

## Araştırma Makalesi | Research Article

## MEME KANSERİ HÜCRESİNDE METİLEN MAVİSİ ARACILI FOTODİNAMİK TERAPİ VE DOKSORUBİSİNİN KOMBİNASYONEL ETKİSİ

### COMBINATIONAL EFFECT OF METHYLENE BLUE-MEDIATED PHOTODYNAMIC THERAPY AND DOXORUBICIN ON BREAST CANCER CELLS

 Kübra Açıkalın Coşkun<sup>1\*</sup>,  Elif Cansu Abay<sup>2</sup>,  Lütfi Tutar<sup>3</sup>,  Yusuf Tutar<sup>4</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. <sup>2</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. <sup>3</sup>Ahi Evran Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Kırşehir, Türkiye. <sup>4</sup>Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Rize, Türkiye.



#### ÖZ

**Amaç:** Meme kanseri kadınlarda görülen en sık kanser olup görülme sıklığı giderek artmaktadır. Günümüzde meme kanserinin tedavisinde cerrahi tedavi, radyasyon tedavisi ve kemoterapi gibi birçok yöntem vardır. Kemoterapi tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötiklerden birisi olan doksorubisin (DOX) belirli bir dozun üzerinde tehlikeli yan etkilere ve ilaç direncine neden olur. Mevcut tedavilere kıyasla kombinasyon tedaviler son zamanlarda bu sorunların üstesinden gelmek için önem kazanmıştır. Bir fotoduyarlayıcı ile uygulanan fotodinamik terapi klinikte birçok kanser türünde uygulanmaktadır. Bu çalışma ile meme kanseri tedavisinde kullanılan DOX'u fotodinamik terapi (PDT) ile aktive edilen metilen mavisi (MB) ile kombinasyon uygulayarak DOX'un uygulanmasında düşük toksisite ile yüksek etkinlik alınması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyonlarda DOX, MB, MB-PDT, DOX-PDT, MB-PDT+DOX ve DOX+MB-PDT olacak şekilde ayrı ayrı ve kombinasyon tedaviler denenmiştir. Hücre canlılığını belirlemek için MTT testi gerçekleştirilmiş ve hücrelerin %50 canlılık gösterdiği IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, MB ve DOX arasındaki etkileşimin derecesini belirlemek için kombinasyon indeksi (CI) değeri bulunmuştur. Ayrıca DOX ve fotodinamik terapi kombinasyonunun meme kanseri hücrelerine karşı apoptotik potansiyelini belirlemek için apoptotik ve antiapoptotik belirteçlerin (Bax, Bcl-2) mRNA ekspresyon seviyelerine RT-PCR ile bakılmıştır.

**Bulgular:** MB-PDT ve ardından düşük konsantrasyonda DOX (428.4 nM) kombinasyonunun, tek başına DOX'a ve önce DOX ardından MB-PDT'ye kıyasla kanser hücresi ölümünü indüklemeye daha iyi bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda bu kombine uygulama Bcl-2 gen ekspresyonunu düşürürken, Bax gen ekspresyonunu yükselterek apoptotik potansiyelini göstermiştir.

**Sonuç:** Doksorubisin ve metilen mavisi ile indüklenmiş fotodinamik terapi kombine tedavisi meme kanseri hücreleri üzerinde sinerjik, sitotoksik ve apoptotik etkiler göstererek, umut verici bir yaklaşım sunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Meme kanseri, doksorubisin, fotodinamik terapi, metilen mavisi, kombinasyon tedavisi.

#### ABSTRACT

**Objective:** Breast cancer is the most common cancer in women and its incidence is increasing. Today, there are many methods in the treatment of breast cancer, such as surgery, radiation therapy and chemotherapy. Doxorubicin (DOX), one of the chemotherapeutics commonly used in chemotherapy treatment, causes dangerous side effects and drug resistance above a certain dose. Thus, it reduces the effect of the treatment. Compared to existing treatments, combination therapies have recently gained importance to overcome these problems. Therefore, this study aimed to reduce the dose of DOX used in breast cancer treatment and increase the effectiveness of the treatment by combining it with methylene blue (MB) activated by photodynamic therapy (PDT).

**Methods:** Different concentrations of DOX, MB, MB-PDT, MB-PDT, DOX-PDT, MB-PDT+DOX and DOX+MB-PDT were tested separately and in combination on MCF-7 breast cancer cell line. MTT assay was performed to determine the cell viability and IC<sub>50</sub> values were calculated where cells showed 50% viability. In addition, the combination index (CI) value was found to determine the degree of interaction between MB and DOX. In addition, mRNA expression levels of apoptotic and antiapoptotic markers (Bax, Bcl-2) were analysed by RT-PCR to determine the apoptotic potential of DOX and photodynamic therapy combination against breast cancer cells.

**Results:** The combination of MB-PDT followed by low concentrations of DOX (428.4 nM) had a better effect in inducing cancer cell death compared to DOX alone and DOX followed by MB-PDT. At the same time, this combined treatment showed its apoptotic potential by decreasing Bcl-2 gene expression and increasing Bax gene expression.

**Conclusion:** The combined treatment of doxorubicin and methylene blue-induced photodynamic therapy has shown synergistic, cytotoxic and apoptotic effects on breast cancer cells, offering a promising approach.

