

**4-NİTRO (Zn) FİTALOSİYANİNİN MCF-7 HÜCRELERDE
OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali UĞUR

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BIYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
AĞUSTOS- 2021**

**4-NİTRO (Zn) FİTALOSİYANİNİN MCF-7 HÜCRELERDE
OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali UĞUR

ORCID ID: 0000-0002-2158-1815

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

Danışman

Prof. Dr. Birgül MAZMANCI

ORCID ID: 0000-0001-7535-2143

**MERSİN
AĞUSTOS - 2021**

ÖZET

4-NİTRO (Zn) FİTALOSİYANİNİN MCF-7 HÜCRELERDE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kanser tedavisinde uygulanan kemoterapinin yan etkileri nedeniyle alternatif olarak uygulanan fotodinamik tedavi (FDT) 1960'lı yıllardan itibaren araştırma konusu olmuştur. FDT nin ana bileşenleri fotoalgılayıcı (FS), ışık ve oksijen olup, kanser hücrelerinde hedeflenen bir fotoalgılayıcıya ışık verilmesiyle oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROT) hücrede oksidatif stres oluşturularak kanser hücrelerinin yok edilmesi yöntemidir. FDT de FS olarak fitalosiyanimler (Pc) kullanılmaktadır. Metalofitalosiyanimlerin singlet oksijen verimi oldukça yüksek olduğundan FDT kullanımına yönelik çalışmalarda popüler hale gelmiştir.

Oksidatif stres birçok biyolojik ve patolojik süreçte rol oynamaktadır. Hücreler, stres sırasında meydana gelen olumsuz koşullarla baş edebilmek için antioksidan savunma sistemlerini devreye sokarlar. Süperoksitdismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri oksidatif strese karşı hücrelerde birincil yanıt oluşturan antioksidan enzimlerdir. FDT çalışmalarında Pc'lerin uygun fotoalgılayıcılar olup olmadığının araştırılmasında singlet oksijen verimi yanında antioksidan enzim aktiviteleride ölçülmektedir. Bu çalışmada tetranitro çinko fitalosiyaniminin (4-nitro ZnPc), meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerdeki etkisi SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinin yanında lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA) yan ürün ölçülerek incelenmiştir.

4-Nitroftalonitrilin, dimetilamino etanol çözgeninin içinde ve çinko tuzu varlığında 140 °C sıcaklıkta 20 saat boyunca siklotetramerizasyon reaksiyonuyla sentezlenmiştir. Sentezlenen 4-nitro-ZnPc 20, 30 ve 40 µM'lık üç dozu meme kanseri hücre (MCF-7) hattına verilmiştir. Işık uygulamasını takip eden 18, 36 ve 48. saatlerde elde edilen verileri karşılaştırmak için kontrol grubu da oluşturulmuştur. Sonuç olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; SOD enzim % inhibisyonunun 18. saatte 40 µM dozda, CAT enzim aktivitesinin 18. saatte 20 µM dozda, GPx enzim aktivitesinin 36. saatte 40 µM dozda ve MDA'nın 48. saatte 40 µM dozda istatistiksel olarak önemli şekilde arttığı tespit edilmiştir. Sentezlenen 4-nitro ZnPc'nin MCF-7 hücrelerde oksidatif stres oluşturduğu ve meme kanseri hücrelerinde FDT için kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fotodinamik Tedavi, Metalofitalosiyanim, MCF-7, SOD, CAT, GPx, MDA

Danışman: Prof. Dr. Birgül MAZMANCI, Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF 4-NITRO (Zn) PHTHALOCYANINE ON OXIDATIVE STRESS IN MCF-7 CELLS

Photodynamic therapy (PDT), which is applied as an alternative due to the side effects of chemotherapy in cancer treatment, has been the subject of research since the 1960s. The main components of FDT are photosensors (FS), light and oxygen, and it is a method of destroying the cancer cell by creating oxidative stress in the reactive oxygen species (ROT), which is formed by giving light to a targeted photodetector in cancer cells. Phthalocyanines (Pc) are used as FS in FDT. Since the singlet oxygen yield of metalophthalocyanines is quite high, it has become popular in studies for the use of PDT.

Oxidative stress plays a role in many biological and pathological processes. Cells activate their antioxidant defense systems to cope with the adverse conditions that occur during stress. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) enzymes are antioxidant enzymes that create the primary response in cells against oxidative stress. In FDT studies, in investigating whether PCs are suitable photodetectors, antioxidant enzyme activities are measured as well as singlet oxygen yield. In this study, the effect of tetranitro zinc phthalocyanine (4-nitro-ZnPc) on MCF-7 cells, a breast cancer cell line, was investigated by measuring SOD, CAT and GPx enzyme activities, as well as the by-product of Malondialdehyde (MDA) formed as a result of lipid peroxidation.

4-Nitrophthalonitrile was synthesized by cyclotetramerization reaction in dimethylamino ethanol solvent and in the presence of zinc salt at 140 °C for 20 hours. Three doses of synthesized 4-nitro ZnPc 20, 30 and 40 µM were administered to the breast cancer cell line (MCF-7). A control group was also formed to compare the data obtained at the 18th, 36th and 48th hours following the light application. As a result, when compared with the control group; It was determined that SOD enzyme activity increased at a dose of 40 µM at the 18th hour, CAT enzyme activity at a dose of 20 µM at the 18th hour, GPx enzyme activity at a dose of 40 µM at the 36th hour and MDA at a dose of 40 µM at the 48th hour. As a result, 4-nitro ZnPc caused oxidative stress in MCF-7 cells and has the potential to be used for FDT in breast cancer.

Keywords: Photodynamic Therapy, Metalophthalocyanine, MCF-7, SOD, CAT, GPx, MDA

Advisor: Prof. Dr. Birgül MAZMANCI, Faculty of Science and Letters, Mersin University, Mersin.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini sabırla paylaştan değerli hocam, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Birgül MAZMANCI'ya çok teşekkür ederim.

Mersin üniversitesi biyoloji bölümündeki tüm değerli hocalarıma, kimyasal malzemeyi sentezleyen Prof. Dr. Mine İNCE OCAKOĞLU ve ekibine, deneylerimde yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Şeyma Gülnaz YARLILAR ve Mehmet COŞKUN'a, hücre kültürünü ve deneylerimi gerçekleştirdiğim yer olan Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki (MEİTAM) hocalarıma ve personellerine çok teşekkür ederim.

Hiçbir zaman anlayışını ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Selda UĞUR'a, biricik kızlarım Elvin'e, Deniz'e ve tüm aileme çok teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tez çalışması Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi'nce (BAP) 2019-3-TP2-3752 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Kanser	3
2.2. Fotodinamik Tedavi	5
2.2.1. Fotoalgılayıcı	8
2.2.2. Işık	10
2.2.3. Oksijen	10
2.3. Oksidatif Stress	11
2.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	14
2.3.2. Katalaz (CAT)	14
2.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)	15
2.3.4. Malondialdehit (MDA)	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM	18
3.1. Tetranitro Çinko Fitalosiyanın Sentez ve Karakterizasyonu	18
3.2. Işık Kaynağı	18
3.3. Kullanılan Araç-Gereçler, Sarflar ve Kimyasallar	19
3.3.1. Kullanılan Araç-Gereçler	19
3.3.2. Kullanılan Sarflar ve Kimyasallar	20
3.4. Hücre Kültürü Uygulamaları	21
3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması	21
3.6. Oksidatif Stress Parametrelerinin Belirlenmesi	22
3.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) % İnhibisyonunun Ölçülmesi	23
3.6.2. Katalaz (KAT) Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	24
3.6.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	26
3.6.4. Malondialdehit (MDA) Miktarının Ölçülmesi	27
3.7. İstatiksel Analiz	29
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	30
4.1. Bulgular	30
4.1.1. 4-Nitro ZnPc'nin Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi Üzerine Etkisi	30
4.1.2. 4-Nitro ZnPc'nin Katalaz (KAT) Enzimi Üzerine Etkisi	32
4.1.3. 4-Nitro ZnPc'nin Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzimi Üzerine Etkisi	35
4.1.4. 4-Nitro ZnPc'nin Malondialdehit (MDA) Miktarı Üzerine Etkisi	37
4.2. Tartışma	39
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	51

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Bütün yaş gruplarındaki erkeklerde en çok görülen kanserlerin bu grup içindeki yüzdeler dağılımları	4
Tablo 2.2. Bütün yaş gruplarındaki kadınlarda en çok görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları	4
Tablo 3.1. Deney planı	22
Tablo 4.1. Süreye bağlı SOD % inhibisyon değerleri	30
Tablo 4.2. Süreye bağlı KAT enzim miktarı ortalamaları	32
Tablo 4.3. Süreye bağlı GPx enzim miktarı ortalamaları	35
Tablo 4.4. Süreye bağlı MDA miktarı	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Sistemler arası geçiş (ISC)	6
Şekil 2.2. a) Porfirin halkası b) Fitalosiyanın halkası	9
Şekil 2.3. Oksidatif Denge	13
Şekil 3.1. Tetranitro çinko fitalosiyanın sentezi	18
Şekil 3.2. Işık şiddet ölçümü ve ışık kaynağı düzeneği	19
Şekil 3.3. SOD test prensibi	23
Şekil 3.4. CAT standart serisi hazırlanması	25
Şekil 3.5. CAT enzim aktivitesinin renk değişimi	26
Şekil 3.6. GPx standart serisi hazırlanması	27
Şekil 3.7. MDA-TBA oluşumu	28
Şekil 3.8. MDA spektrofotometre ölçümü	29
Şekil 4.1. 18. saatteki SOD enzim % inhibisyon verileri	31
Şekil 4.2. 36. saatteki SOD enzim % inhibisyon verileri	31
Şekil 4.3. 48. saatteki SOD enzim % inhibisyon verileri	32
Şekil 4.4. 18. saatteki KAT enzim miktarları	33
Şekil 4.5. 36. saatteki KAT enzim miktarları	34
Şekil 4.6. 48. saatteki KAT enzim miktarları	34
Şekil 4.7. 18. saatteki GPx enzim miktarları	35
Şekil 4.8. 36. saatteki GPx enzim miktarları	36
Şekil 4.9. 48. saatteki GPx enzim miktarları	36
Şekil 4.10. 18. saatteki MDA miktarları	37
Şekil 4.11. 36. saatteki MDA miktarları	38
Şekil 4.12. 48. saatteki MDA miktarları	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma/Simge	Tanım
FDT	Fotodinamik Tedavi
Pc	Fitalosiyanın
nm	Nano Metre
Zn	Çinko
Mg	Magnezyum
Ga	Galyum
Se	Selenyum
MCF-7	Meme Kanseri Hücre Hattı
SOD	Süperoksit Dismutaz
CAT	Katalaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
MDA	Malondialdehit
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
FS	Fotoalgılayıcı
ROT	Reaktif oksijen türleri
ISC	Sistemler arası geçiş
4-nitro ZnPc	Tetranitro çinko fitalosiyanın
HpD	Hemotoporfirin
1O_2	Singlet oksijen
H_2O_2	Hidrojen peroksit
OH*	Hidroksil radikali
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfit

1. GİRİŞ

Dünya genelinde ölüm oranlarına bakıldığında kanserden kaynaklı ölümler ikinci sırada gelmektedir. Kanser normal sınırlarının dışında büyüyen ve sonrasında organizmanın diğer kısımlarına yayılabilen anormal hücrelerin kontrol edilemeyen çoğalmalarıdır. Kadınlarda en sık rastlanan kanser türü meme kanseridir. Kanser tedavisinde geleneksel olarak üç temel yöntem kullanılmaktadır. Bunlar cerrahi yöntem, kemoterapi ve radyoterapidir. Bu yöntemlerin tedavi etkinliği yanında istenmeyen yan etkileri de mevcuttur. Meydana gelen bu yan etkiler hastanın yaşam kalitesini olumsuz şekilde etkilemektedir.

Kanser hastalığı tedavisinde geleneksel yöntemler harici kullanılan bir diğer yöntem fotodinamik tedavi (FDT) dir. İlk olarak hematoporfirin'den (HpD) türeyen fotofrin isimli fotoalgılayıcının (FS) klinik uygulamalarına onay verilmesiyle deri kanseri tedavisinde kullanılmıştır. Diğer kanser türlerinin tedavi için kullanılabilirliğine yönelik araştırmalar günümüzde de popüler çalışma konuları arasındadır.

FDT, ışığa duyarlı bir fotoalgılayıcının (fotosensör) hastaya damar yolu, topikal vb. verilmesiyle bu ilacın tümörlü dokuda yoğunlaşmasının ardından, belli bir dalga boyunda ışık ile FS'nin uyarılarak singlet oksijen (1O_2) ve diğer reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşması ile ROT'un kanserli hücreleri apoptoz ya da nekroza uğratarak öldürmesi yöntemidir. FDT; fotoalgılayıcı, ışık ve oksijen olmak üzere üç unsurdan meydana gelmektedir. İlk zamanlar FS olarak kullanılan fotofrin kullanılmış ancak fotofrinlerin aktive olduğu dalga boyunda absorpsiyon özelliği düşük olması nedeni ile ikinci nesil FS'ler geliştirilmiştir.

İkinci nesil FS'ler arasında yüksek absorpsiyon özelliğine sahip fitalosiyanimler (Pc) ön plana çıkmıştır. Fitalosiyanimlerin fotofiziksel özellikleri merkezinde bulunan metalin varlığına ve türüne çok bağlıdır. Merkez atomu Zn^{2+} , Al^{3+} ve Ga^{3+} içeren fitalosiyanim komplekslerinin singlet oksijen üretimin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Planlanan bu tez çalışmasında merkezinde çinko bulunan ve hidrofobik yan grup olan nitro grubu ile fonksiyonel hale getirilmiş, tetranitro çinko fitalosiyaniminin (4-nitro ZnPc) FDT de kullanılabilirliği araştırılmıştır. İlaveten FDT'nin meme kanseri tedavisinde etkin bir yöntem olup olmadığını ortaya koymak için çalışmada meme kanseri hücre hattı (MCF-7) kullanılmıştır.

Fotodinamik tedavide amaç fotoalgılayıcının absorbladığı ışık enerjisini oksijene

aktararak kanser hücrelerinde oksidatif stres yaratmak. Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri, savunma sisteminin önemli parçası olan antioksidanlarla ortadan kaldırılırlar. Antioksidan sistemin ortadan kaldırdığı ve daha fazla ROT birikmesiyle hücredeki dengenin bozulması durumu oksidatif stres olarak tanımlanır. Oksidatif stres araştırmalarında ROT artışı veya antioksidan savunma parametreleri çalışılmaktadır. ROT son derece reaktif ve kısa ömürlü olmasından dolayı direkt olarak ölçülmeleri zordur. MCF-7 hücrelerde 4-nitro ZnPC'nin etkisinin belirleneceği bu çalışmada oksidatif stresin belirlenmesinde antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri ve oksidatif hasarın göstergesi lipid peroksidasyonu düzeyi olan malondialdehit (MDA) miktarı ölçülmüştür.

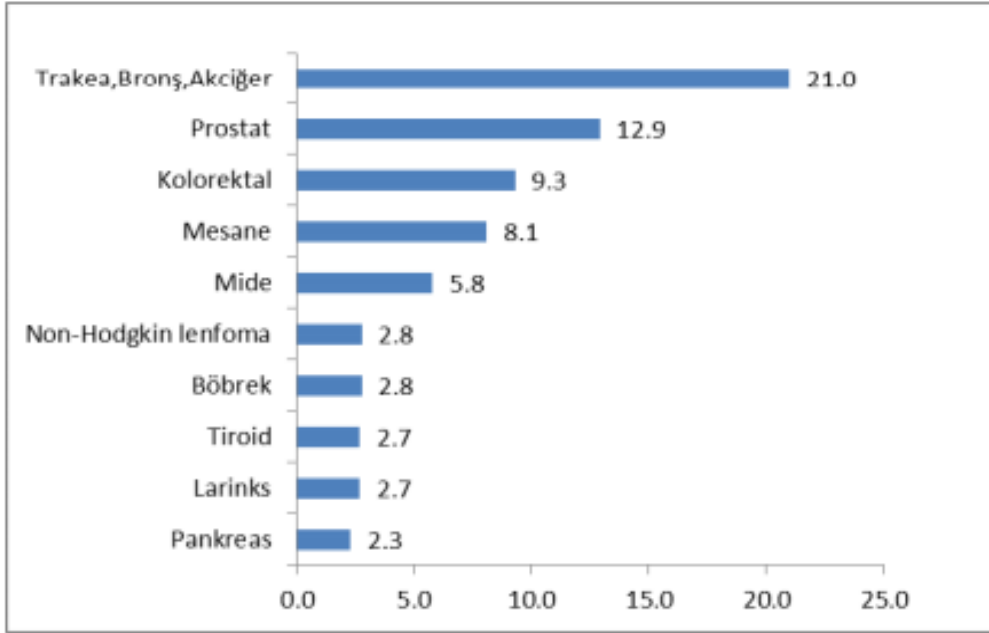


2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

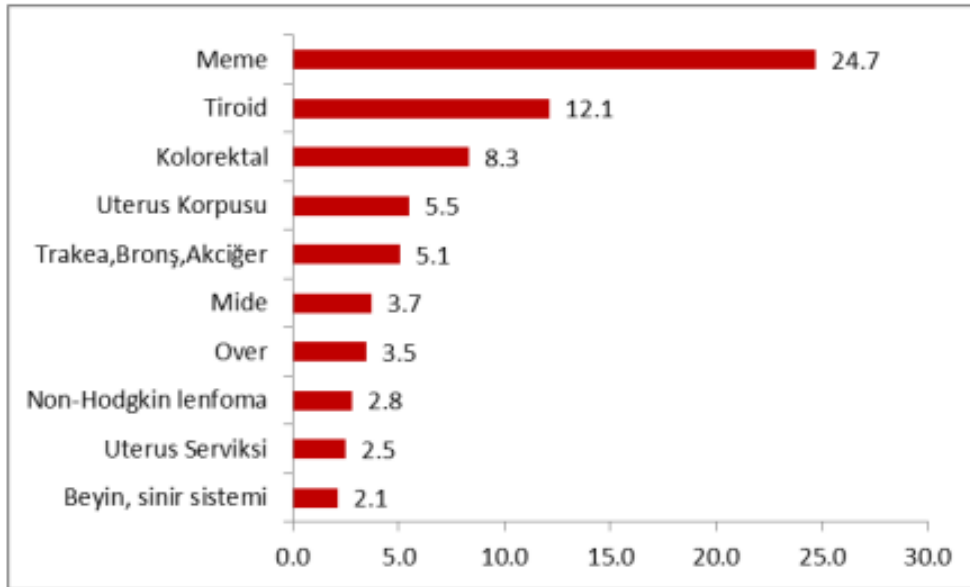
2.1. Kanser

Dünyadaki en sık ölüm sebebi olarak görülen kanser; vücudumuzun bir çok bölgesindeki hücrelerin kontrolü olmadan büyümesiyle oluşan bir durumdur. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2014 yılında yayınladığı raporda, 2012 yılında yaklaşık olarak 14 milyon yeni vaka ve 8 milyon kansere bağlı ölümlerle birlikte tüm ülkelerde ve tüm bölgelerde nüfusu etkileyen önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmuştur. Kanser WHO'ya göre, 2018 yılında yaklaşık olarak 9.6 milyon ölüme ve ölümlerin yaklaşık %17'sine sebep vermesiyle dünyada kalp ve damar hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedenidir. Dünyada erkekler arasında, 2012 yılında en sık teşhis edilen beş kanser tipi akciğer (toplamın % 16.7'si), prostat (% 15.0), kolorektum (% 10.0), mide (% 8.5) ve karaciğerdir (% 7.5). Kadınlar arasında en sık görülen beş kanser türü olarak meme (toplamın% 25.2'si), kolorektum (% 9.2), akciğer (% 8.7), serviks (% 7.9) ve midedir (% 4.8) [1,2]. Ülkemizde de kanser ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Fakat dünyada her altı ölümden birine sebep olan kanser, Türkiye'de beş ölümden birine sebep olmaktadır. Ülkemizde erkekler arasında birinci sırada olan kanser türü akciğer (% 21) iken kadınlarda ise meme kanseri (% 24.7) birinci sırada olup tanısı konulan her dört kadın kanserinden biri meme kanseridir [3].

