



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**FOTODİNAMİK TERAPİDE KULLANIM POTANSİYELİ OLAN
BAZI AJANLARIN ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Nihan ÇELİK

Birinci Danışman: Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN

İkinci Danışman: Prof. Dr. Nihal DELİGÖNÜL

TOKAT- 2023



Bu tez çalışması, TÜBİTAK 219Z081 no'lu 1001 – Bilimsel ve Teknik Araştırma Projesi tarafından ve Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir.

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN danışmanlığında hazırlamış olduğum **“Fotodinamik Terapide Kullanım Potansiyeli Olan Bazı Ajanların Aktivitelerinin Araştırılması”** adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

.../.../2023

Fatma Nihan ÇELİK

JÜRİ KABUL VE ONAY

Fatma Nihan ÇELİK tarafından hazırlanan “**Fotodinamik Terapide Kullanım Potansiyeli Olan Bazı Ajanların Antikanser Aktivitelerinin Araştırılması**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 20/07/2023 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Üye (Başkan): Prof. Dr. Şaban TEKİN

.....

Üye: (II. Danışman) Prof. Dr. Nihal DELİGÖNÜL

.....

Üye: (Danışman) Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN

.....

Üye: Doç. Dr. Hüseyin AKBAŞ

.....

Üye: Doç. Dr. Ali AYDIN

.....

ONAY

...../...../2023

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimime başlamama vesile olan, sonuna kadar desteğini üzerimden eksik etmeyen, sahip olduğu akademik bilgi ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan değerli danışmanım Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN'a teşekkürler ederim.

Yüksek lisans eğitimimde birçok projeye dahil olmamı sağlayan, sahip olduğu tüm imkanı önüme sunan, her sıkıntıda desteğini esirgemeyen, akademik bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan, bir biyologdan nasıl kimyager olunabileceğini gösteren değerli ikinci danışmanım Prof. Dr. Nihal DELİGÖNÜL'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Her tökezlediğimde beni daha da çok yüreklendiren, bilgi ve desteğini asla esirgemeyen, her durumda yanımda olan, her zaman sorunlarımı çözmemde yardımcı olan Arş. Gör. Çağlar BERKEL, Doç. Dr. Adem KESKİN, Arş. Gör. Burak KÜÇÜK, Arş. Gör. Dr. Feyzanur ÇALDIRAN, Aysun KESKİN'e ve tez çalışmam sürecinde bana desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Burcu BAL, Çağla SEVİNÇ, Efe AYDINKAL, Şule ÖZER, Esra YILMAZ ve Bahra NAJİ'ye çok teşekkür ederim.

Ayrıca sayın jüri üyelerim Prof. Dr. Şaban TEKİN, Doç. Dr. Hüseyin AKBAŞ ve Doç. Dr. Ali AYDIN'a değerli görüşleri ve önerileri için çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmamın gerçekleşmesinde maddi kaynak sağlayan TÜBİTAK'a ve Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi'ne projemi tamamlama imkanı sağladıkları için çok teşekkür ederim.

Her zaman sevgisini ve desteğini esirgemeyen, her sorunumda yanımda olan canım arkadaşlarım Döne AVCI ve Aslı KÜPELİ'ye sonsuz teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca desteklerini üzerimden esirgemeyen, her zaman beni destekleyen, bana benden daha çok inanan babam Erkan ÇELİK, annem Tülay ÇELİK, ablam Saidenur ÇELİK ve kardeşim Zeynep ÇELİK'e çok teşekkür ederim.

Bu tezi canım aileme ithaf ediyorum.

Fatma Nihan ÇELİK

ÖZET

FOTODİNAMİK TERAPİDE KULLANIM POTANSİYELİ OLAN BAZI AJANLARIN ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Çelik, Fatma Nihan

Yüksek Lisans, Eğitim Programları ve Biyoloji Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ercan Çaçan

İkinci Danışman: Prof. Dr. Nihal Deligönül

Ağustos 2023, v + 203 sayfa

Uzun yıllardan beri kanser tüm dünyada en ölümcül hastalıkların başında gelmektedir. Kanser birçok çeşidi olmakla birlikte Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı istatistiksel verilere göre meme kanseri, over kanseri ve kolorektal kanseri tüm dünyada önemli bir yük oluşturan kanser türleridir. Kanser hastalarının tedavisinde radyoterapi, cerrahi, kemoterapi gibi geleneksel tedavi türleri uygulanmaktadır. Ancak bu tedavi şekilleri bazı durumlarda kanserin metastaz özelliğinin ve tekrardan nüks etmesinin önüne geçememektedir. Dolayısıyla daha etkili kanser tedavi yöntemleri için araştırmalar çalışmaları devam etmektedir. Işığın kimyasallarla entegrasyonuna dayanan ve yeni kanser tedavi yöntemi olarak bilinen fotodinamik terapide kullanılan ışığa duyarlaştırmacılar, topik veya intravenöz şekilde uygulanarak vücuttaki kanser hücrelerine ulaşabilmekte ve kanser hücrelerinde birikme eğilimi gösterdikleri ve lokal bir tedavi yöntemi olduğundan dolayı sağlıklı vücut hücrelerine olan negatif etkileri minimize etmektedir. Tez kapsamında fotodinamik terapide kullanım potansiyeli olan Aza-BODİPY esaslı yeni nesil fotoduyarlaştırmacı moleküllerin MCF-7, OV2008 ve HT29 hücre hatları üzerinde antikanser özelliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Fotodinamik terapide kullanılan ışığa duyarlaştırmacılarından biri olan aza-BODİPY molekülünün tasarlanabilir özelliğinden faydalanarak halojenizasyon ile iyot bağlanılmıştır. İyot bağlanmasıyla, aza-BODİPY molekülünün floresan verimliliğinin ve kutantum verimliliğinin artmasıyla birlikte singlet oksijen veriminin artırılması hedeflenmiştir. Kitosen gibi bileşiklerin kontrollü ilaç dağıtım sisteminde kullanıldığı bilinmektedir. Kitosenin bu özelliği sayesinde tez kapsamında kullanılacak olan bileşiklerin düşük dozlarda kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, bileşiklerin hücre canlılığı ve metabolik aktivitesi MTT testi ile belirlenirken, hücre hasarı ve hücre zarı bütünlüğü LDH testi ile belirlendi. Ayrıca kullanılan bileşiklerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin hangi hücre ölüm mekanizmasıyla tetiklendiği flow sitometri analizleriyle kısmen ortaya konuldu. Aza-BODİPY esaslı yeni nesil fotoduyarlaştırmacı moleküller, konsantrasyona ve kitosen içerip içermediğine bağlı olarak üç farklı kanser hücre hatlarında hem benzer hem de farklı etkiler sergilediği gözlemlendi. Kullanılan bileşiklerden yalnızca L2 ligandları üç hücre hattında da FDT uygulandığında yüksek sitotoksik etki gösterdi. Kitosen eklenen bileşiklerde OV2008 için L1 ve HT29 için L2 serileri FDT için anlamlı sonuç oluşturdu. Üç hücre hattı içerisinde HT29 kullanılan FD'lara daha fazla duyarlı olduğu görüldü. Kitosensiz L2 ligandlarının ve kitosenli L2 ligandı ile L2 komplekslerinin HT29 hücre hattı ile yapılan çalışmada LDH salınımını azalttığı, kitosenli L2-NİS ligandının ise hücre membranında hasara yol açarak LDH salınımını artırdığı belirlendi. Flow sitometri analizlerinin sonuçlarına göre L2 ligandı ve

NİS’li bileşikleri HT29 hücre hattı daha çok apoptozu tetiklediği gözlemlendi. Ayrıca hücre morfolojilerine bakıldığında, MCF-7 hücre hattında ile yapılan çalışmada daha çok hücre zarı bütünlüğünü korurken, OV2008 ve HT29 hücre hattında hücre zarı hasarı ve apoptotik cisimcikler görüldü.

Anahtar Kelimeler: Fotodinamik Terapi, Aza-BODİPY, Kitosen, Singlet Oksijen, Antikanser Aktivite



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTI-CANCER ACTIVITIES OF SOME AGENTS WITH POTENTIAL USE IN PHOTODYNAMIC THERAPY

Çelik, Fatma Nihan

Master's Thesis, Division of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ercan Cacan

Second Advisor: Prof. Dr. Nihal Deligonul

August 2023, vii + 203 pages

Cancer has been one of the deadliest diseases in the world for many years. Although there are many types of cancer, according to the statistical data published by the World Health Organization, breast cancer, ovarian cancer and colorectal cancer are cancer types that constitute a significant burden all over the world. Traditional treatment types such as radiotherapy, surgery and chemotherapy are applied for the treatment of cancer patients. However, these treatment modalities can not completely prevent the metastasis and recurrence of cancer in some cases. Therefore, research studies continue for more effective cancer treatment methods. Photosensitizers used in photodynamic therapy, which is based on the integration of light with chemicals and known as a new cancer treatment method, can reach cancer cells in the body by applying topically or intravenously, and minimize the negative effects on healthy body cells since they tend to accumulate in cancer cells and are a local treatment method. Within the scope of the thesis, it is aimed to examine the anticancer properties of Aza-BODIPY-based new generation photosensitizer molecules, which have the potential to be used in photodynamic therapy, on MCF-7, OV2008 and HT29 cell lines. Iodine was bonded by halogenation by taking advantage of the designable feature of the aza-BODIPY molecule, which is one of the photosensitizers used in photodynamic therapy. By iodine binding, it is aimed to increase the singlet oxygen yield with the increase of the fluorescence efficiency and cutaneous efficiency of the aza-BODIPY molecule. Compounds such as chitocene are known to be used in controlled drug delivery systems. Thanks to this feature of chitose, the usability of the compounds to be used in the thesis at low doses has been investigated. For this purpose, cell viability and metabolic activity of the compounds were determined by MTT assay, while cell damage and cell membrane integrity were determined by LDH assay. In addition, the mechanism of cell death triggered by the cytotoxic effects of the compounds used on the cells was partially revealed by flow cytometry analysis. It was observed that Aza-BODIPY-based new generation photosensitizer molecules exhibited both similar and different effects in three different cancer cell lines, depending on the concentration and whether they contained chitocene. Of the compounds used, only L2 ligands showed a high cytotoxic effect when PDT was applied to all three cell lines. The L1 series for OV2008 and the L2 series for HT29 produced significant results for FDT in chitocene added compounds. Among the three cell lines, it was found to be more sensitive to FDs using HT29. It was determined that L2 ligands without chitocene and L2 ligand with chitosen and L2 complexes decreased LDH secretion in the study with HT29 cell line, while L2-NIS ligand with chitocene

caused damage to the cell membrane and increased LDH secretion. Flow cytometry analysis revealed that L2 ligand and compounds with NIS triggered more apoptosis in the HT29 cell line. In addition, when cell morphologies were examined, cell membrane damage and apoptotic bodies were observed in OV2008 and HT29 cell lines, while the study with MCF-7 cell line mostly preserved cell membrane integrity.

Keywords: Photodynamic Therapy, Aza-BODIPY, Chitocene, Singlet Oxygen, Anticancer Activity



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ETİK SÖZLEŞME.....	ii
JÜRİ KABUL VE ONAY	iii
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
TABLO LİSTESİ.....	xx
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Kanser tedavisinde terapötik yöntemler	4
2.2.1. Kanser ve immünoterapi	5
2.2.2. Kanser ve radyoterapi	6
2.2.3. Kanser ve cerrahi yaklaşım.....	7
2.2.4. Kanser ve kemoterapi	7
2.3. Fotodinamik Terapi ve Biyoteknoloji.....	9
2.3.1. Fotodinamik terapinin tarihsel gelişimi	9
2.3.2. Fotodinamik terapi nedir?	12
2.3.3. İdeal fotoduyarlayıcılar da bulunması gereken özellikler	14
2.3.4. Singlet oksijen	15
2.3.5. Fotodinamik terapi mekanizması	16

2.4. Aza-BODİPY (Azadipirometanlar)	20
2.4.1. Literatürde bulunan bazı azadipirometan ligandları:	21
2.5. FDT'nin Kansere Hücreleri Üzerindeki Etkisi.....	24
2.5.1.FDT ve hücre ölüm şekilleri.....	25
2.6. Biyouyumlu Malzemeler ve İlaç Dağıtım Sistemi	32
2.6.1.Kitosen.....	33
2.7. Kontrollü İlaç Dağıtım Sistemi ve Kanser Tedavisi.....	34
3. MATERYAL VE YÖNTEM	37
3.1. Materyal.....	37
3.2. Metod.....	39
3.2.1.Hücre kültüre edilmesi ve bileşik dozlarının hazırlanması	39
3.2.2.Hücre ekimi ve MTT uygulaması	43
3.2.3.Test edilecek maddelerin LDH (Laktat dehidrogenaz) deneyi ile sitotoksitelerinin belirlenmesi ve hücre hasarı	44
3.2.4.Flow sitometri analizleri.....	45
3.2.5.Fotoduyarlaştırıcı bileşiklerin hücre morfolojisine olan etkilerinin belirlenmesi .	46
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	47
4.1. MTT Uygulaması-IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	47
4.1.1. Kitosensiz ligand ve kompleksler	48
4.1.2. Kitosenli ligand ve kompleksler	95
4.2. LDH (Laktat Dehidrogenaz) Deneyi- LDH Aktivitesi	129
4.3. Flow Sitometri-Apoptoz Analizi (Fotoduyarlaştırıcı Bileşiklerin Apoptotik, Nekrotik ve Hücre Döngüsüne Olan Etkilerinin Akış (Flow) Sitometrisi ile Belirlenmesi	132
4.4. Fotoduyarlaştırıcı Bileşiklerin Hücre Morfolojisine Olan Etkilerinin Belirlenmesi (Hücre Boyama).....	135
4.5. Verilerin Tartışılması.....	149

5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	154
6. KAYNAKLAR	156
7. ÖZGEÇMİŞ	180



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 2.1: 2020'de Tahmini kanser vaka sayısı	3
Şekil 2.2: Kanser tedavi yaklaşımları	4
Şekil 2.3: Fotodinamik terapiye genel bakış	13
Şekil 2.4: Fotodinamik terapi mekanizmasının şematik gösterimi	13
Şekil 2.5: İndirgenmiş Jablonski Diyagramı	16
Şekil 2.6: Işığa duyarlaştırıcıların hücre içinde lokalize olduğu bölgelere göre hücre ölüm mekanizmaları	18
Şekil 2.7: Farklı aza-BODIPY iskeleti	22
Şekil 2.8: Proje kapsamında kullanılan Aza-BODİPY yapılarının ana iskeleti	22
Şekil 2.9: FDT ve ölüm mekanizmaları	25
Şekil 2.10: Kitin ve kitosenin kimyasal yapıları	33
Şekil 4.1: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L ligandı hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	48
Şekil 4.2: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	49
Şekil 4.3: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-BF ₂ kompleksi hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi.	50
Şekil 4.4: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-NİS-BF ₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	51
Şekil 4.5: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	52
Şekil 4.6: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	53
Şekil 4.7: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-BF ₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	54
Şekil 4.8: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-NİS-BF ₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	55

Şekil 4.9: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi.....	56
Şekil 4.10: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-NİS ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	57
Şekil 4.11: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-BF ₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	58
Şekil 4.12: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-NİS-BF ₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	59
Şekil 4.13: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3 ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	60
Şekil 4.14: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	61
Şekil 4.15: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF ₂ kompleksi hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	62
Şekil 4.16: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF ₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	63
Şekil 4.17: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3 ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	64
Şekil 4.18: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	65
Şekil 4.19: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF ₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	66
Şekil 4.20: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF ₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	67
Şekil 4.21: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3 ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi.....	68
Şekil 4.22: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	69
Şekil 4.23: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF ₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	70
Şekil 4.24: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF ₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	71
Şekil 4.25: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1 ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	72