**Keywords:** Breast cancer, doxorubicin, photodynamic therapy, methylene blue, combination therapy.

\*Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: Kübra Açıkalın Coşkun; İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

Phone/Telefon: +90 (532) 436 14 50, e-mail/e-posta: kubraacikalincoskun@aydin.edu.tr

Submitted/Başvuru: 22.06.2024

Accepted/Kabul: 30.05.2025

Published Online/Online Yayın: 30.06.2025

## Giriş

En yaygın ve öldürücü hastalıklardan biri olan kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve bulundukları bölge dışına yayılarak metastaz yapması ile gelişir. Akciğer kanserinden sonra ikinci sıklıkta görülen kanser çeşidi olan meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türünün başında gelir.<sup>1</sup>

Çeşitli kriter ve sınıflandırmalar olmasına rağmen, en temel meme kanseri türleri üç gruba ayrılabilir; meme kanseri eksprese eden hormon reseptörü (östrojen reseptörü (ER+) veya progesteron reseptörü (PR+)), insan epidermal reseptörü 2'yi eksprese eden meme kanseri (HER2+) ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC) (ER-, PR-, HER2-).<sup>2</sup> TNBC, ER, PR veya HER2 eksprese etmez ve meme kanserlerinin %15-20'sinde görülmektedir. HER2 ise meme kanserlerinin %20-25'ini oluşturur.<sup>3</sup> Meme kanseri türleri içerisinde en agresif olanı olan TNBC çoğunlukla beyin, kemikler, akciğerler ve karaciğere metastaz yapar. Bununla birlikte, çoğu zaman tanı anında ileri evrelerde fark edildiğinden yüksek nüfus oranına ve düşük hayatta kalma oranına yol açar.<sup>4</sup>

Cerrahi müdahale, radyasyon ve kemoterapi kanser tedavisinde kullanılan 3 temel tedavi yöntemidir. Kullanılan en yaygın yöntem olan kemoterapi sürecinde birden fazla anti-kanser ilaç uygulanarak başarıya ulaşma hedeflenir. Ancak kanserin mutasyona uğraması, hastalarda ilaç direncinin gelişmesi, çeşitli yan etkilerin görülmesi ya da metastatik meme kanserinin son evrede tanısının konması bu başarıyı gölgelemektedir.<sup>5</sup> Bu nedenle pek çok anti-kanser ilaç, hastalar üzerinde beklenen etkisini gösterememekte ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır. Bu kapsamda kombine tedaviler önem kazanmaktadır.

Fotodinamik terapi (PDT) malign tümörlere karşı seçici sitotoksik aktivite gösterirken normal dokuya düşük toksisite gösteren bir tedavi olup son yıllarda kanser tedavisinde büyük ilgi görmüştür.<sup>6</sup> Üç temel bileşeni vardır; ışığa duyarlılaştırıcılar (photosensitizer), belirli dalga boylarında ışık ve oksijen. Tek başlarına toksik değildir. Ancak, belirli bir dalga boyundaki ışıkla uyarılan ışığa duyarlılaştırıcıların oksijenle moleküler reaksiyona girmesiyle hedef dokuda reaktif oksijen türlerini oluşturur. Böylece apoptoz veya nekroz yoluyla tümör hücrelerinin ölümüne yol açar.<sup>7</sup> Metilen mavisi (MB), PDT tedavisinde ışığa duyarlılaştırıcı olarak kullanılan bir boyadır. MB, metiltiyoninyum klorür olarak da bilinir. Hidrofilik ve fenotiyazin türevidir. 660 nm'de maksimum optik absorpsiyon sunar.<sup>8</sup> MB ışık varlığında aktive olurken karanlıkta toksisite üretmez. MB ayrıca düşük maliyetli bir ışığa duyarlılaştırıcıdır. MB, tüm bu özellikleriyle PDT'de kullanılan iyi bir ışığa duyarlılaştırıcı seçeneğidir.<sup>9</sup>

Doksorubisin (DOX), *Streptomyces peucetius* türlerinden izole edilen bir antrasiklin antibiyotiktir. Adriamisin olarak da bilinir ve birçok kanser çeşidinde antikanser ilaç olarak kullanılmaktadır. DOX enterkalasyon yoluyla DNA ile etkileşerek DNA polimerazı inhibe eder. Böylece nükleik asit sentezini durdurur. Ayrıca, DNA replikasyonunda önemli rolü olan topoizomerez II ile

etkileşime girerek enzimin ilerlemesini engeller.<sup>10</sup> Ne yazık ki DOX oldukça etkili olmasına rağmen kanser hücreleri için seçici değildir ve toksisitesi kullanımını ciddi şekilde sınırlamaktadır. Bu toksisite sonucunda kalp, beyin, karaciğer ve böbrekler etkilenir ve bu etkilerin görülmesi yıllar alabilir.<sup>11</sup>

Apoptozun moleküler mekanizmalarındaki kilit düzenleyicilerden biri Bcl-2 ailesidir. Bu proteinler hücre membranıyla ilişkili veya sitozolde serbest halde bulunur. İntrinsik apoptozu düzenleyen mitokondrinin hücre içi membranlarında işlev görürler. Bu aile Bax gibi proapoptotik ve Bcl-2 gibi antiapoptotik üyeleri içerir. Hem sitozolik hem de mitokondriyal Bcl-2 ailesi üyelerinin ekspresyon seviyelerindeki değişime bağlı olarak aralarındaki iletişim, hücrenin ölüm veya hayatta kalma kaderini belirler.<sup>12,13</sup>

Kombinasyon tedavisinde iki veya daha fazla tedavi kullanılarak tedavinin etkinliğini arttırmak amaçlanır. Birçok araştırma kombine tedavinin tümör büyümesini ve ilaç direncini azaltabileceğini göstermiştir.<sup>14,15</sup> Bu yüzden bu çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hattında DOX ve MB ile aktive edilen PDT'nin kombine tedavisi uygulanarak DOX toksisitesini ve yan etkilerini azaltmak amaçlanmıştır.

## Yöntem

### Hücre Kültürü

Ticari olarak temin edilen MCF-7 hücre hattı (HTB-22, The American Type Culture Collection; ATCC, Manassas, VA, USA). 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ve %95 nem içeren ortamda %10 fetal bovin serumu (FBS, 12103C, Sigma-Aldrich, USA), yüksek glikozlu Dulbecco modifiye Eagle's besiyeri (DMEM, ECB7501L, Euroclone S.p.A, Italy) ve 1% Penicillin- streptomycin (10,000 U/mL, Capricorn Scientific, Germany) içeren besiyerinde kültüre edilmiştir. %80-90 yoğunluğa ulaşan MCF-7 Dulbecco's fosfat buffer saline (DPBS, ECB4004, Euroclone S.p.A, Italy) ile yıkanıp %0.25 Tripsin-EDTA (T4049, Sigma-Aldrich, USA) ile kaldırılmıştır. Tripsin-EDTA-hücre karışımı 1200 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve taze besiyeri eklenmiştir. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara (6x10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk, Euroclone S.p.A., Italy) ekilerek inkübe edilmiştir.