Tablo 2.1. Bütün yaş gruplarındaki erkeklerde en çok görülen kanserlerin bu grup içindeki yüzdelik dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015)



Tablo 2.2. Bütün yaş gruplarındaki kadınlarda en çok görülen kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015)



Kanserin risk faktörleri arasında en önemli olarak; tütün kullanımı (dünya da kanserle ölenlerin yaklaşık % 22'sinden tütün sorumludur), obezite, yeterli meyve ve sebze alınamamasına bağlı sağlıksız beslenme, az fiziksel aktivite, alkol, cinsel yolla bulaşan human

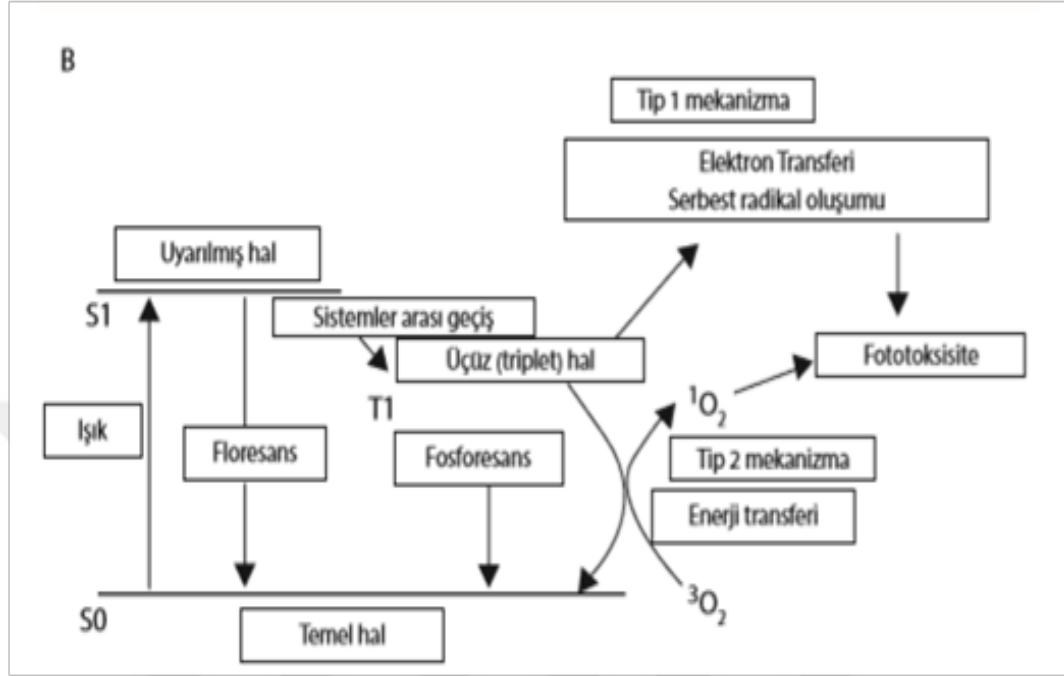
papilloma virus (HPV) enfeksiyonu, hepatit veya diğer kanserojen enfeksiyonlarla oluşan enfeksiyon, radyasyon, hava kirliliği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu risk faktörlerinden kaçınarak kanser yükünü %30-50 oranında azaltabiliriz [4]. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan cerrahi yöntem, kemoterapi ve radyoterapi en sık kullanılan yöntemler olarak bilinmektedir. Bu yöntemlerin bulantı, kusma, saç dökülmesi, kemik iliğinde hasarla oluşan kan hücreleri bozuklukları, şiddetli halsizlik, deri bozuklukları vs. gibi birçok dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajların olmadığı ya da en düşük seviye de olan kanser tedavi yöntemleri araştırılmakta ve geliştirilmeye çalışılmaktadır. Fotodinamik tedavi (FDT) yöntemi, kanser tedavisinde geleneksel yöntem tedavilerindeki dezavantajlarının olmamasından dolayı alternatif bir kanser tedavisi olarak bulunmuştur [5].

2.2. Fotodinamik Tedavi

Fotodinamik tedavi (FDT), oksijenin varlığında belirli bir dalga boyunda görünür ışık tarafından fotoalgılayıcıların (FS) uyarılmasıyla reaktif oksijen türlerinin (ROT), özellikle singlet oksijenin (1O_2) üretilmesine yol açar. Bu ROT, fotoalgılayıcılarının dokulara lokalizasyonuna bağlı olarak hücre ve vasküler etkilere aracılık eder ve hedef hücreler üzerinde doğrudan veya dolaylı sitotoksik etki ile sonuçlanır. FDT sadece istenilen tümöral kitleyi hedef olarak yok etmeyi ve böylece normal dokulara verilen hasarı en aza indirmeyi amaçlamaktadır. FDT'nin bileşenleri olarak oksijen, ışık ve FS kendi başlarına zararsızdır fakat kombinasyon halinde buldukları hücrelere ve dokulara karşı ciddi bir toksisite gösterir [5,6].

Fotokimyasal olarak; fotoalgılayıcısı kırmızı ışık enerjisini absorblayarak uyarılmış singlet hale geçer ve hızla triplet hale dönüşür. Fotoalgılayıcısı triplet durumunda (1 milisaniyeden 1 saniyeye kadar) singlet durumuna (~ 10 nanosaniye) göre daha uzun süre kalır ve singlet oksijenin oluşumuna neden olur. Fotoalgılayıcının singlet halde kalması ile ROT oluşumu sağlanamaz, fotoalgılayıcı bu durumdan floresans yaparak temel durumuna döner, ancak triplet haldeyken enerjisini oksijene vererek singlet oksijen ve ROT oluşumunu sağlar. Daha sonra fosforesans yaparak temel durumuna döner ve başka bir fotonu absorblayarak döngüyü devam ettirir. Fotoalgılayıcısının enerjisini aktarmasıyla oluşan singlet oksijen veya hidroksil radikalleri (OH^*) çok reaktiflerdir ve çok kısa bir ömre (0,04 mikro saniye) sahiptirler. Çok kısa ömürleri olduğundan uzaklara yayılmadan çok küçük bir alanda ($0,02 \mu m$) lokal olarak etki gösterirler. Singlet halden triplet hale dönüşümü sistemler arası geçiş (ISC) olarak bilinir. Fotoalgılayıcısı temel durumuna dönüşünde enerjiyi ya ısı olarak ya da floresans ve fosforesans şeklinde ışık saçarak yapar. Reaktif oksijen türlerini türeten iki tip mekanizma vardır; Tip I ve Tip II. Tip I'de ROT oluşumu sağlanırken, Tip II'de singlet oksijen oluşumu gerçekleşir. Genel olarak hücrede oksidatif hasarın nedeninde singlet oksijenin anahtar rol oynadığı bilinmekte olup FDT

sırasında Tip II mekanizmasının daha baskın bir rolü olduğu bilinmektedir. Reaktif singlet oksijen hedef dokuda vasküler endotele, hücrede ise membranlarına saldırarak oksidatif hasara sebep olur. Singlet halde olan oksijenin ömrü kısa olmasından dolayı hasar çok sınırlandırılmış ve daha uzaktaki sağlıklı doku etkilenmez [7-10].



Şekil 2.1. Sistemler arası geçiş (ISC) [7,8]

Oluşan singlet oksijen ve ROT'un biyolojik etkileri birincil olarak hücresel ikincil olarak vasküler hasara sebep olarak etki gösterirler. Topikal yöntemle uygulanan FDT'de birincil etki olan hücresel zarar fazla iken sistemik yöntemle uygulanan FDT'de ikincil etki olan vasküler sisteme olan hasar daha fazla görülmektedir. Hücresel hasar olarak FS'nin hücre içi lokalizasyonuna bağlı olarak, mitokondri, lizozomlar ve endoplazmik retikulum gibi hücre organellerinde hasar meydana gelirken DNA, tiyol grubu içeren proteinler ve membran lipidleri birincil olarak hedeflidir. Erken gözle görülür öldürücü hasar, lipid peroksidasyonunun bir sonucu olarak hücre zarı hasarlarından oluşur ve bunun sonucunda hücre lizisi oluşur. Vasküler sistem hasarı, vazokonstriksiyon ve kan stazı ile tümör iskemisine neden olarak, dendritik hücreler ve nötrofiller gibi lökositleri çeken akut bir enflamatuvar yanıt üretilir nekroza neden olan bir durumdur [5,11].

Fotodinamik tedavinin diğer kanser tedavilerine göre avantajları arasında yüksek tümör seçiciliği ile tüm organizmayı etkilememesi, bağışıklık sisteminin zayıflatılmasından ziyade daha fazla güçlendirilmesi, ışık olmadığında toksik olmaması, kümülatif toksisite olmaksızın aynı tümöre tekrarlı tedavi yapma olasılığı, non-invaziv bir yöntem olduğundan yara izi bırakmayan

ve kanserojenik olmamasını söylenebilir [12,13].

Tarihsel olarak bakıldığında; FDT Lipson ve Baldes'in hematoporfirin (HpD) türevi olarak adlandırılan porfirinin tümoral dokularına verilmesiyle ultraviyole ışık ışınlaması altında floresan olabileceğini bildirmesinden sonra 1960'larda şekillenmeye başlamıştır. Resmi olarak ilk kez 1970'li yıllarda Schwartz tarafından hazırlanan porfirin kompleksinin tümör dokusu için daha iyi bir afinitesi ve ham HpD'ye göre daha güçlü fototoksisteye sahip olduğu bulunmuş, hem klinik öncesi hem de klinik çalışmalarda porfirin türevlerinin fototerapötik potansiyelini araştırmak için erken çalışmalar hızla genişletilmiştir. Dougherty tarafından sentezlenen ilk fotoalgılayıcı Photofrin, Amerikan Yiyecek ve İlaç Yönetimi Dairesi (FDA) yönetmeliklerine göre üretilmiş klinik kullanım için onaylanmıştır. İlk ticari fotoalgılayıcı olarak 1993 yılında Kanada, mesane kanseri için klinik kullanımını onaylamış ve daha sonra 1995 yılında ABD de porfirin türevi fotoalgılayıcıların bazı kanser türlerinin (özofagus ve akciğer) tedavisinde kullanımını onaylamıştır. Ardından Japonya, Hollanda ve dünyadaki diğer gelişmiş ülkelerin düzenleyici otoriteleri tarafından onaylanarak yaygınlaşmıştır. İlk olarak özafagus, cilt, baş ve boyun ve akciğer kanserlerinin tedavisi için FDT uygulanmıştır [14,15].

Fotodinamik tedavi uygulaması günümüzde malign ve benign tümoral kitlelerin tedavisinde uygulanmakta ve bugüne kadar çok sayıda tedavilerde kullanım alanı bulmuştur. Bir cilt hastalığı olan Bowen hastalığı için Robinson ve arkadaşları iki hasta üzerinde 500'e yakın lezyonu FDT ile tedavi etmiş ve 6 ay takip edilen hastalarda nüks olmadığı tespit edilmiştir. FDT bu lezyonların tedavisinde kullanılan geleneksel yöntem olan sıvı nitrojenle kriyoterapiye göre çok daha iyi sonuç almıştır [16]. Deri kanserinin bir türü olan bazal hücre karsinomu üzerinde FDT uygulaması yapan pennigton ve arkadaşları 21 yüzeysel karsinom da % 100 erken klinik yanıt alındığını, karsinomların histopatolojik değerlendirmesinde % 50 sinde rezidüel tümörün saptandığını ve başka çalışmalarda ikinci bir FDT'nin uygulamalarında daha iyi bir sonuç alacaklarını bildirmişlerdir. Birçok cilt kanseri türleri üzerine yapılan FDT'de olumlu yanıtlar alındığı çalışmalar bulunmaktadır [17]. Pamukkale üniversitesinde ratlarla yapılan FDT çalışmasında walker 256 meme kanseri hücre hattı ile oluşturulan tümöral dokunun boyutunun küçüldüğünün takibinde ise tümörün zamanla kaybolduğu gözlemlenmiştir [18]. Bugüne kadar yapılan FDT çalışmalarına bakıldığında daha çok yüzeysel tümöral kitleler üzerine çalışılmış olduğunu, endoskopik ışıkların kullanımı ile iç organ kanserlerinin tedavisinde de uygulamaların artacağı düşünülmektedir.

FDT, fotoalgılayıcı, ışık ve oksijen gibi üç temel bileşenden oluşan tedavi yöntemidir.

2.2.1 Fotoalgılayıcı

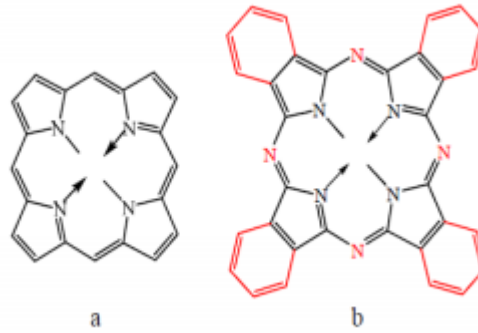
Fotodinamik tedavinin kimyasal ajanı olan fotoalgılayıcılar kritik bir öneme sahiptir. Tedavinin genel etkinliği büyük ölçüde fotoalgılayıcıların davranışına bağlıdır [19].

İdeal bir FDT fotoalgılayıcısının özellikleri şunlardır;

- Tek tip bir tür olmalı izomer karışımı olmamalıdır,
- Hedeflenen doku ve hücrelere karşı seçici özelliği olmalıdır,
- Karanlıkta toksisitesi olmamalı yada çok düşük toksisite göstermeli, ışıkta ise yüksek fototoksisite göstermelidir,
- İyi bir ışık geçirimi için yüksek absorpsiyona sahip olmalıdır,
- Vücuttan hızlı bir şekilde atılması gerekmektedir,
- Yüksek fotokimyasal reaktiviteye ve yüksek kuantum verimine sahip olan uzun ömürlü triplet seviyeye sahip olmalı, yeterli singlet oksijen üretmelidir,
- Saf ve kolay üretilmeli, ayrıca uzun depolama için yeterince kararlı olmalıdır.

Işık enerjisini absorblayarak kimyasal enerjiye dönüştüren fotoalgılayıcılar ilk olarak 1970'lerde İlk jenerasyon FDT ilacı olarak hemaglobinin parçalanmasıyla oluşan hematoporfirin türevi photofrin kullanımıyla başlanmış fakat bu fotoalgılayıcı etkili olmasına rağmen, en aktif olduğu dalga boyunda düşük şiddetli absorpsiyona sahip olmasından dolayı ve ışığa karşı hassasiyeti düşüklüğünden ikinci nesil FDT ilaçlarının araştırılıp gelişmesinin gerektiği görülmüştür. İkinci nesil FDT fotoalgılayıcıları olarak; porfirin türevi olan visudyne, klorofil türevi olan foscan ve en çok yer bulan Pc-4 gibi fitalosiyanın türevleri söylenebilir. İkinci nesil fotoalgılayıcılar, yapılarının belirli ve iyi karakterize edilmiş olması, tedavinin olduğu dalga boyu bölgesinde (650nm - 800nm) yüksek absorpsiyon yapması, daha düşük toksik etkilerinin olması ve kimyasal modifikasyon kolaylığı gibi bir dizi avantajlı özelliğe sahip olması sebebiyle FDT için uygun fotoalgılayıcılar olarak ümit vaat etmektedir [15,19].

Bunların içinden fitalosiyanınlar (Pc), FDT için fototoksik ilaçlar olarak en ideal ikinci nesil fotoalgılayıcılar arasındadır, çünkü yüksek ışık absorpsiyonu, yüksek kimyasal stabilite ve ISC üzerine yüksek ROT üretimi verimliliğine sahiptirler. Fitalosiyanınların porfirinlerden farkı, porfirinde yalnız bulunan herbir pirol halkasına eklenen benzen halkasına sahip olmalarıdır. Bunun için de daha çok kırmızı ışığa doğru kayma eğilimi gösterirler. Porfirinler yaklaşık 400 nm de yoğun absorpsiyon gösterirken Pc'ler 650- 800 nm dalga boylarında yoğun bir absorpsiyon gösterirler. Işığın kırmızı dalga boyuna doğru kaymasının avantajı, doku penetrasyonunu arttırarak derin yerleşmiş tümörlere uygulamada avantaj sağlamaktadır [20].



Şekil 2.2. a) Porphirin halkası b) Fitalosiyenin halkası [20].

Fitalosiyenin molekülünün merkezindeki iki adet hidrojen atomunun hemen hemen metallere tamamına yakını ile yer değiştirmesiyle birçok metali fitalosiyenin (MPc) sentezlenmiştir. Fitalosiyenin fotofiziksel özellikleri merkezde bulunan metalin varlığıyla ve türüyle çok ilişkilidir. Fitalosiyene bağlanan metal ISC'yi artırarak triplet haline dönüşüm olasılığını artırır. Dış kabuklarındaki orbitalleri dolu diyamanyetik metal iyonlar (Zn^{2+} , Al^{3+} ve Ga^{3+}) içeren fitalosiyenin türlerinin singlet oksijen verimleri yüksektir. Özellikle agregasyonu azalttığı ve yüksek uzun ömürlü triplet durum yaratarak singlet oksijen üretimini de arttırdığı için bu diyamanyetik iyonlu fitalosiyenler FDT için daha çok tercih edilmektedirler [6,21,22]. Özellikle merkezinde Zn^{2+} iyonunu içeren Pc'lerin d orbitalinde 10 elektronlu konfigürasyonu nedeniyle daha yoğun bir kırmızı görünür bölge emilimiyle geniş bir şekilde FDT de çalışılmıştır [23].