Şekil 4.26: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	73
Şekil 4.27: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-BF ₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	74
Şekil 4.28: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS-BF ₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	75
Şekil 4.29: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1 ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	76
Şekil 4.30: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	77
Şekil 4.31: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-BF ₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	78
Şekil 4.32: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS-BF ₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	78
Şekil 4.33: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1 ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi.....	79
Şekil 4.34: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	80
Şekil 4.35: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-BF ₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	81
Şekil 4.36: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS-BF ₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	82
Şekil 4.37: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2 ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	83
Şekil 4.38: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	84
Şekil 4.39: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF ₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	85
Şekil 4.40: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF ₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	86
Şekil 4.41: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2 ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	87
Şekil 4.42: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	88

Şekil 4.43: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF ₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	89
Şekil 4.44: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF ₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	90
Şekil 4.45: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2 ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi.....	91
Şekil 4.46: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	92
Şekil 4.47: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF ₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	93
Şekil 4.48: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF ₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	94
Şekil 4.49: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3 kitosenli ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	95
Şekil 4.50: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	96
Şekil 4.51: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	97
Şekil 4.52: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	98
Şekil 4.53: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3 kitosenli ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	99
Şekil 4.54: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	100
Şekil 4.55: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	101
Şekil 4.56: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	102
Şekil 4.57: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3 kitosenli ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	103
Şekil 4.58: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS kitosenli ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	104
Şekil 4.59: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	105

Şekil 4.60: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	106
Şekil 4.61: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1 kitosenli ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	107
Şekil 4.62: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	108
Şekil 4.63: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	109
Şekil 4.64: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	110
Şekil 4.65: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1 kitosenli ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	111
Şekil 4.66: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	112
Şekil 4.67: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	113
Şekil 4.68: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	114
Şekil 4.69: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1 kitosenli ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	115
Şekil 4.70: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	116
Şekil 4.71: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	117
Şekil 4.72: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	118
Şekil 4.73: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2 kitosenli ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	119
Şekil 4.74: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	119
Şekil 4.75: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	120
Şekil 4.76: MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	120

Şekil 4.77: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2 kitosenli ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	121
Şekil 4.78: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	122
Şekil 4.79: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	123
Şekil 4.80: OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	124
Şekil 4.81: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2 kitosenli ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	125
Şekil 4.82: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	125
Şekil 4.83: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	126
Şekil 4.84: HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF ₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	126
Şekil 4.85: HT29 hücre hattında, karanlık ortamda, LDH yöntemi ile MTT testinde anlamlı sonuç veren L2 serisi bileşiklerin LDH aktivitesinin belirlenmesi.....	129
Şekil 4.86: HT29 hücre hattında, aydınlık ortamda, LDH yöntemi ile MTT testinde anlamlı sonuç veren L2 serisi bileşiklerin LDH aktivitesinin belirlenmesi.....	130
Şekil 4.87: L2 (A), L2-NİS (B) ve L2-NİS-BF ₂ (C) bileşiklerinin, HT29 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri	132
Şekil 4.88: Kristal viyole boyama ile MCF-7 kontrol	136
Şekil 4.89: L3 ligandı uygulanmış MCF-7 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	136
Şekil 4.90: L3-NİS- BF ₂ uygulanmış MCF-7 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	137
Şekil 4.91: L1 uygulanmış MCF-7 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	137
Şekil 4.92: L1-BF ₂ kompleksi uygulanmış MCF-7 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	138
Şekil 4.93: L2 uygulanmış MCF-7 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	138

Şekil 4.94: L2-NİS uygulanmış MCF-7 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	139
Şekil 4.95: OV2008 aydınlık ortam kontrolü	139
Şekil 4.96: L2 uygulanmış OV2008 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	140
Şekil 4.97: L2-NİS uygulanmış OV2008 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	140
Şekil 4.98: L2-BF ₂ uygulanmış OV2008 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	141
Şekil 4.99: L2-NİS-BF ₂ uygulanmış OV2008 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	141
Şekil 4.100: HT29 hücre hattı kontrol	142
Şekil 4.101: L3 uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	142
Şekil 4.102: L3-NİS uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	143
Şekil 4.103: L3-BF ₂ uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	143
Şekil 4.104: L3-NİS-BF ₂ uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	144
Şekil 4.105: L1 uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	144
Şekil 4.106: L1-NİS uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	145
Şekil 4.107: L1-BF ₂ uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	145
Şekil 4.108: L1-NİS-BF ₂ uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	146
Şekil 4.109: L2 uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	146
Şekil 4.110: L2-NİS uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri	147

Şekil 4.111: L2 kitosenli uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri 147

Şekil 4.112: L2-NİS kitosenli uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri 148

Şekil 4.113: L2-BF₂ kitosenli uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri 148

Şekil 4.114: L2-NİS-BF₂ uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri 149



TABLO LİSTESİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 2.1: Tez kapsamında kullanılan ligandlar ve kompleksler	23
Tablo 2.2: FDT ve ana anti-tümör mekanizmaları	24
Tablo 3.1: Deney çalışmasında kullanılan malzeme ve ekipmanlar	37
Tablo 3.2: Bileşiklerin stok konsantrasyonlarının hesaplanması.....	41
Tablo 3.3: Çalışmada kullanılacak olan bileşiklerin konsantrasyonlarının hazırlanması	42
Tablo 4.1: Tez kapsamında kullanılan ligand ve komplekslerin MCF-7 hücre hattında IC ₅₀ değerinin belirlenmesi.....	127
Tablo 4.2: Tez kapsamında kullanılan ligand ve komplekslerin OV2008 hücre hattında IC ₅₀ değerinin belirlenmesi	128
Tablo 4.3: Tez kapsamında kullanılan ligand ve komplekslerin HT29 hücre hattında IC ₅₀ değerinin belirlenmesi.....	128
Tablo 4.4: Karanlık- aydınlık ortam LDH aktivitesi değerlendirilmesi	130
Tablo 4.5: L2, L2-NİS ve L2-NİS-BF ₂ bileşiklerinin, HT29 hücre hattı üzerindeki etkisini incelemek için Annexin V ve 7-AAD ile akış sitometri analizi tablosu.....	134

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklamalar
μM :	Mikromolar
$^1\text{FD}_0$:	Temel Haldeki Fotoduyarlaştırıcı
$^1\text{O}_2$:	Singlet Oksijen
$^3\text{FD}_1^*$:	Uyarılmış Haldeki Fotoduyarlaştırıcı
$^3\text{O}_2$:	Moleküler Oksijen
5-ALA:	5-Aminolevünilik Asit
7-AAD:	7-Aminoaktinomisin D
Agt7:	Otofaji İle İlgili 7
AlPcS:	Sülfonlanmış Alüminyum Ftalosiyenin
ATG1:	Otofaji İle İlgili 1
Atg5:	Otofaji İle İlgili 5
Aza-BODİPY:	Azadipirometanlar
Bak:	Bcl-2 Antagonist/killer
Bax:	Bcl-2 İle İlişkili X
BCC:	Bazal Hücreli Karsinomlar
Bcl-2:	B-hücresi lenfoma-2
Beclin1:	İnsanlarda BECN1 Geni Tarafından Kodlanan Bir Protein
BF ₂ :	Bordiflorür
Bid:	BH3 Interacting-domain Death Agonist
BODİPY:	Bordipirometanlar
CAD:	Karbomoil Fosfosentetaz, Aspartat Transkarbamoilaz ve Dihidroorotat Dehidrogenaz Enzimlerinin Oluşturduğu Kompleks
DMSO:	Dimetilsülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DNaz:	Deoksiribonükleaz
EDTA:	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ER:	Endoplazmik Retikulum
FBS:	Fetal Bovin Serum
FD:	Işığa Duyarlaştırıcı/ Fotoduyarlaştırıcı

FDT:	Fotodinamik Terapi
g:	Gram
H ₂ O ₂ :	Hidrojen Peroksit
HPD:	Hematoporfirin Türevi
HY:	Hiperisin
IP ₃ proteini:	ER İle İlişkili Otofajik Mekanizmanın Düzenleyicisi
IR:	Kızılötesi
ISC:	Sistemler Arası Geçiş
LDH:	Laktat Dehidrogenaz
mg:	Miligram
mRNA:	Mesajcı Ribonükleik Asid
Mtor:	Rapamisin Memeli Hedefi, Rapamisin Kinazın Mekanik Hedefi
MTT:	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)
NF _κ B:	Nükleer Faktör Kappa B
nm:	Nanometre
NIR:	Yakın Kızılötesi
NPe6:	Mono-L-Aspartil Klorin E6
O ₂ [•] :	Süperoksit
OH [•] :	Hidroksil Radikali
PBS:	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
Pc4:	Ftalosiyanin
Photofrin:	Porfimer Sodyum
RIP ₃ :	Reseptör İle Etkileşen Protein-3
ROS:	Reaktif Oksijen Türevleri
S ₀ :	Temel Enerji Durumu, Temel Hal
S ₁ :	Uyarılmış Durum, Uyarılmış Hal
SCC:	Skvamöz Hücreli Karsinom
SD:	Standart Sapma
T ₁ :	Tirplet Hal
TOR:	Protein Sentezini Kontrolünden Sorumlu Rapamisin Kinaz
TPP:	Tripolifosfat
TPPS4:	Mezo-Tetra(4-Sülfonatofenil)Porfin

1. GİRİŞ

Multidisipliner bir doğaya sahip olan fotodinamik terapi (FDT), tüm dünyanın önüne geçemediği bir ölüm nedeni olan kanserin tedavisinde klinik olarak onay almış bir tedavi şeklidir. Düşük yan etkileri ile hassas kontrol edilebilirliği ve daha başka pozitif etki gösteren özellikleri sayesinde kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavilere göre daha çok tercih edilen bir yöntem olma yolunda ilerlemektedir. FDT temel olarak ışığa duyarlaştırıcı (FD), ışık ve singlet oksijen olmak üzere üç bileşenden meydana gelmektedir. Bu üç bileşen tedavi içerisinde tek başına toksik etki oluşturmazken, bir araya geldiklerinde kanser hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır. FDT'nin genel prensibi FD'ların, uygun dalga boyuna (600-800 nm) sahip bir ışık kullanılarak aktive edilmesi sonucunda kanser hücresi içerisinde reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşturmaya bağlı olarak hücre ölümüne neden olmaktadır (Hamblin, 2020; Sarbadhikary ve ark., 2021). 600-800 nm arasındaki dalga boyu bölgesi, dokuda önemli ölçüde yüksek optik penetrasyon derinliği sergileyen FDT için optik veya terapötik pencere olarak bilinir ve bu dalga boyu bölgesinde absorpsiyon yapabilen FD'lar kullanılarak hem öldürme kapasitesinin artmasına hem de vücudun daha derin bölgelerinde var olan kanser tedavilerinde kullanılabilmesine imkan tanımaktadır. Ayrıca bu aralıktaki fotonlar, FD'yı uyarmak için yeterince yüksek enerjiye sahiptir (Sarbadhikary ve ark., 2021).

1900'de Oscar Raab, akrinin boyalarının protozoa üzerindeki etkilerini araştırırken akrinin kırmızısı boyar maddesini belirli dalga boylarını kullanarak infusoria için öldürücü etkiye sahip olduğunu bulmasıyla başlayan tedavi serüveni, FDT'nin çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanımına yönelik çalışmalarla devam etmiştir (Hamblin, 2020). Tappeiner ve Jesionek'in kanser üzerine yaptıkları ilk çalışmadan sonra geleneksel tedavi yöntemlerinin kanser tedavisinde kesin başarı yakalayamaması ve yan etkileri nedeniyle FDT ile kanser tedavisinin geliştirilmesi hız kazanmıştır (Hamblin, 2020). FDT'nin tedavideki etkinliği, kullanılan FD'nin özelliklerine ve tümör hücrelerinde yeterli miktarda birikip birikmediğine bağlıdır. Bu tedavi yönteminde kullanılan FD'ların kanser tedavisinde spesifik olarak hedeflenebilmesi için tasarlanabilir olması gerekmektedir.

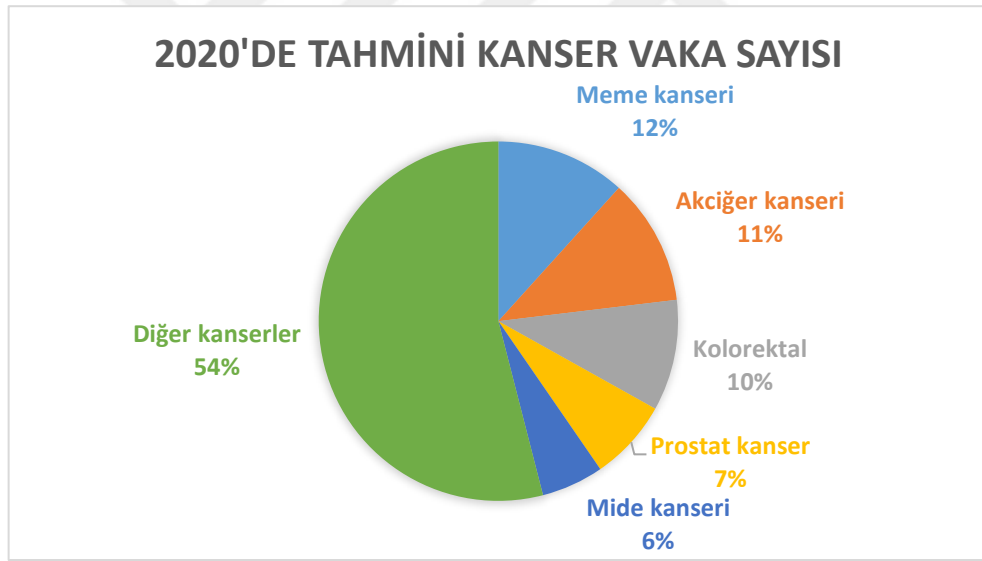
Tez kapsamında kullanılacak olan aza-BODİPY'lerin absorpsiyon özelliklerinin sentetik olarak ayarlanabilmesi ve modifiye edilebilmeleri, kimyasal sağlamlık ve fizyolojik koşullar altında yüksek hidrolitik stabiliteye sahip olmaları yönünden fotodinamik terapide kullanılan ve dezavantajlara sahip olan diğer fotoduyarlaştırıcıların önüne geçmektedir ve molekülünü hücre içi etiketleme ve FDT kullanılabilmeye uygun olan bir bileşik yapmaktadır (Carpenter ve ark., 2015; Fan ve ark., 2014).

