (II)phthalocyanine, Photodynamic Therapy, K562, Cytotoxicity, Genotoxicity.

Advisor: Prof. Dr. Birgöl MAZMANCI, Department of Nanotechnology and Advanced Materials, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmasının planlanması, yürütülmesinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım tez danışmanım Prof. Dr. Birgül MAZMANCI' ya, hücre kültürü çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN' e, çalışma materyalini sağlayan sayın Doç. Dr. Mine İNCE OCAKOĞLU ve ekibine teşekkürlerimi sunarım. Deneylem sırasında katkısını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Dr. Serpil KÖNEN ADIGÜZEL' e ve yüksek lisans dönemi boyunca yardımını hiç esirgemeyen arkadaşım Şeyma Gülnaz YARLILAR' a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini her anımda hissettiğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu yüksek lisans tez çalışması Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nce (BAP) 2017-1-TP2-2235 proje numarası ile desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Fotodinamik Terapi	3
2.1.2. Fotodinamik Terapinin Bileşenleri	5
2.1.2.1. Işık	5
2.1.2.2. Oksijen	5
2.1.2.3. Fotosensör (FS)	6
3. MATERYAL ve YÖNTEM	9
3.1. Zn(II)Pc Sentez ve Karakterizasyonu	9
3.2. Hücre Kültürü Uygulamaları	9
3.2.1. Hücre Kültürü İçin Kullanılan Materyaller	10
3.2.2. Deney Planı	10
3.3. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi	11
3.3.1. MTT Testi İçin Gerekli Malzemeler	11
3.3.2. MTT Solüsyonunun Hazırlanması	12
3.3.3. MTT Test Protokolü	12
3.4. Genotoksik Etkinin Belirlenmesi	12
3.4.1. Komet Testinde Kullanılan Malzemeler	12
3.4.2. Komet Testi Protokolü	13
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	15
4.1. Sitotoksik Etki	15
4.1.1. Işıklı Ortamdaki Canlılık Değerleri	15
4.1.2. Işıksız Ortamdaki Canlılık Değerleri	19
4.2. Genotoksik Etki	22
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	25
KAYNAKLAR	26
ÖZGEÇMİŞ	33

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Deney Grupları	11



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Sentezlenen Zn(II)PC' ninin yapısı.	9
Şekil 4.1. Işık uygulaması sonrası 12. Saatteki canlılık yüzdesi.	16
Şekil 4.2. Işık uygulaması sonrası 24. Saatteki canlılık yüzdesi.	17
Şekil 4.3. Işık uygulaması sonrası 48. Saatteki canlılık yüzdesi.	18
Şekil 4.4. Işıksız ortamda 12. Saatteki canlılık yüzdesi.	20
Şekil 4.5. Işıksız ortamda 24. Saatteki canlılık yüzdesi.	21
Şekil 4.6. Işıksız ortamda 48. Saatteki canlılık yüzdesi	22
Şekil 4.7. Komet görüntüleri.	25



1. GİRİŞ

Son yıllarda kanser hızla artmaktadır ve bu hastalık dünyada kardiyovasküler hastalıkların ardından en yaygın ölüm nedeni olarak bilinmektedir. Kanser tedavisinin önündeki en büyük engel tümör hücrelerinde proliferasyonun engellenmesinin zorluğudur ve kanser üzerine çalışmalar bu amaca yönelik sürdürülmektedir. Günümüzde kanser tedavisi için kullanılan yöntemlerin (radyasyon, ameliyat, kemoterapi vb.) zararlı yan etkileri bulunmaktadır. Fotodinamik tedavi (FDT) kanser veya kanser olmayan lezyonların tedavisinde fotosensörlerin (FS) kullanıldığı tedavi yöntemidir. Geleneksel kanser terapisine göre FDT tedavisinin avantajı, sağlıklı dokuların zarar görmesi engellendiği için tekrarlanabilir olması, tedavi sırasında ve sonrasında daha az ağrı hissedilmesidir. FDT kanser tedavisinde uygun dalga boyunda ışık kullanılarak FS madde ile moleküler oksijenin uyarılmasını içeren tedavi yöntemidir. FDT' nin etkinliği ışık, oksijen ve FS' e bağlıdır.

FS olarak fitalosiyanın (Pc) kullanımı yönünde araştırmalar günümüzde oldukça yaygındır. Pc' ler günümüzde çok geniş ve kapsamlı kullanımı, fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle dikkat çekici gruptur. Pc' ler doğal olarak oluşan porfirinlere yapısal olarak benzeyen makrosiklik bileşiklerdir. Pc' lerin apoptoz indüksiyonu yoluyla hücre nekrozu ve ölüme sebep oldukları da aydınlatılmış ve önemleri artmıştır. Pc' lerin içermiş oldukları merkezi metal iyonları FDT' nin verimliliğini arttırmaktadır.

FDT' nin etkinliği üzerine yapılan çalışmalarda merkez atomu Zn, Al olan Pc' lerin yaygın olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir. Bu tedavi yönteminin solid kanserlerde veya lösemik kanserlerde etkisi ise tartışmalıdır. Bu tez çalışmasında çinko merkezli üretilen Zn(II)Pc' nin kronik miyeloid lösemi kanser hücre hattında (K562) etkinliği araştırılmıştır. FDT üç temel bileşenden oluşmaktadır. Işık bu bileşenlerden biridir. Bu çalışmada IC 50 altındaki Zn(II)Pc dozlarının etkisi araştırılırken ışığın etkisi de göz önünde bulundurulmuştur. Bu amaçla Zn(II)Pc' nin ışısız oluşturabileceği toksisite çalışması da yapılmıştır. Toksisite çalışmalarında sitotoksik etki ve genotoksik etki sıklıkla kullanılmaktadır. Tez çalışmasında sentezlenen Zn(II)Pc' nin IC 50 altındaki dozunun ışıklı ve ışısız olmak üzere 12, 24 ve 48 saatlik sitotoksik ve genotoksik etkileri belirlenmiştir.

Hücre temelli analizler; test moleküllerinin, hücre çoğalması üzerinde etkisinin ya da etki sonrası hücre ölümüne yol açarak sitotoksik etki gösterip göstermediğini belirlemek için kullanılır. Moleküler düzeyde gerçekleşen bir dizi olaylar sonucu çeşitli makro moleküllerin sentezinin durdurulması ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi sitotoksikite olarak adlandırılmaktadır. Hücrelerde meydana gelen bu olayların varlığını tespit ederek hücrelerdeki hasar boyutunun saptanması ise sitotoksikite testleri yardımıyla yapılmaktadır. Bu sayede test edilecek materyalin seçilen hücre üzerindeki

toksik etkileri ortaya çıkarılabilir. Sitotoksik etkinin ortaya konması için MTT, XTT, Xelinge gibi testlerden yararlanılmaktadır. Sitotoksikite için hücre canlılığının ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinden biri Metiltiazoldifeniltetrazolyum (MTT) testidir. Hücrelerin proliferasyonlarının gerçekleşmesi sonucu artan dehidrojenaz enzim aktiviteleri ile tetrazolyumu (MTT: sarı,) kullanarak formazan (mor) üretmesi neticesinde gerçekleşen renk değişiminin absorbans olarak spektrofotometre ile ölçülmesi temeline dayanan bu test, sıkça tercih edilen ve hızlı sonuç alınan bir yöntemdir [1]. Bu çalışmada Zn(II)Pc' nin K562 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin belirlenmesinde MTT testinden faydalanılmıştır.

Genotoksik etki test materyallerinin çekirdek ve DNA üzerinde meydana getirdikleri hasarları ifade etmektedir. Genotoksik etkilerin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan test yöntemlerinden biri Tek Hücre Jel Elektroferez Tekniği olarak da bilinen KOMET testidir. "Komet Assay" basit, hızlı, duyarlı olması, farklı hücre tipleri ve DNA hasar çeşitleri için uygulanabilirliği, en önemlisi ise radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle DNA hasar ölçümünde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir [2]. "Komet Assay" Singh ve ark. tarafından geliştirilmiş olan, tek ve çift zincir kırıklarının tamamının tanımlanmasına olanak sağlayan metodolojidir [3]. Son yıllarda ise "Komet Assay" belirli DNA dizilerine spesifik işaretli problemler kullanılarak floresan in situ hibridizasyon tekniği ile birleştirilerek uygulanmaktadır. Komet değerlendirmesinde hücrede meydana gelen hasar, hücreden göç eden DNA' nın oluşturduğu kuyruk uzunluğuna göre değerlendirilir. Çalışmada Zn(II)Pc' nin genotoksik etkisinin tespitinde KOMET testinden yararlanılmıştır.

2.KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Fotodinamik Terapi

Fotodinamik tedavi (FDT) günümüzde klinikte kanser veya kanser olmayan lezyonların tedavisinde foto sensörlerin kullanıldığı tedavi yöntemidir [4]. FDT; Fotosensör (FS) olan bir ajanın ışık ile aktive olması ve aktive olan ajanın singlet oksijen oluşturarak hücre tahribatı yaratması esasına dayanır [5]. Fotodinamik terapinin gerçekleştirilebilmesi için bir FS, bir ışık kaynağı ve oksijen gereklidir. FDT de her bileşen kendi başına zararsızdır, ancak kombinasyon halinde hedef hücrelere ve dokulara karşı ciddi toksisite oluştururlar. Moleküler oksijenin varlığında oksidatif hücre hasarının ve hücre ölümünün meydana gelebilmesine yol açan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşması için belirli dalga boyunda görünür ışık kullanılır [6,7].

PDT' nin etki mekanizması genel anlamda spesifik olmamakla birlikte iki mekanizma ile spesifik hale getirilir. İlk olarak, seçilen FS' nin hedef hücre veya dokuya yöneliminin ve birikiminin sağlanması, ikincisi ışığın FS birikimi olan sınırlı alana uygulanmasıdır. Böylelikle ROS üretimi FS bulunduğu alanda aynı anda oksijen ve ışık uygulanması ile meydana gelir ve lokalize alanda sitotoksik etki oluşturulur [8]. Fotodinamik terapiyle kanser tedavisi, hastaya düzenli bir şekilde bir FS' nin verilmesinin ardından uygun dalga boyunda ki bir ışık kaynağının ışığa yapmasına, bu sayede FS' nin uyarılarak moleküler oksijenden yüksek reaktif oksijen oluşturmasına, oluşan reaktif oksijenin ise proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi hedefleri okside ederek nekroz ya da apoptoz ile hücre ölümüne yol açmasına dayanır [9]. PDT, bir FS veya FS öncülünün intravenöz, intraperitoneal veya topikal uygulamasından ve ardından ışığa maruz kalmasından oluşan iki aşamalı bir prosedürdür. Bu iki aşamalı prosedür, zararsız FS' nin yalnızca yönlendirilmiş bir aydınlatma ile aktive olması nedeniyle lokal doku tahribatına yol açarak yan etkiler önemli ölçüde azalır [10]. Sağlıklı hücreler kanserli hücrelere kıyasla oksidatif strese karşı çok daha dirençlidir. FDT bileşenleri çevredeki sağlıklı hücreleri hasar görmesini engelleyerek, tümör dokusunun tahrip olmasına izin verir. PDT genellikle etraftaki kan damarlarına zarar verir ve böylece tümörün besin almasını önler ve ayrıca kanser hücrelerine karşı bir immün tepkiyi tetikleyebilir [8].