Son zamanlarda, FDT de fotoalgılayıcı olarak fitalosiyenlerin biyolojik etkinliklerini artırmak, FS'nin hedef kitlesini hedeflemesi ve hedefte birikmenin sağlanması için çeşitli proteinler, peptidler, oligonükleotidler ve monoklonal antikorlar konjuge edilmektedirler. Bundan dolayı, türevlenebilerek sentezlenmiş olan ve fonksiyonel amino grubu içeren asimmetrik çinko fitalosiyenin ($ZnPc$), kanser hücrelerinin ekstrasellüler olarak yüksek derecede salgılandığı matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerinin substratı olacak bir peptid dizisi ile konjuge edilmiştir. Bu nedenle MMP enzim substratı olacak peptid dizileriyle konjuge edilen fitalosiyen türevleri istenen hedefe yönlendirilmiştir [24,25].

Periferik halkalarına süstitüsyon yapılmamış Pc'lerde, makrohalkalar arasındaki yakınlığından dolayı molekül içi etkileşimler fazla olur bu nedenle pek çok organik çözücünde çözünmez ve bu nedenle kullanım alanları kısıtlanır. Periferik pozisyonlarda süstitüsyon yapıldığında, fitalosiyenlerin konjuge 18- π elektron içeren halkalar arasındaki uzaklığını artırarak çözünürlüklerini arttırmış olurlar [26]. Yapılan çalışmalarda lipoproteinlerin hidrofobik grupları hücre içine alımında rol oynadığını göstermiş, bundan dolayı hidrofobik bir

grupla sübstitüe edilen ZnPc'nin hücre içi alımında daha kolaylık sağlandığı bilinmektedir [27,28]. Sübstitüe edilecek grubun aynı zamanda organik bileşiklerle afinitesi de önemlidir. Hidrofobik bir grup olan nitro grubu, tıbbi kimyada çok yönlü ve benzersiz bir fonksiyonel grup olarak kabul edilmekte olup moleküller içinde lokalize elektron eksikliği olan yerler oluşturan ve proteinler, amino asitler, nükleik asitler ve enzimlerle etkileşime giren güçlü bir elektron çekme kabiliyetine sahiptir [29]. Bu nedenle nitro FDT de etkinliği arttırmada Pc'lere sübstitüe edilmek için uygun bir grup olacağı düşünülmektedir.

2.2.2. Işık

Işığın terapötik etkisinin olduğu binlerce yıldır bilinmekte olup tek başına ya da kimyasal bileşiklerle birlikte tedavi edici olarak uzun bir süre kullanıldığı bilinmektedir [30,31, 32]. Işık, FDT'nin üç ana bileşeninden biridir ve optimizasyonu FDT'nin performansı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. FDT'nin kalbi olarak ışık kaynağının seçilmesi, fotoalgılayıcının hangi dalga boyunda yüksek aktivasyon gösterdiği ve absorpsiyon zirvesine, tümörlerin yeri ve tipine ve ışık dozu dağıtımına bağlıdır [33]. FDT de penetrasyonun daha fazla olduğu 650-780 nm olan görünür spektrumun kırmızı bölgesi tercih edilir. Fitalosiyanın, naftalosiyanın, benzoporfirin gibi porfirin türevi yapılar bu dalga boyunda yüksek ışık emme katsayısına sahip olup yüksek oranda ROT oluştururlar [34]. FDT de derin tümörlere erişmek penetrasyonu artırmak için yüksek enerjili ışık kaynağı (Lazer) kullanmak gerekir, fakat hücre kültürü deneylerinde ışık hücreye direkt geleceğinden bu dalga boyundaki led ışık kaynaklarında yeterli ROT oluşturulacağı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda tümoral kitlelere verilen ışığın gücü 50-150 joule/cm², hücre kültüründe kullanılan ışık gücü 2-25 joule/cm² olarak bildirilmiştir [13,34,35].

2.2.3. Oksijen

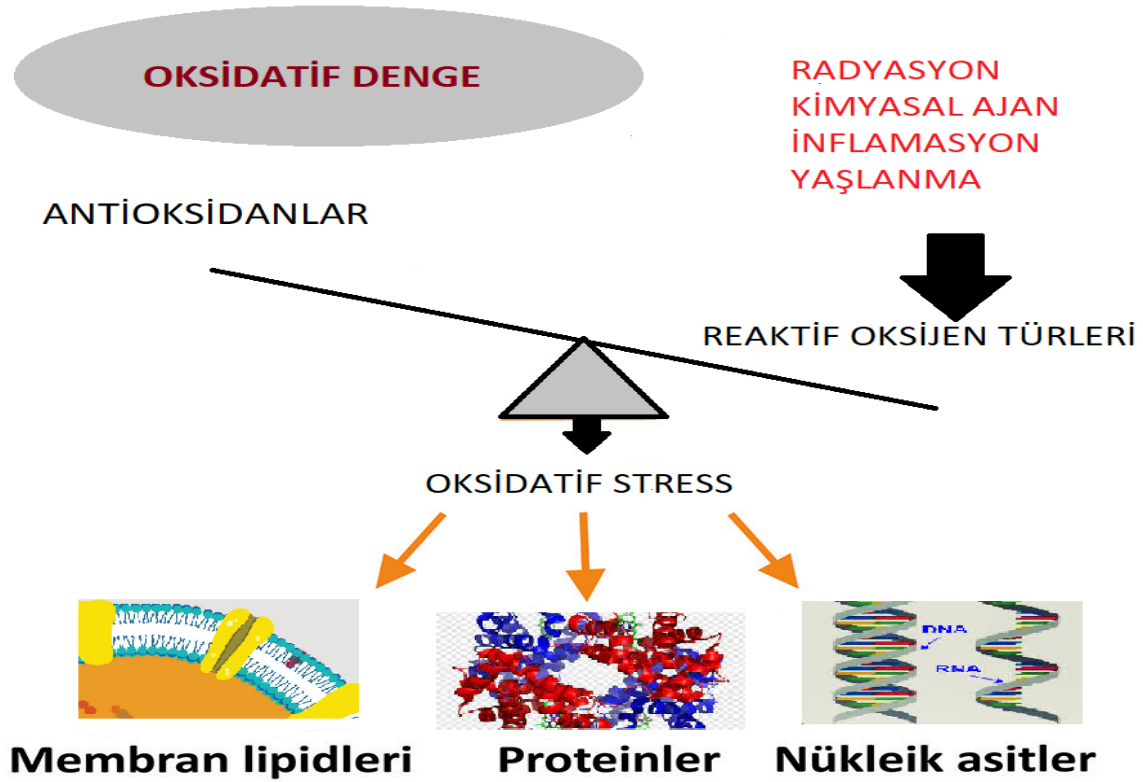
Biyolojik sistemde en bol molekül olan oksijen, hayatımızın vazgeçilmezi iken aynı zamanda yıpranmamızın, yaşlanmamızın hatta ölmemizin de sebebidir. Yüksek konsantrasyonlu oksijenin canlılar üzerindeki patofizyolojik hatta öldürücü etkisi uzun zamandır bilinmektedir [36]. Aerobik organizmalar, devamlı olarak metabolik süreçte moleküler oksijenden türevlenen serbest radikaller veya ROT olarak adlandırılan molekülleri üretirler. ROT en dış orbitalinde bir ya da birden fazla eşi olmayan elektron taşıyan, yüksek enerjili atom veya moleküller olarak bilinmektedir [37,38]. Hücrelerde metabolik faaliyetler için gerekli olan oksijenin %90'ı mitokondride oksidatif fosforilasyon esnasında kullanılır. Mitokondrilerde kullanılan oksijenin

%1-3'ü ROT'lara dönüştürülür [39].

2.3 Oksidatif Stress

Reaktif oksijen türlerinin, savunma sistemi olan antioksidanlardan fazla miktarda oluşmasıyla oksidatif denge ROT lehine çevrilir. ROT'lar hücrelerin membranlarındaki lipidlerin peroksidasyonuna neden olarak, membranın geçirgenliğinin bozulmasına, hücre içinde iyon dengesinin bozulmasına, makromolekül olan proteinlerin, karbonhidratların, DNA ve RNA moleküllerinin yapısını bozarak birçok hasara ve hastalıkların oluşumuna neden olmaktadır. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. ROT bir veya daha fazla eşi olmayan elektron içeren moleküller olup, yüksek kimyasal aktivite isteklerinden dolayı hücre içi makromoleküller yapılarının hasarına neden olurlar. Metabolizmada ROT üretimi ve nötralizasyonu ile antioksidanlar arasındaki denge çok hassastır ve eğer bu denge ROT'un daha fazla üretimine daha baskın ise hücreler oksidatif stresin sonuçlarına maruz kalmaya başlar [40]. Hücre organellerinin membranlarında yapı taşı olarak bulunan lipitler serbest radikallere çok duyarlıdır ve bunlarla reaksiyona girerek lipit peroksidasyonuna uğrarlar. Lipit peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) ve bir çok toksik yan ürünlerin ortaya çıkar ve zararlı olan bu yan ürünler ikinci bir etki mekanizması gibi hareket eder ve üretildiği alan dışında daha uzak alanlarda etkilerini gösterirler. Doymamış bağ ve yapısında sülfür olan makromoleküller ROT ile daha yüksek reaktiviteye sahiptirler, bundan dolayı, triptofan, tirozin, histidine, fenil alanin, metionin ve sistein amino asitlerini sahip proteinler serbest radikallerle daha kolay olarak reaksiyona girerler ve yapısal fonksiyon ve enzim aktivitesi bozukluğu meydana getirirler [41]. DNA ile reaksiyona giren serbest radikaller, karbonhidratlardaki hidrojen atomlarının artmasına veya azalmasına sebep olabilir. Özellikle pirimidin bazının C4 ile C5 arasındaki çift bağı hidroksil radikalinin saldırılarına karşı çok hassas olup saldırılar sonucunda urasil glikol, üre kalıntısı, timin glikol, 5-hidroksideoksiüridin, 5-hidroksideoksisitidin ve hidantoin gibi hasar yan ürünleri oluşur. Aynı şekilde pürin bazları da hidroksil radikal saldırılarına karşı duyarlıdır. Hidroksil saldırıları sonucunda ise 8-hidroksi deoksiguanozin, 8-hidroksi deoksiadenozin ve formamidopirimidin yan ürünlerinin oluşumuna neden olarak hücre apoptozuna ve DNA'nın parçalanmasına neden olur [42]. Karbonhidratlar ile de reaksiyona giren serbest radikaller, karbona bağlı hidrojen atomlarından birini çıkararak karbon merkezli radikal üretirler. Bunlar hücre dışı matriksin ana yapısı olan hyaluronik asit gibi önemli moleküllerde zincir kırılmalarına sebep olur [43]. Oksidatif stres'in yapmış olduğu bu hasar durumunu, FDT ile tümoral kitlelere ve kanser hücrelerine uygulanarak yok edilmek istenmesi, oksidatif stres'in metabolizma için olan dezavantajlı durumunu avantaja çevirmiştir.

Metabolizmada ROT'un belirli düzeydeki varlığı, metabolik faaliyetlerde zararlarının yanında birçok yararlı olaya da etki etmektedir. Oksidatif stresin yararlarına örnek olarak; salınım sistemini uyarmaları, fagositoz yaptırarak enfeksiyonları önlemeleri, iyonların taşınması, sitotoksik lenfositler ve makrofajların kanser hücrelerinin öldürülmesi, sitokrom p450 tarafından ksenobiyotiklerin, uzaklaştırılması, ATP üretimi, hücre gelişmesi ve düşük konsantrasyonda mitojenik yanıtla neden olmaları ve gen transkripsiyonu gibi yaşamsal önemi olan faaliyetlere yardımcı olmaları söylenebilir [43-46]. Son yıllardaki çalışmalarda yara yerindeki üretilen ROT'ların, mikrovasküler sistemin yenilenmesine aracılık ederek yara yeri iyileşmesine yardımcı olduklarını göstermiştir [47]. Bir insan hücresinin günlük olarak hidroksil radikal ve diğer ROT'lar tarafından hedeflenerek oksidatif strese maruz kalma ortalama sayısı 105 defa olduğu tahmin edilmektedir [48]. Normal süreçteki metabolik faaliyetlerle ve dış kaynaklı (sigara, alkol, hava kirliliği, radyasyon, toksik kimyasallar vs) etkenlerle oluşan ROT'lar, savunma sistemi olan antioksidanlarla yok edilmeye çalışılır.



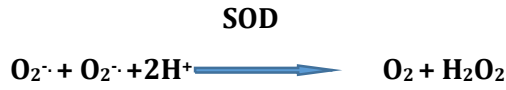
Şekil 2.3. Oksidatif Denge

Antioksidanlar; endojen ve eksojen kaynaklı olmakla birlikte enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak da sınıflandırılır. Antioksidanların dört farklı mekanizma ile etki gösterirler. 1. Temizleme etkisi; serbest radikallerle etkileşime girerek radikallerin tutulmasını ya da daha zayıf bir haline dönüştürerek etkisizleştirilmesidir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller temizleme etkisini kullanır. 2. Baskılama etkisi; serbest radikallere hidrojen atomu vererek zararsız hale getirmek ya da reaksiyon hızlarının azaltılmasıdır. Vitaminler ve flavonoidler baskılama etkisini kullanır. 3. Onarma etkisi; serbest radikallerin geri dönüşümü olabilecek lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşturdukları hasarların onarılmasıdır. 4. Zincir kırıcı etkisi; serbest radikalleri tutarak, yeni radikallerin oluşumuna yol açacak zincirleme reaksiyonlarının engellenmesidir [49,50]. Enzimatik olmayan antioksidanların bir kısmını dışardan alırken, enzimatik olan antioksidanları organizma hücresel düzeyde kendisi üretir. Organizmanın serbest radikallere karşı ürettiği birinci basamak enzimatik antioksidanlar süperoksit dizmutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidazdır (GPx). Enzimatik olmayan antioksidanların da oksidatif streste önemli bir yeri vardır. Bunlar ise A, C ve E vitaminleri, fenolik maddeler, resveratrol ve flavonoid türleri olan kuersetin ve kateşindir. Oksidatif stresin ortaya konması için bilimsel çalışmalarda en çok çalışılan enzimatik antioksidanlar olarak SOD, CAT ve GPx enzimleri ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşan Malondialdehit (MDA) yan ürünüdür

[51,52].

2.3.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz serbest radikallere karşı metabolizmayı korumada ilk savunma hattını oluşturur. SOD süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen endojen enzimatik bir antioksidandır [53].



Bu tepkime, süperoksit radikalinin anyon ve katyon formlarının aynı oranda bulunduğu pH'nın 4,8 olduğu ortamda tepkime kendiliğinden olur. Fakat organizma pH'nın 7,35- 7,45 olduğundan dolayı bu reaksiyon istenilen pH seviyesi olmadığından çok daha yavaş oluşacaktır. Tepkimede SOD enzimi olduğunda pH'ın en az 7,4 olduğu koşullarda iken bu reaksiyonu enzim dört kat daha hızlandırır [54]. İnsanlarda SOD'un üç farklı çeşidi bulunur. Bunlardan bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD) sitozolde, lizozomda ve nükleer bölmelerde bulunur. Amniyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Gen Mutasyonları ve Down sendromu gibi durumlarda etkindir. Manganez (Mn) içeren süperoksit dismutaz (Mn SOD) mitokondride bulunur. Tümör oluşumu, hücre farklılaşması ve pulmoner toksisite ile başlayan hipokside etkindir. En son keşfedilen ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC SOD) hücre dışı sıvılarda ve özellikle damar duvarlarında bulunur. Hipertansiyon, ateroskleroz, koroner arter hastalıkları, diyabet ve iskemi/reperfüzyon hasarı gibi vasküler kaynaklı hastalıkların patogeneğinde önemli bir etkinliği vardır [55]. SOD seviyesinin düşmesi ile ROT oluşumu artar. Yaşlanma ile birlikte SOD seviyeleride azalır. Bağışıklık sistemini koruyarak günlük SOD desteğini sağlayabilir, hastalıklara yakalanma şansını ve yaşlanma sürecini azaltabilir, SOD kaynakları olarak lahanalar, brüksel lahanası, brokoli, buğday çimi ve arpa çimi gösterilebilir [56].

2.3.2. Katalaz (CAT)

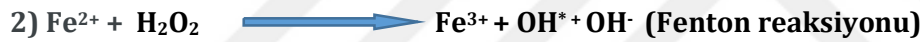
Katalaz enzimi hücrede peroksizomlarda bulunmaktadır [57]. Katalaz (CAT), dört benzer alt birime tetramerik yapıda protein yapıya sahiptir. Herbir polipeptit alt birimi tek bir ferriprotoporfirin içerir [58]. CAT, oksijeni kullanan hemen hemen tüm canlı dokularda bulunan

yaygın bir antioksidan enzimdir. Enzim, kofaktör olarak demir veya manganez kullanır ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) suya ve moleküler oksijene indirgenmesini kataliz ederek, SOD tarafından başlatılan süreci tamamlar. Son derece hızlı çalışan bir enzimdir milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü bir saniyede parçalayabilir [59,60].

CAT



Serbest radikal olmadığı halde ROT olarak kabul edilen H_2O_2 serbest radikal biyokimyasında kritik bir rol üstlenmiştir. Bunun nedeni H_2O_2 demir iyonu (Fe^{+2}) veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonuna girerek, süperoksit radikalının varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonuna girerek hidroksil radikali (OH^*) oluşur. Hidroksil radikali ise en reaktif ve zarar verici bir serbest radikaldir [61].



Hidrojen peroksidin düşük konsantrasyonları, birçok fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar fakat yüksek konsantrasyonunda hücreye çok zarar vermektedir. Bu yüzden birinci basamak antioksidan enzim görevi olan CAT, H_2O_2 artışı ile yoğunluğunu arttırarak saniyede milyonlarca H_2O_2 'yi parçalar [51]. Katalaz, her bir alt biriminde birer tane NADPH ve hem grubu içeren 4 protein alt birimden oluşmaktadır. Katalaz H_2O_2 'yi su ve oksijen molekülüne indirgemede elektron kaynağı olarak NADPH'ı kullanır [62].

2.3.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Glutatyon peroksidaz, mitokondride ve sitozelde lipit peroksidlerini alkollerine, katalaz enziminin yaptığı gibi hidrojen peroksiti de su ve oksijen molekülüne çevirir. Katalazdan farkı ise elektron kaynağı olarak glutatyonu (GSH) kullanır. Hidrojen peroksiti indirgeyerek suya,

glutasyonu ise oksitleyerek glutatyon disülfite (GSSG) çevirir. Okside olan glutatyon, glutatyon redüktaz (GR) enzimi varlığında tekrar redükte glutatyonla dönerek döngüyü tamamlar [51,63].