Bu tez çalışmasında, 219Z081 nolu Tübitak-ARDEB 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projesi kapsamında sentezlenmiş olan ilaç potansiyeli taşıyan bileşiklerin çeşitli konsantrasyonlarının, farklı kanserlerdeki etkilerini gözlemlemek için kolorektal kanser hücre hattı (HT29), meme kanseri hücre hattı (MCF-7) ve yumurtalık kanseri hücre hattı (OV2008) kullanıldı. Kullanılan bileşiklerin hücre proliferasyonuna olan etkilerini ve IC₅₀ değerlerini belirlemek için MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) testi yapıldı. MTT testi sonucuna bağlı olarak kullanılan bileşiklerden etkin olanların hücre zarı hasarı ve sitotoksik aktiviteleri Laktat dehidrogenaz (LDH) yöntemi ile belirlendi. MTT ve LDH testi sonrasında yapılan analizler sonucunda anlamlı, karanlık sitotoksitesi düşük, aydınlık ortamda yüksek sitotoksik etki gösteren bileşiklerin apoptotik, nekrotik ve hücre döngüsüne olan etkileri akış (flow) sitometrisi ile belirlendi. MTT ve LDH testleri sonucuna bağlı olarak, üç hücre hattında da ortak olarak 12.5 µM konsantrasyonu seçilerek bileşiklerin hücre morfolojisine olan etkileri kristal viyole boyama yöntemi ile boyanarak Leica DFC295 S 40/0.45 floresans mikroskobu yardımıyla görüntüleri bulundu ve Leica Application Suite v+ yazılımı kullanılarak fotoğrafları çekildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Hücrelerde meydana gelen bir DNA hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz bir biçimde büyümesi ve bunun sonucunda hücrelerin doğal dengesinde meydana gelen bozulmayla birlikte doğal ölümlerinin olmaması ve hücrelerin aşırı derecede çoğalmasına kanser denir. Kanser, tüm dünyada en ölümcül hastalıkların başında gelmektedir. 2020 yılında 19.3 milyon kişiye kanser teşhisi konulmuş ve dünya çapında yaklaşık 10 milyon kansere bağlı ölüm meydana geldiği açıklanmıştır. 2018 yılındaki 18.1 milyon vaka ve 9.6 milyon ölüm oranları 2020 oranlarıyla karşılaştırıldığında dünyada kanser hastalığının gün geçtikçe arttığı görülmektedir. 2020 istatistiklerine göre Kadın meme kanseri, en sık teşhis edilen kanser türü olarak listenin başında yer almaktadır (Sung ve ark., 2021).



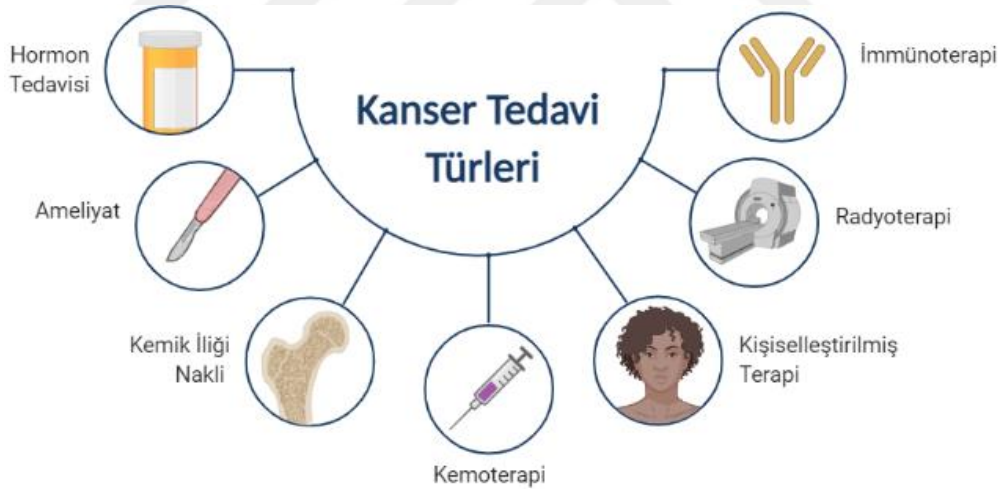
Şekil 2.1. 2020'de Tahmini kanser vaka sayısı (DSÖ Kanser Verileri Tablo Çevirisi 1, 2020; Sung ve ark., 2021)

2020 istatistiklerinde ~19.3 vakadan %11.7'si meme kanseri, bunu takiben %11.4'ü akciğer, %10.0'u kolorektal, %7.3'ü prostat ve %5.6'sı mide kanserleri olarak belirlenmiştir. Akciğer kanseri, tahmini 1.8 milyon ölümle kanser ölümlerinin %18'ini oluştururken, kolorektal %9.4'ünü, mide %7.7'sini ve kadın meme kanseri %6.9'unu oluşturmuştur (Şekil 2.1) (Shakil ve ark., 2021; Sung ve ark., 2021). Birçok kanser için

kanserin türü ve ilerleme durumu baz alınarak çeşitli tedavi şekilleri uygulanmaktadır (Sung ve ark., 2021).

Tedavilerde kullanılan kanser ilaçlarının büyük bir kısmının DNA replikasyonunu önlemek amacıyla nükleotid ile etkileşime girer ve böylelikle ya hücrenin prolifer olmasının önüne geçilmiş olur ya da tümör hücrelerinin apoptoza yönlendirilmesi sağlanmış olur. Ancak kanser hücrelerinin sürekli mutasyonu sonucu kemoterapi ilaçlarına karşı direnç geliştirdiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, sistematik bir tedavi yöntemi olan kemoterapinin ve radyoterapinin yan etkileri hastanın yaşam kalitesini çok fazla düşürmekte ve hastayı hem psikolojik hem de fizyolojik olarak yıpratmaktadır. Bu sebeple, minimum yan etkiyle maksimum fayda sağlayan yeni tedavi yöntemlerinin hızla geliştirilmesi gerekmektedir (Obeidin ve ark., 2018).

2.2. Kanser tedavisinde terapötik yöntemler



Şekil 2.2. Kanser tedavi yaklaşımları

Hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve daha sonra da birikmesi anlamına gelen kanserin günümüzde bilinen 100'den fazla türü bilinmektedir. Birçok kanser hastalığını tedavi etmek amaçlı uygulanan tedavi yöntemleri belirli bir düzenle ve farklı döngülerde kanser hastasına verilir. Bu yöntemlerin ve bu yöntemde kullanılan ilaçların büyük çoğunluğu hücre için toksik etki oluşturma amacı gütmektedir. İlk nesil

kanser tedavileri 1950’lerde başlamış ve bu tedaviler çoğunlukla sitotoksik olmakla birlikte kanserli hastalarda çeşitli yan etkilere neden olmuştur. Sağlıklı hücrelere zarar vermeden sadece kanser hücreleri üzerinde etkisini gösterebilecek yeni kanser tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır. Kanseri tedavi etmede kullanılan standart yöntemler sırasıyla kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi tedavi olarak sınıflandırılabilir. Bunlar tek başına ya da birkaç tedavi yönteminin bir araya getirilmesiyle de kullanılabilir (Akeren & Hindistan, 2021).

Şuana kadar kanser ile mücadele etme ve tedavi için kullanılan ışın ya da kemoterapi gibi geleneksel tedavi yaklaşımları kanser hücrelerini tahrip eder veya yok eder (Şekil 2.2). Bu tedavi seçeneklerinin kombinasyonu, bir kanser hastasının yaşam kalitesini iyileştirerek hayatta kalma oranını artırır (Yangin ve ark., 2019). Her tedavinin kendine özgü avantajları olduğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bununla birlikte günümüz kanser tedavilerinin kişiye özgü olmaması ve bu tedavi sonucunun kişiler arasında farklılık göstermesi nedeniyle tek bir kesin tedavi yönteminin varlığından bahsetmek imkansızdır. Bu tedaviler, kanser hücrelerinin ölümüne yol açmakla birlikte, vücudun sahip olduğu sağlıklı hücrelerde kısmen zarar verebilmektedir. Bu dezavantajı yok etmek ve daha çok avantaja sahip olan yeni tedavi şekilleri bulmak için araştırmalar devam etmektedir. Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte günümüzde var olan tedavilere ek olarak yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir (Baykara, 2016).

2.2.1. Kanser ve immünoterapi

Kanser tedavisinin çoğunluğunda radyoterapi, cerrahi müdahale ve kemoterapi kullanılmaktadır. Bunlarla birlikte immünoterapi yaklaşımları ile hastanın tümör ile savaşma kabiliyetine sahip immün hücreleri aktive edilerek tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması hedeflenmektedir. İmmünoterapi kanser tedavisi için günümüzde yenilikçi bir yaklaşım sunmaktadır. Şuana kadar yapılan çeşitli klinik çalışma ve deneylere göre immünoterapi progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalımı uzatabilen bir tümör yaklaşım çeşidi olabileceği sonucunu göstermiştir (Tan ve ark., 2020).

İmmünoterapi insan vücudunun hastalıklarla savaşması için bağışıklık sisteminin belirli kısımlarını kullanır bu nedenle kanseri kontrol etmede doğal bir yaklaşım sunar. Bunu iki şekilde yapabilir. Birincisi, vücudun doğal savunması olan bağışıklık sistemini uyarmak veya daha da güçlendirmek suretiyle bağışıklık sisteminin kanserli hücreleri bulması ve savaşması için daha akıllı çalışmasını sağlar. İkincisi ise laboratuvarı tıpkı insan vücudunda var olan bağışıklık sistemi bileşenleri gibi maddeler yaparak ve bunları kanser hastasına vererek bağışıklık sistemini uyarır. İmmünoterapi, tümör antijenlerinin hedeflendiği monoklonal antikor aracılı hücre ölümü, non-antijen spesifik immün sistem modülasyonu yapan check point inhibitörleri ve/veya tümör ilişkili antijenler aracılığıyla immün sistemin T helper, T sitotoksik hücrelerini uyarmayı ve antikor oluşmasını tetiklemeyi hedefleyen bir kanser tedavi yaklaşımıdır (Özlük ve ark., 2017).

İlerleyen kanserin tedavisi için uygulanan kemoterapi ve radyoterapi tedavilerinden kaçabilen resistant tümör hücreleri tekrar büyümeye ve çoğalmaya devam eder ve aynı zamanda anti-kanser immün hücrelerden de kaçarlardı. Ancak immünoterapötik yaklaşımlar sayesinde tümör mikroçevresini değiştirerek immün hücrelerinin var olan tümör hücrelerini yok etmesi sağlayabilir (McDowell, 2019).

2.2.2. Kanser ve radyoterapi

Radyoterapi, kanser için kullanılan en yaygın tedavilerden biridir. Radyoterapi ile kanser tedavi edilebilir, vücutta kanserin geri oluşması önlenir, büyümesi durdurulabilir veya yavaşlatılabilir. Kanser için etkili radyoterapi, normal hücreleri minimum düzeyde öldürürken tümör hücrelerini maksimum düzeyde yok etme düşüncesine dayanmaktadır. Geleneksel olarak kanser radyoterapisi, komşu normal dokulara maksimum tolere edilen doz ile sınırlıdır. Bu düşünceye göre etkili radyoterapide, komşu sağlıklı hücreleri radyasyon hasarından, tolere edilebileceği kabul edilebilir doz kapasitesi seçilerek kanser hücrelerini öldürme kapasitesini nasıl en üst seviyeye çıkarılması amaçlanmaktadır (Chen & Kuo, 2017).

Işın tedavisi olarak da bilinen radyoterapide, büyük ölçüde iyonlaştırıcı X-ışınları kullanılır. Belirli dozda verilen radyasyon kanser hücrelerini öldürür veya DNA hasarına yol açarak kanser hücrelerinin bölünmelerini yavaşlatmaktadır. Kanser hücrelerinin DNA'sının hücreleri öldürmesine yetecek şekilde hasar görmesi ve tedavi bittikten sonra kanser hücrelerinin ölmesi zaman almaktadır. DNA'sı onarılamayacak düzeye gelen hücrelerin bölünmesi durur veya kanser hücreleri ölür. Ölen hücreler parçalanır ve vücut tarafından atılır (Baskar ve ark., 2012).

2.2.3. Kanser ve cerrahi yaklaşım

Cerrahi yaklaşım, dokunun kesilip vücuttan alınması işlemidir. Kanser tedavisinde kullanılan en eski yöntemlerdendir. Cerrahi tedavi katı tümör tedavisinde önemli bir yere sahiptir ama tek başına cerrahi tedavi, kanser hastalığının bölgesel olduğu zamanlarda kanser için iyileştirici olabilir. Bu tedavi yöntemi daha çok yavaş ilerleyen kanserler için uygundur. Cerrahi tedavi yapılmadan önce hastalığın hangi evrede olduğuna bakılmalıdır. Tedavi sonrası kişi enfeksiyon oluşumuna karşı kendini korumalıdır (*Surgery for Cancer* - NCI, 2015; Tohme ve ark., 2018).

1960'lı yıllarda radyoterapi ve cerrahi kanseri tedavisinde egemendi. Ancak bu tedaviler sonrasında kanserli hücrelerin metastazı ve kanserin tekrardan ortaya çıkması iyileşme oranını belirli bir noktada sabitlendiği görülmüştür. Yeni veriler kombinasyon kemoterapisinin çeşitli gelişmiş kanserleri iyileştirebileceğini gösterme zamanını kadar devam etmiştir (Amjad & Chidharla, 2023).

2.2.4. Kanser ve kemoterapi

Birçok farklı kemoterapi türü vardır ve farklı kemoterapi türlerinde birçok kemoterapi ilacı olmasına rağmen çalışma prensipleri benzerdir. Genelleme yapılacak olunursa kemoterapi için kullanılan ilaçlar hücre döngüsünün belirli bölümlerinde hücrelere saldırarak kanseri tedavi eden güçlü kimyasallardır. Tüm hücreler hücre döngüsü kontrol noktalarından geçer. Kanser hücreleri bu süreçten normal hücrelerden daha hızlı geçer, bu nedenle kemoterapi ilaçlarının bu hızlı büyüyen hücreler üzerinde daha fazla etkisi

vardır. Hızla bölünen hücreleri öldürmeye hedeflenmiş bu ilaçlar tümörleri küçültmeyi de sağlamaktadır. Kemoterapi ile kanserli hücreler küçültürken, hücrelerin var olduğu dokularda çoğalmasını ve hücrelerin metastaz yaparak farklı dokulara yayılmasını önlemektedir. Kemoterapi ilaçları sistemiktir. Kemoterapinin sistematik olması demek kan yoluyla dolaşımından geçtiği ve vücudun tüm bölgelerine ulaştığı anlamına gelmektedir. Kemoterapi tüm vücuda yayıldığı için, sağlıklı hücrelere de zarar verebilir. Bu nedenle kemoterapi gören hastalarda yan etki olarak aşırı ağrı, yorgunluk, saç dökülmesi, bulantı-kusma, uyku bozukluğu, immünolojik ve psikolojik değişiklikler gibi yaşam kalitesini düşürecek istenmeyen yan etkiler gözlemlenmektedir (Akeren & Hindistan, 2021; Amjad & Chidharla, 2023). Kemoterapinin hem hücrel bağışıklık üzerinde güçlü etkileri vardır. Bu etkiler, birçok durumda kanserle ilgili faktörler tarafından zaten tehlikeye girmiş olan hastanın savunma mekanizmalarına da zarar verir. Bağışıklık sisteminin zayıflamasıyla kanserli hastalar, özellikle bakteriyel ve fungal olmak üzere hemen hemen her tür enfeksiyona karşı oldukça hassaslaşırlar. Daha da önemlisi, kemoterapi alan kanserli hastalarda tüm enfeksiyon türleri önemli ölçüde morbidite ve mortalite oranları ile ilişkilidir (Vento & Cainelli, 2003). Kanser hastalarına verilen kemoterapi, kanser türüne ve ne kadar yayıldığına bağlıdır. Kemoterapi tek başına veya farklı tedavileri içeren bir tedavi planının parçası olarak verilebilir.

Kemoterapide ilaçlar, doz ve tedavi programı birçok faktöre bağlıdır. Bunlar; kanser türü, kanserin hangi evrede olduğu, kanser hastasının yaşı, genel sağlığı, sahip olduğu diğer tıbbi durumlar ve hastanın önceden aldığı kanser tedavileri, her ilacın olası yan etkileri vb. içermektedir (Debela ve ark., 2021).