2.1.1. Fotodinamik Terapinin Temel Prensipleri

FDT' nin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. FDT; ışık ile uyarıldığında kararsız halde bulunan FS' nin yapısındaki fazla enerjiyi etrafındaki moleküllere transfer etmesiyle radikallerin (hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil radikali) oluşmasıdır [11]. Bir FS ışıklandırıldığında bir fotonu alır ve bir elektronun daha

yüksek enerjili bir yörüngeye doğru kaydırıldığı uyarılmış tekli durumuna veya S_1' e yükselir. FS; meydana gelen bu stabil olmayan kısa ömürlü durumundan (bir nanosaniye), teşhis ve optik izleme amacıyla kullanılabilir bir özellik olarak ısı veya floresan oluşturarak temel enerji durumu olan S_0 a dönebilir [12]. Bir diğer mekanizma, FS' nin uyarılmış tekli durumundan daha yüksek kararlılığa sahip uzun ömürlü üçlü duruma dönüşmesidir. Bu da uzun ömürlü elektronun dönüşünün tersine çevrilmesi veya sistemler arası geçişi yoluyla gerçekleşir [11,13,14]. Elektronların çevre ile etkileşimi iki tip mekanizmayla gerçekleşir. I. Tip mekanizmada uyarılmış üçlü durumundaki FS, bir elektron / hidrojeni veren veya alan bir organik hücrel substrat ile etkileşime girer. Serbest radikalleri ve radikal iyonları üretir ve böylece zincir reaksiyonlarını başlatır. FS' nin oksijenle etkileşimiyle, süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksit anyonları ve yüksek oranda reaktif hidroksil radikal ($OH\cdot$) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşabilir, bunlar hücrel bileşenlere saldırarak zarar verebilir [15-17]. Serbest radikaller doğrudan hücrel hasara neden olabileceğinden, bu süreçte oksijen gerekli değildir. Tip II reaksiyonda uyarılmış üçlü durumundaki FS, enerjisini enerji aktarımı yoluyla üçlü temel durumundaki moleküler oksijene doğrudan aktarır ve oldukça reaktif ve sitotoksik singlet oksijen (O_1) oluşur [18]. Her iki tip reaksiyon aynı anda gerçekleşir ve aralarındaki denge FS' e bağlıdır. Ancak PDT sırasında geçerli mekanizmanın bir Tip II reaksiyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir [15-17,19-21]. Sitotoksik ROS üretildikten sonra, FS molekülü oksidasyondan dolayı foto-ağartma yoluyla tahrip olabilir ya da kimyasal değişiklik olmadan temel durumuna geri dönebilir ve uyarma-enerji transfer işlemi birçok kez tekrarlanabilir [22-24].

Singlet oksijen ve süperoksit anyonu lipid, protein ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek sitotoksik etkiye yol açabilir [25]. Tip I reaksiyonlarında oluşan süperoksit anyonları doğrudan biyolojik sistemlere zarar vermez ancak hidrojen peroksit oluşumuna yol açan reaksiyonlara katkı yapar. Hidrojen peroksit, Fenton reaksiyonu yoluyla süperoksit anyonlarıyla reaksiyona girerek hidroksil radikallerini oluşturulabilir. Hidroksil radikaller hemen hemen tüm biyomoleküllerin çiftli bağlarına veya hidrojen atomlarına kolayca eklenebilen reaktif bir türdür. Örneğin bir yağ asiti ile reaksiyonu sonrası hidroksillenmiş bir ürün meydana getirir. Böylece, lipid peroksidasyonlarının zincirleme reaksiyonları başlar lipid radikaller şekillenir[26].

FS' lerin çoğunun singlet oksijenin oksidatif hasara yol açtığı Tip II reaksiyonlarla etki ettiği düşünülmektedir. Singlet oksijenin membran lipidleri ile reaksiyonu lipid peroksidasyonu yoluyla ve hücrel membranların bozulmasına yol açabilir. Ayrıca amino asitler ile reaksiyona girerek, hayati fonksiyona sahip proteinlerin işlevini bozabilir. Oldukça reaktif olan singlet oksijenin yarılanma ömrü 40 ns civarında ve maksimum aksiyon yarıçapı da 20 nm' dir. Çoğu

organellerin çapından daha az olan bu kısa etki çapı, sadece FS' nin lokalize olduğu alandaki dokunun ışıklandırılmasıyla ile FDT' nin spesifik ve kontrol edilebilir hale gelmesini sağlar. Yani FS' nin lokalizasyonu, FDT' nin hücre içi seviyedeki etki alanını belirlemektedir [27,28].

2.1.2. Fotodinamik Terapinin Bileşenleri

Fotodinamik terapi üç temel bileşenle gerçekleştirilir. Bunlar ışık, oksijen ve FS' lerdir.

2.1.2.1. Işık

FS' ler belirli dalga boyunda ışığa maruz bırakılarak aktive edilirler. FS' leri aktive etmek için kullanılan ışığı FS molekülü ne kadar güçlü absorbe ederse o kadar yüksek kuantum verimi yani ROS üretimi gerçekleşir. İn-vivo uygulamalarda kullanılacak FS' ler için maksimum absorban dalga boyunun endojen pigmentlerin (melanin, hemoglobin gibi) optimum dalga boyu olan 650 nm' nin üzerinde olması gereklidir. Endojen pigmentlerin penetrasyon derinliği 1-3 mm'e ışık şiddeti 400-600 nm' dir [29-31]. Derin tümörlere erişmek penetrasyonu artırmak için yüksek enerjili ışık kaynağı (Lazer) kullanmak gerekir. Bu uygulama doku yüzeyinde yanıklara neden olur. Kırmızı görünür bölgede (650-780 nm) ve kızılötesi bölgede >750 nm' den düşük yoğunluklu ışık sağlıklı dokuda hasar oluşturmadan birkaç cm derinliğe ulaşmayı mümkün kılar [29,30]. Singlet oksijenin enerjisi 1270 nm' dir. Bununla beraber 800 nm' den daha yüksek olan bölgede ışığı absorbe edecek bileşikler ise oldukça azdır. Bu tür yüksek emilim dalga boyları için aromatik bağın konjuge edilmesi veya bileşiklerin yapısına metal iyonlarının dahil edilmesi gerekir. FDT terapide 650-780 nm olan görünür spektrumun kırmızı bölgesi tercih edilir [29]. Fitalosiyanın, nafitalosiyanın, benzoporfirin gibi porfirin türevi yapılar bu dalga boyunda yüksek ışık emme katsayısına sahip olup yüksek oranda ROS oluştururlar. Tümör dokusunda seçici olarak birikmeleri de bu II. Nesil FS' leri avantajlı hale getirmektedir. Lazer; idrar kesesi, sindirim sistemi, beyin veya derin tümörlere erişimi sağlamak için fiberoptik sistemler ile birlikte kullanılabilir.

2.1.2.2. Oksijen

Kanser tedavisinde oksijen oldukça önemlidir. Tümörlerde var olan hipoksik durum tedaviyi engellemektedir. Oksijen radyoterapi ve kemoterapinin etkisi için gereklidir. FDT' de başarıyı sağlamak için singlet oksijen oluşumuna bunun içinde temel hal durumundaki oksijene ihtiyaç duyulur. Tümörler içerisindeki damar tıkanıklıkları tümör dokusunda hipoksik alan

oluşmasına neden olmaktadır. Hipoksik alanlar FDT' nin etkinliğini önemli ölçüde azaltmaktadır. Tümör dokusuna oksijenasyonun arttırılmasının kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğini arttığı gösterilmiştir [32-34]. FDT ile ilgili yapılan çalışma sonuçları çelişkili olabilmektedir. Fotofrin ile yüksek oksijen uygulanan tümörlü farelerde FDT sonrası ölümün arttığı gözlemlenmiştir [35,36]. Bir diğer çalışmada düşük oksijen seviyelerinin tedaviyi etkilemediği bildirilmiştir [37]. FDT sırasında meydana gelen ROS' lar oksijen azalmasına neden olur. Yine FDT sonrası damar dejenerasyonu tümörde oksijen azalmasına neden olur. Işık ve FS düzenlenmesi yapılarak bu sorunlar aşılabılır [38].

2.1.2.3. Fotosensör (FS)

FS' ler geliştirilme zamanları ve karakteristik özelliklerine göre sınıflandırılır. İlk nesil FS' ler hematorporfirinler (Hp) olup 19 YY keşfedilmiştir. Kandan İzole edilmiş olan Hp Türevleri fotoporfirinler adı altında 1. nesil FS olarak kullanılmıştır. Bu türevlerin ışık emiliminin zayıf olması bu nedenle hastaların daha fazla ışığa maruz kalması gibi dezavantajları bulunmaktadır [39,40]. 2. nesil FS' ler porfirin benzeri moleküller olup pirol halkasına benzer yapılar içerir. Çoğunlukla siklitetrapirooller içeren türevleri kullanılmaktadır. Bu yapılar insan vücudunda bulunan endojen yapılara benzerlik gösterdiğinden toksik etkileri ya çok azdır ya da bulunmamaktadır. İlaveten ışık emilimi yüksek olup fazla miktarda ROS üretmektedirler [29,41]. Pirol halkaları ile birleştirilmiş porfirin benzeri yapılar; benzoporfirinler, Pc' ler ve nafitalosiyeninlerdir [8].

Pc' ler, FDT için fototoksik ilaçlar olarak kullanılma potansiyeline sahip 2. nesil FS' lerdir. Pc' ler yüksek ışık emme kabiliyetlerine bağlı olarak yüksek reaktif oksijen türlerinin üretkenliğine sahiptir ilaveten kimyasal stabilite ve floresans özellikleri de yüksektir [42-45]. Sentetik olarak elde edilen ve önemli bir boyar madde grubu olan Pc' ler, ilk kez 1907 yılında Braun ve Tcherniac isimli araştırmacılar tarafından fitalimid ve asetikanhidrit ile o-siyanobenzamid sentezi sırasında mavi renkli bir yan ürün olarak rastlantı sonucu bulunmuştur [46]. Pc molekülünün gerçek yapısı 1929 yılında Linstead ve ekibinin çalışmaları sonucunda belirlenmiştir [47]. Pc doğal olarak oluşan porfirinlere yapısal olarak benzeyen makrosiklik bileşiklerdir. Pc' ler etkili FDT için "terapötik pencere" olarak kabul edilir kırmızı spektral bölgede (maksimum 680-700 nm' de) yüksek ışık emilimi ve singlet oksijen üretiminde yüksek kuantum verimi göstermektedirler. Pc' lerin apoptoz indüksiyon yoluyla hücre nekrozu ve ölüme sebep oldukları da aydınlatılmış ve önemleri artmıştır [5].

Pc türevlerinin PDT uygulamalarında popüler olması ile ilgili önemli bir konu, singlet oksijen üretim etkinliği, suda çözünürlük ve toplanma özellikleri ve buna bağlı in vivo dağılımlarının ve biyoyararlanımlarının avantajlı olmasıdır [48]. Lipofilik Pc' lerin yüksek

kutanöz fototoksositeyle birlikte tümörlere bağlanma afinitesi de yüksektir [49]. Katyonik Pc' ler yeni nesil fotoalgılayıcılar olup, suda çözünürlükleri geliştirilerek FDT etkinliğini azaltan agregasyonu engeleyebilirler. Riega ve ark. (2018) yaptıkları bir çalışmada hidrofilik ve lipofilik iki farklı Pc' nin sitotoksik etkilerini mürin kolon karsinoma hücrelerinde (CT26) araştırmışlardır. Çalışma sonucu IC 50 doz yanıtına göre lipofilik Pc' lerin canlılık oranını hidrofilik olan Pc den daha fazla etkilediği tespit edilmiştir [48].

Pc' ler uygun kırmızı spektral bölgede güçlü bir ışık emilimine ve singlet oksijen oluşumuna yol açan, kanser hücrelerini yüksek miktarda tahrip eden FS adaylarıdır. Kuzyniak ve arkadaşları (2016), yapmış oldukları çalışmada tetra-trietileneoksisülfonil çinko fitalosiyanınin (ZnPc) PDT için yeni FS olarak uygunluğunu değerlendirmişlerdir. ZnPc' nin indüklediği fototoksosite, apoptoz indüksiyonu ve hücre döngüsü durdurma etkileri, farklı kökenli insan gastrointestinal kanser hücre hatlarında incelenmiştir. ZnPc ile ön işleme tabi tutulmuş (1-10 M) kanser hücrelerinin fotoaktivasyonu, 10J/cm² güç yoğunluğunda geniş bant beyaz ışık kaynağıyla (400-700 nm) aydınlatılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda; ZnPc yüklü hücrelerin fotoaktivasyonu, güçlü fototoksik etkileri ortaya çıkarmış ve hücre döngüsünün G1-fazında durdurarak apoptozu indüklediği rapor edilmiştir. Buna karşılık, aydınlatma olmadan ZnPc' ler herhangi bir sitotoksosite, apoptoz, hücre döngüsü durması veya hücre büyümesinde azalmaya neden olmamıştır [50].