### MTT Testi

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) kolorimetrik bir yöntemdir. Hücre canlılığının, çoğalmasının ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmek için kullanılır. MTT sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur ve metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor formazan kristallerine indirgenir. Belirli bir miktar formazanın DMSO içerisinde çözünmesiyle oluşan bu mor çözeltinin absorbansı 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Oluşan mor rengin miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.<sup>16</sup>

Kombine olarak kullanımda Doksorubisinin ve MB'nin etkin dozunu (IC<sub>50</sub>) belirlemek için MCF-7 hücreleri 96

kuyucuklu plakalara  $6 \times 10^4$  hücre/kuyucuk şekilde ekilmiştir. Hücrelerin 24 saat kuyucuklara tutunmasının ardından DOX ve MB için 32-16-8-4-2-1-0,5-0,25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda 5 tekrar olacak şekilde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Etken maddenin uygulanmadığı hücre grubu kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Deney süresi sonunda tüm kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılıp kuyucuklara 100  $\mu\text{L}$  besiyeri ile 20  $\mu\text{L}$  (5 mg/mL) MTT solüsyonu (T0793(DB0362), Bio Basic Inc., Markham ON, Canada ) eklenmiştir. 3 saat inkübasyonun ardından her kuyucuğa 100  $\mu\text{L}$  DMSO (MERCK) ilave edilmiştir. Absorbans değerleri 570 nm'de ELISA okuyucuda (Multiskan GO-Thermo) ölçülmüştür. Sonuçlar GraphPad Prism 9 (California, USA) programı kullanılarak hücre canlılığının %50 azalmasını sağlayan doz ( $\text{IC}_{50}$ ) değerleri hesaplanmıştır. Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 9 (California, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.  $\pm$  SD olarak ifade edilmiştir. Veriler One-Way ANOVA ile analiz edilmiştir. 0.05'ten küçük p-değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

#### Fotodinamik Terapi

Hücreler taze kültür ortamı uygulanarak 96 kuyucuklu plakaya ekilmiş ve ardından  $37^\circ\text{C}$ 'de 24 saat boyunca %5  $\text{CO}_2$  altında inkübe edilmiştir. Ardından, hücrelere farklı konsantrasyonlarda MB (32-16-8-4-2-1-0,5-0,25  $\mu\text{M}$ ) ve DOX (32-16-8-4-2-1-0,5-0,25  $\mu\text{M}$ ) içeren besiyerinde 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler PBS tamponu ile yıkandı ve ardından 660 nm ile 60 sn ışınlama yapılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında Hücrelerin canlılığını belirlemek için MTT testi uygulanmıştır. Her deney 5 kez tekrarlanmıştır. Lazer ve ilaç uygulanmayan hücreler kontrol olarak eklenmiştir.

#### MCF-7 Hücrelerinde MB-PDT ve DOX ile Kombinasyon Tedavi

Bu çalışmalar için iki farklı kombinasyon yapılmıştır.

##### Önce MB-PDT Ardından DOX ile Tedavi

96 kuyucuklu plakalara  $6 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen MCF-7 hücreleri tutunması için 24 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$ 'de inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda hücrelere MB için hesaplanan  $\text{IC}_{50}$  değerinin altındaki bir konsantrasyon (3,5  $\mu\text{M}$ ) 5 tekrar olacak şekilde taze besiyeri ile eklenmiş ve 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüm kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılıp PBS ile yıkanmıştır. Hücrelere 660 nm dalga boyu ile 60 saniye lazer ışığı uygulanmıştır. Daha sonra hücrelere farklı konsantrasyonlarda DOX (32-16-8-4-2-1-0,5-0,25  $\mu\text{M}$ ) ilave edilip ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücre canlılığını belirlemek için MTT testi gerçekleştirilmiştir.

##### Önce DOX Ardından MB-PDT ile Tedavi

MCF-7 hücreleri  $6 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücrelere farklı konsantrasyonlarda DOX (32-16-8-4-2-1-0,5-0,25  $\mu\text{M}$ ) ilave edilip ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda tüm kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılıp PBS ile yıkanmıştır.

3,5  $\mu\text{M}$  MB içeren taze besiyeri ile 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından hücrelere 660 nm dalga boyu ile 60 saniye lazer ışığı uygulanmış olup hücre canlılığını belirlemek için MTT testi gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca tedavileri daha iyi karşılaştırmak amacıyla DOX+PDT (lazer), MB+PDT, MCF-7+PDT tedavileri uygulanmıştır. Uygulanan DOX ve MB dozları 32-16-8-4-2-1-0,5-0,25  $\mu\text{M}$ 'dir. 5 tekrar olacak şekilde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 660 nm dalga boyu ile 60 saniye lazer ışığı uygulanmış ve hücre canlılığını belirlemek için MTT testi yapılmıştır.

#### Kombinasyon indeksi (CI) Hesaplanması

MB ve DOX arasındaki sinerjik etki, CompuSyn yazılım programı (Chou and Martin, 2005, Compusyn Inc, USA) kullanılarak hesaplanmıştır. Kullanılan formül  $\text{CI} = \text{D1}/(\text{Dx})_1 + \text{D2}/(\text{Dx})_2$ .  $(\text{Dx})_1$  ve  $(\text{Dx})_2$ , belirlenen bir konsantrasyonda hücre büyümesini inhibe etmek için gereken ve tek başına uygulanan MB ve DOX dozlarıdır. D1 ve D2 ise, kombinasyon halinde uygulanan DOX ve MB dozlarıdır. 1'in altındaki CI değerleri sinerjiyi ( $\text{CI} < 1$ ), 1'e eşit olan CI değerleri ( $\text{CI} = 1$ ) aditif etkiyi ve 1'in üzerindeki CI değerleri antagonizmi ( $\text{CI} > 1$ ) gösterir. Etkilenen fraksiyon ( $\text{Fa}$ ) dozdan etkilenen büyüme inhibisyonunu belirtir.<sup>17</sup>  $\text{Fa}$ 'ya ilişkin ortalama CI değerleri, DOX ve MB'ye ait sekiz kombinasyonu hesaplamak için kullanıldı.