Kanser için geleneksel tedaviler uzun süredir gösterilen çabalara rağmen kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi ile tedavi gören birçok hastada kısa süreli sonuçlarda yeterli olsa da uzun vadeli sonuçlarda yetersiz kalmaktadır. Geleneksel tedaviler, bilindiği üzere immünoşüpresif (bağışıklık baskılama) olma eğilimindedir. Bu sebepten dolayı bu geleneksel tedavi yöntemlerin dışında yeni bir tedavi yöntemi olan fotodinamik terapinin (FDT) ideal bir kanser tedavi yöntemi olarak ortaya çıkması olası bir sonuçtur. FDT tümör hücrelerini etkili bir şekilde yok edebilen ve metastaz yapmış kanser hücrelerini

yok etmek için bağıışıklık sistemini duyarlı hale getirebilen sınırlı bir kanser terapisiidir. Bu bilgilere dayanarak temel bileşen olarak FDT'yi esas alan kombinasyon tedavileri kanser tedavisinde daha olumlu sonuç vermesi beklenmektedir (Robertson ve ark., 2009). FDT, bu tedavilerle karşılaştırıldığı zaman daha az invaziv olması, tümörlerin seçici ablasyonu, ışığa duyarlaştırıcıların düşük toksisite göstermesi gibi birçok avantaja sahiptir (Yoo & Ha, 2012). Tümörlü bölgeye cerrahi müdahalede bulunmak istendiğı zaman akıllara ilk tümörlü dokunun metastaz yapabildiğı gelmektedir. Cerrahi tedavinin sahip olduğı bu dezavantaj varlığında FDT'nin cerrahi ile alınamayan tümörler için kullanılan bir tedavi yöntemi olarak geleneksel tedavilere göre ön plana çıkmıştır (Li & Wilson, 2015; Ye ve ark., 2015). FDT geleneksel tedavilerin başarısız olduğı, tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğı, cerrahinin hasta vücudunda şekil bozukluğa neden olacağı ve çoklu lezyon oluşturmaya eğilimine sahip hastalarda etkinlik göstermiştir. Standart tedavi yöntemlerinin işe yaramadığı durumlarda ise FDT devreye girerek daha kesin ve minimum yan etkili bir tedavi yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Geleneksel tedaviler son yıllarda bazı kanserler için başarı göstermelerine rağmen dirençli kanser hücreleri, kanserin tekrarlamaşı, metastaz gibi bazı sorunlar hala devam etmektedir. Bu nedenle, kanser tedavileri için bu sorunları aşabilecek daha iyi yeni teknolojiler gerekmektedir (Algorri ve ark., 2021; *Photodynamic Therapy (PDT): Procedure, Uses & Recovery*, 2022).

2.3. Fotodinamik Terapi ve Biyoteknoloji

2.3.1. Fotodinamik terapinin tarihsel gelişimi

Araştırmacılar yapılan bazı çalışmalarla bir asırdan daha uzun süre öncesinde ışık ve bazı kimyasalların birlikte kullanımı ile hücre ölümüne neden olabileceğini buldular. Oscar Raab, 1900'de yaptığı bir çalışmada, akridin boyalarının protozoa üzerindeki etkilerini araştırırken akridin kırmızısı boyar maddesini belirli dalga boylarını kullanarak infusoria için öldürücü etkiye sahip olduğunu buldu. Yapılan çalışmadaki denemelerde akridin kırmızısı-ışık kombinasyonunun, akridin kırmızı veya ışığın tek başına kullanımından daha yüksek bir sitotoksite gösterdiğini gözlemledi (Hamblin, 2020; Raab, 1900).

1900’de, Nörolog J. Prime epilepsi hastalarının oral eosin ile tedavisinde, vücutlarında güneş ışığına maruz kalan bölgelerinde dermatit geliştiğini gözlemledi (Hamblin, 2020; Manganiello & Figge, 1951).

Bu olayın ardından 1903 yılında H. V. Tappeiner ile A. Jesionek deri beyin tümörlerine sahip farelere eozin (topikal olarak) ve beyaz ışık kombinasyonu uygulayarak tedavi edebileceklerini buldular. Tümörlerin en derin bölgelerde olan hücreler dışındaki tüm tümörün nekroza yöneldiğini gözlemlediler. Bu olayı da fotodinamik eylem olarak adlandırdılar (Hamblin, 2020; Manganiello & Figge, 1951; Peck ve ark., 1955).

Işığa duyarlaştıracılardan şüana kadar en kapsamlı araştırılan porfirinler, 19. yüzyılın ortalarında tanımlanmıştır. Bu reaktifle ilk olarak W. Hausmann bir porfirin türevi olan hematoporfirin ve ışık kombinasyonu kullanarak paramesyum ve kırmızı kan hücrelerini tedavi edilebileceğini buldu. Ancak işlemin ardından ışığa maruziyet sonucu farelerde cilt reaksiyonları gözlemledi (Lipson & Baldes, 1961).

1993’te ilk kez insanları porfirinle tedavi eden Alman Feriedrich Meyer-Betz, kendi cildi üzerinde 200 mg hematoporfirini deneyerek vücudundaki etkilerini izledi. Bu test sonucunda ışık ile temas eden bölgelerde ağrı ve şişlik oluştuğunu gözlemledi (Diamond ve ark., 1972).

R. Lipson ve arkadaşları, S. Schwartz’ın geliştirdiği bir hematoporfirin türevi (HPD) olan bir bileşik kullanarak yaptıkları çalışmayla hem hematoporfirinlerden daha düşük dozda kullanım kolaylığı sağlaması ve hem de Lipson ve EJ Baldes, HPD’nin floresans özelliğini kullanarak lokalize olduğu tümör hücreleri için bir teşhis aracı kullanım potansiyeline sahip olduğunu buldu (Kelly & Snell, 1976; Lipson ve ark., 1961).

Tappeiner ve Jesionek’in kanser üzerine yaptıkları ilk çalışmadan sonra FDT ile kanser tedavisinin geliştirilmesi, 1972’de I. Daimond ve arkadaşları porfirinlerin tümör hücrelerindeki birikimi ve fototoksik özellikleriyle yaptığı çalışmayla devam etmiştir. Bu yapılan çalışmada sıçanlara verilen porfirinin, vücutlarına yerleştirilen gliomlardaki büyümenin yavaşladığı ve hatta 10-20 gün aralığında bastırıldığı görülmüştür. Ancak

daha sonra gliomların daha derin bölgelerde tekrardan büyümeye başladığı gözlemlenmiştir (Hamblin & Huang, 2014).

T. Dougherty ve arkadaşlarının 1975'te fareler ile yaptığı çalışmada HDP-kırmızı ışık kombinasyonu ile meme tümörü büyümesini tamamen durdurması ve ortadan kaldırması FDT'nin kanser tedavisi gelişiminde önemli bir ilerleme olmuştur (Fagnoli & Peris, 2015).

1975'te HPD ile yapılan başka bir çalışmada, JF Kelley ve arkadaşları farelerde HPD'nin hafif aktivasyonu ile mesane karsinomunu ortadan kaldırdığını bulmuşlardır (Szeimies, 2007). Farelerde yapılan bu uygulamadan sonra, 1976'da Kelley ve arkadaşları tarafından mesane kanseri için ilk defa insan deneyleri başlatılmış oldu. HPD'nin floresans özelliğini kullanarak beş kişiye kanser teşhisi konuldu. Aynı zamanda geleneksel tedavi yöntemlerinin başarısız olduğu mesane karsinomunun nüksettiği bir kanser hastasının tedavisinde kullanıldı. Yapılan çalışmada ilk olarak tümör floresansı ölçülürken daha sonra HPD'yi vücutta fotoaktivesi ve tümör yıkımını tetiklemek için civa buharlı bir lambaya bağlı kuvars kullanıldı. Hastada tümör büyümesi yavaşlarken FDT uygulanan yerlerde tümör nekrozu gerçekleşti (Hamblin, 2020; Kelly & Snell, 1976).

1987'de Dougherty ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği başka bir çalışmada ise 113 primer/sekonder cilt tümörüne sahip 25 hastada HPD-ışık tedavisi uygulandı. Bu tedavi sonucunda tümöre 98 tam yanıt, 13 kısmi yanıt ve 2 tedaviye direnç yanıtı görüldü. Bu çalışma FDT'nin başarılı bir şekilde tedavi ettiği ilk yüksek sayılı insan serisini bildirdi (Bonnett & Berenbaum, 1983; Hamblin, 2020).

Çalışmada yanıt veren tümör tipleri arasında skuamöz hücreli karsinom (SCC), bazal hücreli karsinomlar (BCC), habis melanomlar, meme kolon, endometriumun primer kanserlerinden kaynaklı metastatik deri lezyonlarını içerir. Tedavi sürecinde oluşan yan etkiler (eritem, ödem, bazı cilt nekrozları gibi) HPD'nin vücuda enjekte edilmesinden ışığa maruziyet işlemleri arasındaki süreyi en az üç güne çıkarılarak azaltılması sağlandı (Hamblin, 2020).

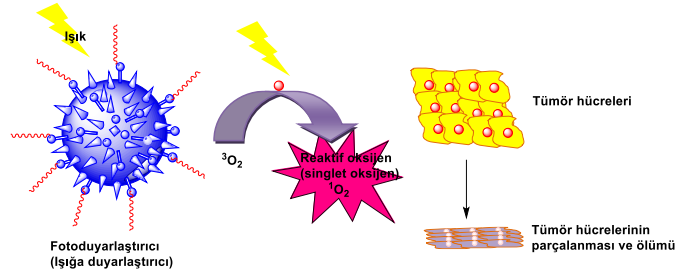
FDT'nin cilt ve mesane tümörüne karşı başarılarından sonra Y. Hayata ve arkadaşları, tıkaçıcı akciğer kanserini tedavisinde FDT'yi çalıştılar. Yapılan bronoskopik analizler sonrasında hastaların çoğunda tümör büyümesinde gerileme görülürken on dört hastadan sadece bir tanesi tamamen iyileşebildi (Kessel, 1986).

FDT'nin bu iki kanser üzerindeki başarılarından sonra, 1984 yılında JS McCaughan ve arkadaşları özofagus kanserine sahip olan hastaların ve OJ Balchum ve arkadaşları ise akciğer kanserine sahip olan hastaların tedavisinde FDT'yi kullandılar (Moan ve ark., 1983). Bu çalışmalardan bir sene sonra Hayata ve arkadaşları FDT'yi mide kanserine sahip hastaların tedavisinde kullandılar. Yapılan bu çalışmaların ışığında erken evre kanser için FDT başarılı bir yöntem olmasıyla geleneksel tedaviler uygulanan kanser hastalarında bazı komplikasyonlar görülmesinin sonucunda cerrahi işlem göremeyen erken evredeki kanser hastalarının tedavisi için FDT seçeneği önerildi (Hamblin, 2020).

İlerleyen zamanlarda bazı kanser hastalarında Klinik Araştırmalar web sitesinde (<https://clinicaltrials.gov/>) de gösterildiği gibi meme kanseri, göz içi tümörleri, beyin tümörleri, baş ve boyun kanserleri, kolorektal kanser, akciğer zarı kanseri, safra kanalı kanseri ve pankreas kanseri gibi birçok kanser türüne sahip olan hastalarının bazıları FDT ile tedavi edilmiş oldu (Felscher, 2003).

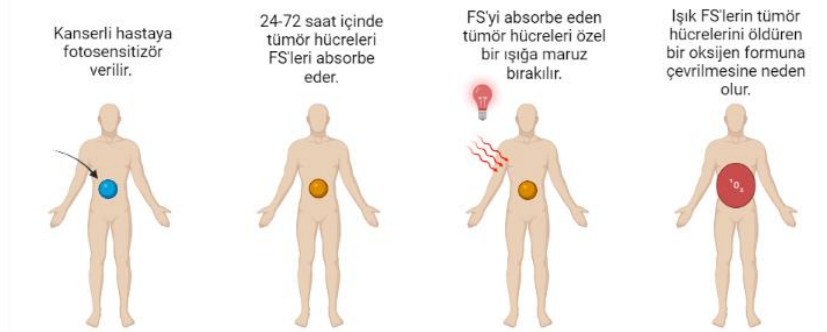
2.3.2. Fotodinamik terapi nedir?

Işığın tedavi edici özelliği binlerce yıl önceden beri bilinmektedir ve üç bin seneyi aşkın süredir ışın terapisi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Ackroyd ve ark., 2001). FDT'nin (tıp, kimya, biyokimya, malzeme bilimi gibi) multidisipliner doğası sayesinde birçok alandaki gelişmelere de katkı sağlamıştır (Algorri ve ark., 2021). Bu sayede FDT, teknolojilerde temel etki mekanizmalarının daha çok anlaşılır ve klinik uygulamaların daha kapsamlı hale gelmesine yol açmıştır (Li & Wilson, 2015). Işık tedavisi tek başına yeterli olmadığı için kimyasallar ile entegre edilerek kullanılmaya başlanmıştır. Bu ikili kombinasyonların denenmesi için yapılan deneyler fotodinamik terapinin ortaya çıkmasına yol açmıştır (Şekil 2.3) (Felscher, 2003).



Şekil 2.3. Fotodinamik terapiye genel bakış (Hong ve ark., 2016)

FDT'nin etki mekanizmalarını daha iyi anlamak için bileşenlerinin tanımlanması ve araştırılması gerekmektedir. Temel olarak FDT, fotoduyarlastırıcı (FD) adı verilen moleküllerin uygun bir dalga boyunda ışık ışıması ile etkileşimleri sonucu sitotoksik türlerin üretilmesinin sağlaması esasına dayalı fotokimya temelli bir yöntemidir (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4). FDT, ışıkla aktive edilen FD'ları kullanılarak malign ile benign hastalıklar için minimal invaziv bir tedavi çeşididir. Fotodinamik terapi bazı cilt ve göz rahatsızlıklarının yanı sıra bazı kanser türlerinin tedavisinde de kullanılır. FDT, tümörlerin tedavisi için umut verici yöntemidir. FDT, bazı kanser tedavisinde kullanımı klinik olarak onaylanmış çalışma türlerinden birisidir (Mallidi ve ark., 2016).



Şekil 2.4. Fotodinamik terapi mekanizmasının şematik gösterimi FS: FD, Fotoduyarlastırıcı (Kanser Tedavisinde Fotodinamik Terapi - Ulusal Kanser Enstitüsü, n.d.)

FDT, FD, ışık ve oksijen olmak üzere üç ana bileşenden meydana gelmektedir. Bunların hiçbirisi tek başına toksik aktiviteye sahip değildirler ancak bir arada bulundukları zaman toksik etki gösterebilirler. Bu da kanserli bölgeyi ameliyata gerek kalmadan tedavi edilme imkanı sağlar. Fotokimyasal reaksiyonun başlaması ve singlet oksijenin oluşması için bu

üç reaktifin aynı anda çalışabilmesi gerekmektedir (*Photodynamic therapy (PDT) - NHS, y.y.*).