Glutatyon peroksidaz enziminin bilinen 8 çeşidi bulunmakta olup, çoğu da selenyum atomunu (Se) kofaktör olarak kullanır. Bundan dolayı selenyum eksikliğinde glutatyon peroksidaz yetersizliği görülür. GPx1 en çok bulunan tipidir ve neredeyse tüm hücrelerde, GPx2 gasrointestinal sistemde bulunan hücrelerde, GPx3 böbreklerde ve ekstraselüler sıvılarda bulunur. GPx4 monomer birimli, fosfolipid hidroperoksitleri parçalayan tek GPx enzimidir. GPx5, GPx6 tiplerinin farkı selenyum kullanmamalarıdır. GPx7 ve GPx8 tıpkı GPx4 gibi monomer yapıda olup selenyumdan bağımsız olarak işlev görürler. GPx 1-2-3-5 ve 6 tiplerinin yapısı tetramerik yapıdadır [64,65]

2.3.4. Malondialdehit (MDA)

Hücre membranında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağlarına saldırarak kolay bir şekilde reaksiyona giren ROT, zincirleme bir reaksiyon serisi ile lipid peroksidasyonunu oluşturur. Zincirleme ilk olarak ROT'un membrandaki doymamış yağ asidi zincirlerinden hidrojen atomlarını kopartarak yağ asidi zincirinin bir lipid radikali (L*) olması ile başlar. Sonrasında lipid radikallerinin oksijenle reaksiyona girmesi ile lipid peroksit radikalleri (LOO*) oluşur. Lipid peroksit radikalleri membranda bulunan diğer yağ asitleri ile reaksiyona girerek hasarlara neden olur. Lipid peroksitleri, açığa çıkan hidrojeni alır ve lipid hidroperoksitleri (LOOH) oluşturur. Lipid peroksitler yıkıldığında ise acrolein, malondialdehit ve 4-hidroksinonenal gibi yan ürünler açığa çıkar ve bunlarda protein ve DNA ile reaksiyona girerek hasar bırakırlar [66]. MDA, araşidonik asidin ve büyük boyutlu çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonu sonucu son ürün olarak oluşan, kimyasal olarak kararlı ve ROT'a göre membranlardan daha kolay geçen ve hasar oluşturan bir metabolittir. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir belirteci olmamakla birlikte lipid peroksidasyonu sonucu ile iyi korelasyon gösterdiğinden lipid peroksidasyonu çalışmalarında en çok çalışılan üründür [67,68].

Planlanan bu tez çalışmasında sentezlenen 4-nitro ZnPc meme kanser hücreleri üzerine etkisinin araştırılması ve FDT'nin meme kanseri hastalarında kullanılabilirliğinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla da 4-nitro ZnPc üç farklı dozu kullanılmış, üç farklı süredeki etkisi SOD,

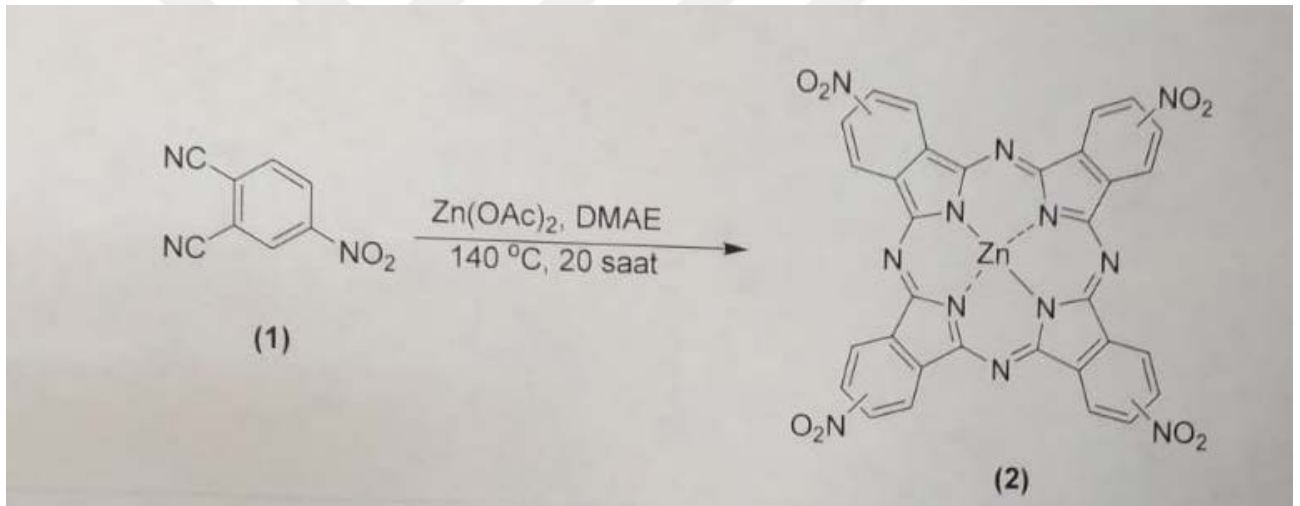
KAT ve GPx aktiviteleri ve MDA miktarı ölçülmüştür.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Tetranitro Çinko Fitalosiyanın Sentez ve Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan merkezinde çinko atomu içeren simetrik tetranitro çinko fitalosiyanın molekülü Prof. Dr. Mine İNCE OCAKOĞLU ve ekibi tarafından sentezlenmiştir. Pc'nin sentezi için gereken başlangıç maddesi 4-nitroftalonitrildir. 4-nitroftalonitrilin, dimetilamino etanol gibi yüksek kaynama noktasına sahip bir çözügen içinde ve bir çinko tuzu varlığında 140 °C sıcaklıkta 20 saat boyunca 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.

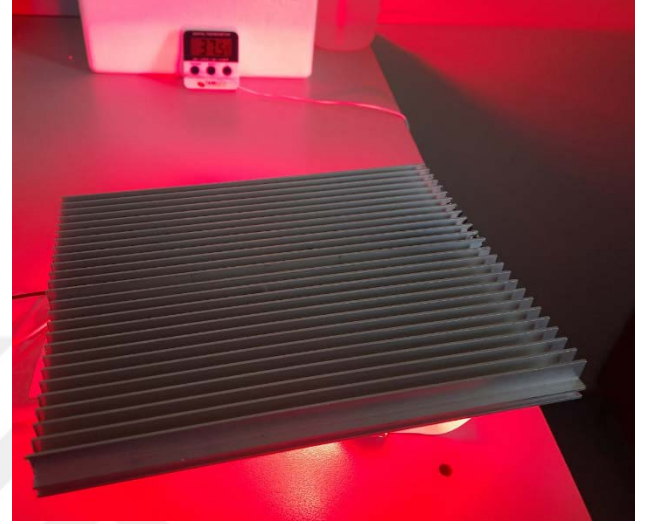


Şekil 3.1. Tetranitro çinko fitalosiyanın sentezi

3.2. Işık Kaynağı

692 nm dalga boyunda en yüksek aktivasyonunu gösteren 4-nitro ZnPc için HQG marka AXD-50WGJ24WW model 50 watt kırmızı power led ışık kaynağı kullanılmıştır. Işık kaynağının güç ölçümü Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik bölümü Lazer laboratuvarında PM130 Series Slim Profile Optical Power Meter ile yapılmıştır. Ölçüm yapılan cihazın sensörünün çapı 0,90 mm olduğundan sensör alanı 0,70 cm² hesaplanarak sensör alanına düşen 692 nm dalga boyundaki ışık şiddeti 16,31 mW ölçülmüş olup cm²'ye düşen ışık şiddeti 23,3 mW hesaplanmıştır. 10 joule enerji verilmesi planlanan deneyde J=watt x saniye formülünden 429 saniye (7 dakika 9 saniye) ışığa maruz bırakılması hesaplanmıştır. Bu süre içinde led ışık

kaynağının yüksek ısı vererek hücrelere zarar vereceğinden 40 cm X 40 cm genişliğinde alüminyum soğutucu panel hazırlanarak ışık kaynağına sabitlenip dijital termometre eşliğinde ışık verme işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Işık şiddet ölçümü ve ışık kaynağı düzeneği

3.3. Kullanılan Araç-Gereçler, Sarflar ve Kimyasallar

3.3.1. Kullanılan Araç-Gereçler

- Etüv
- Laminar akımlı kabin
- CO2 inkübatörü
- Soğutmalı Santrifüj
- İnverted mikroskop
- Buzdolabı
- Derin dondurucu
- Hücre sayım cihazı
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (10-100µl ve 100-1000µl'lik)
- Spektrofotometre
- 50 watt kırmızı power led ışık kaynağı
- Dijital termometre
- Hassas elektronik laboratuvar terazisi

- Ultrasonik su banyosu
- Vortex
- Laboratuvar su banyosu

3.3.2. Kullanılan Sarflar ve Kimyasallar

- MCF-7 hücre hattı (HTB-22, ATCC)
- Tetranitro çinko fitalosiyanın (4-nitro ZnPc) 757,9 gr/mol
- Abcam marka Superoxide Dismutase Activity Assay Kit/100 Test
- USCN marka Catalase Elisa Kit/96 Test
- USCN marka Glutathione Peroxidase 1 (GPX1) Elisa Kit/96 Test
- CAYMAN marka Tbars (MDA) Assay Kit/96 Test
- RPM-1640 medium
- L-glutamin
- Penisilin/streptomisin
- Fetal sığır serumu (FBS)
- Tripsin-EDTA
- DPBS-1X
- Dimetil sülfoksit (DMSO) %1
- 0.1M Tris/HCL (SOD için)
- pH 7.4 containing 0.5% Triton X-100 (SOD için)
- 5mM Merkaptotanol (β -ME) (SOD için)
- 0,1 mg/mL (fenilmetilsülfonil florür) PMSF (SOD için)
- Distile edilmiş su
- Flasklar (25 ml ve 75 ml'lik)
- 6'lı, 12'li ve 96'lı well plate
- Petri kaplar
- Cam santrifüj tüpleri (15ml)
- Falkon tüpler (15ml ve 50 ml'lik)
- Pastör pipeti
- Pipet uçları (0,5-10 μ l, 1-200 μ l ve 1-1000 μ l'lik)
- Eppendorf tüpler (2ml ve 5ml'lik)
- Smart Slides

3.4. Hücre Kültürü Uygulamaları

Hücre kültürü çalışmaları Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM) bünyesindeki kök hücre rejeneratif tıp (MERKÖK) biriminde yapılmıştır. Çalışmada MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri meme epitel dokusundan elde edilmiş, bir siklusu yaklaşık olarak 38 saat olan hücreler adheren özellikte olan hücrelerdir. Hücrelerin üretimi için RPMI-1640 medyumun (L-Glutamin 2,5 mM katkılı) içine inaktive edilmiş % 10 fetal sığır serumu (FBS), % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 gentamisin eklenerek katkılı medyum hazırlanmıştır. İlk hücre pasajlanmasında dondurulmuş haldeki hücre hattının 37°C gelmesi sağlanmış, steril koşullarda laminar akımlı kabine alınarak 15 ml'lik falkon tüpe konulup medyumla yıkanmıştır. 5 dakika boyunca 130 g'de santrifüjlenerek süpernatant olarak üzerine 5 ml hazırlanan RPMI besiyeri konulmuştur. 25 ml lik flasklarda 24 saat 37°C ve % 5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. 36 saat aralıklarla, hücreler % 80 konfluent oluncaya kadar medyum değiştirilerek inkübasyona devam edilmiştir.

3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada toz formda olan, %1 DMSO ile çözelti oluşturulan 4-nitro ZnPc'nin oksidatif stress üzerine etkilerini belirlemek amacıyla üç farklı dozu kullanılmıştır (20 µM, 30 µM 40 µM). Belirlenen dozların 18, 36 ve 48. saatlerdeki etkisi belirlenmiştir.

Deney grupları için 101 x 10⁶ sayıda hücre ekimi yapılmıştır 24 saat sonra 4-nitro ZnPc'nin 20 µM, 30 µM 40 µM dozları eklenmiştir. 4-nitro ZnPc'ler eklendikten 4 saat sonra, 7 dakika 9 saniye (10 joule, 692 nm ışık) süresince doz grupları ışığa maruz bırakılmıştır. Işık maruziyetinden sonra flasklar inkübatöre kaldırılmış, maruziyetten sonraki 18, 36 ve 48. saatlerinde antioksidan enzim analizleri ve MDA ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ayrıntılı deney planı tablo 3.1 de gösterilmiştir. Kontrol gruplarına 4-nitro ZnPc ve ışık uygulaması yapılmamış, doz grupları ile aynı sürelerde antioksidan enzim analizleri ve MDA miktarı ölçülmüştür.

Tablo 3.1. Deney planı

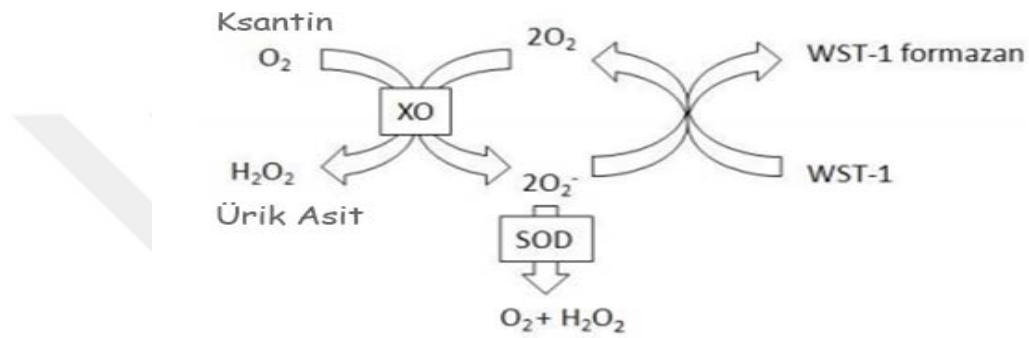
Deney grupları	Işık uygulaması	İnkübasyon süresi (saat)
Kontrol (Kont) (Hücre + PBS)	Yok	18
		36
		48
Doz 1 (Hücre +20 μ M 4-nitro ZnPc + PBS)	Var	18
		36
		48
Doz 2 (Hücre +30 μ M 4-nitro ZnPc+ PBS)	var	18
		36
		48
Doz 3 (Hücre+ 40 μ M 4-nitro ZnPc+ PBS)	var	18
		36
		48

3.6. Oksidatif Stress Parametrelerinin Belirlenmesi

Tetranitro çinko fitalosiyenin'in 20 μ M, 30 μ M 40 μ M üç dozu uygulanıp ışıkla uyarıldıktan sonraki 18., 36. ve 48. saatlerde oluşan oksidatif stresin belirlenmesi için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri ve lipit peroksidasyon ürünü malondialdehit (MDA) ölçülmüştür.

3.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) % İnhibisyonunun Ölçülmesi

Yönteme göre; süperoksit anyon ile indirgeme üzerine suda çözünür bir formazan boyası üreten bir tetrazolyum tuzu olan WST-1'i kullanılır. WST-1 indirgeme hızı, SOD tarafından ksantin oksidazın (XO) inhibisyon aktivitesi ile doğrusal olarak ilişkilidir. SOD, süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülmesini katalize ederek WST-1 indirgemesinin azalmasına neden olur. SOD'un bu inhibisyon aktivitesi, optik dansite (OD) 450 nm'de kolorimetrik olarak ölçülür.



Şekil 3.3. SOD test prensibi

SOD enzim % inhibisyonu için kit prosedürüne göre, yaklaşık $4,8 \times 10^6$ hücre pasajlanarak çoğaltılmış sayımı Cedex XS hücre sayım cihazında yapılmıştır. 18, 36 ve 48. saatleri için üç tane 6'lı platelerin her birine; kontrol, doz 1, doz 2 ve doz 3 için dört kuyucuk konumlandırılmıştır. Her konumlandırılmış kuyucuklara 3 ml besiyeri ile 4×10^5 hücre ekimi yapılmıştır. 24 saat sonra platelerdeki 1. kuyucuklara 20 μ M, 2. kuyucuklara 30 μ M, 3. kuyucuklara 40 μ M 4-nitro ZnPc eklenerek 4. kontrol kuyucuklara ekleme yapılmamıştır. 6 saat 37°C inkübasyona bırakılan platelerde doz gruplarına 10 joule 692 nm ışık uygulanarak 37°C de standart inkübasyon koşullarına bırakılmıştır. 18. saatte 1. plate kuyucuklarındaki besiyeri alınıp, yapışık olan hücreler PBS ile iki defa yıkandıktan sonra tripsinle kaldırılmıştır. Tripsini inaktif etmek için FBS'li besiyeri konularak pipetaj yapılmıştır ve santrifüj yapılması için 15 ml'lik falkon tüplere alınıp 170 x g de 7 dakika santrifüjlenerek supernat atılmıştır. Test prosedüründe hücre hazırlığı için PMSF, β -ME, triton ve tris/HCL içeren soğuk solüsyondan 1'er ml eklenerek 2 ml'lik ependorf tüplerde deneyin uygulanacağı zamana kadar hücreler dondurulmuştur. Aynı işlemler 36. saatte 2. plate ve 48. saatte 3. plate içinde uygulanmıştır.

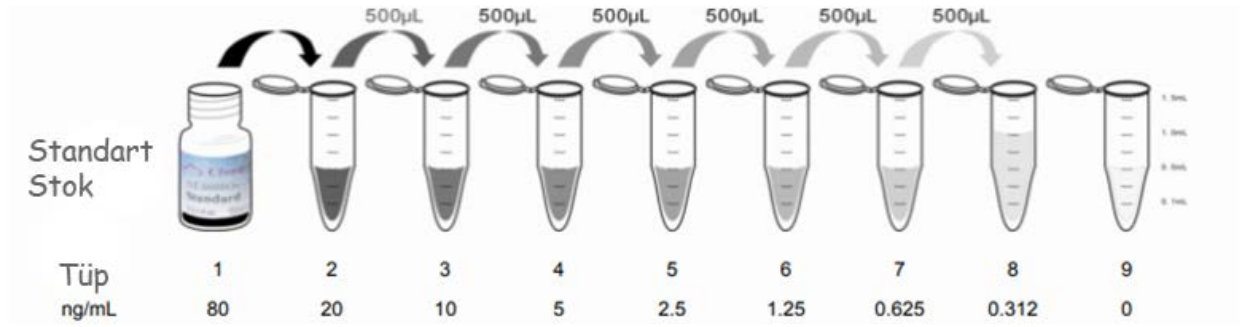
Analiz için dondurulan hücreler 96'lı plate de aşağıdaki şekilde yerleştirilmiştir.