Pc' nin yapısında merkezi metal iyonunun bulunması foto fiziksel özelliklerini güçlendirmektedir. Bunun sebebi; metal ile fitalosiyanın arasındaki bağın oldukça kuvvetli olmasıdır. Bu sayede tüm molekül aromatik bir yapı kazanarak dayanım ve verim maksimum düzeyde artmaktadır. Zn(II)Pc' ler kırmızı görünür bölgede yoğun ışık emilim kabiliyetine sahiptir. Tekli ve üçlü kuantum verimleri yüksek ve üçlü uyarılma durumları uzun ömürlüdür. Bu özellikler ZnPc' leri PDT için değerli kılmaktadır [48].

Tedesco ve arkadaşları (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, in vitro hücre sel sistemler kullanılarak, metaloftalosiyanınlerin etkili fotodinamik duyarlılaştırıcılar olduğu gösterilmiştir. Kloroalüminyum ftalosiyanın tetrasülfonat (AlPcS₄Cl), tümörlerde birçok PDT çalışması için fotosensitizer olarak kullanılmıştır. Ek olarak, alüminyum fitalosiyanın tetrasülfonatın (AlPcS₄) tümör dokusunda lokalize olduğunu ve kırmızı ışığa maruz kaldıktan sonra doku nekrozuna yol açtığını gösteren in vivo çalışmalar yapılmıştır [51]. Bir diğer çalışmada Erdem ve ark (2017) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada sentezlenen Zn(II)Pc' nin iyi bir fotosensör olduğu ovaryum kanser hücre hattında (SKOV- 3) gösterilmiştir. Çalışmada Zn(II)Pc' nin 100 µM dozunun SKOV-3 hücre hattında toksik etkisinin olmadığı, 5J şiddetinde ışıkla aktive edildiğinde aynı hücre hattında yüksek oranda toksisite sonucu hücre ölümüne yol açtığı belirlenmiştir [52]. Avşar ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan ZnPc ile ilgili çalışmada 10µM ve 90µM dozları farklı hücre hatlarına uygulanmıştır. Uygulanan dozlar insan meme

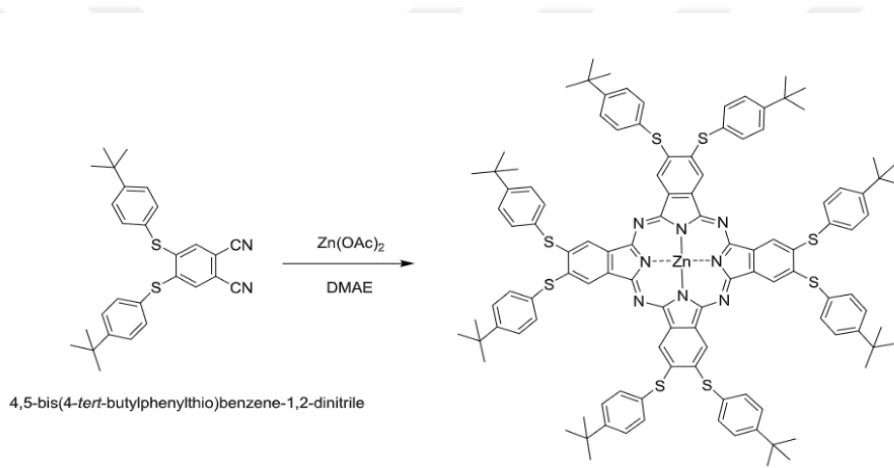
kanser (MCF-7) hücreleri, ovaryum kanser (MDAH), insan akciğer fibroblast (WI-38) hücrelerinde toksik etkiye neden olmamıştır [53]. Çinko fitalosiyanınin fotoalgılayıcı olarak kullanıldığı bir diğer çalışmada serbest Zn(II)Pc ve titanyumdioksit nanopartikülü ile bağlanmış formu hepatoselüler karsinoma (HepG2) kolorektal karsinoma (HT29) ve sağlıklı akciğer kanser hücre hattındaki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucu titanyumdioksitin (TiO_2) ZnPc' ninin toksik etkisini azalttığı belirlenmiş, TiO_2 -ZnPc nin kolorektal kanser için kullanılabilceği bildirilmiştir [54]. Mehreban ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada Zn(II)Pc' i, polimerik nanopartikülle (PLGA-b-PEG) kaplayarak insan akciğer hücre hattına (A549) uyguladıklarında serbest Zn(II)Pc' e oranla 500 kat daha etkili olduklarını belirlemişlerdir [55]. Mayahi ve ark. (2019) tarafından yapılan, merkezi galyum metal iyonu içeren çalışmada; galyum Zn(II)Pc klorürün (GaPcCl) bir radyoterapi ajanı ve ışığa duyarlılaştırıcı olarak MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. GaPcCl' nin farklı konsantrasyonları ile hücreler inkübe edilmiş, ardından tekli ve kombinasyonlu olarak 2-Gy-X ışınları altında farklı dalga boyları ile ışığa maruz bırakılmıştır. Hücre canlılığı ve apoptozun belirlenmesi için uygulanan MTT ve akım stometri analizleri sonucu; X-ışını ile GaPcCl PDT (fotodinamik terapi) entegrasyonunun kullanılmasının, X-ışını yokluğuna kıyasla büyük ölçüde hücre ölümünü arttırdığını gösterilmiştir. Bu çalışma sonucu metal iyonu eklemesinin fitalosiyanınin fotofiziksel özelliklerini geliştirdiği belirlenmiştir. PDT de kullanılan GaPcCl' nin radyoterapi ile kombinasyonunun meme kanseri tedavisinde başarıyı arttırabileceği rapor edilmiştir [56].

Pc ile yapılan çalışmalara bakıldığında in-vitro deneylerde adherent hücre hatlarının kullanıldığı görülmektedir. Planlanan bu tez çalışmasında merkez atomu Zn olan Pc kullanılarak solid hücre olan K562 hücrelerdeki etkisinin çalışılması amaçlanmıştır. Pc nin ışıklı ve ışıksız ortamdaki etkisi, 12.5 μ M; 25 μ M ve 50 μ M dozlar uygulanarak belirlenmiştir. Maruziyet süresi olarak 12., 24. ve 48. saatlerdeki etkisi araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Zn(II)Pc Sentez ve Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan merkezinde çinko atomu içeren simetrik fitalosiyanın molekülü Doç. Dr. Mine İNCE OCAKOĞLU ve ekibi tarafından sentezlenmiştir. Pc' nin sentezi için gereken başlangıç maddesi ftalonitrildir. Ftalonitrilin, dimetilamino etanol gibi yüksek kaynama noktasına sahip bir çözügen içinde ve bir çinko tuzu varlığında siklotetramerizasyon reaksiyonuyla hedeflenen fitalosiyanın sentezi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda elde edilen ham ürün kromatografik yöntemlerle saflandırılmış, NMR, IR, UV-Vis ve MALDI-TOF gibi spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiştir.



Şekil 3.1. sentezlenen Zn(II)Pc' ninin yapısı

3.2. Hücre Kültürü Uygulamaları

Sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilen Zn(II)Pc' nin fotosensör olarak K562 kronik miyeloid lösemi hücre hattı üzerinde fotodinamik terapi etkinliğini belirlemek için sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Hücre kültürü uygulamaları Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM) bünyesindeki Kök Hücre Rejeneratif Tıp (MERKÖK) biriminde yapılmıştır.

Çalışmada K562 kronik miyeloid lösemi hücre hattı kullanılmıştır. K562 hücreleri, kronik miyeloid lösemnin blastik kriz evresinden kaynaklı bir miyeloid seri hücre dizisidir. Elektron mikroskopunda bakıldığında K562 hücreleri kolay bağıntılı, düzgün şekilli, kısa mikrovillüslü, farklılaşmış lösemik hücrelerine benzer şekilde görülebilir. Giemsa ile hazırlanmış preparatlarda K562 hücreleri yaklaşık 20 µm çapında iki ya da daha fazla parçalı

nükleuslu farklılaşmamış blast hücreleri olarak tanımlanabilir. Bazofilik sitoplazmaları granül içermez.

3.2.1. Hücre Kültürü İçin Kullanılan Materyaller:

- Fetal Bovine Serum+ 0,3 mg/ml G418
- L-glutamin 1X
- Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium
- DMSO %8 (v/v)
- Penisilin/Streptomisin Antibiotic (G418 Sulfate)
- DPBS 1X
- Pastör pipeti
- 25 cm² flask
- 6 Well Plate
- 15 ml ve 50 ml falconlar
- 2 ml ependorflar
- Işık mikroskobu

3.2.2. Deney Planı

K562 hücreleri %10 FBS, 2,5 mM L-glutamin (fenol red'siz) ve Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium kullanılarak flask içinde çoğalmaya bırakılmıştır. 48-72 saat süreyle flask içinde CO₂ inkübatöründe bekletilen K562 hücrelerinin büyüme durumlarına ışık mikroskopunda bakılmıştır. Hücrelerin yoğun olduğu flasktan hücreler pasajlanarak 3 ayrı flaska bölünmüştür.

Daha sonra 6 kuyucuklu well plate' e kuyucuk başına 150×10^3 hücre ekilmiştir. %1' lik DMSO içerisinde çözülen Zn(II)Pc' nin üç farklı konsantrasyonu (12,5 μ M; 25 μ M; 50 μ M) eklenmiştir. Sentez molekülün ışıklı (Xenon lamba) ve ışıksız olmak üzere iki farklı durumdaki etkinliği çalışılmıştır. Bu nedenle bir grup bir saatlik inkubasyon sonrası 10 dk ışığa maruz bırakılmıştır. Weller tekrar inkübatöre kaldırılarak 12, 24 ve 48 saatliklerdeki sitotoksik etkiler incelenmiştir. Elde edilen verileri karşılaştırmak için kontrol grubu ve çözücü kontrol grubu da deney gruplarına eklenmiştir. Pc' nin; Uygulama süreleri ve uygulama şekilleri göz önünde bulundurularak yapılan deney planı tablo 3.1. gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Deney Grupları

Deney grupları	Uygulama süreleri (Saat)	Uygulama şekli (Xenon lamba)	
Kontrol (K.) : Besiyeri+hücreler	12	Işıklı ortam	Işıksız ortam
	24		
	48		
Dimetilsülfooksit Kontrol(DMSO K.): 50µM DMSO+besiyeri+hücreler	12	Işıklı ortam	Işıksız ortam
	24		
	24		
12,5 µM Zn(II)Pc Besiyeri+hücreler	12	Işıklı ortam	Işıksız ortam
	24		
	48		
25 µM Zn(II)Pc Besiyeri+hücreler	12	Işıklı ortam	Işıksız ortam
	24		
	48		
50µM Zn(II)Pc Besiyeri+hücreler	12	Işıklı ortam	Işıksız ortam
	24		
	48		

3.3. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Sitotoksosite için hücre canlılığının ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinden metiltiazoldifeniltetrazolyum (MTT) testi kullanılmıştır.

3.3.1.MTT Testi İçin Gerekli Malzemeler

- MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue, SIGMA.)
- DMSO (dimetilsülfoksit)
- PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X
- Etanol
- CO₂ inkübatörü
- Spektrofotometre ölçüm küvetleri

3.3.2. MTT Solüsyonunun Hazırlanması

MTT suda (10 mg / mL), etanolde (20 mg / mL), tamponlu tuz çözeltileri (PBS) içinde veya besiyeri (5 mg / mL) içinde çözünebilir. Çalışmada PBS' de 5 mg / mL' lik bir çözelti hazırlanılarak kullanılmıştır. Elde edilen solüsyon önce vortekslenerek iyice homojenize edilmiş, ardından filtreden geçirilerek sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Stok MTT çözeltisi -20° C'de saklanmış (en az 6 ay boyunca stabil); stoktan elde edilen çözeltiler ise +4° C' de yalnızca birkaç gün bekletilerek kullanılmıştır.