#### Gene Ekspresyon Analizi

MCF-7 hücresinde anti-apoptotik, pro-apoptotik genlerin (Bax ve Bcl-2) mRNA ekspresyon seviyeleri sadece DOX, DOX+MB-PDT ve MB-PDT+ DOX kombinasyonu kullanılarak qPCR ile belirlenmiştir. Hücrelere 24 saatlik inkübasyonda belirlenen  $\text{IC}_{50}$  değerlerinde DOX, MB ve 660 nm lazer uygulanmıştır. Ardından, total RNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Primerler, Bax ve Bcl-2 Gen Bankasında yayınlanan gen dizisine göre Primer3 yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır. Primer setleri Tablo 1'te verilmiştir. İfade düzeyleri  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  yöntemi ile hesaplanmıştır.

**Tablo 1.** Primer dizileri

| Primer  | Dizi                    |
|---------|-------------------------|
| Bax-F   | TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG  |
| Bax-R   | TGTGTCCACGGCGCAATCATC   |
| Bcl-2-F | ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT  |
| Bcl-2-R | GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC |
| GADPH-F | GTCTCTCTGACTTCAACAGCG   |
| GADPH-R | ACCACCTGTTGCTGTAGCCAA   |

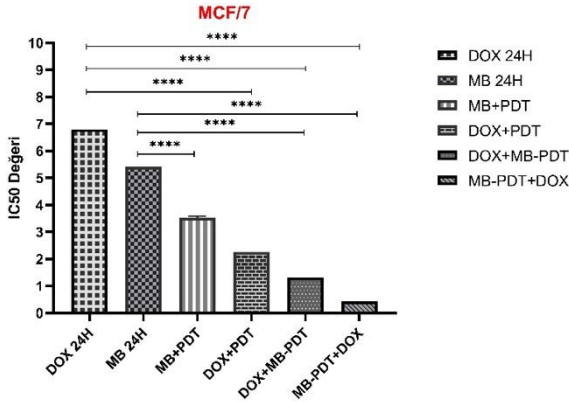
#### İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 9 (California, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.  $\pm$  SD olarak ifade edilmiştir. Veriler One-Way ANOVA ile analiz edilmiştir. 0.05'ten küçük p-değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## Bulgular

### DOX'un ve MB'nin MCF-7 Hücre Hattındaki Etkisi

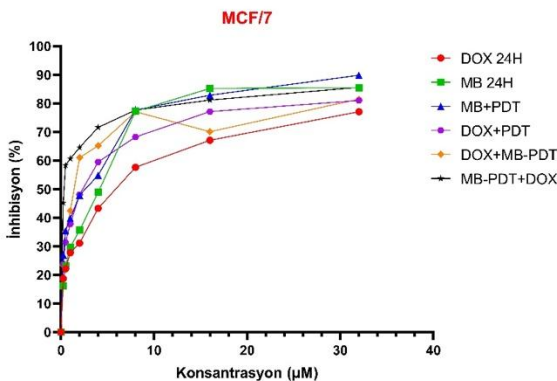
Farklı konsantrasyonlarda (32-16-8-4-2-1-0,5-0,25  $\mu\text{M}$ ) uygulanan DOX'un meme kanseri hücre hattı MCF-7'nin canlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar, DOX ve MB'nin konsantrasyonunun artmasıyla hücre canlılığının azaldığını, inhibisyon değerinin arttığını göstermiştir. DOX'un 24 saatte MCF-7 hücre hattındaki  $\text{IC}_{50}$  değeri 6,8  $\mu\text{M}$  ve MB'nin ise 5,42  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 1).



**Şekil 1.** Dokсорubisin (DOX), metilen mavisi (MB) ve kombinasyon tedavilerin (MB+ fotodinamik terapi (PDT), DOX+PDT, DOX+MB-PDT, MB-PDT+DOX)  $\text{IC}_{50}$  değerleri (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

### DOX+PDT'nin ve MB+PDT'nin MCF-7 Hücre Hattındaki Etkisi

DOX'un ardından yapılan lazerin etkisi 32-16-8-4-2-1-0,5-0,25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda uygulanarak incelenmiştir. Sadece DOX uygulaması ile karşılaştırıldığında 32-16-8-4-2-1-0,5-0,25  $\mu\text{M}$ 'da %77, %67, %57,6, %43,2, %31,1, %27,8, %22,1, %18,6 olan inhibisyon değerleri %80,9, %77,1, %68,2, %59,4, %48,1, %37,8, %31,4, %23,7'ye yükselmiştir (Şekil 2). Sadece DOX'un 24 saatteki  $\text{IC}_{50}$  değeri 6,8  $\mu\text{M}$  iken bu değer DOX+PDT'nin birlikte uygulamasında 2,26  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



**Şekil 2.** Dokсорubisin (DOX), metilen mavisi (MB), ve kombinasyon tedavilerin (MB+ fotodinamik terapi (PDT), DOX+PDT, DOX+MB-PDT, MB-PDT+DOX) MCF-7 hücre hattındaki inhibisyon grafiği.

Sonuçlar, 32-16-8-4-2-1-0,5-0,25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda MB ardından uygulanan lazerin etkisi tek başına uygulanan MB'ye göre inhibisyon değerini daha da arttırdığını göstermiştir. %85,4, %85,2, %77,2, %48,8, %35,6, %29,6, %23,1, %16,1 olan inhibisyon değerleri %89,8, %82,8, %77,7, %54,8, %47,8, %39,7 %35,4 ve %26,9'a yükselmiştir. Ek olarak, 5,42  $\mu\text{M}$  olan  $\text{IC}_{50}$  değeri lazerin etkisi ile 3,57  $\mu\text{M}$ 'a gerilemiştir.