	Hücre (μ l)	Kör 1 (μ l)	Kör 2 (μ l)	Kör 3 (μ l)
Hücre örnek	20	0	20	0
Distile su	0	20	0	20
WST çalışma solüsyonu	200	200	200	200
Enzim çalışma solüsyonu	20	20	0	0
Seyreltme tamponu	0	0	20	20

Hazırlanan 96'lı platdeki karışım 20 dakika 37°C inkübasyonda bırakıldıktan sonra spektrofotometrede 450 nm'de SOD enzim % inhibisyonunun hesaplanması için absorbanı ölçülmüştür. Her bir ölçüm 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.2. Katalaz (KAT) Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

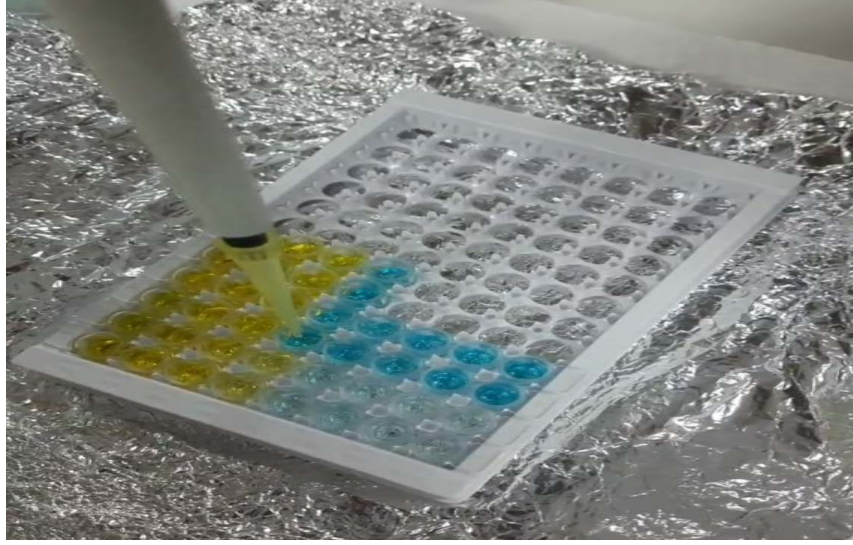
Yönteme göre; kit içeriğinde katalaza özgü bir antikorla kaplanmış mikrolate bulunmaktadır. Standart ve örnekler (hücre lizatları) katalaza özgü antikor bağlanmış mikrolakalardaki kuyucuklara eklenir. Sonra tespit için, yaban turpu köklerinden elde edilen peroksidaz enzimine (HRP) konjuge edilmiş avidin, her mikrolaka kuyusuna eklenir ve inkübasyona bırakılır. Tetrametilbenzidin (TMB) substrat çözeltisi eklendikten sonra, sadece katalaz içeren biyotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge avidin içeren kuyucuklarda renk oluşur. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisinin eklenmesiyle sona erdirilir ve renk değişimi spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda ölçülür. Örneklerdeki CAT konsantrasyonu elde edilen standart eğriye göre belirlenmiştir. CAT standart eğrisi şekil 3.4. de gösterilen standart serisine göre yapılmıştır.



Şekil 3.4. CAT standart serisi hazırlanması

CAT enzim aktivitesi için kit prosedürüne göre 24×10^6 hücre pasajlanarak çoğaltılmış sayımı Cedex XS hücre sayım cihazında yapılmıştır. 18, 36 ve 48. saatleri için üç tane 6'lı platelerin her birine; kontrol, doz 1, doz 2 ve doz 3 için dört kuyucuk konumlandırılmış, her konumlandırılmış kuyucuğa 3 ml besiyeri ile 2×10^6 hücre ekimi yapılmıştır. Test 2 tekrarlı planlanmıştır ve 24 saat sonra platelerdeki 1. kuyucuklara 20 μ M, 2. kuyucuklara 30 μ M, 3. kuyucuklara 40 μ M 4-nitro ZnPc eklenerek 4. kontrol kuyucuklara ekleme yapılmamıştır. 6 saat 37°C inkübasyona bırakılarak sonrasında platelerde doz gruplarına 10 joule (692 nm) ışık uygulanarak 37°C de standart inkübasyon koşullarına bırakılmıştır. 18. saatte 1. platadaki hücreler pellet haline getirilip 200 μ l soğuk PBS konularak pipetajla 2 ml'lik eppendorf tüplere alınmıştır. Daha sonra hücreleri parçalamak için buz içinde lizis işlemi uygulanmış ve deney gününe kadar -20 °C' de dondurulmuştur. Aynı işlemler 36. saatte 2. plate ve 48. saatte 3. plate içinde uygulanmıştır.

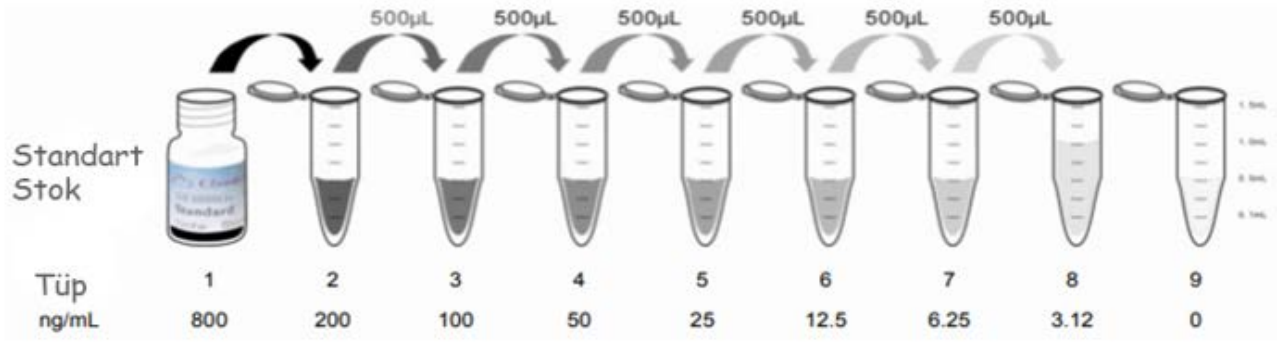
Analiz için dondurulan hücrelerden 100'er μ L (10^6 hücre), tabanı CAT'a özgü antikorla kaplanmış olan hazır mikropelatelere saat ve doz gruplarına göre konularak, sırasıyla tespit reaktifleri A ve B ile muamele edilmiştir. Daha sonra TMB substrat çözeltisi ve stop solüsyonu eklenerek oluşan sarı renk 450 nm spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.5. CAT enzim aktivitesinin renk değişimi

3.6.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Kit içeriğinde GPx'e özgü antikorla kaplanmış microplate bulunmaktadır. Standart ve örnekler (hücre lizatları) GPx'e özgü antikor bağlanmış mikroplate kuyucuklarına eklenmiştir. Sonrasında tespit için, peroksidaz enzimine (HRP) konjuge edilmiş avidin her microplate kuyusuna eklenir ve inkübasyona bırakılmıştır. Tetrametilbenzidin (TMB) substrat çözeltisi eklendikten sonra, sadece GPx içeren biyotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge avidin içeren kuyucuklarda renk değişikliği meydana geldi. Enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit çözeltisinin eklenmesiyle sona erdirilerek renk değişimi spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Örneklerdeki GPx konsantrasyonu elde edilen standart eğriye göre belirlenmiş GPx Standart eğrisi şekil 3.6. da gösterilen standart serisine göre yapılmıştır.



Şekil 3.6. GPx standart serisi hazırlanması

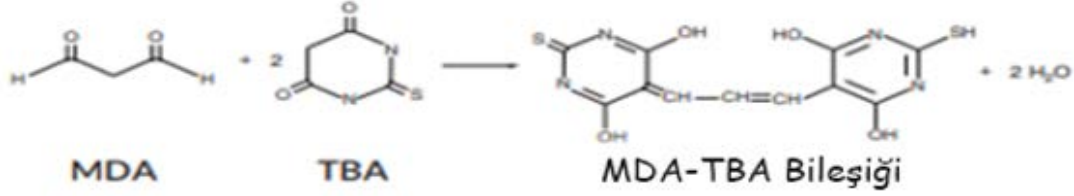
GPx aktivitesi ölçümü için deney kit prosedürüne göre 24×10^6 hücre pasajlanarak çoğaltılmış sayımı Cedex XS hücre sayım cihazında yapılmıştır. 18, 36 ve 48. saatleri için üç tane 6'lı platlerin her birine; kontrol, doz 1, doz 2 ve doz 3 için dört kuyucuk konumlandırılmış, her konumlandırılmış kuyucuğa 3 ml besiyeri ile 2×10^6 hücre ekimi yapılmıştır. 24 saat sonra platlerdeki 1. kuyucuklara 20 μ M, 2. kuyucuklara 30 μ M, 3. kuyucuklara 40 μ M 4-nitro ZnPc eklenerek 4. kontrol kuyucuklara ekleme yapılmamıştır. 6 saat 37°C inkübasyona bırakılarak sonrasında platlerde doz gruplarına 10 joule (692 nm) ışık uygulanarak 37°C de standart inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında 18. saatte 1. platedeki hücreler pellet haline getirilip 200 μ l soğuk PBS konularak pipetajla 2 ml'lik eppendorf tüplere alınmıştır. Hücre lizis işlemleri sonrasında -20 °C' de dondurulmuştur. Aynı işlemler 36. saatte 2. plate ve 48. saatte 3. plate içinde uygulanmıştır.

Analiz için dondurulan hücrelerden 100'er μ L (10^6 hücre), tabanı GPx'e özgü antikorla kaplanmış olan mikropatlere saat ve doz gruplarına göre konularak sırasıyla tespit reaktifleri A ve B ile muamele edilmiştir. Daha sonra tetrametilbenzidin (TMB) substrat çözeltisi eklenmiş ardından stop solüsyonu eklenmesiyle oluşan sarı renk 450 nm spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.6.4. Malondialdehit (MDA) Miktarının Ölçülmesi

Malondialdehit lipid peroksidasyonundan doğal olarak oluşan bir üründür. Lipid peroksidasyonu, hem bitkilerde hem de hayvanlarda iyi bilinen bir hücresel hasar mekanizmasıdır ve hücrelerde ve dokularda oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılır. Çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) türetilen lipid peroksitler, kararsız ve karmaşık bir dizi oluşturan MDA gibi reaktif karbonil türevleri içeren bileşiklerdir. Tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin (TBARS) ölçümü, lipid peroksidasyonunun taranması ve izlenmesi için en iyi bilinen yöntem olup lipid peroksidasyonunu belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. MDA ve

tiyobarbitürik asitin (TBA) yüksek sıcaklık (90-100 °C) ve asidik koşullar altında reaksiyonu sonucu oluşan MDA-TBA eklentisi, 530-540 nm'de kolorimetrik olarak ölçülür.



Şekil 3.7. MDA-TBA oluşumu

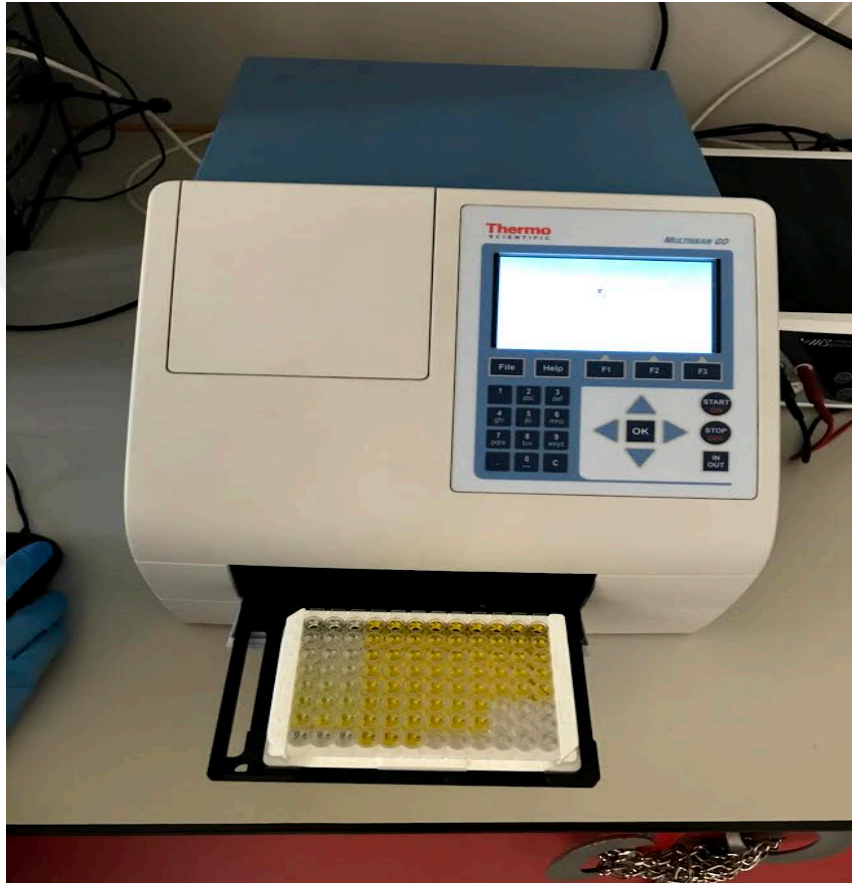
Örneklerdeki (hücre lizatları) MDA konsantrasyonu standart eğriden belirlenir. MDA standart eğrisi aşağıdaki gibi hazırlanan standart serisine göre yapılmıştır.

Tüp	MDA stok solüsyonu 125 µM (µl)	Distile su (µl)	MDA konsantrasyon (µM)
A	0	1000	0
B	5	995	0,625
C	10	990	1,25
D	20	980	2,5
E	40	960	5
F	80	920	10
G	200	800	25
H	400	600	50

MDA analizi için deney kit prosedürüne göre 48×10^6 hücre pasajlanarak çoğaltılmış sayımı Cedex XS hücre sayım cihazında yapılmıştır. 18, 36 ve 48. saatler için 12 petri kabının her birine kontrol, doz 1, doz 2 ve doz 3 için 6 ml besiyeri ile 4×10^6 hücre ekimi yapılmıştır. 24 saat sonra 3 petriye 20 µM, 3 petriye 30 µM, 3 petriye 40 µM 4-nitro ZnPc eklenerek kalan 3 petriye ekleme yapılmayarak 18, 36 ve 48. saatler için üç seri oluşturulmuştur. 6 saat 37°C inkübasyona bırakılarak sonrasında 10 joule (692 nm) ışık uygulanmıştır. Daha sonra 37°C inkübasyona bırakılarak 18. saatinde 1. seri 4 petrideki hücreler pellet haline getirilerek 200 µl soğuk PBS konularak pipetajla 2 ml'lik ependorf tüplere alınmıştır. Daha sonra hücre lizisi işlemi gerçekleştirilmiş -20 °C'de dondurulmuştur. Aynı işlemler 36. saat ve 48. saatler içinde

uygulanmıştır.

Analiz için kaynatmaya uygun cam tüplere, standart serisi ve hücre lizatı 100'er µl (2.10^6 hücre) ayrı eklenmiştir. Sonrasında tüplere sırasıyla TBA SDS solüsyonu, TBA asidik asit ve TBA sodyum hidroksitten hazırlanmış reaktifler eklenerek 1 saat boyunca kaynatılmıştır. Reaksiyonu durdurmak için kaynatma sonrasında 10 dakika buz banyosuna konularak +4 °C de 1600 X g'de santrifüjlenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 96'lı platlere yerleştirilerek 530 nm spektrofotometrede absorbans okunmuştur.



Şekil 3.8. MDA spektrofotometre ölçümü

3.7. İstatiksel Analiz

Çalışmalarda ölçümler iki tekrarlı yapılmış, elde edilen verilerin analizi için tek yönlü varyans analizi (ANOVA), grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalarda Post-hoc Tukey testi uygulanmıştır. Sunulan veriler ortalama \pm standart hata değerleri olarak sunularak, $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Sentezi ve karakterizasyonu Prof. Dr. Mine İNCE OCAKOĞLU ve ekibi tarafından tamamlanan 4-nitro ZnPc oksidatif stres etkilerinin araştırılması için MCF-7 hücreleri ile muamele edilmiştir. 4-nitro ZnPc'nin 20 μ M, 30 μ M ve 40 μ M dozlarının 10 joule 692 nm ışık maruziyeti sonrası 18, 36 ve 48. saatlerdeki MCF-7 üzerindeki oksidatif stres üzerine etkileri, oksidatif stres parametreleri olan SOD, KAT, GPx ve MDA ile ölçülmüştür.

4.1.1. 4-Nitro ZnPc'nin Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi Üzerine Etkisi

Yapılan istatistiksel analizler sonucu 4-nitro ZnPc'nin SOD enzimi % inhibisyon değeri üzerine etkisi süreye bağlı olarak ve her bir sürede doza bağlı olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. 18, 36 ve 48. saatlerde SOD enzimine ait % inhibisyon değerleri tablo 4.1 de gösterilmiştir

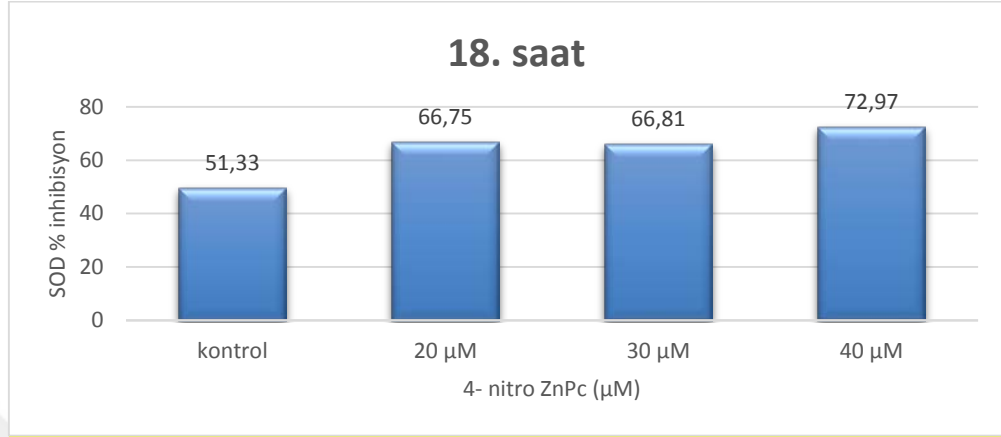
Tablo 4.1. Süreye bağlı SOD % inhibisyon değerleri

Süre	SOD % İnhibisyon ort \pm SH
18.saat	64,46* \pm 3,91
36.saat	77,31* \pm 2,95
48.saat	90,83* \pm 2,42

Süreye bağlı olarak SOD % inhibisyon değeri 18. saate göre 36. ve 48. saatlerde artmıştır, herbir sürede artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). 18, 36. ve 48. saatlerde kontrol ve doz gruplarında elde edilen SOD % inhibisyon verileri sırasıyla şekil 4.1, 4.2 ve 4.3 de verilmiştir.