3.3.3. MTT Test Protokolü

Hazırlanan MTT stok solüsyonu 1/20 oranında dilüe edilmiştir. 6' lı well plate' e ekimi yapılmış hücrelere, Zn(II)Pc dozları (12,5µM, 25µM, 50µM) eklenerek, hücreler 1 saat inkübe edilmiştir. Işıkla uyarılan gruba 10 dk ışık verilmiştir. Işıksız grup karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra ışıklı ve ışıksız gruplarda 12, 24 ve 48 saatlerde, plate' in her bir kuyucuğuna 300µL MTT solüsyonu eklenmiş, plate ışık görmemesi için alüminyum folyoya sarılarak 2 saat 37° C' de inkübatörde bekletilmiştir. 2 saatlik süre sonunda her bir kuyucukta bulunan MTT solüsyonu üzerine 300µL DMSO (dimetilsülfooksit) eklenmiştir. Bu çözücünün eklenme amacı kuyucuklarda oluşan mavi-mor renkli formazanı çözmektir. DMSO eklendikten sonra yeniden folyolanan plate, 30 dakika boyunca orbital çalkalayıcı yardımı ile karıştırılmıştır. Süre sonunda her bir gözde bulunan solüsyonlar çekilerek spektrofotometre küvetlerine aktarılmış ve OD:570 nm' de absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.4. Genotoksik Etkinin Belirlenmesi

Genotoksisitenin belirlenmesi için KOMET testi yapılmıştır. Kolay, hızlı, oldukça hassas bir test olan komet testi, farklı hücre tipleri ve DNA hasar çeşitlerini tespit için uygulanabilirliği, en önemli özelliği olarak radyoaktif işaretleme ihtiyacının olmaması sebebiyle DNA hasar ölçümünde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir.

3.4.1. Komet Testinde Kullanılan Malzemeler

- **Lizis çözeltisi:** 445 ml tampon çözeltisi için; 73.05 gr NaCl, 18.6 gr EDTA, 0.6 gr Tris-Trisma ve 4gr NaOH kullanılarak tüm malzemeler çözününceye dek karıştırılarak stok lizis çözeltisi hazırlandı. Çözeltinin pH' ı 10' a ayarlandı. Hazırlanan lizis çözeltisi 1 gece boyunca 4°C' de bekletildi. Deney günü, 71 ml Lizis solüsyonu içerisine 8 ml DMSO ve 1 ml TritonX-100 eklenerek hazırlandı.
- **Nötralizasyon Tampon Çözeltisi:** 500 ml' lik tampon çözeltisi için; 24 gr Tris (Tris HCl) 500 ml distile su içinde çözdürüldü. Çözeltinin pH' ı asetik asit yardımıyla 7,5'e ayarlandı. 4°C'de saklanan çözelti deney sırasında soğuk olarak kullanıldı.
- **Elektroforez Tampon Çözeltisi:** 1.5 L' lik elektroforez tampon çözeltisi için; 18 gr NaOH ve 0.63 gr EDTA distile suda çözdürüldü. NaOH eklenerek pH' ı 13' e ayarlandı. Hazırlanan elektroforez tampon çözeltisi 4°C' de saklanarak deney sırasında soğuk olarak kullanıldı.
- **Normal Erime Noktalı Agar (NMPA):** Lam kaplamalarında kullanım için hazırlandı. 0.50 gr NMPA sıcak su banyosu kullanılarak 100 ml PBS (phosphate buffered saline) içerisinde çözdürüldü.
- **PBS (Phosphate Buffered Saline):** 200 ml Distile su içinde 1.92 gr PBS çözdürülerek hazırlandı.
- **Düşük Erime Noktalı Agar (LMA):** 0.065 gr LMA içine 10 ml PBS çözeltisi eklenerek hazırlandı.
- **Hidrojen Peroksit Solüsyonu:** 100 µM hidrojen peroksit solüsyonu için; 100 mL distile su içerisine 51 µl hidrojen peroksit eklenerek hazırlandı.
- **Etidyum Bromür (EtBr) Çözeltisi:** 50 ml distile suya 0,1 mg etidyum bromür eklenerek hazırlandı.

3.4.2. Komet Testi Protokolü

K562 hücreleri 6' lı well plate' lere ekilerek ve 37⁰ C' ye ayarlanmış %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilmiştir. 12.5 µM, 25 µM, 50 µM Zn(II)Pc dozları içeren solüsyonlar ile hücreler 12 saat muamele edilmiştir. Muamele süreleri sonrasında inkübatörden alınan platelerden besi ortamları çekilerek, santrifüj yardımıyla falcon tüplerde hücrelerin çöktürülme işlemi gerçekleştirilmiştir. K562 hücreleri süspanse hücreler oldukları için platelerden alınan besiyeri + hücre ortamları doğrudan 15 mL' lik falconlara alınarak 7 dakika 1080 RPM' de santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Tüplerin üzerindeki süpernatant kısım uzaklaştırılarak hücre eldesi sağlanmıştır. Hücreler düşük erime noktalı agar (LMA) içerisine eklenerek, önceden hazırlanmış normal erime noktalı agarla kaplanmış, lamlara yayma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yayma işleminden sonra lamlar 20 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Süre

sonunda lameller alınmış ve lamalar $+4^{\circ} \text{C}$ ' deki lizis solüsyonu içerisine yerleştirilerek ve 1 saat bekletilmiştir. Lizis işleminden sonra lamalar elektroforez solüsyonuna yerleştirilmiştir. Lamalar solüsyon içerisinde 20 dakika bekledikten sonra elektroforez tankında 25 volt, 300 mA'de 20 dakika yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütme işleminden sonra lamalar nötralizasyon tamponunda 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kurutulan lamalar %96'lık etanolde 10 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan preparatlar 80 µl etidyum bromür kullanılarak boyanmış ve boyanan preparatlar floresan mikroskopta incelenmiştir. Komet değerlendirmesinde hücrede meydana gelen hasar, hücreden göç eden DNA'nın oluşturduğu kuyruk uzunluğuna göre değerlendirilir. Kuyruk uzunluğuna göre hücreler 5 tipte sınıflandırılır [57].

Tip 0: Kuyruk içermeyen dairesel DNA'ya sahip hücre

Tip I: Küçük kuyruk içeren düşük DNA hasarlı hücre

Tip II: Biraz daha uzun kuyruk içeren orta seviyede DNA hasarlı hücre

Tip III: Daha uzun kuyruğa sahip, yüksek seviyede DNA hasarlı hücre

Tip IV: Küçük bir baş içeren uzun kuyruklu çok yüksek hasarlı DNA'ya sahip hücre

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

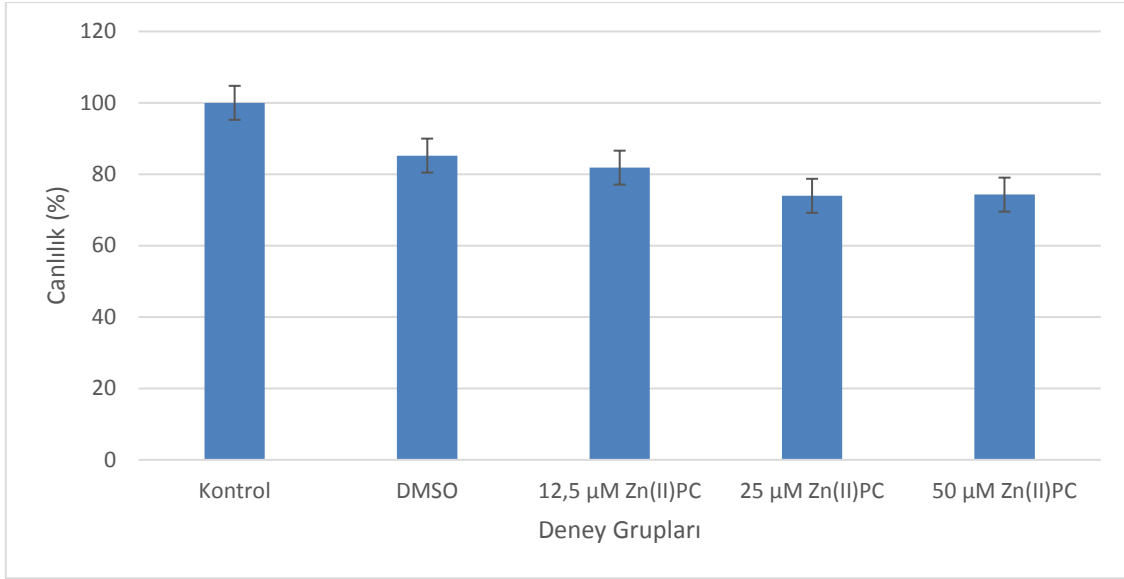
Sentezi ve karakterizasyonu tamamlanan Zn(II)Pc, sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması için K562 hücreleri ile muamele edilmiştir. Zn(II)Pc'nin 12,5 µM, 25 µM ve 50 µM dozlarının 12. saat, 24. saat ve 48. saatlerdeki etkileri ışıklı ve ışısız ortamda incelenmiştir. Belirlenen süreler sonrasında Zn(II)Pc ve hücre etkileşimlerini incelemek için sitotoksik, sitotoksik etki gözlenen grupta da genotoksik etki belirlenmiştir.

4.1. Sitotoksik Etki

MTT testi; hızlı sonuç vermesi ve oldukça hassas olması gibi avantajlarının yanı sıra, materyallerin çok düşük seviyedeki toksisitelerinin dahi tespitine olanak sağlaması nedeniyle güvenilir yöntemlerden biri olarak kabul gören hücre canlılığı analiz yöntemlerinden biridir. Bu nedenle çalışmamızda Zn(II)Pc' in sitotoksik etkileri, MTT testi ile değerlendirilmiştir. Fotodinamik terapide kullanılan Zn(II)Pc' ler ışıkla aktive edilerek kullanılmaktadır. Bu çalışmada sentez molekülün Zn(II)Pc hem ışıklı hem de ışısız ortamdaki sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Işıklı ortamda canlılık ortalaması % 82,33 olarak saptanırken, ışısız ortamda % 90,53 olarak tespit edilmiş, aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p \geq 0,05$). Işık açısından deney grupları arasında interaksiyon olmadığından sitotoksik etki değerlendirilirken doz ve sürelerin etkisi ayrı ayrı ele alınmıştır. Hücre canlılığı % olarak hesaplanmıştır.

4.1.1. Işıklı Ortamdaki Canlılık Değerleri

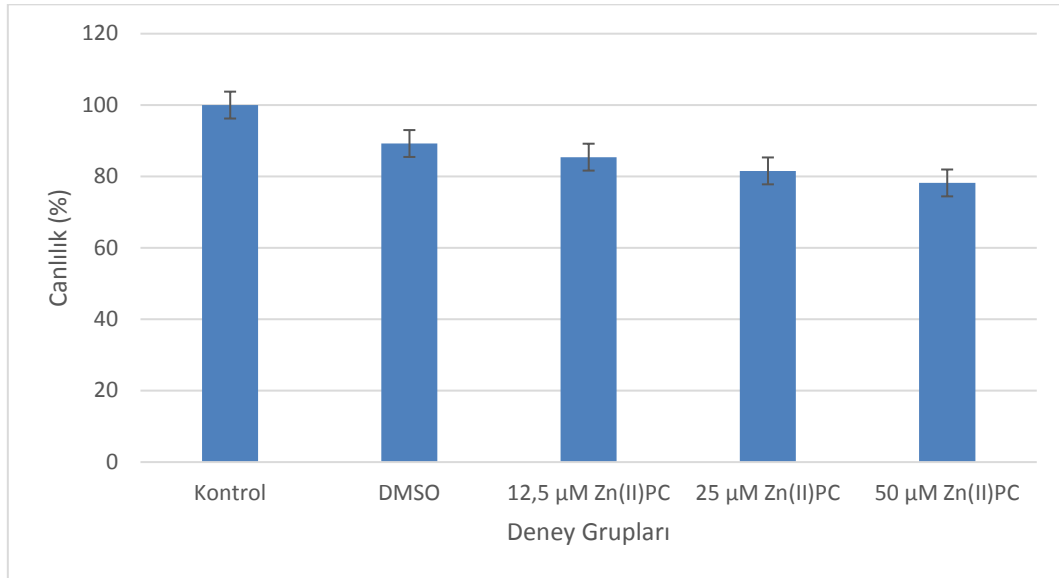
12,5 µM; 25 µM; 50 µM dozlarda Zn(II)Pc uygulanıp 10 dk. Işığa maruz bırakılma sonrası 12. Saatte elde edilen canlılık yüzdeleri Şekil 4.1 de verilmiştir.