Fotodinamik terapinin biyoteknolojideki yeri oldukça önemlidir. Fotodinamik terapinin biyoteknolojideki kullanımında en çok dikkat çeken konulardan biri de insan sağlığı olmuştur. İnsanın yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen kanser için FDT'nin agresifliği düşük ve hedefe yönelik bir terapi türü olması araştırmacıların bu alana ilgisi oldukça artırmaktadır. FDT'de aktif ilaç olarak kullanılan fotoduyarlaştırıcıların geliştirilmesine yönelik birçok çalışma vardır. Yeni fotoduyarlaştırıcılarda aranan en önemli özellik sağlıklı dokulara daha az hasar vermesidir. Bu sayede tedavide sağlıklı dokuların en az hasarla etkilenmesi beklenmektedir. Yeni fotoduyarlaştırıcılar kanser hastasına verildiğinde, sadece istenilen tümör dokusunda birikmesine, kanser hücrelerine verilen ilaç dozajlarının minimum düzeye düşürülmesine ve kanser tedavisi için gerekli terapötik etkinin oluşmasına imkan tanıyabileceği düşünülmektedir (Couto ve ark., 2020). FDT'de sağlıklı hücrelere verilen zarar sınırlıdır çünkü FD'lar anormal şekle sahip olan kanser hücrelerinde birikme eğilimindedir ve ışık direkt olarak FD'ların biriktiği dokulara odaklanmış olur (*Photodynamic Therapy to Treat Cancer-National Cancer Institute, 2021*). FDT'de kanser tedavisi için kullanılabilecek nitelikte yeni FD moleküllerin sentezi ile ilgili çalışmalar diğer araştırmalarda olduğu gibi günden güne artmaktadır.

2.3.3. İdeal fotoduyarlaştırıcılarda bulunması gereken özellikler

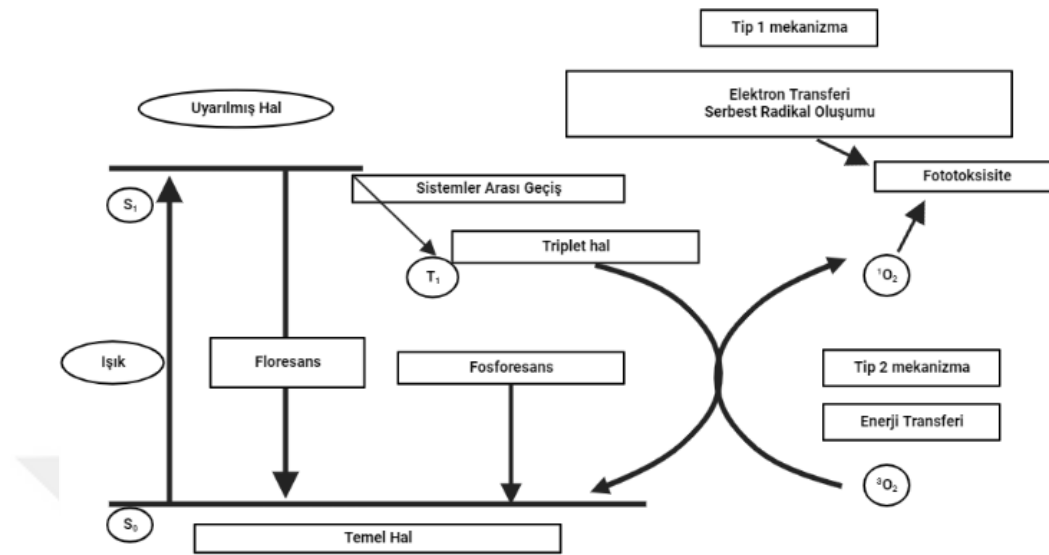
İdeal FD'lar, tercihen tümörlerde yüksek oranda birikmeli, yüksek singlet oksijen kuantum verimine sahip olmalı, karanlık aktivitesinin düşük olmalı, kanser hastasının vücudundan hızla elimine edilmeli, amfifilikliğe sahip olmalı ve yaklaşık 600 nm ile 800 nm arasında bir ışık absorpsiyon pikine sahip olmalıdır (Abrahamse & Hamblin, 2017). Yukarıda sıralanan özellikleri biraz daha açmak istenilirse; vücuda verilen bileşikler vücuttan atılırken böbrek ve karaciğer gibi boşaltım organlarından geçeceği için ihmal edilebilir bir karanlık sitotoksiteye sahip olması gerekmektedir ve normal dokudan hızlı klirens sahip olmalıdır. Derin bölge tümörlerinin tedavisinde kullanılan FD'ların yoğun

NIR absorpsiyonuna sahip olması gerekmekte ve uygun dalga boyuna sahip bir ışığa maruz bırakıldığında aktiveşebilmelidir. İntervenöz enfeksiyondan kaçınmak için hidrofilik ve tümör hücrelerine bağlanması için lipofiliklik gerektiği için amfifilik özelliğe sahip olmalıdır. FDT'nin daha kapsamlı kullanımına hastaların yönlendirilebilmesi için ucuz ve kolay bir şekilde ticari olarak temin edilmelidir (D. Chen ve ark., 2020; Connor ve ark., 2009).

2.3.4. Singlet oksijen

Reaktif oksijen türü olan singlet oksijen kanser tedavisinde kilit noktalardan birisidir. Yüksek enerjiye sahip olan singlet oksijen kanser hücrelerinde meydana geldiğinde hücre ölümüne neden olabilmektedir. FDT'de singlet oksijen oluşumu, kanser hücresinin çeşitli bölgelerinde, yeterli miktarda biriken FD'lar uygun görünür veya NIR bölgesindeki bir ışıkla birlikte aktive olur ve vücutta var olan moleküler oksijenin ($^3\text{O}_2$) tip II mekanizmasıyla birlikte FDT'nin üç bileşeninden birisi olan singlet oksijene ($^1\text{O}_2$) dönüşümü gerçekleşir. Singlet oksijen FD'nın hücre içerisinde lokalize olduğu bölgelerde üretilmektedir. Singlet oksijen üretme mekanizması, $^3\text{FD}_1^* + ^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{FD}_0 + ^1\text{O}_2$ olarak gösterilmektedir (Şekil 2.5). FDT ile oluşan ROS'un ömrü kısa olduğundan singlet oksijenin etki edebileceği mesafe azdır ve hücrede olduğu bölgenin çevresinde etki gösterebilmektedir (Redmond & Kochevar, 2006; Semyachkina-Glushkovskaya ve ark., 2017).

2.3.5. Fotodinamik terapi mekanizması



Şekil 2.5. İndirgenmiş Jablonski Diyagramı (Erdem, 2017)

Özel bir dalga boyundaki ışık kullanılarak FD aktif hale getirilir. Aktif hale getirilen FD, hücrede çeşitli fotokimyasal reaksiyonlar başlatır ve bu reaksiyonların sonunda kanser hücreleri ölüm yoluna girerler. Uyarılan FD iki durumla temel hale döner. Floresans yoluyla doğrudan enerji kaybedilir veya sistemler arası geçiş yoluyla triplet hale dönüşebilir. Triplet halde FDT’de kullanılan FD’lar iki farklı yol üzerinden elektron ve enerji transferi sayesinde DNA hasarına sebep olurlar. Bu mekanizmaların ikisi de hücrelerin içindeki oksijenle yakından ilişkilidir. Her iki mekanizmanın da işleyişi farklı olsa da ilk aşaması benzerlik göstermektedir (Erdem, 2017; Maharjan & Bhattarai, 2022).

Bir fotoduyarlayıcı, hücreye girdikten sonra, FD'nın absorpsiyon spektrumu ile eşleşen bir ışık dalga boyu ile özel bir ışığa maruz bırakılır ve foton absorpsiyonu nedeniyle temel enerji durumundan (S_0 , temel hal) uyarılmış duruma (S_1 , uyarılmış hal) dönüştürülür. FD'deki enerjinin bir kısmı, bir kuantum floresans şeklinde yayılır ve geri kalan enerji, FD'yı triplet hale bileşiğin uygun bir terapötik formuna yönlendirir (Alkan ve ark., 2011). FDT'nin etkisi triplet haldeki kararsız FD'nın yapısında oluşan fazla enerjiyi iki tip

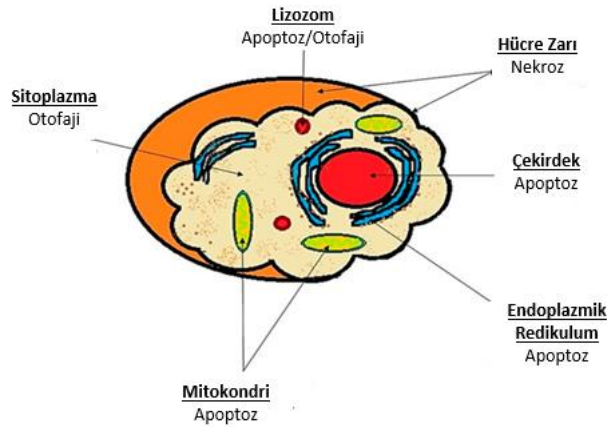
mekanizma ile diğer moleküllere transfer eder ve DNA hasarına sebep olur (Erdem, 2017; Kwiatkowski ve ark., 2018).

Tip I mekanizmasında FD enerjisi direkt etraftaki moleküller-hücre zarıyla etkileşime geçer ya da enerjisi bir protona-elektrona transfer edebilir. Elektronlar temel enerji halindeki oksijenle etkileşime girer. Tip I reaksiyonların işleyiş mekanizmaları hücrede reaktif oksijen oluşumu üzerinden meydana gelmektedir (Barnard & Berners-Price, 2007; Bonnett, 2002). Bu mekanizma reaktif oksijen türlerinin (ROS) (H_2O_2 (hidrojen peroksit), $O_2^{\bullet}$ (süperoksit), $OH^{\bullet}$ (hidroksil radikali)) oluşumuna yol açar ve moleküller oksidasyon ajanı olarak biyomoleküllerdeki reaksiyonlara katılır ve oksidatif strese yol açarak kanseri yok etmeyi sağlamaktadır (Castano ve ark., 2004; Hofman ve ark., 2007; Kwiatkowski ve ark., 2018).

Kanser tedavisinde tümör dokusunun iç bölgesi yetersiz kan Emilimi nedeniyle hipoksiktir. Alternatif etki mekanizmalarından biri olan tip II reaksiyonlarında PDT etkisi yüksek miktarda oksijen içeriğine bağlıdır (Alkan ve ark., 2011). FD'nin triplet hale geçişinin bir sonucu olarak, triplet halde (T_1) FD'nin enerjisi doğrudan oksijen molekülüne aktarılır çünkü aynı spinlere sahiptirler. Sonuç olarak son derece güçlü oksitleyici özelliklerle karakterize edilen uyarılmış oksijen parçacıkları singlet oksijen üretilir. Başka bir deyişle ışıqla aktive olan FD'nin ışıktan aldığı enerjisi hücrelerde bulunan moleküller oksijene transfer edilir ve moleküller oksijenden singlet oksijen oluşumu ile desteklenir (Hofman ve ark., 2007; Sasmal ve ark., 2007; Szaciłowski ve ark., 2005).

Singlet oksijen, yüksek enerjiye ve toksik etkiye sahip olduğu için biyomoleküllerde doymamış lipidler, kolesterol, α -amino asit türevleri ve pürin bazları da (nükleik asit) dahil olmak üzere, birçok çeşitli reaksiyonlarda rol alabilir (Angeles-Boza ve ark., 2004; Hofman ve ark., 2007; Sasmal ve ark., 2007). PDT'de singlet oksijen sadece kanser hücrelerinde değil normal hücrelerde de üretilir ve çevredeki hücrelerde singlet oksijen tutucuların kullanılmasıyla normal hücreler üzerinde oksidatif stres azaltılmış olur. Tip II mekanizması mükemmel bir antikanser potansiyeline sahiptir ve hipoksi etkinliğini ciddi

şekilde engeller (Kwiatkowski ve ark., 2018; Maharjan & Bhattarai, 2022). Bununla birlikte, tip II mekanizmasında enerji, üçlü FD'dan, hücre zarı, çekirdek, mitokondri, endoplazmik retikulum ve lizozomlar gibi hücrelerin bileşenleri ile spesifik olarak etkileşime giren sitotoksik $^1\text{O}_2$ üreten $^3\text{O}_2$ aktarılır ve hücre ölümüne neden olur. Böylelikle hem eş zamanlı hem de ayrı zamanlarda apoptoz ve nekroz sürecinde tümör hücrelerinin doğrudan ölümüne yol açabilir.



Şekil 2.6. Işığa duyarlaştırmaların hücre içinde lokalize olduğu bölgelere göre hücre ölüm mekanizmaları (Mokoena ve ark., 2021)

FDT'nin farklı hücre ölümü türlerinin karşılıklı katkısı, ışığa duyarlılaştırıcının hücre içi konumuna da bağlıdır. Mitokondri hasarı apoptoza yol açabilirken, hücre zarı yıkımları ve bütünlük kaybı nekrozu indükleyebilir ve lizozomların veya endoplazmik retikulumun hasarı otofajiye neden olabilir (Şekil 2.6). Bu etkileşim lizozomal membran ile mitokondri kökenli apoptoza ve vasküler hasara neden olur. Reaksiyonlar kanserli hücrenin ölümüyle sonuçlanır (Kwiatkowski ve ark., 2018; Maharjan & Bhattarai, 2022; Mroz ve ark., 2011).

Reaksiyonda kullanılan FD'nın konsantrasyonuna ve tipine bağlı olarak, her iki mekanizma da aynı anda meydana gelebilir. Tip I reaksiyon genellikle daha ciddi hasara yol açar. Tip I mekanizmasında FD'lar tüketilir ve yenilenmeleri gerekir. Singlet oksijen ve $\text{OH}^\bullet$ kısa ömürlüdürler ama oldukça çok reaktiflerdir (Maharjan & Bhattarai, 2022). FD'nın biriktiği alan ile FDT'nin etkisini gösterdiği alan doğru orantılıdır. FD'nın damar yoluyla da verilebilmektedir. Bu verilmenin sonuçları olarak FD'nın kanserli doku

çevresinde vasküler hasar meydana gelmektedir. Vazokonstriksiyon (damarların büzülmesi ve damarların daralması), tümör damarlarının trombozu (kan pıhtısı ile damarın tıkanması) , kan stazı (kan akımının yavaşlaması) ve bunlara bağlı olarak nekroz gelişmektedir (Kwiatkowski ve ark., 2018; Maharjan & Bhattarai, 2022).

Kanserin, lokal, minimum yan etkiyle ve hedefe yönelik olarak tedavisi hasta için büyük önem taşımaktadır. Vücudun tedavi edilen kanserli bölgeye ve bölgenin yerine bağlı olarak, FD madde ya bir damar yoluyla kan dolaşımına verilir ya da deri üzerine konulur. Belirli bir süre boyunca beklenerek ilacın kanser hücreleri tarafından emilmesi sağlanır. Daha sonra tedavi edilecek bölgeye özel bir ışık uygulanır. Işık, ilacın aktifleşmesine, reaksiyona girmesine ve kanserli hücrelerde hücreleri öldüren özel bir tür oksijen molekülü oluşturmaya neden olur. PDT ayrıca kanser hücrelerini besleyen kan damarlarını yok ederek ve bağışıklık sistemini kansere saldırması için uyararak da yardımcı olabilmektedir (Ackroyd ve ark., 2001; Algorri ve ark., 2021; Felsner, 2003).

FDT kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, cerrahi gibi farklı tedavi yöntemleri ile kombine edilerek hem daha etkili sonuçlar elde edilmesi hem de kullanılan ilaçların yan etkilerinin azalması hedeflenmiştir. FDT'nin kullanıldığı kombinasyon terapilerden şimdiye kadar olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Obeidin ve ark., 2018). FDT'nin çeşitli faydaları vardır. Örneğin, normal hücreleri değil, yalnızca kanser hücrelerini hedefler, radyasyon tedavisinden farklı olarak aynı bölgede birçok kez tekrarlanabilir ve diğer birçok kanser tedavisinden daha az zaman alır. Bununla birlikte daha az maliyetlidir. FDT'lerin aktivasyonu sırasında daha yüksek dalga boyunda ışık kaynağı kullanılabileceği için doku penetrasyonu da kolaylaştırılmış olacaktır.