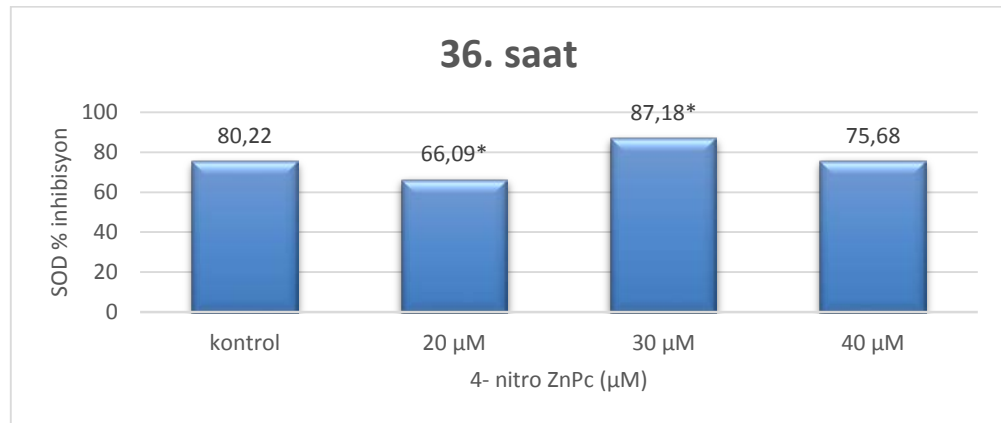
4-nitro ZnPc doz gruplarına ışık maruziyetinden sonra 18. saatteki SOD % inhibisyon verileri şekil 4.1. de verilmiştir. Kontrol grubunun SOD % inhibisyon değeri $51,33 \pm 5,23$; 20 μ M doz grubunda $66,75 \pm 2,94$, 30 μ M doz grubunda $66,81 \pm 11,67$ ve 40 μ M doz grubunda ise $72,97 \pm 0,58$ olarak belirlenmiştir. 18. saatte en yüksek SOD % inhibisyon değeri 40 μ M doz grubunda

belirlenmiştir. 18. saatte kontrol grubu ve doz grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir ($p > 0,05$).



Şekil 4.1. 18. saatteki SOD enzim % inhibisyon verileri

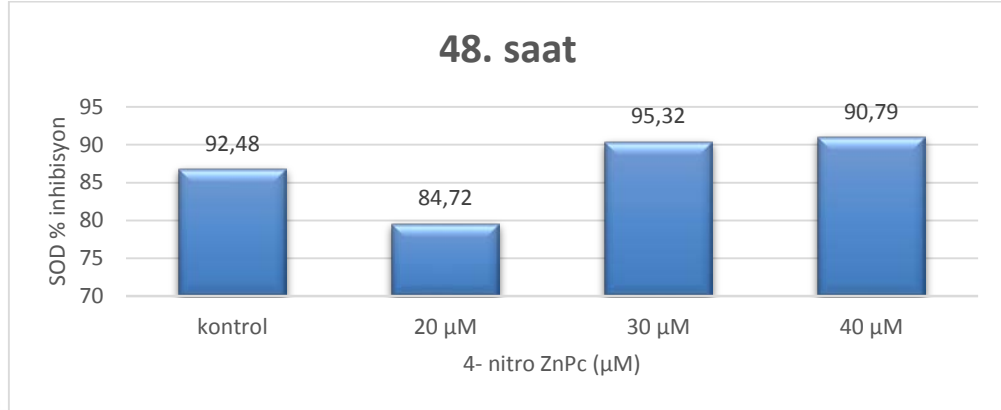
4-nitro ZnPc doz gruplarına ışık maruziyetinden sonra 36. saatteki SOD % inhibisyon verileri şekil 4.2. de verilmiştir. Kontrol grunda SOD % inhibisyon değeri $80,22 \pm 0,73$, 20 µM doz grubunda $66,14^* \pm 2,78$, 30 µM doz grubunda $87,18^* \pm 0,40$ ve 40 µM doz grubunda $75,68 \pm 1,87$ dir. 36. saatte de kontrol grubuna göre 20 µM ve 30 µM doz grupları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4.2. 36. saatteki SOD enzim % inhibisyon verileri

4-nitro ZnPc doz gruplarına ışık maruziyetinden sonra 48. saatteki SOD % inhibisyon verileri şekil 4.3. de verilmiştir. Kontrol grubunun SOD % inhibisyon değeri $92,48 \pm 5,89$, 20 µM doz grubunda $84,72 \pm 4,56$, 30 µM doz grubunda $95,32 \pm 6,81$ ve 40 µM doz grubunda ise $90,79$

$\pm 1,34$ olarak belirlenmiştir. En yüksek değer 30 μM doz grubunda belirlenmiş olup, kontrol grubuna göre gruplarda ki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.3. 48. saatteki SOD enzim % inhibisyon verileri

4.1.2. 4-Nitro ZnPc'nin Katalaz (KAT) Enzimi Üzerine Etkisi

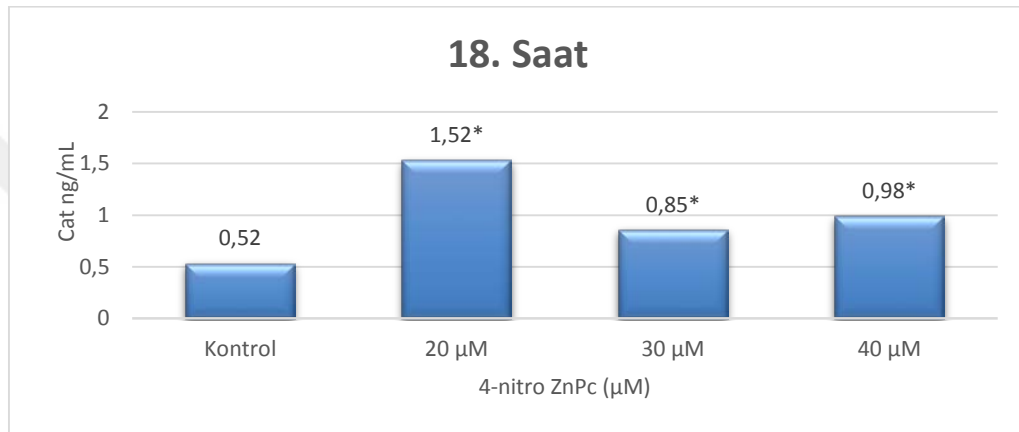
Yapılan istatistiksel analizler sonucu 4-nitro ZnPc'nin KAT enzim aktivitesi üzerine etkisi istatistiksel olarak süreye ve her sürede doza bağlı olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. MCF-7 hücrelerinde süreye bağlı olarak ölçülen KAT enzimi miktarı tablo 4.2. de verilmiştir.

Tablo 4.2. Süreye bağlı KAT enzim miktarı ortalamaları

Süre	KAT (ng/ml) Ort. \pm SH
18.saat	0,97* \pm 0,13
36.saat	1,79* \pm 0,13
48.saat	2,35* \pm 0,17

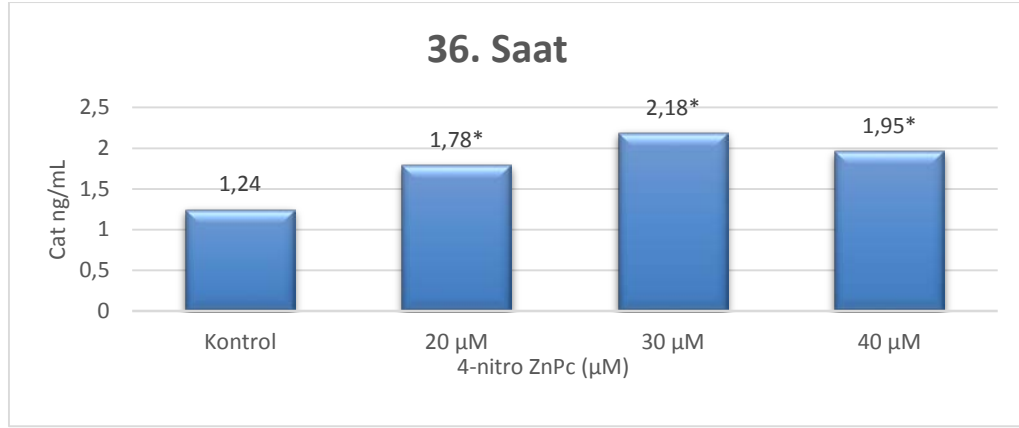
KAT enzim aktivitesinin süreye bağlı olarak arttığı ve bu farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Herbir sürede kontrol ve doz gruplarında ölçülen KAT enzimi miktarı şu şekildedir.

18. saatteki KAT enzim miktarı verileri şekil 4.4. de verilmiştir. Kontrol grubunun KAT enzim miktarı $0,52 \pm 0,01$ ng/ml'dir. $20 \mu\text{M}$ doz grubunda KAT miktarı $1,52^* \pm 0,01$ değerinde 3 katlık bir artış göstermiş olup $30 \mu\text{M}$ doz grubunda $0,85^* \pm 0,10$, $40 \mu\text{M}$ doz grubunda $0,98^* \pm 0,01$ 'e yükselmiş ve bu artışlar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Enzim miktarının 18. saatteki gruplar arasında karşılaştırıldığında en yüksek KAT enzim miktarının kontrole göre % 192'lik bir artışla $20 \mu\text{M}$ grubunda olduğu tespit edilmiş olup, $40 \mu\text{M}$ doz grubunda % 86'lık artış ve $30 \mu\text{M}$ doz grubunda ise % 62 oranında bir artış olduğu belirlenmiştir.



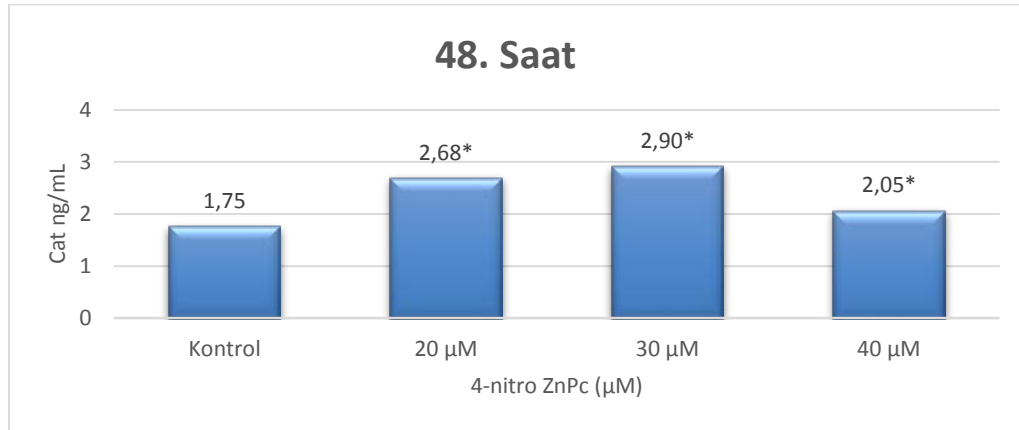
Şekil 4.4. 18. saatteki KAT enzim miktarları

4-nitro ZnPc doz gruplarının ışıkla muamelesinden sonra 36. saatteki KAT enzim miktarı verileri şekil 4.5 de verilmiştir. Kontrol grubunun KAT enzim miktarı $1,24 \pm 0,01$ ng/ml, $20 \mu\text{M}$ doz grubunda $1,78^* \pm 0,01$ ng/ml, $30 \mu\text{M}$ doz grubunda $2,18^* \pm 0,10$ ng/ml ve $40 \mu\text{M}$ doz grubunda $1,95^* \pm 0,01$ ng/ml olarak ölçülmüştür. 36. saatte doz gruplarında meydana gelen bu artışlar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Enzim miktarı kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında en yüksek miktar artışının % 76'lık bir artışla $30 \mu\text{M}$ grubunda olduğu tespit edilmiş olup, $40 \mu\text{M}$ doz grubunda % 57 oranında artış ve $20 \mu\text{M}$ doz grubunda ise % 44 oranında bir artışın olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. 36. saatteki KAT enzim miktarları

4-nitro ZnPc doz gruplarının ışıkla muamelesinden sonra 48. saatteki KAT enzim verileri şekil 4.6 da verilmiştir. Kontrol grubunun KAT enzim miktarı $1,75 \pm 0,01$ ng/ml olarak ölçülmüştür. 20 µM doz grubunda $2,68^* \pm 0,01$ ng/ml, 30 µM doz grubunda $2,90^* \pm 0,01$ ng/ml ve 40 µM doz grubunda $2,05^* \pm 0,01$ ng/ml olarak ölçülmüştür. Doz gruplarında KAT aktivitesinde meydana gelen artışlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Enzim miktarının kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında en yüksek % 65'lik bir artışla 30 µM grubunda olduğu tespit edilmiş olup, 20 µM doz grubunda % 52 oranında artış ve 40 µM doz grubunda ise % 17 oranında bir artışın olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. 48. saatteki KAT enzim miktarları

Kontrol gruplarına göre en yüksek artışın 18. saatteki 20 µM doz grubunda olduğu, 36 ve 48. saatlerdeki etkin dozun ise 30 µM olduğu görülmüştür.

4.1.3. 4-Nitro ZnPc'nin Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzimi Üzerine Etkisi

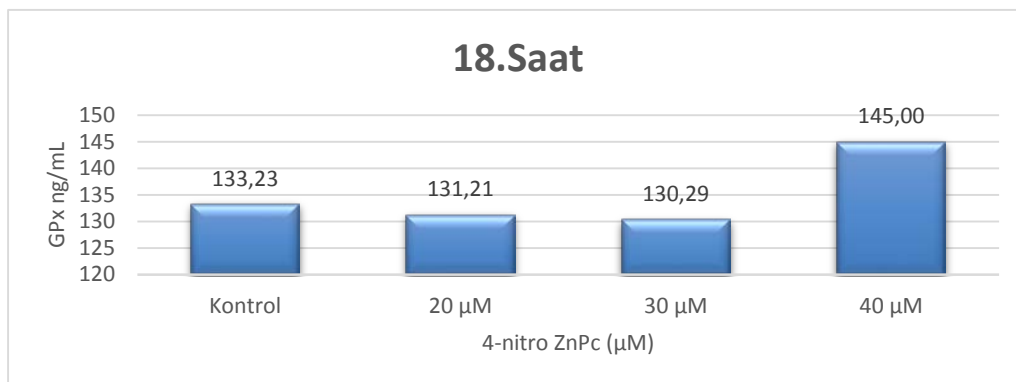
Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi, MCF-7 hücrelerine kontrol, 20, 30 ve 40 μM 4-nitro ZnPc doz gruplarıyla muamelesi ve ışık maruziyetinden sonra 18, 36 ve 48. saatlerindeki ng/ml değerleri tablo 4.3 de verilmiştir.

Tablo 4.3. Süreye bağlı GPx enzim miktarı ortalamaları

Süre	GPx (ng/ml) Ort. \pm SH
18.saat	134,93 \pm 2,23
36. saat	138,29 \pm 4,20
48.saat	144,78 \pm 5,00

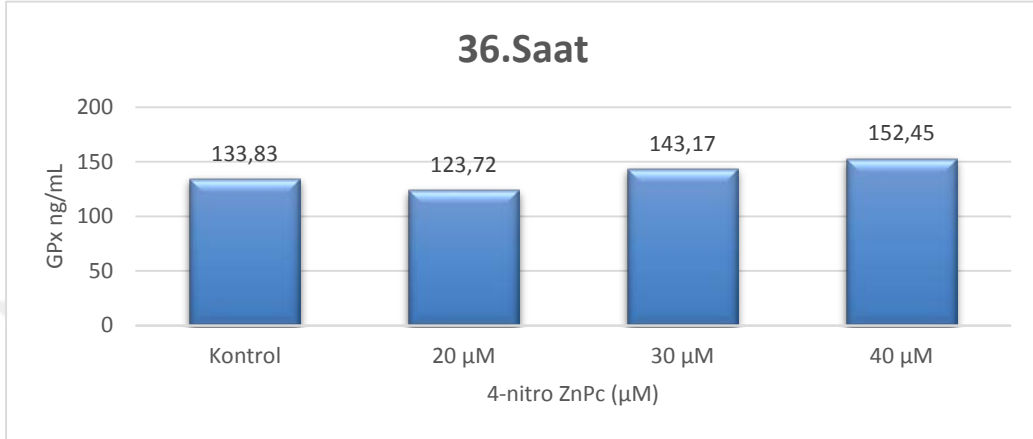
Süreye bağlı olarak GPx enzim aktivitesi 18. saate göre 36. ve 48. saatlerde artmıştır fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

4-nitro ZnPc doz gruplarının ışıkla muamelesinden sonra 18. saatteki GPx enzim miktarı verileri şekil 4.7 de verilmiştir. Kontrol grubunun enzim miktarı $133,23 \pm 0,21$ ng/ml iken 20 μM doz grubunda $131,21 \pm 0,57$ ng/ml, 30 μM doz grubunda $130,29 \pm 0,39$ ng/ml' ye düşmüştür, 40 μM doz grubunda ise $145,00 \pm 0,71$ ng/ml' ye yükselmiştir ($p > 0,05$).



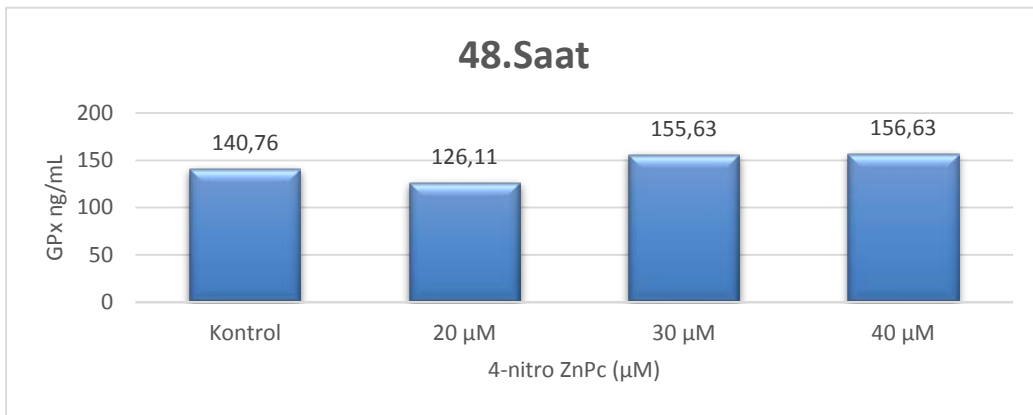
Şekil 4.7. 18. saatteki GPx enzim miktarları

4-nitro ZnPc doz gruplarının ışıkla muamelesinden sonra 36. saatteki GPx enzim verileri şekil 4.8 de verilmiştir. Kontrol grubunun enzim miktarı $133,83 \pm 6,18$ ng/ml iken $20 \mu\text{M}$ doz grubunda $123,72 \pm 0,74$ ng/ml' ye düşmüştür, $30 \mu\text{M}$ doz grubunda $143,17 \pm 0,41$ ng/ml'ye ve $40 \mu\text{M}$ doz grubunda $152,45 \pm 0,43$ ng/ml' ye yükselmiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.8. 36. saatteki GPx enzim miktarları

4-nitro ZnPc doz gruplarının ışıkla muamelesinden sonra 48. saatteki GPx enzim verileri şekil 4.9 da verilmiştir. Kontrol grubunun enzim miktarı $140,76 \pm 8,69$ ng/ml iken $20 \mu\text{M}$ doz grubunda $126,11 \pm 1,39$ ng/ml' ye düşmüştür, $30 \mu\text{M}$ doz grubunda $155,63 \pm 0,67$ ng/ml'ye, $40 \mu\text{M}$ doz grubunda ise $156,63 \pm 0,77$ ng/ml' ye yükselmiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.9. 48. saatteki GPx enzim miktarları

Glutasyon Peroksidaz enzim aktiviteleri zaman bakımından karşılaştırıldıklarında 18, 36 ve 48. saatlerdeki $40 \mu\text{M}$ doz grubunda enzim aktivitelerinde artışın olduğu görülmüştür.