Şekil 4.1. Işık uygulaması sonrası 12. Saatteki canlılık yüzdesi.

Işık uygulamasını takip eden 12. saatte doza bağlı canlılık oranları arası farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($p \geq 0,05$). Kontrolle karşılaştırıldığında canlılık yüzdesi 12, 5 µM dozda %18,15, 25 µM dozda % 26,03 ve 50 µM dozda %25,71 azalmıştır.

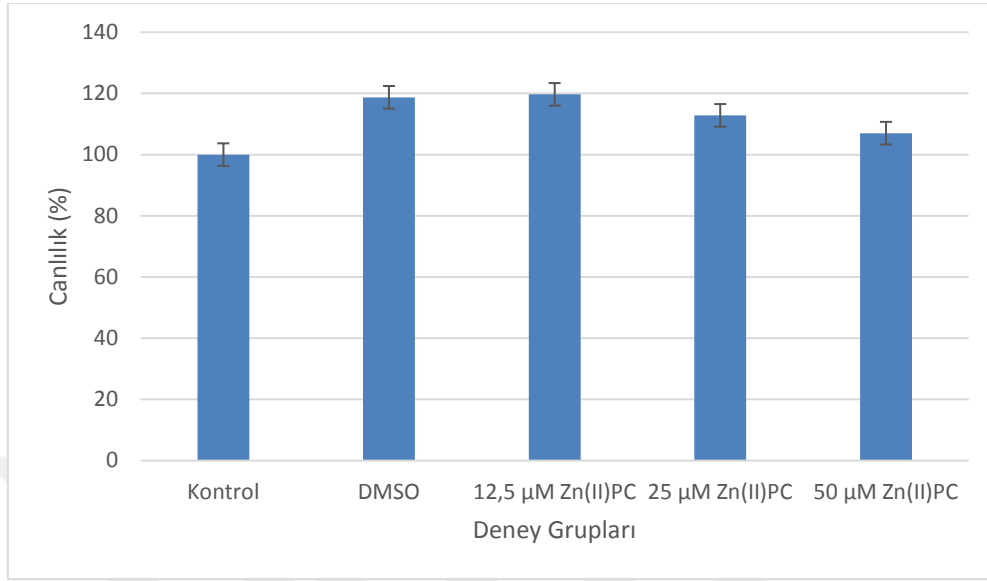
12,5 µM; 25 µM; 50 µM dozlarda Zn(II) Pc uygulanıp 10 dk. Işığa maruz bırakılma sonrası 24. Saatte elde edilen canlılık yüzdeleri Şekil 4.2 de verilmiştir.



Şekil 4.2. Işık uygulaması sonrası 24. Saatteki canlılık yüzdesi.

Işık uygulamasını takip eden 24 saatte doza bağlı canlılık oranları arası farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($p \geq 0,05$). Kontrolle karşılaştırıldığında canlılık yüzdesi 12, 5 µM dozda %14,58, 25 µM dozda %18,43 ve 50 µM dozda %21,80 azalmıştır.

12,5 µM; 25 µM; 50 µM dozlarda Zn(II) Pc uygulanıp 10 dk. Işığa maruz bırakılma sonrası 48. Saatte elde edilen canlılık yüzdeleri Şekil 4.3 de verilmiştir.



Şekil 4.3. Işık uygulaması sonrası 48. Saatteki canlılık yüzdesi.

Işık uygulamasını takip eden 48 saatte doza bağlı canlılık oranları arası farkın istatikselsel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($p \geq 0,05$). Kontrolle karşılaştırıldığında canlılık yüzdesi 12, 5 µM dozda %19,69, 25 µM dozda %12,83 ve 50 µM dozda %7,01 fazla bulunmuştur.

Bulgulara göre ışıkla aktive edilen Zn(II)Pc' nin 12. ve 24. saatlerde K562 hücrelerde sitotoksik etki oluşturduğu belirlenmiştir. Canlılık ortalaması en düşük 50 µM doz grubunda tespit edilmiştir. Yüksek dozda Zn(II)Pc nin kanser hücrelerini öldürdüğü belirlenmiştir. Süreler açısından karşılaştırıldığında 12. saatte canlılık ortalaması en düşüktür ($1,28 \pm 0,07$).

İnce ve ekibi tarafından sentezlenen iki farklı çinko fitalosiyanınin (Zn(II)Pc1 ve Zn(II)Pc2) fototoksitesinde üç farklı dozu kullanılmış (3.13, 6.25 ve 12.5 µM) ve üç farklı dozda ışıkla (10, 20 ve 30 J/cm²) uyarım yapılmıştır. Bu çalışmada in vitro sitotoksitesiyi tespit etmek için fare meme kanser hücre hattı (EMT6/P) ve HeLa servikal adenokarsinoma hücre hattı kullanılmıştır. Düşük doz Zn(II)Pc1 in HeLa hücrelerde proliferatif etki yaparken yüksek dozun kanser hücrelerinde sitotoksik etki yaptığı belirlenmiştir. Benzer şekilde EMT6/P hücrelerde de 6,25 µM doz toksik değilken, 12.5 µM lık doz toksik bulunmuştur. Çalışmada FDT de Zn(II)Pc1 için etkin ışık şiddeti de 30 J/cm² olarak rapor edilmiştir [58].

Avşar ve ark. tarafından yapılan çalışmada, İnce Ocakoğlu ve ekibi tarafından sentezlenen ZnPc radyoaktif iyot ile işaretlenerek hücre alım düzeyleri ve sitotoksitesiyi belirlenmiştir. Çalışmada insan meme kanser hücre hattı (MCF-7), ovaryum kanser hücre hattı (MDAH) insan epitel serviks karsinoma (HeLa), fare meme kanser hücre hattı (EMT-6) ve insan

akciğer fibroblast (WI-38) hücre hattı kullanılmıştır. ZnPc nin kanser hücrelerine (MCF-7) alınımının normal hücrelere (WI-38) alınımından dört kez daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 10-90 µM'lık doz aralığında uygulanan ZnPc nin sitotoksik etkisine yönelik yapılabilecek MTT testi sonuçlarına göre; MCF-7, MDAH ve WI-38 hücrelerde 90 µM'a kadar toksik etki gözlenmemiştir. EMT6 hücreler için IC50 değeri 50 µM ve HeLa hücreler için 35 µM olarak belirlenmiştir [53].

F. Yurt ve ark. tarafından yapılan çalışmada ZnPc sentezlenmiş. Radyoaktif işaretli fitalosiyanın hem serbest (ZnPc) hem de TiO₂ ile kombinlenmiş (ZnPcTiO₂), toksik etkisi hepatoselüler karsinoma (HepG2), kolorektal karsinoma (HT29) ve sağlıklı akciğer (WI38) hücrelerinde çalışılmıştır. Toksik etki bulgularına göre; IC50 değeri hücre hatlarına göre, HepG2 için 7.30 µM; HT29 için 18.20 µM ve WI38 hücreler için 5.60 µM olarak belirlenmiştir. ZnPcTiO₂ için IC50 değerleri HepG2 hücreler için 16.09 µM, HT29 için 35.68 µM ve WI38 20.19 µM olarak bulunmuştur. Hücre hatları aynı moleküle farklı düzeylerde tepki vermiştir. HepG2 hücrelerde ZnPc'nin ZnPc-TiO₂ den daha toksik olduğu bulunmuştur. Çalışmada ZnPc toksisitesini TiO₂ in azalttığı rapor edilmiştir. Diğer yandan HT29 hücreleri için TiO₂-ZnPc, ZnPc den daha toksik bulunmuştur [59].

Çinko fitalosiyanın etkilerine yönelik yapılan in vitro çalışmalar incelendiğinde çalışmada kullanılan hücre hatlarının türüne göre toksisitenin de değiştiği belirlenmiştir. Bu çalışmada dozlar belirlenirken İnce ve ekibi tarafından sentezlenmiş Zn(II)Pc ve etkileri çalışılmış kaynaklar referans olarak alınmıştır. İnce ve ekibi tarafından yapılan çalışmada 3,13; 6,25 ve 12,5 µM dozlardan 12,5 µM dozun toksik olduğu belirlendiği [58] için, 12,5 µM ve üzerindeki dozlar (12,5 µM, 25 µM, 50 µM) kullanılmıştır. Çalışma sonucu ışık uygulaması sonrası 12. ve 24. saatte 50 µM dozda sitotoksikite oluştuğu belirlenmiştir.

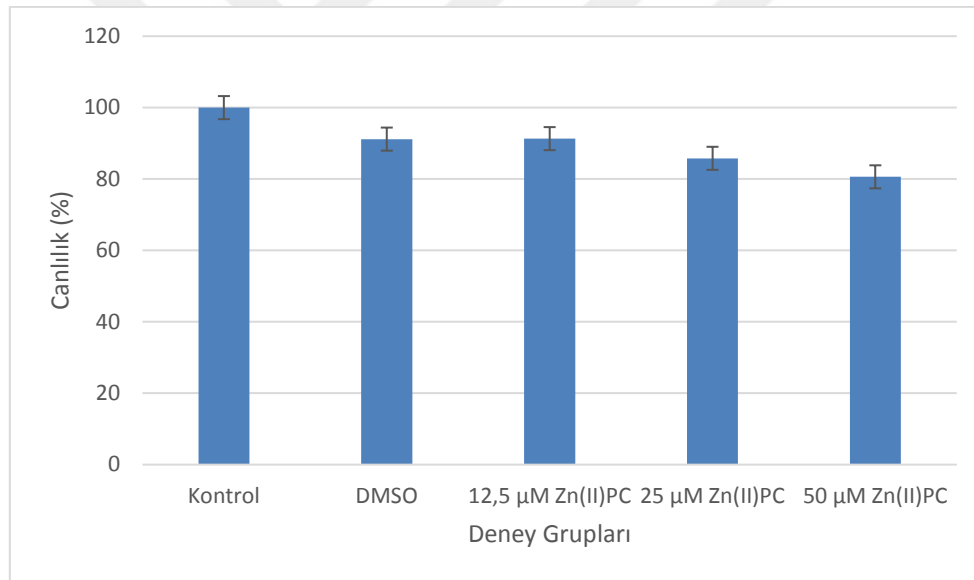
Yapılan bu çalışmada K562 hücreler için toksik dozun 50 µM olduğu belirlenmiştir. Çalışmalar göz önüne alındığında etkin bir fotodinamik terapi için yüksek doz uygulamak gerekmektedir. K562 hücreler süspanse hücrelerdir ve yapılan literatür çalışmalarında fotodinamik terapi çalışmaları için çok fazla tercih edilmediği gözlenmiştir. Moosavi ve ark. bizim çalışmada kullandığımız K562 hücrelerle çalışmışlar, K562 hücrelerin kronik miyeloid lösemisinin fotodinamik tedavinin çoklu hücresel yanıtlarının değerlendirilmesi için uygun hücreler olduğu ifade edilmiştir. Moosavi ve ark. çalışmada fitalosiyanın TiO₂ nanopartikülü ile kombinleyerek uygulamışlar ve düşük doz ve düşük ışık şiddetinde herhangi bir hücresel yanıt oluşmadığını rapor etmişlerdir. Yine bu çalışmada yüksek dozda ve ışıkla uyarılarak aktifleştirilen nanopartikül fitalosiyanın kompleksinin K562 hücrelerde megakaryosit farklılaşmasını veya hücre ölümünü indükledikleri belirlenmiştir. Hücre ölümünün, hücre içi ROS seviyelerinde artışa bağlı olduğu ve otofajiye aracılık ettiği bildirilmiştir [60].