Porfimer sodyum (Photofrin) en eski klinik FDT ajanlarından. Photofrin saflaştırılmış bir hematoporfirin türevidir, esterler ve eterler ile bağlanmış oligomerik porfirin birimlerinden oluşan bir karışımdır. Photofrin akciğer, yemek borusu mesane kanseri gibi insan sağlığını önemli ölçüde etkileyen çeşitli kanser tedavilerinde dünya çapında düzenleyici onay almıştır. Photofrin yaklaşık 630 nm'de absorban vermektedir fakat bu dalga boyunda ki fotonlar dokunun birkaç milimetre ilerisine etki edemezler bu nedenle

yalnızca yüzeysel tümörler gibi ulaşabileceği noktalarda kullanılması uygundur. Photofrin'nin 630 nm'de düşük absorpsiyon vermesi nedeniyle yüksek enerjili bir kaynaktan uzun süreli ışınlama ihtiyacına yol açar ve bunun sonucunda farklı komplikasyonların meydana gelmesine neden olur. Diğer bir dezavantajı ise vücuttan hızlı bir şekilde temizlenemez ve de verilen tedavi sonrasında hasta cildinin ışığa duyarlılığına yol açar (Kamkaew ve ark., 2013). Bu dezavantajlarının olması araştırmacıları daha etkili FDT ışığa duyarlılaştırıcılar geliştirmeye yöneltmiştir.

2.4. Aza-BODİPY (Azadipirometanlar)

İdeal fotoduyarlılaştırıcılarda aranan özellikler; ışık yokluğunda düşük toksisite, düşük yan etki göstermesi; fotoduyarlılaştırıcıların tümör dokusunda seçici birikim için uygun lipofilik/hidrofilik denge oluşturmaları; ışığın derin doku penetrasyonu için özellikle uzun dalga boylarında yüksek absorpsiyon göstermeleri ve singlet oksijen oluşum kuantum veriminin yüksek olması olarak sıralanabilir (Kamkaew ve ark., 2013).

Bordipirometanlar (BODİPY), moleküler oksijenden yüksek oranda reaktif singlet oksijen ($^1O_2$) üretmek için ışıkla aktive edilebilen ve foto-ışınlanmış bölgede doku hasarına yol açan ışığa duyarlılaştırıcılardır ve uzun yıllar boyunca ideal fotoduyarlılaştırıcılar olabileceği düşünülmüştür (Kue ve ark., 2018). BODİPY biyobelirteç araştırmalarındaki önemli ilerlemelere rağmen, bu BODİPY türevlerinin çoğu, hidrofobik yapıları, sulu ortamlarda agrega oluşturma eğilimleri ve yeterli tümör seçiciliğinin olmaması nedeniyle sınırlı biyolojik kullanıma sahiptir (Lan ve ark., 2019). Bordipirometanın ana halkasındaki karbon atomunu bir nitrojen atomu ile değiştirmesi sonu aza-bordipirometan adı verilen moleküller elde edilirler ve yakın akrabaları bordipirometanlara göre daha iyi fotoduyarlılaştırıcı adaylarıdır. Aza-bordipirometanlar mavi renkli kırmızı bölgede absorpsiyon yapabilen boyalar olarak bilinirler (Shi ve ark., 2020). Birçok bordipirometana (BODİPY) kıyasla aza-bordipirometanlar (aza-BODİPY) daha uzun dalga boyu absorpsiyonuna ve floresan emisyon maksimumuna sahiptir. Bu özelliği sayesinde Aza-BODİPY'ların biyolojik sistemlerde prob olarak kullanımı yaygındır (Kamkaew ve ark., 2013).

Bu tezde kullanılacak bileşiklerin, porfirin ve bordirometan türevlerine göre daha yüksek verimle, birkaç basit adımda sentezlenebilecek ve türevlendirilebilecek yapıdadır. Azadirometan ligandlarının birçoğu BF₂ komplekslerine dönüştürülmedikleri zaman floresan özellik göstermez fakat yeni bileşikler emisif karaktere sahiptir. Aza-BODİPY boyalarının absorpsiyon ve emisyon maksimumları uygun kimyasal modifikasyonlarla yakın kızılötesi (NIR) bölgesine kaydırılabilir bu da FDT’de aranan en önemli özelliklerinden birisidir. Yakın Infrared bölgede absorpsiyon yapmalarının sonucunda Aza-BODİPY’lar hücre içi etiketleme ve FDT’de kullanılabilmeye uygun olan bileşiklerdir (Fan ve ark., 2014).

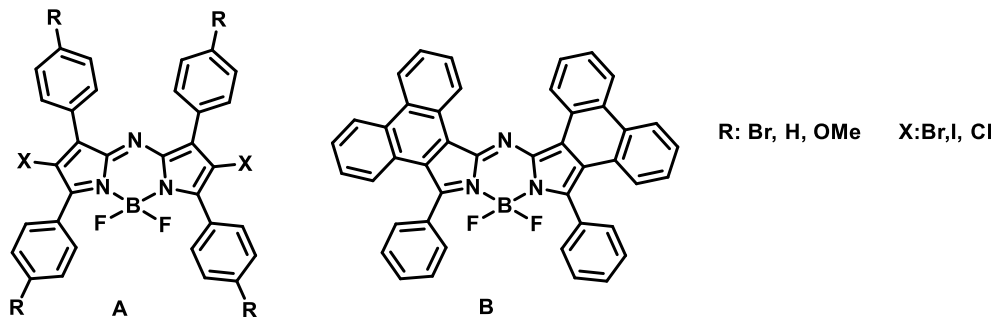
Aza-BODİPY molekülü çeşitli modifikasyonlar yapılması uygundur. Aza-BODİPY boyaları, absorpsiyon özelliklerinin sentetik olarak ayarlanabilmesi ve modifiye edilebilmeleri, kimyasal sağlamlık ve fizyolojik koşullar altında yüksek hidrolitik stabiliteye sahip olmaları yönünden fotodinamik terapide kullanılan ve dezavantajlara sahip olan diğer fotoduyarlaştırıcıların önüne geçmektedir (Carpenter ve ark., 2015). Bu sınıftaki boyaların çoğu, PDT ajanları için birçok ideal özelliğe sahip olması dolayısıyla uzun dalga boylarında absorpsiyon sağlayan modifikasyonların yapılması mümkündür.

Fotodinamik terapide sistemler arası geçişi (ISC) arttırmak için modifiye edilme eğilimi gösteren BODİPY boyaları, ağır atomlara spin-bağlama başka bir deyişle ağır atom etkisi bu modifikasyonların en yaygınıdır ve bu modifikasyonlardan en sık karşılaşılan halojenasyondur. BODİPY çekirdeği üzerine ağır atomların uygun şekilde yerleştirilmesi, spin-yörünge eşleşmesini, dolayısıyla sistemler arası geçişi teşvik eder (Kamkaew ve ark., 2013).

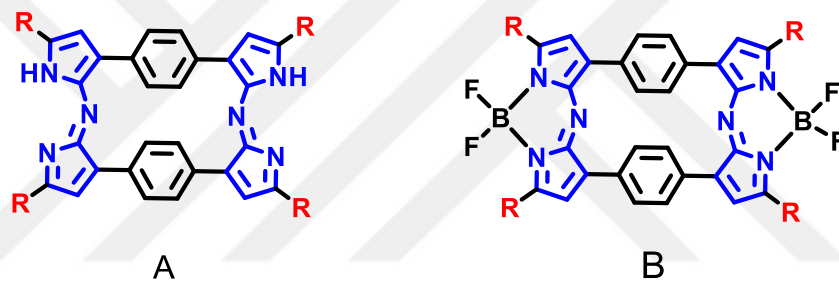
2.4.1. Literatürde bulunan bazı azadirometan ligandları:

Azadirometan kromoforlarının ilk literatüre girişlerinden bugüne kadar çeşitli gruplarla fonksiyonel hale getirilmişlerdir. Bu ligandlar hem fenil grupları üzerinden hemde pirolük uçlardan ihtiyaca binaen halojenize edilebilir (Mcdonnell & Shea, 2006). Azadirometan kromoforları, pirolük pozisyonlar üzerinden de aromatik gruplar ile konjuge edilmişlerdir

(Şekil 2.7) (Sheng ve ark., 2017). Böylelikle kuantum verimi yüksek ve yakın IR bölgede emisyon yapabilen moleküler yapılar elde edilmiştir.



Şekil 2.7. Farklı aza-BODIPY iskeleti A (Mcdonnell & Shea, 2006) B (Sheng ve ark., 2017)



Şekil 2.8. Proje kapsamında kullanılan Aza-BODİPY yapılarının ana iskeleti A: Aza-BODİPY ligandı, B: Aza-BODİPY kompleksi

Kemoterapötik ilaçlar kanser tedavisinin sonucunu iyileştirse de, bazı hastalar ilaca bağlı yan etkiler gösterebilir ve en önemlisi, yüksek doz gerekliliği, zayıf biyoyararlanım, düşük seçicilik, ilaç direnci gelişimi ve spesifik olmayan etkileşimler gibi kemoterapötik ilaçların dezavantajları vardır. Bu oluşabilecek dezavantajları yok etmek veya en aza indirmek için birçok yeni araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Çalışmalar terapötik dozu veya sıklığı azaltmak ve böylece antikanser ilaçlarının toksik etkilerini en aza indirmek için uygun bir ilaç dağıtım sisteminin geliştirilmesine acilen ihtiyaç vardır (Shakil ve ark., 2021).

BOPİDY’de dahil olmak üzere şuana kadar üretilen FD’lar için düşük singlet oksijen veriminden yakınılmaktadır (Zou ve ark., 2017). FDT’de oluşan fotohasarın üçlü

uyarılmış durum yoluyla oluştuğu düşünülür. Sistemler arası geçişi (ISC) daha da geliştirmek için tasarlanabilir FD kullanmak tedaviyi avantajıdır. Bu modifikasyonlarda en yaygın olanı ağır atom etkisi oluşturmaktır ve bunu en çok halojen (iyot vb.) eklenmesiyle gerçekleştirilmektedir. Aza-BODİPY gibi FD'ların tasarlanabilirlik özelliği avantajı sayesinde ağır atomlar ile modifiye edilerek ISC geçiş kolaylaşır ve singlet oksijen oluşum verimini arttırabilmektedir (Abrahamse & Hamblin, 2017; Kamkaew ve ark., 2013). Aza-BODİPY'nin tasarlanabilir oluşu ve halojenizasyonun FDT'ye olan avantajları kombinasyonu ile tez kapsamında kullanılacak liganlar ve kompleksler Tablo 2.1'de gösterilmiştir (Şekil 2.8).

Tablo 2.1. Tez kapsamında kullanılan ligandlar ve kompleksler

Tez Kapsamında Kullanılan Ligandlar ve Kompleksler			
Ligandlar	NİS Ligandları	BF ₂ Kompleksleri	NİS-BF ₂ Kompleksleri
<u>L3</u> $C_{52}H_{30}I_4N_6$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 1246.47 g/mol	<u>L3-NİS</u> $C_{52}H_{26}I_8N_6$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 1750.06 g/mol	<u>L3-BF₂</u> $C_{52}H_{28}B_2F_4I_4N_6$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 1342.07 g/mol	<u>L3-NİS-BF₂</u> $C_{52}H_{24}B_2F_4I_8N_6$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 1845.66 g/mol
<u>Na-L</u> $C_{52}H_{30}N_6Na_4O_4$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 894.81 g/mol	<u>Na-L- NİS</u> $C_{52}H_{26}I_4N_6Na_4O_4$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 1398.39 g/mol	<u>Na-L-BF₂</u> $C_{52}H_{28}B_2F_4N_6Na_4O_4$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 990.41 g/mol	<u>Na-L- NİS-BF₂</u> $C_{52}H_{24}B_2F_4I_4N_6Na_4O_4$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 1493.99 g/mol
<u>L1</u> $C_{56}H_{42}N_6O_4$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 862.99 g/mol	<u>L-NİS</u> $C_{56}H_{38}I_4N_6O_4$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 1366.58 g/mol	<u>L1-BF₂</u> $C_{56}H_{40}B_2F_4N_6O_4$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 958.59 g/mol	<u>L-NİS-BF₂</u> $C_{56}H_{36}B_2F_4I_4N_6O_4$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 1462.17 g/mol
<u>L2</u> $C_{80}H_{90}N_6O_{16}$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 1391.63 g/mol	<u>L2-NİS</u> $C_{80}H_{86}I_4N_6O_{16}$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 1895.21 g/mol	<u>L2-BF₂</u> $C_{80}H_{88}B_2F_4N_6O_{16}$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 1487.22 g/mol	<u>L2-NİS-BF₂</u> $C_{80}H_{84}B_2F_4I_4N_6O_{16}$ <u>Moleküler ağırlığı:</u> 1990.81 g/mol

2.5. FDT'nin Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkisi

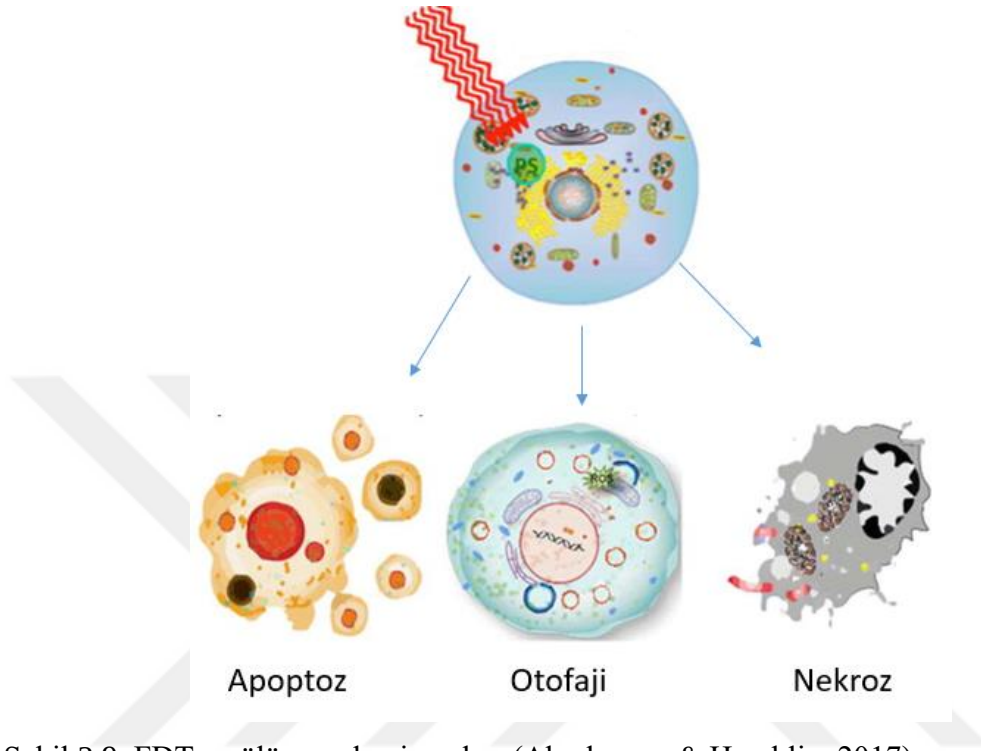
FDT'nin tümör yıkımına aracılık ettiği üç ana mekanizma vardır (Dougherty ve ark., 1998). İlk olarak, FDT reaksiyonları sonucu üretilen ROS, kanser hücrelerini doğrudan yok edebilir. Aynı zamanda da FDT tümörle ilişkili damarlara zarar vererek tümör enfarktüsüne yol açabilir. Son olarak, FDT, tümör hücrelerine karşı bir bağışıklık tepkisinin aktive olmasına neden olabilir. Bu üç mekanizma birbirini etkileyebilir.