### DOX+MB-PDT'nin MCF-7 Hücre Hattındaki Etkisi

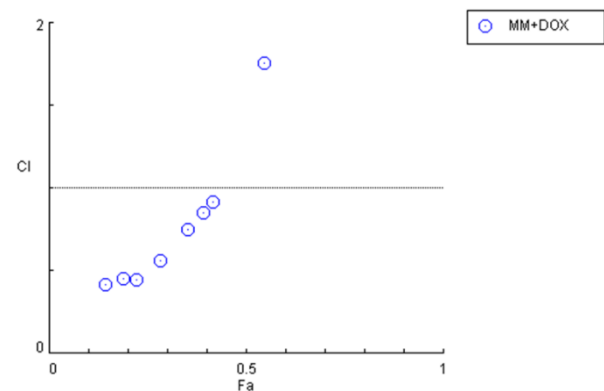
Şekil 2. ye göre 24 saatlik DOX tedavisinden sonra uygulanan MB-PDT'nin DOX+PDT'ye göre inhibisyon değerinde çok önemli bir artma görülmesine de  $\text{IC}_{50}$  değeri 2,26  $\mu\text{M}$ 'dan 1,32  $\mu\text{M}$ 'a düşmüştür.

### MB-PDT+DOX'un MCF-7 Hücre Hattındaki Etkisi

MB-PDT ardından uygulanan DOX tedavisi sonucunda inhibisyon değeri %85,5, %81,1, %77,6, %71,6, %64,5, %60,6, %58,3, %45,1'ye önemli ölçüde artmıştır.  $\text{IC}_{50}$  değeri 428.4 nM bulunmuştur. Böylece MB+PDT tedavisinde elde edilen  $\text{IC}_{50}$  değeri (3,57  $\mu\text{M}$ ) DOX etkisi ile 428.4 nM'a gerilemiştir. Sonuç olarak tüm tedaviler karşılaştırıldığında, en yüksek ölüm ve inhibisyon yüzdesi, hücreler MB-PDT ve ardından DOX tedavisi uygulandığında gözlenmiştir (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

### MB-PDT+DOX Tedavisinin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Kombinasyon İndeksi (CI) Analizi

MB-PDT ardından 32-16-8-4-2-1-0,5-0,25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda uygulanan DOX tedavisinin MCF-7 hücrelerindeki kombinasyon indeksi (CI) analiz grafiği Şekil 3'te gösterilmiştir.  $\text{CI} < 1$ ,  $= 1$  ve  $> 1$  değerleri sırasıyla sinerjistik, aditif ve antagonist etkileri temsil eder. İnhibitör oranını ise etkilenen fraksiyon (Fa) gösterir.



**Şekil 3.** MB-PDT'den (Metilen mavisi-Fotodinamik terapi) sonra uygulanan farklı konsantrasyonlardaki dokсорubisin (DOX) tedavisinin MCF-7 hücrelerinde büyüme inhibisyonunun kombinasyon indeksi (CI) analizi.

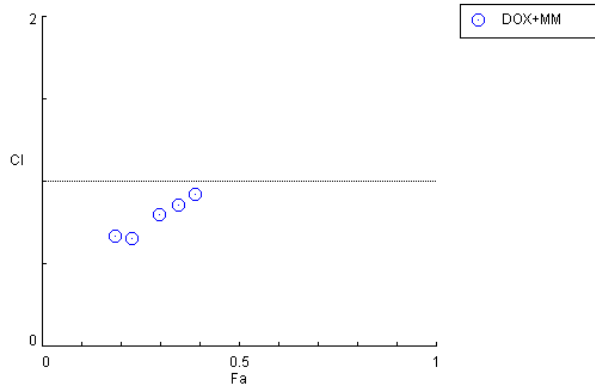
Analiz sonucu MB-PDT ardından DOX kombinasyonunun 0,25  $\mu\text{M}$  hariç tüm konsantrasyonlarda CI değerinin 1'den düşük ve sinerjistik olduğunu ortaya çıkarmıştır (Tablo 2).

**Tablo 2.** MB-PDT'den (Metilen mavisi-Fotodinamik terapi) sonra uygulanan farklı konsantrasyonlardaki doksorubisin (DOX) tedavisinin kombinasyon indeksi (CI) analizi.

| MB Dozu ( $\mu\text{M}$ ) | DOX Dozu ( $\mu\text{M}$ ) | CI Değerleri | Etkisi     |
|---------------------------|----------------------------|--------------|------------|
| 3,5                       | 32                         | 0,41378      | Sinerjizm  |
| 3,5                       | 16                         | 0,44999      | Sinerjizm  |
| 3,5                       | 8                          | 0,44732      | Sinerjizm  |
| 3,5                       | 4                          | 0,56188      | Sinerjizm  |
| 3,5                       | 2                          | 0,75277      | Sinerjizm  |
| 3,5                       | 1                          | 0,85384      | Sinerjizm  |
| 3,5                       | 0,5                        | 0,91456      | Sinerjizm  |
| 3,5                       | 0,25                       | 1,75517      | Antagonizm |

#### DOX+MB-PDT Tedavisinin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Kombinasyon İndeksi (CI) Analizi

DOX ardından uygulanan MB-PDT tedavisinin MCF-7 hücrelerindeki kombinasyon indeksi (CI) analiz grafiği Şekil 4'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.** Farklı konsantrasyonlarda uygulanan doksorubisin (DOX) tedavisi ardından yapılan MB-PDT (Metilen mavisi-Fotodinamik terapi) tedavisinin MCF-7 hücrelerinde büyüme inhibisyonunun kombinasyon indeksi (CI) analizi.

Analiz sonuçları DOX ardından uygulanan MB-PDT tedavisinin 32-16-8-4-2  $\mu\text{M}$ 'da CI değeri 1'den düşük ve sinerjistik etki, 1-0,5-0,25  $\mu\text{M}$ 'da CI değeri 1'den büyük ve antagonist etki göstermiştir (Tablo 3).