Bizim çalışmamızda da yüksek doz grubunda ışık uyarımına bağlı ROS oluşumu ve buna bağlı olarak K562 hücrelerde sitotoksik etkinin oluştuğunu söyleyebiliriz. Bulgular

değerlendirildiğinde hücrelere Zn(II)Pc verilir ışıkla uyarıldıktan sonra oluşan singlet oksijen türevlerinin ilk 12. ve 24. saatlerde etkili olduğu 48. saatte etkinin ortadan kalktığı düşünülmektedir. Fotodinamik aktivitenin süresi ile ilgili pek fazla çalışma bulunmamakla birlikte Avşar ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada kullanılan iyot işaretli Zn(II)Pc' nin fotoaktivasyonu sonrası kuantum veriminin yüksek olduğu ve in vitro da verimin yaklaşık 24 saate kadar yüksek olduğu rapor edilmiştir. İlk fotoaktivasyonda 100 olan verim 24. saate 81 e kadar azalmıştır [53]. Bu çalışmada etkinin ilk 12. ve 24 saatlerde daha yüksek olması 48. saatte etkinin ortadan kalkması kuantum verimin azalması ile ilgili olabilir.

4.1.2. Işıksız Ortamdaki Canlılık Değerleri

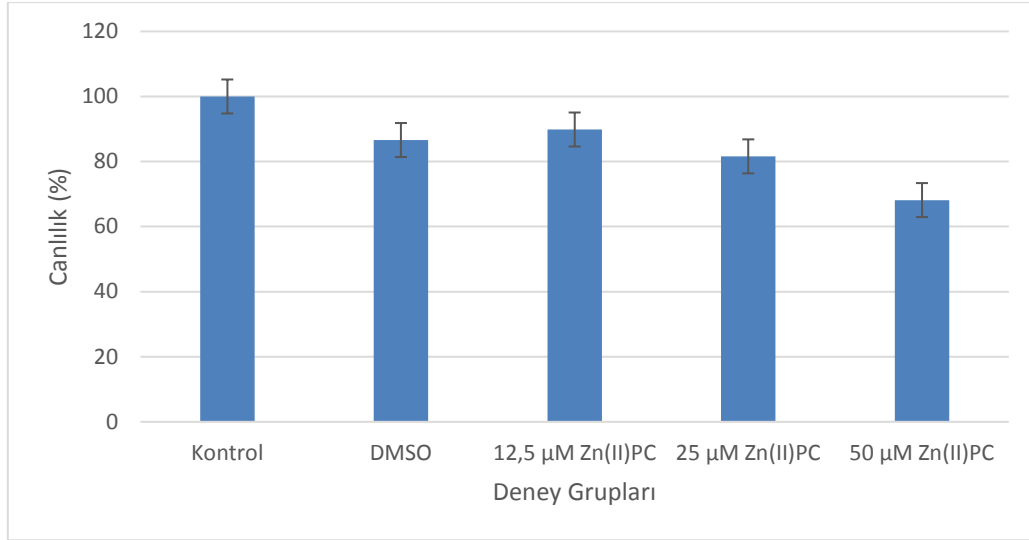
12,5 µM; 25 µM; 50 µM dozlarda Zn(II) Pc uygulama sonrası ışıksız ortamda 12. Saatte elde edilen canlılık yüzdeleri Şekil 4.4 de verilmiştir.



Şekil 4.4. Işıksız ortamda 12. Saatteki canlılık yüzdesi.

Işık uygulaması olmadan 12. saatte doza bağlı canlılık oranları arası farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($p \geq 0,05$). Kontrolle karşılaştırıldığında canlılık yüzdesi 12,5 µM dozda %8,69, 25 µM dozda %14,20 ve 50 µM dozda %19,39 azalmıştır.

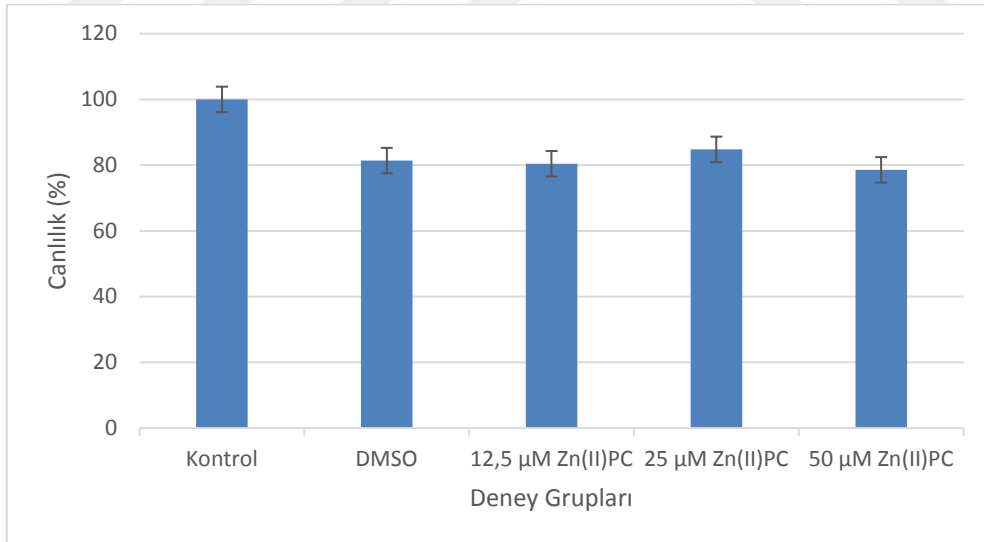
12,5 µM; 25 µM; 50 µM dozlarda Zn(II) Pc uygulama sonrası ışıksız ortamda 24. Saatte elde edilen canlılık yüzdeleri Şekil 4.5. de verilmiştir.



Şekil 4.5. Işıksız ortamda 24. Saatteki canlılık yüzdesi.

Işık uygulaması olmadan 24. saatte doza bağlı canlılık oranları arası farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($p \geq 0,05$). Kontrolle karşılaştırıldığında canlılık yüzdesi 12,5 µM dozda %10,15, 25 µM dozda %18,40 ve 50 µM dozda %31,84 azalmıştır.

12,5 µM; 25 µM; 50 µM dozlarda Zn(II) Pc uygulama sonrası ışısız ortamda 48. Saatte elde edilen canlılık yüzdeleri Şekil 4.6de verilmiştir.



Şekil 4.6. Işıksız ortamda 48. Saatteki canlılık yüzdesi.

Işık uygulaması olmadan 48. saatte doza bağlı canlılık oranları arası farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($p \geq 0,05$). Kontrolle karşılaştırıldığında canlılık yüzdesi 12,5 µM dozda %19,58, 25 µM dozda %15,20 ve 50 µM dozda %21,43 azalmıştır.

Işıklı uyarılmaksızın 12,5 µM; 25 µM; 50 µM dozlarda uygulanan Zn(II)Pc nin de toksik etkili olduğu bu deney sonucu tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre tüm doz gruplarında canlılık ortalaması azalmıştır. En fazla azalma 50 µM doz grubunda meydana gelmiştir. Oluwole ve ark. (2018) farklı kimyasal gruplar eklenerek suda çözünürlük özelliği kazanan iki farklı ZnPc (I,II) ile yaptıkları çalışmada hem karanlık hem de aydınlık toksisitesini MCF-7 hücrelerde araştırmışlardır. Çalışma sonucu ZnPcI ve ZnPcII nin karanlıkta toksik olmadığı yüksek doz 80 µM dozda canlılık % 85 olduğu bildirilmiştir. Işıklı uygulamada ise canlılık %40-55 aralığında belirlenmiştir [61].

Elde ettiğimiz sonuçlara göre bu çalışmada kullanılan Zn(II)Pc, K562 hücrelerinde ışığa bağlı olmaksızın da sitotoksik etki oluşturmuştur. Bu sonuçlara göre Zn(II)Pc k562 hücreler için kemoterapik ajan olarak da kullanılabilir olduğu ortaya konmuştur.

Daha önce yapılan çalışmalarda fitalosiyanınların farklı ışık kaynağı ve şiddetine bağlı olarak göstermiş oldukları etkilerin değiştiği rapor edilmiştir. Ince ve arkadaşları (2016) tarafından çinko fitalosiyanınların kullanılarak in vitro PDT aktivitelerinin ve in vivo biyo potansiyelinin meme kanseri, HeLa servikal kanser hücre hatlarında araştırıldığı çalışmada; karanlıkta bileşik ile 3 saat inkubasyon sonrası, hücreler 10-30 J / cm² dozlar vermek için kırmızı ışığa (660 nm) maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucu elde edilen deneysel bulgularda her bir hücre hattı için fitalosiyanınların PDT aktiviteleri farklı dozlarda etki göstermesine rağmen; en uygun ışık şiddetleri 20 J/cm² ile 30 J/cm² olarak tespit edilmiştir [58].

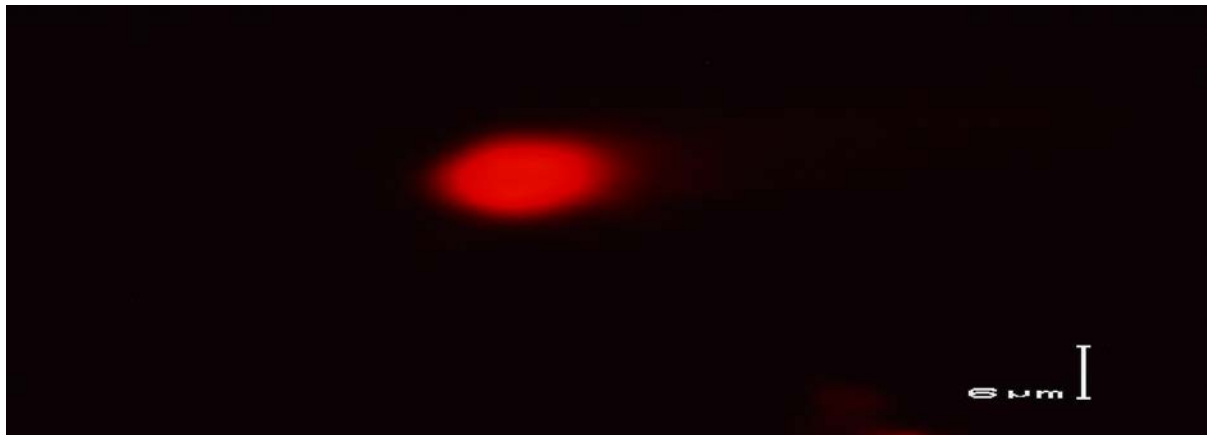
Bir diğer çalışmada Yurt ve arkadaşları (2017) TiO₂ immobilize edilmiş çinko fitalosiyanınin PDT aktivitelerini hepatoselüler karsinoma (HepG2), kolorektal adenokarsinoma (HT29) tümörü ve insan sağlıklı akciğer (WI38) hücre hatları üzerinde test etmiştir. Hücreler karanlıkta PS ile 3 saat inkubasyon sonrası 30-60-90 J / cm² lik dozlar vermek için kırmızı ışığa (660 nm) maruz bırakılmıştır. Elde edilen deneysel sonuçlara göre; HepG2 hücreleri için en uygun fitalosiyanın dozu 6.25 µM olarak belirlenirken, en uygun ışık şiddeti 90 J/cm² olarak belirlenmiştir. Bu dozlarda kaydedilen en yüksek fototoksikite oranı ise %69,7 olarak rapor edilmiştir. HT29 hücrelerinde ise fototoksik etkinin yüksek olduğu iki farklı fitalosiyanın dozu tespit edilirken (3.13 mM (57.32%) ve 6.25 mM (59.67%)), en uygun ışık şiddeti 90 J/cm² olarak belirlenmiştir. WI38 hücre hattı üzerinde ise ZnPc' nin düşük afinitesi sayesinde ışıksız ortamda uygulanan PDT ile sağlıklı hücrelerin korunduğu rapor edilmiştir. [59].