4.1.4. 4-Nitro ZnPc'nin Malondialdehit (MDA) Miktarı Üzerine Etkisi

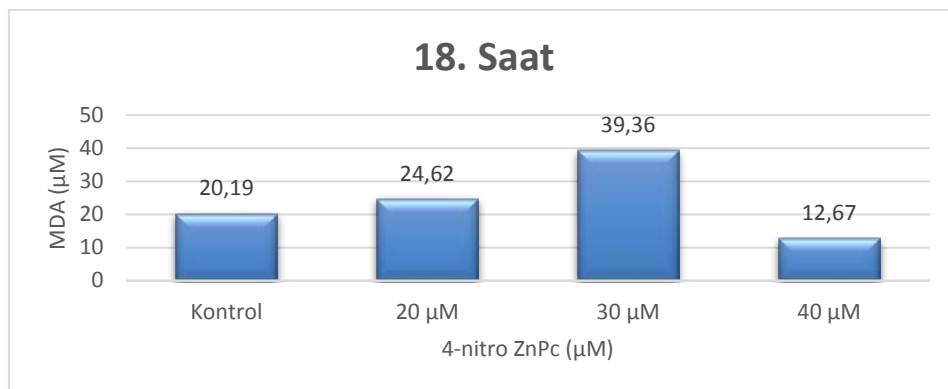
Malondialdehit miktarı, MCF-7 hücrelerine kontrol, 20, 30 ve 40 μM 4-nitro ZnPc doz gruplarıyla muamelesi ve ışık maruziyetinden sonra 18, 36 ve 48. saatlerindeki ng/ml değerleri tablo 4.4 de verilmiştir.

Tablo 4.4. Süreye bağlı MDA miktarı

Süre	MDA (μM) Ort. \pm SH
18. saat	24,21* \pm 3,69
36. saat	7,17* \pm 1,18
48. saat	12,58* \pm 2,86

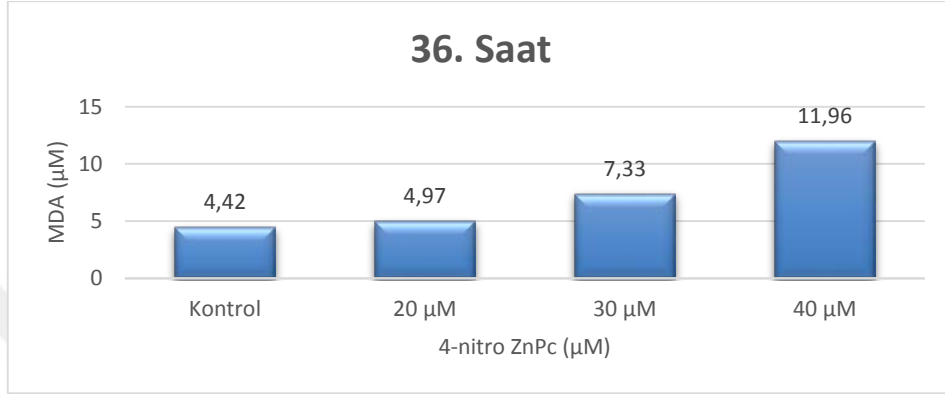
Süreye bağlı olarak MDA miktarının azalmaya başladığı görülmektedir. 18. saatten 24,21* \pm 3,69 olarak ölçülen MDA değeri 36. saatte 7,17* \pm 1,18 ve 48. saatte 12,58* \pm 2,86 olmuştur. MDA değerinde en düşük miktar 36. saatte ölçülmüş ve süreye bağlı olarak MDA miktarında meydana gelen azalmalar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

4-nitro ZnPc doz gruplarının ışıkla muamelesinden sonra 18. saatteki MDA verileri şekil 4.10 da verilmiştir. Kontrol grubunun MDA'sı 20,19 \pm 0,56 ng/ml iken 20 μM doz grubunda 24,62 \pm 1,12 ng/ml, 30 μM doz grubunda 39,36 \pm 0,36 ng/ml' ye yükselmiş olup 40 μM doz grubunda ise 12,67 \pm 1,40 ng/ml' ye düşmüştür ($p > 0,05$). MDA miktarı kontrol grubuna göre 20 μM ve 30 μM doz grubunda artış olduğu tespit edilmiş olup 40 μM doz grubunda kontrol grubundaki değerinden % 59 oranında daha düşük bir değer görülmüştür.



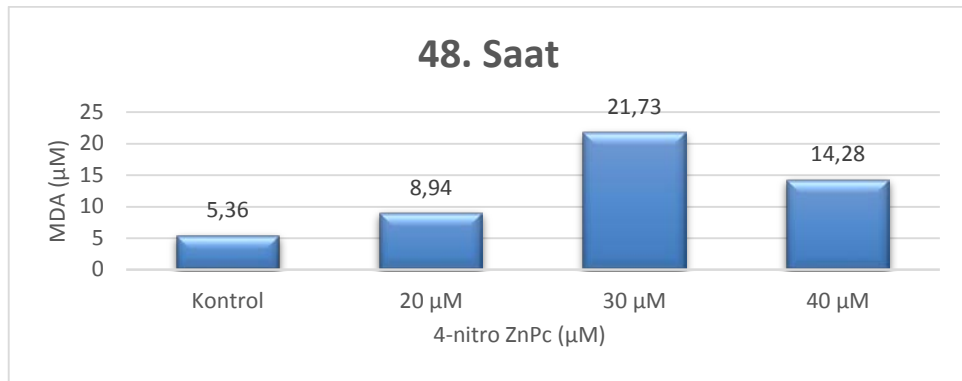
Şekil 4.10. 18. saatteki MDA miktarları

4-nitro ZnPc doz gruplarının ışıkla muamelesinden sonra 36. saatteki MDA verileri şekil 4.11 de verilmiştir. Kontrol grubunun MDA'sı $4,42 \pm 0,05$ ng/ml iken $20 \mu\text{M}$ doz grubunda $4,97 \pm 1,90$ ng/ml, $30 \mu\text{M}$ doz grubunda $7,33 \pm 0,08$ ng/ml ve $40 \mu\text{M}$ doz grubunda ise $11,96 \pm 0,46$ ng/ml' ye yükselmiştir ($p>0,05$). MDA miktarı kontrol grubuna göre bütün gruplarda artışı olup en az artışın ise $20 \mu\text{M}$ grubunda olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. 36. saatteki MDA miktarları

4-nitro ZnPc doz gruplarının ışıkla muamelesinden sonra 48. saatteki MDA verileri şekil 4.12 de verilmiştir. Kontrol grubunun MDA'sı $5,36 \pm 0,38$ ng/ml iken $20 \mu\text{M}$ doz grubunda $8,94 \pm 1,94$ ng/ml, $30 \mu\text{M}$ doz grubunda $21,73 \pm 7,89$ ng/ml ve $40 \mu\text{M}$ doz grubunda ise $14,28 \pm 3,53$ ng/ml' ye yükselmiştir ($p>0,05$). MDA kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında tüm doz grupları artış göstermiş en az artışının $20 \mu\text{M}$ doz grubunda olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. 48. saatteki MDA miktarları

4.2. Tartışma

Fotodinamik tedavide fiziksel, kimyasal ve optik özellikleri nedeni ile fotoalgılayıcı olarak fitalosiyanınların (Pc) kullanımı oldukça yaygındır. Son zamanlarda FDT de kullanım amaçlı birçok Pc sentezlenmiş olup yüksek kuantum enerjilerinden dolayı metalofitalosiyanınlar FDT de daha çok tercih edilmiştir.

Metalli Pc' ler içinde Barut ve ark. yaptığı çalışmada kullanılan Mg ve Zn' li Pc lerde FDT için MgPc nin toksik bir etkisinin olmadığını, ZnPc nin hücre canlılığını azalttığını belirterek FDT için iyi bir ajan olduğunu rapor etmişlerdir [69]. Couto ve ark. yaptığı FDT çalışmasında fotoalgılayıcı olarak Zn, Ni ve Cu' lu metalloporfirinleri kullanarak en etkin metalloporfirinin Zn bağlanmış olduğunu tespit etmişlerdir [70]. Manisso ve ark. FDT de fotoalgılayıcının metalsiz, Mg ve Zn'li Pc çalışmasında en iyi sonucun Zn metalli Pc olduğunu belirtmişlerdir [71].

Lipofilik özellik taşıyan ZnPc' lerin tümör hücre zarından sentezlenen lipoproteinler tarafından tutularak hücre içine alındığı bilinmektedir [28]. Avşar ve ark. tarafından yapılan çalışmada, 4 binaftil grup takılarak lipofilik özellik taşıyan ZnPc sentezlenmiş ve I-131 ile işaretlenerek insan meme kanser hücre hattı (MCF-7), yumurtalık kanser hücre hattı (MDAH), insan rahim ağzı kanser hücre hattı (HeLa), fare meme kanser hücre hattı (EMT-6) ve insan akciğer fibroblast hücre hattı (WI-38) hücreleri kullanılarak hücre içi alımı araştırılmış, en yüksek hücre içi alımının % 30.2 olarak MCF-7 hücrelerinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada normal hücreler ve kanser hücrelerinin ZnPc' nin hücre içi maksimum alımları karşılaştırılmış ve kanser hücrelerinin 4 kat daha fazla hücre içi alımı tespit edilmiştir [72]. FDT de kullanılan fotoalgılayıcıların hücre içi geçişinin kolay olması için lipofilik özellikte olması avantajdır ve FDT nin meme kanseri üzerinde etkinliği diğer kanserlere göre daha etkin olacağı düşünülmektedir. Yaptığımız bu çalışmada FDT de etkinliğin iyi olması amaçlı metalofitalosiyanın olarak merkez atomu Zn olan metalli Pc sentezlenmiş ve lipofilik özellik kazandırmak amaçlı ise NO₂ ile sübstiüte edilmiş 4-nitro ZnPc elde edilmiştir. Elde edilen çalışma bulgularımız; MCF-7 hücrelerde oksitativ stresin indüklendiğini ve meme kanseri tedavisi için FDT'de fotoalgılayıcı olarak 4-nitro ZnPc kullanılabileceği yönünde bilgileri desteklemektedir.

Kuzyniac ve ark. Kyse-70 (özafagus kanser hücre hattı) ve BON (pankreas kanser hücre hattı) hücre hatlarındaki FDT çalışmalarında fotoalgılayıcı olarak trietilenoksisülfonil ile sübstiüte edilmiş ZnPc kullanılmış ve ışık gücü olarak 10 joule (400-700 nm) ışık uygulanan hücrelerin % 100'üne yakın hücre ölümleri gerçekleşmiştir [73]. Lantz ve ark. yaptığı çalışmada fare deri altına yerleştirilen HT-29 CRC (kolon kanser hücre hattı) hücrelerinin oluşturduğu mikrotümoral kitleye FDT uygulanmıştır. Deri altına uygulanan FDT' de penetrasyonun arttırmak için ışık kaynağı olarak lazer kullanılmış, 3 mm derinlikteki kitleye 75 J / cm², 4,5- 5 mm

derinliğindeki kitleye $150 \text{ J} / \text{cm}^2$ ışık verilerek tümoral kitleyi % 50 küçültmüştür [74]. Bizim MCF-7 hücrelerinde yaptığımız çalışmada, 10 joule (692 nm) ışık gücü, led ışık kaynağı ile verilmiştir. Çalışma kanser hücreleri olduğundan güçlü lazer ışıklarının kullanılması gerekli görülmemiştir. Tümoral kitlelerde yapılan FDT de lazer kaynaklı ışık kaynaklarının doku penetrasyonunu arttırarak daha etkin bir sonuç vereceği düşünülmektedir.

FDT de meydana gelen singlet oksijen ve diğer serbest oksijen radikalleri kanser hücrelerinin ölümünden sorumludur. Fotosensör ışıkla aktive edildiğinde ROT lar şekillenir ve bu ilk aşamada bu toksik türevlere karşı antioksidan enzimler karşı koyar. Tüm oksijen metabolize eden hücrelerde antioksidan enzimlerden en önemlileri süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve substrata özgü peroksidaz, glutatyon peroksidazdır (GPx). SOD'lar süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene (O_2) dönüştürürken, katalaz ve peroksitler hidrojen peroksiti suya ve oksijene dönüşmesine aracılık ederler. Bu enzimlerin izoenzimleri hücrelerin pek çok kompartmanına dağılmış durumdadır. Böylece, bu enzimlerin her birinin birçok formu, hücrenin çeşitli bölümlerindeki oksidatif stresi azaltır [75].

Karadeniz teknik üniversitesinde yapılan çalışmada, fotoalgılayıcı olarak titanyum (IV) fitalosiyanın bileşiklerinin 3 türevi kullanılarak (Pc1, Pc2, Pc3) süperoksit dismutaz (SOD), 2,2-difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH) ve metal şelat bağlanma metotlarıyla antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Pc bileşiklerinin 25, 50, 75 ve 100 μM dozları kullanılarak SOD inhibisyon aktivitelerinin yüzde (%) cinsinden değerleri kontrol grubu olan bütillenmiş hidrokşianisola (BHA) göre değerlendirilerek, çalışma sonucu türevlenen üç Pc' nin de oldukça iyi aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada SOD değerlerinin, en yüksek değeri veren Pc3' ün (2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrakis-(2-{2-[3-(dimetilamino)fenoksi]etoksi}-etoksi)-ftalosiyanimato oksotitanyum(IV)iyodür) 25 μM dozunda, kontrol grubuna göre yakalaşık olarak 3 kat fazla olduğu saptanmıştır [76]. Bizim çalışmamızda ise en etkin SOD % inhibisyonu kontrol gruplarına göre 18. saatteki 40 μM doz grubunda % 46' lık bir artışın olduğu, 36. saatte 30 μM doz grubunda % 9'luk artışın olduğu, 48. saatteki 30 μM doz grubunda % 3'lük bir artışın olduğu tespit edilerek SOD enzim % inhibisyonunun tüm gruplarda arttığı belirlenmiştir. % inhibisyon artışı enzim aktivite artışını göstermekte olup süperoksit radikal miktarının artışına bağlı olarak SOD enzim aktivitesinin arttığını söyleyebiliriz.

Rehman ve ark. tarafından yapılan çalışmada; kemik iliği kök hücreleri (BMS) üzerinde yapılan fotodinamik tedavide, fotoalgılayıcı olarak tetra sulfonatofenil porfirin (TSPP) kullanılarak oksidatif stresin belirteçleri ölçülmüştür. Çalışmada ışık alan, ışısız ve kontrol grupları olarak 3 grup üzerinde çalışılmış, KAT seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre ışıklı ve ışısız gruplar arasında çok bir fark olmadığı ışıklı grubun kontrol grubuna göre % 13 bir artış sağladığı tespit edilmiştir [77]. Bizim çalışmamızda en yüksek artışın kontrol

grubunun yaklaşık 3 katı düzeyinde 18. saatte ve 20 µM dozda olduğu, 36. saatte % 76'lık artışın olduğu 30 µM doz grubunda ve 48. saatte kontrol grubundan % 65'lik artış gösteren 30 µM doz grubunda olduğu tespit edilmiştir. Katalaz enzim değerlerinin zamana bağlı artışının SOD enzim sonuçlarına göre paralel gittiğini söyleyebiliriz. Bunun nedeni olarak hücrede oluşan oksidatif stresin nedeni olan süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) artmasıyla hücre savunma mekanizmasını devreye sokar ve SOD enziminin üretimini artırır. SOD oluşan süperoksit radikallerini katalizleyerek süperoksit radikallerini hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijen molekülüne çevirir. Ortamda biriken H_2O_2 daha zararlı hidroksil radikallerine dönüşmeden savunma sistemi KAT enziminin üretimini artırır ve oluşan H_2O_2 'leri katalizleyerek su ve oksijen molekülüne dönüştürür[59].

GPx antioksidan enzimi KAT gibi H_2O_2 'leri katalizleyerek zararsız hale getirir. GPx'in Katalazdan farkı ise elektron kaynağı olarak glutasyonu (GSH) kullanmasıdır. GSH reaksiyon sonucunda oksitlenerek glutasyon disülfite (GSSG), H_2O_2 ise su molekülüne indirgenir[51]. Aykota ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; ratlar üzerine subkutan olarak walker 256 meme kanser hücre hattı ekilerek tümoral bir kitle oluşturulmuş ve bu kitle üzerine uygulanacak FDT'nin etkilerini antioksidan enzimlerinin aktiviteleriyle ölçmüşlerdir. Fotoalgılayıcı olarak Tetraetilen glikol yan zincir taşıyan özgün Zn (II) fitalosiyenin molekülü (TEG-Pc) kullanılarak, FDT tümörlerde 6. saatte GPx indüksiyonuna neden olmuş, kontrol grubunda GPx seviyesi $93,62 \pm 75,57$ mU/gr yaş doku iken tedavi grubunda $349,19 \pm 243,05$ mU/gr yaş doku olarak yaklaşık 4 kata yakın bir değer raporlamışlardır ($p=0,001$) [78]. Bizim çalışmamızda GPx enzim aktivitesinin her saat guruplarında en etkili dozunun 40 µM olduğu tespit edilerek en iyi enzim aktivitenin ise kontrol grubuna göre % 14'lük bir artışın görüldüğü 36. saatteki 40 µM dozda olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlarımıza göre süreye bağlı olarak Aykota ve ark. çalışmasındaki gibi GPx aktivitesi artmıştır. GPx enziminin artışının sebebi de CAT gibi, oluşan H_2O_2 miktarının artışı ile yükselmiştir. Bulguları genel olarak değerlendirdiğimizde SOD ve CAT enzimleri gibi GPx enzim miktarının artması FDT'nin temel mekanizması olan oksidatif stresin meydana geldiği şeklinde değerlendirilebilir.