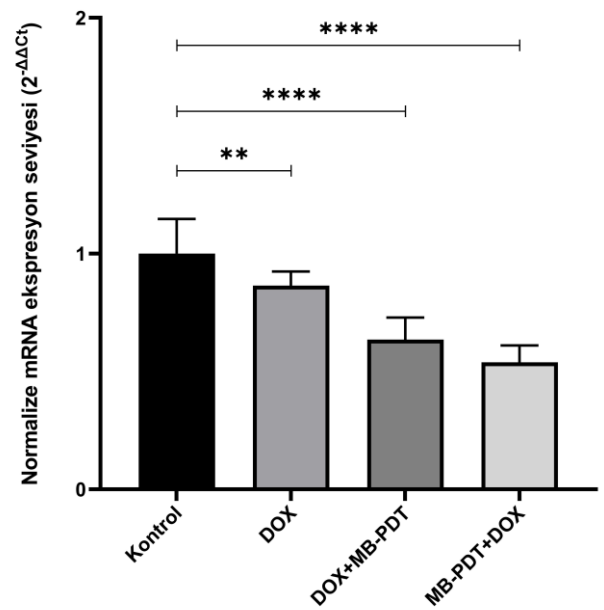
**Tablo 3.** Farklı konsantrasyonlarda uygulanan doksorubisin (DOX) tedavisi ardından yapılan MB-PDT (Metilen mavisi-Fotodinamik terapi) tedavisinin kombinasyon indeksi (CI) analizi.

| MB Dozu ( $\mu\text{M}$ ) | DOX Dozu ( $\mu\text{M}$ ) | CI Değerleri | Etkisi     |
|---------------------------|----------------------------|--------------|------------|
| 3,5                       | 32                         | 0,67315      | Sinerjizm  |
| 3,5                       | 16                         | 0,65838      | Sinerjizm  |
| 3,5                       | 8                          | 0,80353      | Sinerjizm  |
| 3,5                       | 4                          | 0,85953      | Sinerjizm  |
| 3,5                       | 2                          | 0,92748      | Sinerjizm  |
| 3,5                       | 1                          | 2,30276      | Antagonizm |
| 3,5                       | 0,5                        | 3,19629      | Antagonizm |
| 3,5                       | 0,25                       | 6,88738      | Antagonizm |

#### Gen Ekspresyon Sonuçları

MCF-7 hücrelerinde tek başına DOX uygulanmasına kıyasla kombine DOX ve MB aracılı fotodinamik terapi tedavisi MCF-7 hücrelerinde Bcl-2 ve Bax genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerini değiştirmiştir. Bu değişim Önce MB-PDT sonra DOX uygulanmasında daha fazla olmuştur. Sonuçlar kontrole göre normalize edilmiş ve istatistiksel açıdan anlamlı olması değerlendirilmiştir.

Bcl-2'nin mRNA gen ekspresyon seviyeleri yalnızca Dox için MCF-7'de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kontrole göre 0.86 kat, DOX+MB-PDT kombinasyonu için 0.63 kat ve MB-PDT +DOX kombinasyonu için 0.53 kat azalmıştır (Şekil 5).



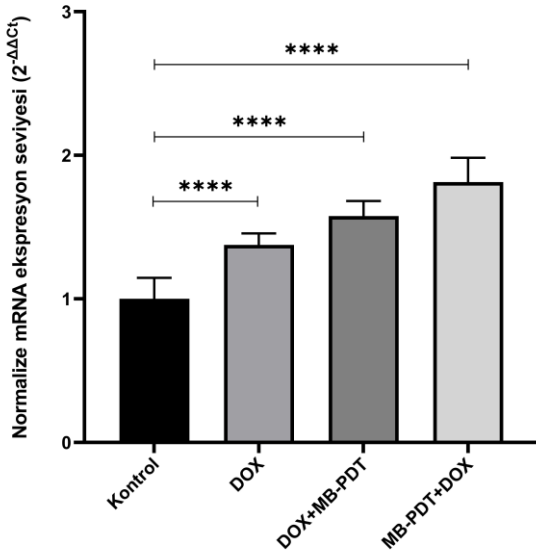
**Şekil 5.** DOX tek başına ve kombinasyon halinde 24 saatlik inkübasyonda Bcl-2 mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi. Veriler kontrole normalize edilmiştir. (n=3, \*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001).

Bax için mRNA ekspresyon seviyeleri sadece hücelere DOX uygulandığında kontrole göre gen ifadesi 1.37 kat, önce DOX ardından MB-PBT uygulandığında 1.57 kat ve önce MB-PDT ardından DOX uygulandığında 1.81 kat artmıştır (Şekil 6). Bu artışlar üç grup içinde kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

#### Tartışma

Antrasiklin antibiyotik doksorubisin (DOX) yıllardır meme kanseri, yumurtalık kanseri, akciğer karsinomu, akut lösemi gibi pek çok kanser çeşidinde kullanılan bir anti-kanser ajandır<sup>10</sup>. Klinikte kullanımı yaygın olmasına rağmen sitostatik etkisi genellikle terapötik dozlarda yetersizdir. Daha yüksek dozlarda kullanımı ise kalp, beyin, karaciğer ve böbrekler dahil olmak üzere çeşitli organlarda çeşitli olumsuz etkilere neden olabilir. Ayrıca kanser hücrelerinde DOX direncinin gelişmesi tedavinin etkinliğini azaltmaktadır.<sup>18</sup> Bu sorunların üstesinden gelmek ve DOX'un etkinliğini artırmak için çeşitli

çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan bir tanesi PDT ile kombinasyon tedavidir.



**Şekil 6.** DOX tek başına ve kombinasyon halinde 24 saatlik inkübasyonda Bax mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi. Veriler kontrole normalize edilmiştir. (n=3, \*\*\*\*p<0.0001).

Metilen mavisi (MB), fotodinamik terapide (PDT) ışığa duyarlılaştırıcı olarak kullanılan bir fenotiyazinil boyadır ve antikanser tedavisi için umut verici olmuştur. Akridin boyalarına benzer düzlemsel yapısı nedeniyle MB, DOX ile benzer şekilde DNA ile kolayca etkileşime girebilir.<sup>19</sup> Bu yüzden birçok çalışma PDT ile DOX'u kombinasyon uygulayarak tedavi etkisinin arttırabileceğini göstermiştir.