Tablo 2.2. FDT ve ana anti-tümör mekanizmaları (Mroz ve ark., 2011)

FDT VE ANA ANTİ-TÜMÖR MEKANİZMALARI		
	Organeller	Süreç
Doğrudan Hücre Hasarı	Mitokondri: • Sitokrom c salınımı • Bcl-2 Hasarı	Apoptoz
	Sitoplazma: • NFκB hasarı	Apoptoz
	Endoplazmik Retikulum: • Beclin 1 • MTOR aktivasyonu	Otofaji
	Hücre zarının parçalanması	Nekroz
	Oksijen ve besinlerin yerel olarak tükenmesi	Apoptoz Otofaji Nekroz
Bağışıklık yanıtı aktivasyonu	Sitotoksik T hücreleri	Granzim aracılı apoptoz

FDT'de hücre ölüm şekli FD'nin hücre içinde nereye lokalize olduğuna bağlıdır. Mitokondride lokalize olan FD, mitokondri membranının geçirgenliğinde bir kayıp oluşturur. Bu kayıp proapoptotik araçların salınmasına yol açar. Endoplazmik retikulumda (ER) lokalize olan bir FD, ER'de bir hasara yol açarak hücresel kalsiyum birikintilerinin serbest kalmasına yol açar. Lizozomda lokalize olan FD, proteolitik enzimlerin serbest kalmasına neden olur. Aynı zamanda lizozomlar otofagozomlarla

birleşerek hasarlı organelleri hidrolize etmeyi ve otofaji esnasında geri dönüşümü sağlamayı amaçlar (Tablo 2.2) (Şekil 2.9) (Mroz ve ark., 2011).



Şekil 2.9. FDT ve ölüm mekanizmaları (Abrahamse & Hamblin, 2017)

2.5.1. FDT ve hücre ölüm şekilleri

Yaygın olarak görülen hücre ölüm şekillerinden apoptoz, her hücrede gerçekleşebilen, genetik olarak kodlanmış, karmaşık ve kontrollü bir hücre ölüm yoludur (Pettigrew & Cotter, 2009). Ölüm reseptörlerinin aktive olması veya mitokondride bulunan sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması ile başlayabilmektedir (Rustin, 2002). Her iki seçenekte sonunda cellat kaspazları olarak bilenen kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 gibi kaspaz kaskadlarını aktive olmasına neden olur. Aktive olan kaspazlar hücresel substratları parçalayarak hücreyi ölüme götürecek morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşmasını başlatır (Rathmell & Thompson, 1999). Bu olay çekirdek laminlerinin bölünmesi, kromatinlerin giderek yoğunlaşması ve çekirdeğin büzüşmesiyle devam eder. Kaspaz ile aktive olan deoksiribonükleaz (DNaz) CAD (karbomoil fosfosentetaz, aspartat transkarbamoilaz ve dihidroorotat dehidrogenaz enzimlerinin oluşturduğu kompleks) inhibitörünün bölünmesi DNA'nın parçalanmasını sağlar. Hücre içi iskelet proteinlerinin

bölünmesi, hücrede bir parçalanma ve apoptotik cisimciklerin oluşmasını sağlar (Savill & Fadok, 2000). Tümör hücreleri birçok protein ile kontrol edilen apoptoza karşı direnç oluşturabilmektedir. Kanser tedavisinde kullanılacak yöntem veya yöntemler seçilirken bu husus göz ardı edilmemelidir (Igney & Krammer, 2002).

FDT terapi ile ilişki birçok deney yapılmıştı ancak FDT'nin neden olduğu ölüm yoluyla ilişkin ilk rapor 1991'de Oleinick ve arkadaşları tarafından sunuldu. Bu çalışmada, L51787 (fare lenfoma) hücrelerinin LY-R ve LY-S suşları üzerinde kloroalüminyum ftalosiyanın FD'sını kullanarak hücrelerde FDT'nin hangi ölüm mekanizmasını indüklediği araştırılmak istenmiştir. Kullanılan FD, her iki suşta benzer olarak apoptozun tetiklenmesine yol açmıştır (Szumiel, 2005).

Günümüze kadar yapılmış çalışmalarda sonuç olarak FDT B-hücresi lenfoma-2 (Bcl-2), aile üyeleri, kaspazlar ve apoptozu indükleyen faktör ile çeşitli hücre ölüm yollarını aktive ederek kanser hücrelerinin ölümüne neden olduğu gözlemlenmiştir. FDT'nin genellikle kanser hücresinin apoptoz yoluyla ölümünü indüklediği bilinmektedir (Mokoena ve ark., 2021).

FDT esnasında, doğrudan hücre hasarı, FD'nin mitokondride birikmesiyle sitokrom c salınımı ve Bcl-2 hasarı ile sonuçlandığı durumlarda apoptoz ölüm yolu indüklenmektedir. Aynı zamanda Nükleer faktör kappa B (NFkB) yolağında hasar meydana gelen bir hücrede, FD sitoplazmada birikirse NFkB yolunda oluşan hasarla anti-apoptotik gen stimülasyonu aktivitesini engellendiği için kanser hücresi apoptoz sürecine girebilmektedir (Agostinis ve ark., 2011; Castano ve ark., 2005; Mokoena ve ark., 2021; Mroz ve ark., 2011). FDT, yapılan çalışmalarda Bcl-2 ve Bcl-2 ile ilişkili antiapoptotik proteinlerde bir fotohasar oluşturduğu ve bu ailenin proapoptotik üyelerinin aktivasyonuna neden olduğu düşünülmektedir (Oleinick ve ark., 2002).

2010 yılında Chen ve arkadaşlarının özofagus kanseri ve 2009 yılında He ve arkadaşlarının rahim ağzı kanseri üzerinde yaptıkları çalışmalarda 5-aminolevünilik asit (5-ALA) ile yaptıkları çalışmada Bcl-2 mRNA üretmesini baskımlarken, Bax mRNA seviyelerinde bir artış meydana geldiğini ve hücrenin G₀/G₁ fazında hücre döngüsünün

durduğunu gözlemladiler ve bu sayede iki kanser hücre hattında da apoptotik ölüm yolunun indüklendiğini gözlemladiler (He ve ark., 2010) .

2010'da Koval ve arkadaşlarının insan meme adenokarsinomu hücre hattı üzerinde yaptıkları bir çalışmada hiperisin (HY) ile yapılan FDT'de proapoptotik proteinler olan Bax protein seviyesinde bir artış meydana geldiğini gözlemladiler ve HY FD'nı kullanılarak yapılan FDT'nin, kanser hücresinin apoptozunu indüklediğini gözlemladiler (Koval ve ark., 2010).

Chiu ve Olenick 2001 yılında fare lenfoma (LY-R) hücrelerinin ftalosiyanın (Pc4) FD'si kullanılarak yapılan FDT tedavisinde, mitokondri zarının geçirgenliğinde bir hasar olduğu ve sitoplazmaya sitokrom c'nin salındığı gözlemlenmiş ve apoptoz hücre ölümü indüklendiği görülmektedir (Chlu & Olenick, 2001).

Başka bir ölüm şekli olan nekroz, sitoplazmadaki hacimsel artış, organellerdeki yıkım ve hücre zarındaki hasar ile tanımlanabilen, hücrenin içeriğinin dışarı sızması ve bu sızıntı sonucunda enflamasyon oluşumu, hücre topluluğunun büyük bir kısmında hızlı ve şiddetli bir yıkım şekli olarak gösterilmiştir (Mroz ve ark., 2011). Piknotik çekirdek varlığıyla sitoplazmik çekirdek membranının parçalanması ile hücre içi metaryallerin dışarı sızmasına yol açarken, kontrolsüz biçimde fiziksel veya kimyasal hasara yol açan nekrozda parçalanma temel olarak proteolitik aktiviteler ile meydana gelir. FDT'de yüksek dozdaki FD kullanımı ve/veya yüksek bir ışığın kullanımının hücre ölüm şeklini nekroza eğilimli yapmaktadır (Kitsis & Molkenin, 2010; Mroz ve ark., 2011; Proskuryakov & Gabai, 2009).

Nagata ve arkadaşlarının insan malign melenom hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada amfifilik FD ATX-S10 (Na) kullanarak %70'in altında sitotoksite oluşturan dozların kullanımının hücre ölümünü apoptoza yönlendirdiğini %99 gibi yüksek miktarda sitotoksite oluşturan dozların ise hücre ölümünü nekroza yönlendirdiğini buldular (Mroz ve ark., 2011; Nagata ve ark., 2003).

FDT ile tedavi sürecinde oluşan apoptozun ortak özelliği mitokondride bulunan sitokrom c'nin sitoplazmaya sızması ve devamında apoptozom ve prokaspazlardan prokaspaz-3'ün

aktive olmasıdır. Hücre membranında biriken FD'lar ile membranın yapısal bütünlüğünün kaybolması ve hücre enerjisi için gerekli olan ATP miktarının hızla tükenmesi sonucunda apoptoza gidecek olan hücre nekroz ölüm yoluna gidebilir (Kessel & Poretz, 2000; Mroz ve ark., 2011).

Yüksek dozda FDT uygulanması, hücredeki temel enzimler ve apoptotik kaskadın (kaspazlar gibi) diğer bileşenlerinin fotokimyasal aktivasyonunu inhibe edebilir. Laive ve arkadaşlarının yüksek miktarda FDT kullanarak perilenkinonlar (hiperisin ve dimetil tetrahidroksiheliantron) ile yaptığı bir çalışmada lamin fosforillenmesinde bir müdahale veya lamin fotodinamik çapraz bağlanması sonucunda apoptozun inhibe olduğunu gözlemlediler (Lavie ve ark., 1999; Mroz ve ark., 2011).

Xue ve Oleinick yaptıkları bir çalışmada MCF-7 hücre kullandılar. Pc4 kullanılarak yaptıkları FDT'de kaspaz-3 içermeyen MCF-7 hücreleri ile MCF-7 hücrelerine kaspaz-3 geri transfekte ettiklerinde hücredeki etkileri gözlemlediler. Bu iki farklı durumda sadece kaspaz eksprese edebilen hücrelerde apoptotik ölüm olduğunu gördüler. Dahle, Steele ve Moan'ın MDCK II hücre hattı kullanarak mezo-tetra(4-sülfonatofenil)porfin (TPPS4) ile yaptıkları çalışma sonucunda FDT'deki hücre ölüm yolunun seçiminde hücre yoğunluğunun da etkili olduğunu bildirdi (Dahle ve ark., 1999; Mroz ve ark., 2011).

Coupienne ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Beyindeki bir kanser türü olan glioblastoma'nın FDT ile tedavisinde ALA FD'sının kullanılması kanser hücrelerini nekrotik hücre ölümünü aktive edebilme mekanizmasını araştırmışlardır. Kontrollü hücre ölümü olan apoptozun hücre ölümü sinyal yollarında yer alan reseptör ile etkileşen protein-3'den (RIP₃) bağımsız, nekrotik ölüm yolunun ise RIP₃'e bağımlı olduğunu görülmüştür (Coupienne ve ark., 2011; Mroz ve ark., 2011).

Hasarlı ve gereğinden fazla miktarda üretilmiş proteinlerinin ve organellerinin yok edilmesi için hücre ölüm yolu olan otofaji, homeostazın korunması ve hücre içi bileşenleri ve hücre canlılığını korumak için metabolik stres zamanlarında diğer hücreler için alternatif enerji kaynağı olarak da görev yapmaktadır. Otofaji hücrede, hücre üretilen ürünlerin sentezi, bozulması ve zamanı geldiğinde geri dönüşümündeki korumakla da görevli olan katabolik bir hücresel süreçtir (Mathew ve ark., 2007). Organellerin ve hücresel

proteinlerin lizozomal bozunmasını barındırır. Bu süreç ilk olarak çift zarlı bir yapıya sahip olan otofagozom, hedeflenen bölgeyi çevreler ve sitoplazmada ayrı bir vezikül oluşturur. Daha sonra bu vezikül lizozom ile kaynaşır ve otofagolizozomu oluşturur. Oluşan otofagolizom içeriği lizozomal hidrolazlarla parçalanır (Kroemer & Jäätelä, 2005).

1990'ların sonunda otofaji moleküler olarak kontrol edilebilir mi sorusuna yoğunlaşıldı. Bu sorunun ardından bu süreçte görevli sinyal yolları, hücre büyümesini ve protein sentezini kontrolünden sorumlu rapamisin kinazın (TOR) hedefinin ne olduğu daha iyi anlaşılmış oldu (Bjornsti & Houghton, 2004).

Ohsumi ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptığı bir çalışmada mayada oluşan otofajinin memeli hücrelerinde olan otofaji ile benzerlik gösterdiğini fark ettiler. Ohsumi ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma ilk kez otofaji ile ilgili genin (ATG1) tanımlanmasını sağladı ve kısa bir süre sonra da ilk kez memeli otofaji genleri keşfedildi (Bjornsti & Houghton, 2004; Mroz ve ark., 2011).

Beclin1 hem otofajide görevli bir protein hem de bir tümör baskılayıcı olduğu keşfedildi. Otofaji ve kanser hakkında yapılan bazı çalışmalar bazı değişik özellikler gösterdi. Beclin1 otofajideki üretimiyle tümör büyümesini baskımlarken kanserin ilerlemesiyle kanser hücrelerini hayatta tutmak ve gerekli olan enerji sağlamak için katı tümörlerin merkez kısmındaki düşük besin kaynağına sahip hücrelerde tümörün ilerlemesini teşvik eder. Otofaji aynı zamanda apoptotik yolları bloke edebilir ve kanser hücrelerini uygulanan tedavilerden koruyabilir (Maiuri ve ark., 2010; Mroz ve ark., 2011). Aynı zamanda bazı kanser tedavileri, tümör hücrelerinin otofaji ölüm yolunu indükler. Kanser hücreleri için otofajinin bu ikili etkisi tam olarak anlaşıldığında daha iyi bir kanser tedavisi sağlanabilir (Mroz ve ark., 2011).

FDT'nin bir sonucu olan otofaji nasıl etkilendiği hala belirsizlik taşımaktadır (Kessel, 2006; Reiners ve ark., 2010). Genel olarak hücreler, hücrede oluşan hasarlı organel ve proteinlerden temizleyerek ROS ile oluşan hasardan korunmak için otofajiyi kullanır

(Scherz-Shouval ve ark., 2007). FDT ile oluşan ROS'nin tipine ve oluşturduğu oksidatif hasarın ne derece olduğuna bakılarak sitoprotektif olarak hareket eden otofajik hücre ölümünü indükleyebilir (Sasnauskiene ve ark., 2009).

2007 yılında Kessel ve Arroyo'nun Murin lösemi L1210 hücreleri ile yaptığı bir çalışmada otofajinin apoptozdan hemen önce gerçekleştiği görülmüştür (Kessel & Arroyo, 2007).