MDA lipit peroksidasyonu son ürünü olup kimyasal olarak kararlı, ROT'a göre membranlardan daha kolay geçen toksik bir metabolittir. Lipit peroksidasyonu çalışmalarında en sık kullanılan üründür [67]. Antioksidan enzimlerin artışına paralel olarak MDA'nın azalması, antioksidanların ROT'un ortadan kaldırılmasıyla ilgilidir. Saczko ve ark. tarafından yapılan çalışmada insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) üzerinde FDT sonrası lipit peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesi ölçülmüştür. Çalışmada fotoalgılayıcı olarak photofrin II 15 µg/ml ve 30 µg/ml dozlar kullanılarak, hücreler 6 j / cm^2 ışığa maruz bırakılarak uygulanmış, 6 saat sonuna kadar MDA miktarları ölçülmüştür. Sonuç olarak 6. saate kontrol grubu 0,10 µM MDA olan

deneyde en yüksek seviyenin 15 µg/ml doz grubunda 0,49 µM MDA olarak tespit edilmiş olup hücrede bir oksidatif stresin belirtisi olduğu ve hücre hasarına neden olacak bir seviye MDA olduğu belirtilmiştir [79]. Fakat Saczco ve ark. çalışmasında 6. saatten sonra bir veri olmadığından ilerleyen saatlerde MDA miktarı hakkında bir bilgi verilmemiştir. Bizim çalışmamızda 18. saatte 30 µM doz grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat fazla MDA miktarının olduğu, aynı saatte 40 µM doz grubunda kontrol grubunun yaklaşık % 40 altına düşen MDA seviyesi tespit edilmiştir. Bu MDA miktarlarının, süreye bağlı olarak antioksidan enzimlerin artışı ile 18. saatten sonra MDA miktarında önemli bir azalma eğilimi görülmüştür. Bu azalmanın nedeni olarak; antioksidan enzimlerinin artmasıyla ortamda azalacak olan ROT'un, hücredeki lipid peroksidasyonunda azaltmış olduğu düşünülmektedir.

Fotodinamik tedavinin etkinliğini artırmak için ortamdaki antioksidan enzimleri bloke ettiğimizde iyi bir sonuç alınacağı düşünülmektedir. Jakub ve ark. yaptıkları çalışmada FDT etkinliğini artırmak için tümör taşıyan farelere FDT uygulamasında SOD inhibitörü olan 2-metoksiestradiol (2-MeOE₂) verilerek FDT etkinliği incelenmiştir. Sonuç olarak 2-MeOE₂ tarafından SOD aktivitesinin inhibisyonunun, PDT'nin antitümör etkinliğini güçlendirebilen etkili bir tedavi yöntemi olduğunu belirtmişlerdir [80].

FDT de oksidatif stres istenen bir durumdur. Hücrede oluşan ROT hücrede hasar oluşturur ve bu hasarı önlemek için hücre, savunma mekanizması olarak antioksidan enzim artışı yaparak ROT'u temizlemeye çalışır. Bu nedenle oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin arttığını gözlemleriz[52]. Bizim çalışmamız da bu sonuçları desteklemektedir

FDT de etkinliğinin tespiti için sinlet oksijen ve ROT miktarını direkt olarak ölçen spin rezonans spektrometrisidir. Bununla ileri teknik donanım ve çok duyarlı olmasından dolayı tercih edilmemektedir. FDT de oksidatif stresi belirlemede yarılanma ömrü kısa olduğu için antioksidan parametrelerin belirlenmesi daha geçerli bir durumdur [81].

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak; Yapılan bu tez çalışmasında kullanılan 4-nitro ZnPc'nin 692 nm de en yüksek emilim gösterdiği ve bu emilimdeki enerjiyi sistemler arası geçişle oksijene aktararak singlet oksijen ve ROT oluşumu sağlayarak oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir. Oksidatif stres SOD, KAT ve GPx enzim miktarı artışıyla tespit edilmiştir. Antioksidan enzimlerin süreye bağlı olarak arttığı belirlenmiş olup enzim artışları en yüksek 48. saatte meydana gelmiştir. En etkin 4-nitro ZnPc dozunun ise 30 ve 40 µM olduğu belirlenmiştir.

MDA miktarının da süreye bağlı olarak azaldığı belirlenmiş olup bu azalmanın antioksidan enzim artışına bağlı olduğu gözlemlenmiştir.

Fotodinamik tedavide etkinliğin, antioksidan enzim parametrelerin ve MDA miktarının ölçülerek belirlenmesi uygundur.

Etkin bir FDT de oksidatif stres istenen bir durumdur. Elde ettiğimiz bulgular oksidatif strese karşı antioksidan savunma sisteminin devreye girdiğini kanıtlamaktadır. Antioksidan enzimler FDT etkinliğini de azaltıyor olabilir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda Sentezlenen 4-nitro ZnPc'nin meme kanserinde FDT için etkisi antioksidan enzim inhibitörleri ile birlikte kullanıldığında daha da artacağı düşünülmektedir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda 4-nitro ZnPc, meme kanseri tedavisi için kullanılan ilaçlarla kombine edilerek başarılı bir FDT için önerilebilir.

Çalışma sonucunda FDT ile MCF-7 hücre hattında antioksidan enzim aktivite ve MDA seviyelerinden hücrelerde oksidatif stresin oluşturulduğu anlaşılmış olup, savunma mekanizması olan bu enzimlerin hücreleri ne seviyede koruduğu ve oksidatif hasarın ne düzeyde olduğunun anlaşılması için sitotoksik ve genotoksik çalışmaların yapılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Stewart, B. W. ve Wild, C. P. (2014). World Cancer Report 2014. Lyon.
- [2]. WHO. (2018). Cancer. 23 Şubat 2020 tarihinde www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer adresinden erişildi.
- [3]. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. (2018). Türkiye Kanser İstatistikleri 2015. Ankara.
- [4]. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. (2016). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388 (10053), 1659-1724.
- [5]. Hönigsmann, H., Szeimies, R. M, ve Knobler, R. (2008). Photochemotherapy and Photodynamic Therapy. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 7, 2249-2262.
- [6]. Rak, J., Pouckova, P., Benes, J. Ve Vetvicka, D. (2019). Drug Delivery Systems for Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. *Anticancer Research*, 39, 3323-3339. doi:10.21873/anticancer.13475.
- [7]. Erdem, S. S., Parlar, R. E., Obeidin, V.A. ve Şahin, U. (2017). Skov-3 Over Kanseri Hücre Hattında Fotodinamik Terapi Uygulaması. *Haydarpasa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 57 (3), 119–124. doi:10.14744/hnhj.2017.25238.
- [8]. Yanoa, S., Hirohara, S., Obatac, M., Hagiya, Y., Ogura, S., Ikeda, A., Kataoka, H., Tanaka, M. ve Johe, T. (2011). Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12, 46-47.
- [9]. Harputlu, E. (2014). Yeni Tür Makrohalkalı Yapıların Sentezi ve Kanser Tedavi Potansiyelinin in vitro Saptanması. Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin.
- [10]. Foote, C.S. (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photobiology*, 54, 659.
- [11]. Castano, A. P., Mroz, P. ve Hamblin, M. R. (2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, 6, 535-545.
- [12]. Kiesslich, T., Krammer, B., Plaetzer, K. (2004). Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 13, 2189–2204.
- [13]. Oniszczyk, A., Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, T. ve Kasprzak, K. (2016). The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 912-929.
- [14]. Jiang, Z., Wei, J., Yang, T., Wang, J. Ve Lee, J. (2014). Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 98-104. doi:

10.1016/j.jpba.2013.05.014.

- [15]. MacDonald, I. J., Dougherty, T. J. (2001). Basic principles of photodynamic therapy, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 5, 2, 105-129.
- [16]. Robinson, P.J., Carruth, J.A.S., Fairris G.M. (1988). Photodynamic therapy: a better treatment for widespread Bowen's disease. *British Journal of Dermatology*, 119, 59-61.
- [17]. Pennington, D.G., Waner, M., Knox, A. (1988). Photodynamic therapy for multiple skin cancers. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 82, 1067-1071.
- [18]. Aykota, M. R. (2014). Tetraetilen glikol yan zincir taşıyan özgün zn (ii) ftalosiyanın molekülünün ratlarda deneysel tümör modelinde fototoksitesinin incelenmesi. Doktora tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.
- [19]. Zheng, B. Y., Shen, X. M., Zhao, D. M., Cai, Y. B., Ke, M. R. ve Huang, J. D. (2016). Silicon(IV) phthalocyanines substituted axially with different nucleoside moieties. Effects of nucleoside type on the photosensitizing efficiencies and in vitro photodynamic activities. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 159, 196-204.
- [20]. Taquet, J. P., Frochot, C., Manneville, V. ve Barberi-Heyob, M. (2007). Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 15, 1673- 1687.
- [21]. Bekaroğlu, Ö. (2014). History, development, and a new concept of phthalocyanines in Turkey. *Turkish Journal Chemistry*, 38, 903 – 922. doi:10.3906/kim-1404-83.
- [22]. Hanack, M., Heckmann, H., Polley, R. (1998). Phthalocyanines and Related Compounds. *Meth. Org. Chem (houben-Weyl)*, E9d, 717–846.
- [23]. Durmus, M., Yaman, H., Göl, C., Ahsen, V. ve Nyokong, T. (2011). Water-soluble quaternized mercaptopyridine-substituted zinc-phthalocyanines: Synthesis, photophysical, photochemical and bovine serum albumin binding properties. *Dyes and Pigments*, 91, 153-163.
- [24]. Zheng, G., Chen, J., Stefflova, K., J arvi, M., Li, H. ve Wilson, B. C. (2007). Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation. *Pnas*, 104 (21), 8989-8994. doi:org/10.1073/pnas.0611142104.
- [25]. Lo, P. C., Chen. J., Stefflova, K., Warren, M. S., Navab, R., Bandarchi, B., Mullins, S., Tsao, M., Cheng, J. D. ve Zheng, G. (2009). Photodynamic Molecular Beacon Triggered by Fibroblast Activation Protein on Cancer-Associated Fibroblasts for Diagnosis and Treatment of Epithelial Cancers. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52 (2), 358-368. doi:10.1021/jm801052f.
- [26]. Zorlu, M. B. (2013). Farklı Süstitüe Ftalonitril ve Ftalosiyanın Türevlerinin Sentezi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi. İstanbul.
- [27]. Berard, V., Rousseau, J.A., Cadorette, J., Hubert, L., Bentourkia, M., Van Lier, J.E., Lecomte, R., 2006. Dynamic Imaging of Transient Metabolic Processes by Small-Animal PET for the Evaluation of

Photosensitizers in Photodynamic Therapy of Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, 47 (7), 1119-1126.

[28]. Fabris, C., Valduga, G., Miotto, G., Borsetto, L., Jori, G., Garbisa, S., Reddi, E., 2001.

Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Research*, 61 (20), 7495–7500.

[29]. Nepali, K., Lee, HY ve Liou, JP. (2018). Nitro Group Containing Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*. 62, 6, 2851-2893. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00147.

[30]. Daniell, M. D., Hill, J. S. (1991). A History of Photodynamic Therapy. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 61, 340-348.

[31]. Epstein, J. H. (1990). Phototherapy and photochemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 322, 1149-1151.

[32]. Raab, O. (1900). The action of fluorescent material on infusorien. *Zoo Biology*, 39, 524–546.

[33]. Navaeipour, F., Afsharan, H., Tajalli, H., Mollabashi, M., Ranjbari, F., Montaseri, A. ve Rashid, M.R. (2016). Effects of continuous wave and fractionated diode laser on human fibroblast cancer and dermal normal cells by zinc phthalocyanine in photodynamic therapy: a comparative study. *Photochemistry and Photobiology*, 30177-4 (16), 1011-1344. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.06.017.

[34]. Moreira, L. M., Dos Santos, F. V., Lyon, J. P., Maftoum-Costa, M., Pacheco-Soares, C. ve Soares Da Silva, N. (2008). Photodynamic therapy: Porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers. *Australian Journal of Chemistry*, 61, 741-754. doi: 10.1071/CH08145.

[35]. Kawczyk-Krupka, A., Bugaj, A. M., Latos, W., Zaremba, K., Wawrzyniec, K., Kucharzewski, M. ve Sieron, A. (2016). Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment—The state of the art in preclinical research. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 13, 158-174.

[36]. Aslan, R., Şekeroğlu, R. ve Bayıroğlu, F. (1995). Serbest Radikal Türlerinin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Hücrel Antioksidan Savunma. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1 (2), 137-142.

[37]. Bast, A., Haenen, G. R. M. ve Doelman, J. A. (1991). Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*, 91 (3), 2-13.

[38]. Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C. (1985). Oxygen radicals and the nervous system. *Trends in Neurosciences*, 8, 22-26.

[39]. Sohal, R.S., Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 128, 379

[40]. Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82,2, 291-295.

[41]. Devasagayam, T. P. A., Bloor, K. K. ve Ramsarma, T. (2003). Methods for estimating lipid

peroxidation: Analysis of merits and demerits. *Indian Journal Biochemistry and Biophysics*, 40 (5), 300-308

[42]. Halliwell, B ve Auroma, O.I. (1993). *DNA and Free Radicals*. Boca raton press.

[43]. Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S. ve Lele, R. D. (2004). Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794-804.

[44]. Dröge, W. (2001). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82, 47-95.

[45]. Lander, H. M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb Journal*, 11, 118-124.

[46]. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82, 47-95.

[47]. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Annals of Botany*, 91, 179-94.

[48]. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J. ve Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell. Biochemistry*, 266, 37-56.

[49]. Niki, E. (1993). Antioxidant defenses in eukaryotic cells. *Free radicals: From basic science to medicine*. 365-373.

[50]. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., ve Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.

[51]. Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54, 287-293.

[52]. Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E.Ş. ve Yılmaz, B. (2019). Oksidatif Stres Durumunda Antioksidan Enzimlerin Rolü – Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx). *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 26 (3), 362-369. doi:10.17343/sdutfd.566969.

[53]. Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(1), 91-100.

[54]. Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C. ve Mecocci, C. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 841-852.

[55]. Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures,

evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 33 (3), 337-349. doi:10.1016/S0891-5849(02)00905-X

[56]. Krishnamurthy, P., Wadhvani, A. (2012). Antioxidant enzymes and human health. Antioxidant enzyme. InTech. doi:10.5772/48109, 2012.

[57]. Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., Freeman, B.A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 22028-22034.

[58]. Surai, P.F. (2006). Selenium in nutrition and health. Nottingham: Nottingham University Press.

[59]. Marklund, S.L. (1984). Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochemical Journal*, 222, 649-655.

[60]. Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 192-208.

[61]. Kehrer, J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149 (1), 43-50. doi:10.1016/S0300-483X(00)00231-6.

[62]. Kirkman, H.N., Galiano, S., Gaetani, G.F. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *Journal Biology Chemistry*, 262(2), 660-666.

[63]. Góth, L., Rass, P., Páy, A. (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 8, 141-149.

[64]. Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B. (2009). Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *The Journal of Clinical Investigation*.119(7), 2074-2085.

[65]. Sanyal, J., Bandyopadhyay, S.K., Banerjee, T.K., Mukherjee, S.C., Chakraborty, D.P., Ray, B.C., Rao, V.R. (2009). Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*,13 (2), 129-132.

[66]. Ayala, A., Munoz, M.F., Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438, 31. doi:10.1155/2014/360438.

[67]. Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. (1991). Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11 (1), 81-128.

[68]. Frankel, E.N., Neff, W.E. (1983). Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta*, 754 (3), 264-270.

[69]. Barut, B., Yalçın, C.Ö., Demirbaş, Ü. (2021). The water soluble Zn(II) and Mg(II) phthalocyanines: Synthesis, photochemical, DNA photodamage and PDT effects against A549 cells. *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*, 405, 112946. doi:10.1016/j.jphotochem.2020.112946.

- [70]. Couto, G.K., Juniora, J.K.R., Pacheco, B.S., Simões, L.F., Paschoala, J.D., Seixasa, F.K., Acunhab, T.V., Iglesias, B.A., Collares, T. (2020). Zinc(II), copper(II) and nickel(II) ions improve the selectivity of tetracationic platinum(II) porphyrins in photodynamic therapy and stimulate antioxidant defenses in the metastatic melanoma lineage (A375). *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 31, 101942. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101942.
- [71]. Manisova, B., BINDER, S., Malina, L., Jiravova, J., Langova, K. and Kolarova H. (2015). Phthalocyanine-mediated Photodynamic Treatment of Tumoural and Non-tumoural cell lines. *Anticancer Research*, 35, 3943-3952.
- [72]. 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.
- [73]. Kuzyniaka, W., Ermilova, E.A., Atilla. D., Gürek, A.G., Nitzsche, B., Derkow, K., Hoffmann, B., Steinemann, G., Ahsen, V., Höpfner, M. (2016). Tetra-triethyleneoxysulfonyl substituted zinc phthalocyanine for photodynamic cancer therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 13, 148–157.
- [74]. Lantz, J.M., Meyer, C., Saussine, C., Leberquier, C., Heysel, F., Miehé, J. (1992). Experimental photodynamic therapy with a copper metal vapor laser in colorectal cancer. *International Journal Cancer*, 52, 491-498.
- [75]. Weydert, C.J. and Cullen, J.J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 5, 51–66. doi: 10.1038/nprot.2009.197.
- [76]. Barut, B. (2016). Suda çözünür Ti (iv) ftalosiyanın bileşiklerinin dna bağlanma, dna kesim, antioksidan, antimikrobiyal aktivitelerinin ve topoizomeraz I inhibitörünün incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.
- [77]. Rehman, F.U., Zhao, C., Wu, C., Jiang, H., Selke, M. ve Wang, X. (2015). Influence of Photoactivated Tetra Sulphonatophenyl Porphyrin and TiO₂ nanowhiskers on Rheumatoid Arthritis infected Bone Marrow Stem Cells proliferation in vitro and oxidative stress biomarkers in vivo. *RSC Advances*. doi: 10.1039/C5RA23480H.
- [78]. Aykota, M.R. (2014). Tetraetilen glikol yan zinc taşıyan özgün Zn (II) ftalosiyanın molekülünün ratlarda deneysel tümör modelinde fototoksitesinin incelenmesi. Doktora tezi. Pamukkale Üniversitesi, Denizli.
- [79]. Sączko, J., Kulbacka, J., Chwilkowska, A., Lugowski, M., Banach, T. (2004). Levels of lipid peroxidation in A549 cells after PDT in vitro. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku*, 49, 1.

- [80]. Goła J., Nowis, D., Skrzycki, M., Czeczot, H., Baran, A., Wilczyn, G.M., Makowski, M., ve ark. (2003). Antitumor Effects of Photodynamic Therapy Are Potentiated by 2-Methoxyestradiol. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 1, 407-414.
- [81]. Tietz, N.W. (1995). *Clinical Guide to Laboratory Tests*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania.