Aniogo ve ark.<sup>20</sup> DOX ile sülfonatlı çinko ftalosiyenin (ZnPcS) PDT ile anti-kanser etkisini MCF-7 hücre hattında ayrı ayrı ve kombinasyon halinde incelediler. DOX ve ZnPcS konsantrasyonları giderek arttırıldı. Bu çalışmanın sonuçları, DOX-PDT kombinasyon tedavisinin MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını ve büyümesini daha etkili bir şekilde engellediğini gösterdi. Ayrıca PDT'nin daha düşük dozlarda DOX ile kombinasyonunun meme kanseri tedavisinde umut verici bir kombinasyon terapi stratejisi olduğunu göstermektedir. Zakaria ve ark.<sup>19</sup> MCF-7 hücrelerinde DOX ile 5-Aminolevulinic acid (ALA)'nın PDT ile etkisini araştırdılar. DOX + ALA/PDT ile tedavi edilen hücrelerde, bireysel etkileriyle karşılaştırıldığında daha fazla hücre ölümü görüldü.

Dos Santos ve ark.<sup>22</sup> üç meme epitel hücre hattında MB kullanarak PDT'nin hücre öldürme potansiyelini değerlendirdi. MDA-MB-231 (TNBC), MCF-7 hücre hatlarında ve neoplastik olmayan MCF-10A hücre hattında MB varlığında ve yokluğunda 660 nm'de PDT uygulandı. En yüksek ölüm malign hücrelerde sırasıyla MDA-MB-231, MCF-7 ve MCF 10A hatlarında gözlemlendi. Yousefi Sadeghloo ve ark.<sup>23</sup> farklı konsantrasyonlarda DOX, MB ve MB-DOX'un kombinasyon tedavisinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki etkisini araştırdı. Önce DOX ardından MB-PDT tedavisi ve önce MB-PDT sonra

DOX tedavisi olacak şekilde iki farklı uygulama yapılmıştır. Sonuçlar, MB-PDT ve ardından DOX'un (düşük konsantrasyonlarda bile) kullanıldığı kombinasyonun, kanser hücresi ölümünü tetiklemede tek başına DOX'tan daha etkili olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada DOX'un MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde ayrı ayrı ve MB-PDT varlığında DOX'un etkilerini değerlendirdik. Böylece MB ile fotodinamik tedavinin etkinliğini arttırarak hücre ölüm oranının arttırılması ve ilaç dozunu azaltarak yan etkilerinin azaltılması hedeflenmiştir. DOX, MB, MB-PDT, DOX-PDT, MB-PDT+DOX ve DOX+MB-PDT olacak şekilde ayrı ayrı ve kombinasyon tedaviler denenmiştir. Sonuçlar MB-PDT ardından uygulanan DOX tedavisinin DOX ardından MB-PDT tedavisine göre ve tek başına uygulanan her tedaviye göre MCF-7 hücrelerinde en yüksek ölüm ve inhibisyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, MCF-7 hücrelerinin önce DOX ardından MB-PDT tedavisi sonucunda 32-16-8-4-2 µM'da sinerjizm, ve 1-0,5-0,25 µM'da antagonist etki gösterse de MCF-7 hücrelerinin önce MB-PDT ve daha sonra DOX ile tedavi edilmesi durumunda terapide sinerji oluşmuş ve düşük konsantrasyonlarda da (1 ve 0,5 µM) DOX'un artan etkisiyle sonuçlanmıştır. Böylece bu çalışmanın sonuçları önceki yapılan sonuçlar ile uyumlu olmuştur ve yapılan çalışmalara benzer şekilde MB, DOX ile kombinasyon halinde etkinliği arttırmış ve ilaç konsantrasyonunu azaltmıştır.

Doksorubisin gibi sitotoksik ajanlar, duyarlı hedef hücrelerde ölüm sinyal yollarını başlatarak apoptozu indükleyebilirler. Apoptoz belirteçleri olarak bilinen çeşitli genlerin ekspresyon seviyeleri ile ajanların apoptoz sürecindeki etkisi belirlenmektedir. Bunlardan Bcl-2 geni apoptozun başlamasını aktive ederken, Bax geninin ekspresyondaki artış apoptozu indüklemektedir. Çok çeşitli deneysel ve klinik raporlar doksorubisin için biyolojik etkiler göstermiştir. Benzer sonuçlar Bcl-2 ekspresyonunda azalmaya ve Bax ekspresyonunda artışa neden olan doksorubisin ile de gösterilmiştir<sup>13</sup>.

Bu çalışmada, MCF-7 hücrelerinde doksorubisin ile apoptozisin uyarılmasını takiben ayrıca fotodinamik terapi uygulanarak Bcl-2 (anti-apoptotik), Bax (pro-apoptotik) genlerinin ekspresyonu, seviyesindeki değişim rapor edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında DOX ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde Bcl-2 geninin ekspresyonundaki azalma (0.86 kat) fotodinamik terapinin DOX ile muamelesinden önce yada sonra verilmesine bağlı olarak değişmiştir. Önce MB+PDT sonra DOX uygulandığı zaman Bcl-2 gen ekspresyonunda azalma (0.53 kat) olmuştur. Ancak hücrelere önce DOX sonra MB+PDT uygulanmasıyla bile (0.63 kat) sadece DOX muamelesine göre Bcl-2 geni daha fazla aşağı regüle olmuştur.

Aynı şekilde Bax geninin ekspresyon seviyelerine baktığımız zaman gruplar arasındaki değişimler Bcl-2 gen değişimleriyle aynı paterni göstermiştir. Bax geni hücreleri apoptozu yönlendiren bir aktivatör olarak rol oynadığı için ekspresyonda yükselme gözlenmesi yaptığımız çalışmayı desteklemektedir. Yalnız DOX uygulandığı zaman Bax ekspresyonu 1.37 kat, önce DOX

sonra MB+PDT uygulandığında 1.57 kat ve önce MB+PDT sonra DOX uygulandığı zaman ise 1.81 kat artmıştır.

Gen ekspresyonundaki bu değişimler literatürde daha önce yapılan çalışmaları <sup>24</sup> desteklediği gibi yalnızca doksorubisin kullanımı değil beraberinde fotodinamik terapinin de uygulanması hem doksorubisinin etkinliğini, artırmış ve hücrelerin daha fazla apoptoza sürüklenmesini sağladığını desteklemiştir.