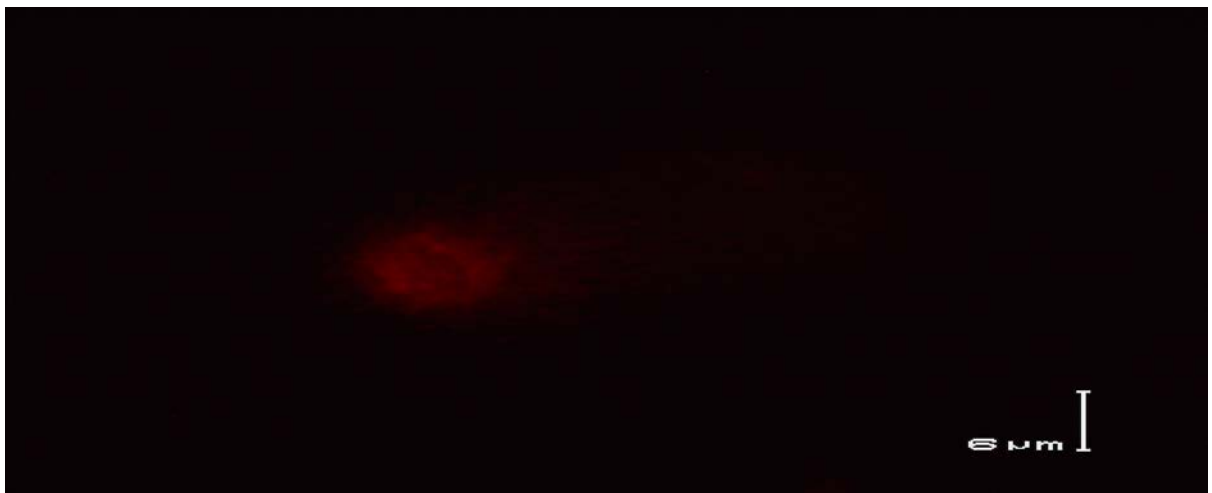
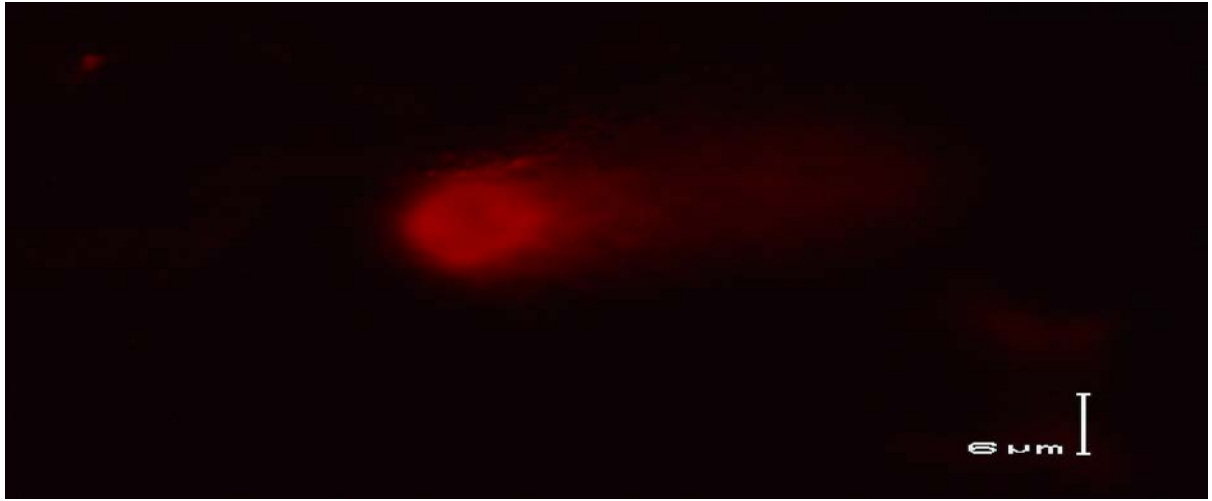
Oluwole ve arkadaşları (2018) ise yapmış oldukları suda çözünebilen, makrosaykl sübstitüentleri olarak imidazol (ZnPc 1) veya piridiloksi (ZnPc2) kısımlarına sahip çinko fitalosiyanınin fotofizikokimyasal ve PDT aktivitelerini tespit etmek için insan meme adenokarsinom hücre hattı üzerinde test etmişlerdir. Sabit lazer ışık kaynağını 170 J / cm² şiddet ile kullanarak; belirli dozlarda FS'nin hücreler üzerinde etkinliği incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucu elde edilen deneysel bulgulara göre; ≤80 µM konsantrasyonda ışıksız ortamda

uygulanan her iki ZnPc çeşidinde % 85 canlı hücre ile çok az bir in vitro sitotoksosite değerine ulaşılırken, ışık uygulaması sonrası ZnPc 1 aktivitesi sayesinde \geq % 50 hücre ölümü değeri kaydedilmiştir [61].

4.2. Genotoksik Etki

Biyolojik etkinliği incelenmek istenen malzeme çalışmalarında genotoksosite yöntemi olarak öne çıkan Komet testi; kolay, hızlı, oldukça hassas bir test olmasının yanı sıra, farklı hücre tipleri ve DNA hasar çeşitlerini tespit için uygulanabilirliği, en önemli özelliği olarak radyoaktif işaretleme ihtiyacının olmaması sebebiyle DNA hasar ölçümünde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Çalışmada Zn(II)Pc' nin genetik materyale etkisi için ışısız ortamdaki 12. saatteki etkisi değerlendirilmiştir. K562 hücreler 12,5, 25 ve 50 μ M Zn(II)Pc içeren solüsyon ile 12 saat' lık inkübe edilmiş ve 12. Saat sonrası test komet test protokolü uygulanmıştır. Komet değerlendirmesinde hücrede meydana gelen hasar, hücreden göç eden DNA' nın oluşturduğu kuyruk uzunluğuna göre değerlendirilmektedir. Kuyruk uzunluğuna göre hücreler 5 tipte sınıflandırılır; Tip 0: Kuyruk içermeyen dairesel DNA' ya sahip hücre, Tip I: Küçük kuyruk içeren düşük DNA hasarlı hücre, Tip II: Biraz daha uzun kuyruk içeren orta seviyede DNA hasarlı hücre, Tip III: Daha uzun kuyruğa sahip, yüksek seviyede DNA hasarlı hücre, Tip IV: Küçük bir baş içeren uzun kuyruklu çok yüksek hasarlı DNA' ya sahip hücreyi ifade etmektedir. Çalışmada MTT testinden elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak KOMET testinin maruziyet süresi 12 saat olarak seçilmiştir. 12 saat' lık maruziyet sonrası Genetik Hücre Hasar indeksi (GHI) ve Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY) hesaplanmıştır. Hasarlı Hücre Yüzdesi Hesaplanması: $HHY = T_2 + T_3 + T_4$ formülüne göre hesaplanmıştır [63]. Genetik Hasar İndeksi Hesaplanması ise $GHI = (T_1 + 2 \times T_2 + 3 \times T_3 + 4 \times T_4) / 100$ formülüne göre hesaplanmıştır [64]. GHI ve HHY' nin 50 μ M konsantrasyonda kontrol grubuna göre önemli oranda arttığı gözlemlenmiştir. GHI kontrol grubunda % 0,46 iken 50 μ M dozda % 1,51' e yükselmiştir. HHY kontrol grubunda %12 iken 50 μ M dozda %40' a yükselmiştir. Komet Görüntüleri şekil 7' de gösterilmektedir.





Şekil 4.7. Komet görüntüleri.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Bu tez çalışmasında kullanımı tercih edilen Zn(II)Pc' ler kırmızı görünür bölgede yoğun emilim kabiliyetine sahiptir, tekli ve üçlü kuantum verimleri yüksek ve üçlü uyarılma durumları uzun ömürlüdür. Bu özellikler ZnPC' leri PDT için değerli kılmaktadır.
- Yapılan bu çalışmada K562 hücreler için toksik dozun 50 μ M olduğu belirlenmiştir. Çalışmalar göz önüne alındığında etkin bir fotodinamik terapi için yüksek doz uygulaması gerekmektedir.
- Çalışma sonucu ışıkla aktivasyon sonrası sitotoksik etkinin 12. saate % 73,62 olduğu tespit edilmiştir.
- Işıksız ortamda en düşük canlılık ortalaması 24. saate % 68,16 olarak bulunmuştur.
- Bundan sonraki Zn (II) Pc nin hücreler için hasar mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik yapılacak çalışmalarda ilk 6. ve 12. saatlerdeki etkilerin çalışılması uygun olacaktır.
- Çalışma sonucu K562 hücrelerde Zn(II) Pc nin karanlıkta toksisitesinin yüksek olması molekülün FDT dışında da kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir.
- Sitotoksik etki mekanizmasının aydınlatılması için oksidatif stres ve apoptotik mekanizmalarla ilgili çalışmaların yapılması Zn(II)Pc nin miyeloid lösemi tedavisinde kullanılabilirliği ile ilgili önemli katkılar sağlayacaktır.
- Elde edilen verilere göre burada kullanılan Zn (II)Pc nin, FDT için süspanse hücreler çok uygun olmayıp, solid tümörler üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L. (2016). *Cell Viability Assays*.
- [2] Vural, N. (2005). Toksikoloji. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*.
- [3] Mortelmans, K., Rupa, S. D. (2004). Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists. *Adv Appl Microbiology*.
- [4] Bonnett, R. (2000). Chemical Aspects of Photodynamic Therapy, *Gordon and Breach Science Publishing*.
- [5] Marino, M., García, V., Furmento V.A. (2013). Lysosomal and mitochondrial permeabilization mediates zinc(II) cationic phthalocyanine phototoxicity, *Int.J. Biochem Cell Biol.* 45. 2553–2562.
- [6] Van Straten, D., Mashayekhi, V., Bruijn, H., Oliveira, S., Robinson, D. (2017). Oncologic photodynamic therapy: Basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers (Basel)* 9: 19. PMID: 28218708. DOI: 10.3390/cancers9020019
- [7] Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J Clin* 61: 250-281. PMID: 21617154. DOI: 10.3322/caac.20114
- [8] Rak, J., Pouckova, P., Benes, J., Vetvicka, D. (2019). Drug Delivery Systems For Phthalocyanines For Photodynamic Therapy *Anticancer Research* 39: 3323-3339 doi:10.21873/anticancer.13475
- [9] Atila, D., Saydan, N., Durmus, M. (2007). Synthesis and photodynamic potential of tetra- and octatriethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanines. *Photobiol. A Chem.* 186 298–307
- [10] Straten, V., Mashayekhi, V., Bruijn, H., Oliveira, S., Robinson, D. (2017). Review Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions *Demian Cancers*, 9, 19; doi:10.3390/cancers9020019
- [11] Henderson, B. W., Dougherty, T. J. (1992). How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 55, 145–157.
- [12] Wagnieres, G. A., Star, W. M., Wilson, B. C. (1998). In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem. Photobiol.* 68, 603–632.
- [13] Foote, C. S. (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* 54, 659.