Sonuç olarak, MB-PDT ardından uygulanan DOX'un IC<sub>50</sub> değeri (428.4 nM) tek başına uygulanan DOX'un IC<sub>50</sub> değerine (6,8 µM) göre oldukça düşük bir değer bulunmuş ve DOX ile fotodinamik terapi sinerjik bir etki göstermiştir. Bu etkiye paralel olarak antiapoptotik ve proapoptotik gen değişimleri de bu sonuçlarla körele olarak artış ve azalış göstererek sitotoksikite sonuçlarını desteklemiştir. Böylece bu çalışmanın sonuçları PDT tedavisinde MB ile kombine olarak uygulanan DOX dozunun azaldığını göstermiştir. Bu, DOX'un yan etkilerinin en aza indirilmesiyle sonuçlanabilir. Dolayısıyla bu yaklaşım gelecekte meme kanserinin tedavisi için umut verici bir strateji olabilir. Daha fazla gen ve protein ekspresyon seviyelerindeki değişimler yolak analizleri floresan görüntülemelerde bu sonuçların doğruluğu daha artırılabilir. Ayrıca meme kanserinin farklı alt tiplerindeki hücre hatlarında daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

#### Etik Standartlara Uygunluk

Bu çalışma etik kurul onayı gerektirmemektedir.

#### Çıkar Çatışması

Yazarların konuyla ve/veya herhangi başka bir yazar ile ilgili maddi veya manevi bir çıkar çatışması yoktur.

#### Yazar Katkıları

Yazarlar eşit katkıda bulunmuşlardır.

#### Finansal Açıklama

Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

#### Kaynaklar

1. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci.* 2017;13(11):1387-1397. doi:10.7150/ijbs.21635
2. Jin X, Mu P. Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer (Auckl).* 2015;9(Suppl 1):23-34. doi:10.4137/BCBCR.S25460
3. Ferrando-Díez A, Felip E, Pous A, Bergamino Sirven M, Margelí M. Targeted Therapeutic Options and Future Perspectives for HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2022;14(14):3305. doi:10.3390/cancers14143305
4. Elswaf Z, Sinn HP. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical and Histological Correlations. *Breast Care (Basel).* 2011;6(4):273-278. doi:10.1159/000331643
5. Mangla B, Kohli K. Combination of Natural Agent with Synthetic Drug for the Breast Cancer Therapy. *Int J Drug Dev & Res.* 2018; 10: 22–26.
6. Correia JH, Rodrigues JA, Pimenta S, Dong T, Yang Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics.* 2021;13(9):1332. doi:10.3390/pharmaceutics13091332
7. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):250-281. doi:10.3322/caac.20114
8. Chen CW, Chan YC, Hsiao M, Liu RS. Plasmon-Enhanced Photodynamic Cancer Therapy by Upconversion Nanoparticles Conjugated with Au Nanorods. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(47):32108-32119. doi:10.1021/acsami.6b07770
9. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2(3):175-191. doi:10.1016/S1572-1000(05)00097-9
10. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem.* 2009;16(25):3267-3285. doi:10.2174/092986709788803312
11. Meredith AM, Dass CR. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68(6):729-741. doi:10.1111/jphp.12539
12. Khodapasand E, Jafarzadeh N, et al. Is Bax/Bcl-2 Ratio Considered as a Prognostic Marker with Age and Tumor Location in Colorectal Cancer? *Iran Biomed J.* 2015; 19(2): 69–75. 10.6091/ibj.1366.2015
13. Sharifi S, Barar J, et al. Doxorubicin Changes Bax /Bcl-xL Ratio, Caspase-8 and 9 in Breast Cancer Cells. *Adv Pharm Bull.* 2015 Sep; 5(3): 351–359. <https://doi.org/10.15171%2Fapb.2015.049>
14. Fisusi FA, Akala EO. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharm Nanotechnol.* 2019;7(1):3-23. doi:10.2174/2211738507666190122111224
15. Palmer AC, Sorger PK. Combination Cancer Therapy Can Confer Benefit via Patient-to-Patient Variability without Drug Additivity or Synergy. *Cell.* 2017;171(7):1678-1691.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.11.009
16. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237-245. doi:10.1007/978-1-61779-080-5\_20
17. Palmer AC, Sorger PK. Combination Cancer Therapy Can Confer Benefit via Patient-to-Patient Variability without Drug Additivity or Synergy. *Cell.* 2017;171(7):1678-1691.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.11.009
18. Hanušová V, Boušová I, Skálová L. Possibilities to increase the effectiveness of doxorubicin in cancer cells killing. *Drug Metab Rev.* 2011;43(4):540-557. doi:10.3109/03602532.2011.609174
19. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 2003;71(1-3):87-98. doi:10.1016/j.jphotobiol.2003.06.002
20. Anigo EC, George BPA, Abrahamse H. In vitro combined effect of Doxorubicin and sulfonated zinc Phthalocyanine-mediated photodynamic therapy on MCF-7 breast cancer cells. *Tumour Biol.* 2017;39(10):1010428317727278. doi:10.1177/1010428317727278
21. Zakaria S, Gamal-Eldeen AM, El-Daly SM, Saleh S. Synergistic apoptotic effect of Doxil® and aminolevulinic acid-based photodynamic therapy on human breast adenocarcinoma cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014;11(2):227-238. doi:10.1016/j.pdpdt.2014.03.001
22. Dos Santos AF, Terra LF, Wailemann RA, et al. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive

- cell death in human breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2017;17(1):194. doi:10.1186/s12885-017-3179-7
23. Yousefi Sadeghloo A, Khorsandi K, Kianmehr Z. Synergistic effect of photodynamic treatment and doxorubicin on triple negative breast cancer cells. *Photochem Photobiol Sci*. 2020;19(11):1580-1589. doi:10.1039/d0pp00132e
24. Ferreto NP, Calaf GM. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology*. 2016; 3(6):753-762. doi.org/10.3892/ijo.2016.3558. 10.15171/apb.2015.049