- [14] Ochsner, M. (1997). Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B Biol* 39: 1-18,. PMID: 9210318. DOI: 10.1016/S1011-1344(96) 07428-3
- [15] Kalka, K., Merk, H., Mukhtar, H. (2000). Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol*: 42: 389-416. PMID: 10688709. DOI: 10.1016/S0190-9622(00)90209-3
- [16] MacDonald, I. J., Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy. *J Porphyrins Phthalocyanines* 05: 105- 129. DOI: 10.1002/jpp.328
- [17] Calixto, G., Bernegossi, J., De Freitas, L. M., Fontana, C. R., Chorilli, M., Grumezescu, A. M. (2016). Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. *Molecules* 21: 1-18. PMID: 26978341. DOI: 10.3390/molecules21030342
- [18] De Rosa, F. S., Bentley, M. V. (2000). Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. *Pharm Res*: 17: 1447-1455. PMID: 11303952. DOI: 10.1023/A:1007612905378
- [19] Konan, Y. N., Gurny, R., Allémann, E. (2002). State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B Biol* : 66: 89-106. PMID: 11897509. DOI: 10.1016/S1011-1344(01)00267-6
- [20] Kharkwal, G. B., Sharma, S. K., Huang, Y. Y., Dai, T., Hamblin, M. R. (2011) Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med*: 43: 755-767. PMID: 22057503. DOI: 10.1002 /lsm.21080
- [21] Gannon, M. J., Brown, S. B. (1999). Photodynamic therapy and its applications ingynaecology. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* : 106: 1246-1254. PMID: 10609717. DOI: 10.1111/j.1471- 0528.1999.tb08177.x
- [22] Moan, J., Streckyte, G., Bagdonas, S., Bech, Q., Berg, K. (1997). Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5- aminolevulinic acid. *Int J Cancer* : 70: 90-97. PMID: 8985096. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970106)70:13.0.CO;2-H
- [23] Leznoff, C. C., Lever, P. (1989). Phthalocyanines: Properties and applications. Wiley.
- [24] Ahmad, N., Mukhtar, H. (2000). Mechanism of photodynamic therapy-induced cell death. In: Singlet Oxygen, UV-A, and Ozone. *Academic Press*, pp. 342-358.
- [25] Bacellar, I. O., Tsubone, T. M, Pavani, C., Baptista, M. S. (2015). Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 20523–20559.
- [26] Sharman, W. M., Allen, C. M., van Lier, J. E. (2000). Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* 319, 376–400.
- [27] Moan, J., Berg, K. (1991). The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 53, 549–553.

- [28] Dysart, J.S., Patterson, M.S. (2005). Characterization of photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of mll cells in vitro. *Phys. Med. Biol.* 50, 2597–2616.
- [29] Moreira, L. M., Dos Santos, F. V., Lyon, J. P., Maftoum-Costa, M., Pacheco-Soares, C., Soares Da Silva, N. (2008). Photodynamic therapy: Porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers. *Aust J Chem* . 61: 741-754. DOI: 10.1071/CH08145
- [30] Nyokong, T., Gledhill, I. (2013). The use of phthalocyanines in cancer therapy. *AIP Conf Proc* : 1517: 49-52. DOI: 10.1063/ 1.4794220
- [31] Banfi, S., Caruso, E., Buccafurni, L., Ravizza, R., Gariboldi, M., Monti, E. (2007). Zinc phthalocyanines-mediated photodynamic therapy induces cell death in adenocarcinoma cells. *J Organomet Chem.* 692: 1269-1276. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2006.11.028
- [32] Zaidi, S. I., Agarwal, R., Eichler, G., Rihter, B. D., Kenney, M. E., Mukhtar, H. (1993). Photodynamic effects of new silicon phthalocyanines: in vitro studies utilizing rat hepatic microsomes and human erythrocyte ghosts as model membrane sources. *Photochem Photobiol* . 58: 204-210. PMID: 8415911. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1993.tb09550.x
- [33] Agarwal, R., Athar, M., Elmet, C. A., Bickers, D. R., Mukhtar, H. (1992). Photodynamic therapy of chemically- and ultraviolet B radiation-induced murine skin papillomas by chloroaluminum phthalocyanine tetrasulfonate. *Photochem Photobiol* . 56: 43-50. PMID: 1508981. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb09600.x
- [34] Brasseur, N., Autenrieth, D., Langlois, R., Liert, J.E. (1985). Biological activities of phthalocyanines-III. Photoinactivation of V-79 chinese hamster cells by tetrasulfophthalocyanines. *Photochem Photobiol* . 42: 515-521. PMID: 4089034. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1985.tb01603.x
- [35] Gregory, P. (2000) Industrial applications of phthalocyanines. *J Porphyr Phthalocyanines* 4: 432-43. PMID: 19404370. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1409(200006/07)4:43.3.CO;2-E.
- [36] Enokida, T., Hirohashi, R., Nakamura, T. (1990). Polymorphism of oxotitanium phthalocyanines and applications for electrophotographic receptors. *Denshi Shashin Gakkaishi (Electrophotography)* 29: 373-383. DOI: 10.11370/isjepj.29.373
- [37] Cook, M. J., Chambrier, I., Cracknell, S. J., Mayes, D. A., Russell, D. A. (1995). Octa-alkyl zinc phthalocyanines: Potential photosensitizers for use in the photodynamic therapy of cancer. *Photochem Photobiol* : 62: 542-545. PMID: 8570709. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1995.tb02381.x

- [38] Bung, N., Pradhan, M., Srinivasan, H., Bulusu, G. (2014). Structural Insights into E. coli Porphobilinogen Deaminase during Synthesis and Exit of 1-Hydroxymethylbilane. *PLoS Comput Biol*: 10: e1003484. PMID: 24603363. DOI: 10.1371/journal.Pcbi.1003484
- [39] Allison, R. R., Mota, H. C., Sibata, C. H. (2004). Clinical PD/PDT in North America: An historical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 1: 263-277. PMID: 25048431. DOI: 10.1016/S1572-1000(04)00084-5
- [40] Ball, D. J., Wood, S. R., Vernon, D. I., Griffiths, J., Dubbelman, T. M., Brown, S. B. (1998). The characterisation of three substituted zinc phthalocyanines of differing charge for use in photodynamic therapy. A comparative study of their aggregation and photosensitising ability in relation to mTHPC and polyhaemato porphyrin. *J Photochem Photobiol*: B 45: 28-35. PMID: 9819897. DOI: 10.1016/S1011-1344(98)00156-0
- [41] Christensen, E., Mork, C., Skogvoll, E. (2012). High and sustained efficacy after two sessions of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for basal cell carcinoma: a prospective, clinical and histological 10-year follow-up study. *Br J Dermatol*: 166: 1342-1348. PMID: 22309486. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2012.10878.x
- [42] Ali, H., van Lier, J. E. (1999). Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chem Rev*: 99:2379-450.
- [43] MacDonald, I. J., Dougherty, T. J. (2001). Basic Principles of photodynamic therapy. *J Porphyr Phthalocyanines* : 5:105-29.
- [44] Detty, M. R., Gibson, S. L., Wagner, S. J. (2004). Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem*: 47:3897-915
- [45] Moeno, S., Krause, M., Ermilov, E. A., Kuzyniak, W., Höpfner, M. (2014). Synthesis and characterization of novel zinc phthalocyanines as potential photosensitizers for photodynamic therapy of cancers. *Photochem Photobiol Sci*: 13:963-70.
- [46] Moser, F. H. (1983). The Phthalocyanines, Properties. CRC.
- [47] Linstead, R.P. (1934). Phthalocyanines, *J.Chem.Soc.*, pp. 1016-1031.
- [48] Sergio, D., Riega, E., Chiarante, N., Valli, F., Marino, J., Roguin Leonor, P., Awruch, J., García Vior, M. C. (2018). Novel hydro- and lipo-philic selenium zinc(II) phthalocyanines: Synthesis, photophysical properties and photodynamic effects on CT26 colon carcinoma cells., *Dyes and Pigments* : 156 133-139.
- [49] Jori, G. J. (1996). Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. B: Biol*;36:87-93.
- [50] Kuzyniak, W., Ermilov, E. A., Atilla, D., Gürek, A. G., Nitzsche, B., Derkow, K., ... Höpfner, M. (2016). Tetra-triethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanine for photodynamic cancer therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 13, 148-157. doi:10.1016/j.pdpdt.2015.07.001

- [51] Tedesco, A., Rotta, J., & Lunardi, C. (2003). Synthesis, Photophysical and Photochemical Aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. *Current Organic Chemistry*, 7(2), 187–196. doi:10.2174/1385272033373076
- [52] Erdem S. S., Parlar R. E., Obeidin V. P., Şahin U. (2017). Skov-3 Over Kanseri Hücre Hattında Fotodinamik Terapi Uygulaması. *Haydarpasa Numune Med J.* 57(3):119–124. DOI: 10.14744/hnhj.2017.25238
- [53] Avşar, G., Sari, F. A., Yuzer, A. C., Soylu, H. M., Er, O., Ince, M., & Lambrecht, F. Y. (2016). Intracellular uptake and fluorescence imaging potential in tumor cell of zinc phthalocyanine. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1-2), 369–375. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.04.023
- [54] Yurt, F., Ince, M., Colak, S. G., Ocakoglu, K., Er, O., Soylu, H. M., ... Kurt, C. C. (2017). Investigation of in vitro PDT activities of zinc phthalocyanine immobilised TiO₂ nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 524(1-2), 467–474. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.03.050
- [55] Mehraban, N., Musich, P., & Freeman, H. (2019). Synthesis and Encapsulation of a New Zinc Phthalocyanine Photosensitizer into Polymeric Nanoparticles to Enhance Cell Uptake and Phototoxicity. *Applied Sciences*, 9(3), 401. doi:10.3390/app9030401
- [56] Mayahi, S., Neshasteh-Riz, A., Pornour, M., Eynali, S., & Montazerabadi, A. (2019). Investigation of combined photodynamic and radiotherapy effects of gallium phthalocyanine chloride on MCF-7 breast cancer cells. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. doi:10.1007/s00775-019-01730-w
- [57] Genç, H., Barutca, B., Koparal, A. T., Özöğüt, U., Şahin, Y., & Suvacı, E. (2017). Biocompatibility of designed MicNo-ZnO particles: Cytotoxicity, genotoxicity and phototoxicity in human skin keratinocyte cells. *Toxicology in Vitro*.
- [58] Ince, M., Er, O., Ocakoglu, K., Lambrecht, F. Y., Colak, S. G., Soylu, H. M., ... Gunduz, C. (2016). Investigation of In vitro PDT Activities and In vivo Biopotential of Zinc Phthalocyanines Using ¹³¹I Radioisotope. *Chemical Biology & Drug Design*, 87(2), 224–232. doi:10.1111/cbdd.12659
- [59] Yurt, F., Ince, M., Colak, S. G., Ocakoglu, K., Er, O., Soylu, H. M., ... Kurt, C. C. (2017). Investigation of in vitro PDT activities of zinc phthalocyanine immobilised TiO₂ nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 524(1-2), 467–474. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.03.050
- [60] Moosavi, M. A., Sharifi, M., Ghafary, S. M., Mohammadalipour, Z., Khataee, A., Rahmati, M., ... Ghavami, S. (2016). Photodynamic N-TiO₂ Nanoparticle Treatment Induces Controlled ROS-mediated Autophagy and Terminal Differentiation of Leukemia Cells. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep34413

- [61] Oluwole, D. O., Sarı, F. A., Prinsloo, E., Dube, E., Yuzer, A., Nyokong, T., & Ince, M. (2018). Photophysicochemical properties and photodynamic therapy activity of highly water-soluble Zn(II) phthalocyanines. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 203, 236–243. doi:10.1016/j.saa.2018.05.090
- [62] De Moraes Vaz Batista Filgueira, D., Paula Salomão de Freitas, D., Paula de Souza Votto, A., Fillmann, G., Maria Monserrat, J., Alicia Geracitano, L., & Santos Trindade, G. (2007). Photodynamic Action of Benzo[a]pyrene in K562 Cells. *Photochemistry and Photobiology*, 83(6), 1358–1363. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00169.x
- [63] Palus, J., Dziubaltowska, E., Rydzynski, K. (1999). DNA damage detected by the komet assay in the White blood cells of workers in a wooden furniture plant. *Mutat. Res.* 444, 61-74
- [64] Pitarque, M., Creus, A., Marcos, R., Hughes, J.A., Anderson, D. (1999). Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutat. Res.* 440195-204



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Nijat NOVRUZLU

Doğum Tarihi : 31/ 03/ 1991

E-mail : nicatnovruzlu314@gmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2009-2015
Yüksek Lisans	Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler	Mersin Üniversitesi	2015-2019
Doktora			

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1.