Agt7 geninin susturulmasıyla otofajinin önlenmesi, düşük ışık dozları kullanılarak foto-öldürmenin gerçekleştirilebileceği görülmüştür. Bu da FDT'den kaynaklı oluşan ROS'lerine karşı oluşan savunma mekanizması teorisiyle tutarlılık arz etmektedir (Kessel & Reiners, 2007).

Ancak apoptotik yolun düzenlenmesinde görev alan Bak ve Bax eksikliğinde apoptoza uğrayamayan hücrelerde bu durum farklılık gösterir ve bu hücrelerde FDT ile tetiklenen otofaji, nekrotik, kaspazdan bağımsız olan bir hücre ölümünü indükler (Buytaert ve ark., 2006). Otofajinin baskılandığı apoptoz yeteneği olmayan hücrelerde FDT ile hücre ölümünde inhibe olmuş olduğu görüldü. Sonuç olarak FDT ile uyarılan otofaji, apoptozdan bağımsız bir şekilde gerçekleşir ve apoptoz yapabilen hücrelerde hayatta kalmaya yönlendirse de apoptoz yeteneği taşımayan hücrelerde hücre ölümünü teşvik ettiği belirlenmiştir (Mroz ve ark., 2011).

FDT ve otofaji arasındaki bağlantının nasıl olduğunu anlamak için, otofaji mekanizmasında FDT'den etkilenen proteinleri araştırmak gerekmektedir. Bu mekanizmadaki birçok protein FDT'nin oluşturduğu ROS ile hasara uğratıldığı fark edilmektedir. Endoplazmik redikulum (ER) ve mitokondriyi hedef alan bazı FD'lar pro-tofajik protein olan Beclin1'in bağlandığı Bcl-2'ye hasar verir. IP₃ proteini (ER ile ilişkili otofajik mekanizmanın düzenleyicisi) Pc4'ten (ftalosiyanın FD) etkilenebilir (Criollo ve ark., 2007; Mroz ve ark., 2011; Xue ve ark., 2007).

AlPcS'nin ışıkla aktivasyonu, otofajik sinyal yolağında görevli, hücre büyüme düzenleyicisi olan rapamisinin memelilerdeki hedefi mTOR'u hasara uğratmaktadır (Mroz ve ark., 2011; Weyergang ve ark., 2009). Otofajide görevli Beclin1, Atg5 ve Atg7

gibi proteinler FDT'den etkilenmezken, FDT ile fotohasara uğrayan otofajie görevli birçok proteinin otofagozom oluşumunda etkinliğinin devam ettiği görülmüştür (Mroz ve ark., 2011).

FDT'de bazı FD'lar, otofajide sorumlu organellere (lizozom, endozom gibi) zarar vermesiyle de otofajiyi etkilemesi mümkündür. Örneğin, TPPS4 (Tetra(4-sülfonatofenil)-porfin) organel matrisinde foto-oksidasyon oluşmasını sağlar (Berg & Moan, 1994; Mroz ve ark., 2011). Bu şekilde gerçekleşen FDT'de, bu organelle spesifik hedeflenmesine izin veren lizozomal enzimler zar yırtılmadan önce inhibe edilmektedir (Strømhaug ve ark., 1997).

FDT'de kullanılan FD'lardan NPe6 ve TPPS2, lizozomun zarına bağlanır ve ışıkla aktive olan bu FD'lar zarı yırtılmaya sebep olur. Yırtılma sonucunda serbest kalan proteazlar (nötralize olmamış), Bcl-2 ailesinde bulunan, proapoptotik bir protein olan Bid'in katepsin aracılı bölünmesiyle birlikte, apoptozun başlamasına neden olabilir (Mroz ve ark., 2011; Reiners ve ark., 2002).

Bu amfifilik FD'ları kullanılarak yapılan FDT, hücrenin otofagazomların, endozomların ve otolizozomların zarlarında yırtılma meydana gelmesine ve içeriklerinin organel dışına sızmasına neden olacaktır. Sonuç olarak PDT'de kullanılan FD'nın tipi tümör hücrelerinin otofajik ölüm yolundaki etkisi değiştirmektedir (Mroz ve ark., 2011).

Joseph ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada murin hepatoma 1c1c7 hücre hattında hasarlı bir lizozomun otofajideki etkisini incelemişlerdir. Hücreler NPE6 ile duyalı hale getirilip LD90'un hafif dozajı ile ışınladı. Lizozom ve endozom gibi asidik organeller akridin turuncusu boyaması yapılarak FDT'nin lizozom üzerindeki etkisine bakıldı. FD'nin etki ettiği hücrelerde uygulanan boyanın bir saat içerisinde tamamının yok olduğu ve iki saat sonrasında hücrelerde otofagozom oluşumu gözlemlendi (Caruso ve ark., 2004). Yapılan çalışmada sonuç olarak lizozom eksikliğinde otofagozom oluşabileceği ancak bu eksiklik dolayısıyla otofajinin tamamlanmadığı belirlendi (Mroz ve ark., 2011).

Yapılan birçok çalışmanın ışığında sonuç olarak FDT ile tedavi gören hücrelerde doğrudan otofajinin uyarılması ve FD'ların ER, mitokondri, lizozom ve endozom organellerinde birikmesinin otofajiye neden olması birçok etkene bağlıdır. Çıkarılabilecek net iki sonuç vardır. Bunlardan birincisi, apoptoz normalde otofaji geçiren hücrelerde meydana gelebilir ve FDT apoptoz ile sonuçlanabilir. Hücrelerde gerçekleşebilecek apoptoz ve otofajinin oranları FDT'nin etki ettiği kanser hücresinin tipine, kullanılan FD'ya ve uygulanan ışığın dozajına bağlıdır. FDT'nin etki ettiği kanser tipine ve evresine bağlı olarak, hücrede oluşan otofaji, hücre ölümünü veya proliferasyonunu destekleyecektir (Mroz ve ark., 2011). Hücrede apoptoz ve otofajinin birlikte gerçekleşmesi FDT ile organellere verilen hasarı geri dönüştürerek FDT'nin oluşturduğu hasarı azaltabilmektedir (Apel ve ark., 2008). Ancak uygulanan FDT ile pro-otofajik proteinlerinin baskılanması ile hücre ölümüne teşvik edilebileceği sonucunu da unutulmaması gerekmektedir. En son olarak apoptoz eksikliği olan hücrelerde otofajinin oluşturduğu ters etkiyle hücreyi nekrotik ölüm yoluna yönlendirebilmektedir. Çıkarılabilecek ikinci sonuç ise FDT'de lizozom hedefli FD'lar otofaji için bir risk taşıyor ama tam olarak otofajinin oluşmasını engellemez. Bu şekilde uygulanan FDT otofagozom oluşum mekanizmasında yer alan Beclin1, Atg5 gibi proteinlerini fotohasara uğratarak otofajinin lizozom ve otofagozom kaynaşmasını engelleyebilir (Mroz ve ark., 2011).

2.6. Biyouyumlu Malzemeler ve İlaç Dağıtım Sistemi

Nanopartiküllerin ilaç endüstrilerindeki uygulamaları gün geçtikçe artmaktadır. Boyut açısından 100 nm'den küçük olan olan nanopartiküller, biyodağılımın gelişmişliği ve bölgeye özgü ilaç dağıtımını elde etmek için gelişmiş bir olanak sağlar ve biyobozunur özelliklerinden dolayı polimerik nanopartiküller ilaç dağıtımında kullanılırlar (Rizeq ve ark., 2019).

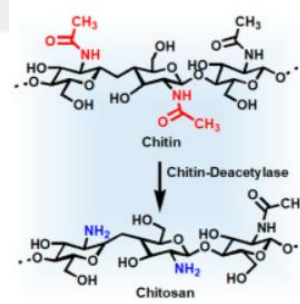
Nanopartikül bazlı ilaç dağıtım sistemi kanser tedavisi için umut verici bir yöntem olup geleneksel ilaç dağıtım sistemi ile karşılaştırıldığında, hassas ilaçlar ile proteinlerin yarı ömrü ile hidrofobik ilaçların çözünürlüğünü artırarak ve hastalıklı bölgede ilaçların

kontrollü ve hedefli salınımına izin vererek oldukça gelişmiş etkinlik gösterir (Dang & Guan, 2020).

Polimerik nanopartiküllerin üretilmesi, yüksek dozajda ilaçlara yoğun ve uzun süreli maruz kalınması gerektiren hastalıkların tedavisinde önemli olduğundan birçok araştırma bu alanda yapılmaktadır. Nanopartiküllerin üretildikleri temel malzeme ile kıyaslandığında daha gelişmiş ya da beklenmedik özelliklere sahip olabilirler. Bu yüzden doğaya ve insan vücuduna ne kadar ve nasıl bir etkisi olacağının bilinmesinin önemli olduğunun göz ardı edilmemesinde fayda vardır. Örneğin glukozamin ve N-asetilglukozamin birimlerinden oluşan doğal bir polisakkarit çeşidi olan kitosen doğal polimer kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilmektedir (Yanat & Schroën, 2021).

2.6.1. Kitosen

Kitin bol miktarda mantar hücre duvarlarında, kabukluların ve böceklerin dış iskeletinde ve balık pullarında birinci bileşen olarak bulunmaktadır (Yanat & Schroën, 2021).



Şekil 2.10. Kitin ve kitosenin kimyasal yapıları (Jhaveri ve ark., 2021)

Amino gruplarının varlığı nedeniyle amino polisakkarit olarak adlandırılan kitosenin aynı zamanda katyonik karakteriyle birlikte hafif reaksiyon koşulları altında aktif amino grupları, farklı yeni grupların bağlanması için reaktif bölge olarak görev yapmaktadır (Şekil 2.10) (Ali & Ahmed, 2018).

Son yıllarda kitosen nanoparçacıkları oldukça rağbet görmüştür. Umut verici olan bu yapılar polimerik ve biyobazlı nanoparçacıklardır. Bu nanoparçacıkların projede kullanılmayı düşünülmesinin nedeni kitosen nanoparçacıklarının ilaçları veya aktif

bileşikleri kapsüllemesi ve kapsüllenen bileşikler belirli yerlere veya bölgeye iletip kontrollü bir şekilde salınımını gerçekleştiren bir nanotaşıyıcı işlevini görme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir (Yanat & Schroën, 2021). Biyobozunurluk, biyouyumluluk ve toksik olmaması gibi özellikleri olan kitosen biyolojik uygulamalarda rolü oldukça yüksektir (Rizeq ve ark., 2019).

Kitosenin deasetilasyon derecesi %56 ile %99 arasında değişmektedir ve kitosenin çözünürlüğü için en az %85 deasetilasyon olması gerekmektedir. Kitosen birçok çözücüde çözünmemekle birlikte asetik, laktik, malik, formik ve süksinik asitler gibi seyreltik organik asitlerde az miktarda çözünmektedir (Islam ve ark., 2017; Periyah ve ark., 2016).

2.7. Kontrollü İlaç Dağıtım Sistemi ve Kansere Tedavisi

Kontrollü ilaç dağıtım sistemleri, geleneksel ilaç dağıtım sistemlerinden kaynaklanan bazı dezavantajların üstesinden gelebilir. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar hedef bölgeye hedefli olmayan bir şekilde dağıtılır. Bu şekilde ajanlar hem sağlıklı hücrelere hem de kanser hücrelerine zarar verir, bu da istenmeyen düşük etkinlik ve yüksek toksisite ile sonuçlanır (Jhaveri ve ark., 2021). Kontrollü ilaç dağıtım sistemi ile kemoterapötik ajanlar mükemmel taşıyıcı olma potansiyeli taşırlar. Bu sayede kemoterapötik ajanlar tümör bölgesine yönlendirilerek kanser hücrelerinde ilaç konsantrasyonlarının artışı ve normal hücrelerdeki oluşabilecek toksisiteyi önler.

Nanopartiküller ilaç dağıtım sistemi olarak kullanıldığında vücuda verilecek ilacın yarı ömrünü ve bazı hidrofobik ilaçların çözünürlüğünü artırarak ve ilacı kontrollü veya sürekli bir şekilde salarak ilacın etkinliğini iyileştirebilir. Uyarılara karşı duyarlı nanopartiküller ayrıca toksisiteyi düşürmeye ve ilaçların biyolojik dağılımını kontrol etmeye yardımcı olabilir (Dang & Guan, 2020).

Kitosenin iyonik çapraz bağlar oluşturma özelliği, kontrollü ilaç salınım süresi zarfında ilacı salan kararlı komplekslerin oluşumuna sebep olur (Jhaveri ve ark., 2021). Kitosen

ilaç dağıtımında bir matris molekölü olarak işlev görür. Kitosenin moleköler matris molekölü olarak kullanımını etkileyen iki önemli unsur kitosenin moleköler ağırlığı ve asetilasyon derecesidir. Bu iki özellik kitosenin suda çözünürlüğünü ve hidrofobikliğini etkiler ve böylece ilaç kapsülleme etkinliğini değiştirir. Kitosen, sulu çözeltilerde nötr ve bazik koşullar altında çok az çözünür. Ancak kitosenin çözünürlüğü, amino gruplarının protonasyonu nedeniyle büyük ölçüde asidik koşullar altında artar. Kitosenin çok yönlülüğü, aynı zamanda amino gruplarına atfedilen ve dolayısıyla amino polisakarit olarak bilinen kitosen'in katyonik karakteri ile birlikte, hafif reaksiyon koşulları kullanılarak çeşitli yeni grup bağlanması için reaktif bölge olarak görev yapan aktif amino gruplarından kaynaklanmaktadır (Dang & Guan, 2020; Jhaveri ve ark., 2021).

Aynı zamanda sitotoksiteyi artırıcı gruplar ligandlara konjuge edilmiş olduğu için projedeki molekülleri diğer FDT ilaçlarından bir adım öne çıkması beklenmektedir. Proje seçilen boyar moleküllerin FDT uygulamaları sırasında, LED ışık kaynakları fotoduyarlaştırıcıların aktivitesinde kullanılacak, in vitro çalışmalarda oturtulan yöntemler, in vivo uygulamaların belirlenmesine imkân sağlayarak farklı metotlar geliştirilmesine de temel olacaktır. Bu tez kapsamında yeni azadiprometan ligand ve farklı kanser hücre hatlarındaki antikanser özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu bileşiklerin biyolojik özelliklerin incelenmesi projeye özgünlük kazandırmaktadır. Yine bu proje kapsamında sentezi yapılacak bileşiklerden bir tanesinin bile antikanser ilacı olarak kullanılma potansiyeline sahip olması ve kitosen ile desteklenmesi projenin önemi ve özgünlüğünü artırmaktadır.

Biyomalzeme bilimi günümüzde büyük gelişmeler barındırmaktadır. Biyomalzemeler başlıca tıbbi uygulamalarda kullanılmasının yanı sıra biyoteknoloji alanında da kullanılmaktadır. İnsan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek amacıyla kullanılan doğal veya sentetik malzemeler olan biyomalzemelerin insan vücudunda çok çeşitli kullanımının olması araştırmacıları biyomalzeme bilimine yöneltmiştir. İnsan vücudunun biyomalzemelere karşı verdiği tepkiler farklılık göstermektedir. Biyouyumluluk tanımlanmak gerekirse biyomalzemenin, vücut sistemine uygun cevap verebilme, vücutla uyuşabilir, kendini çevreleyen dokuların normal fonksiyonlarına engel

olmama ve iltihaplanma oluşturmama yeteneği olarak söylenebilir. Biyouyumluluđu, biyomalzemeyi kabul edebilirliğidir (Güven, 2014). Bunlar proje kapsamında moleküllerin entegre edilebilmesi açısından uygun malzemelerdir. Biyouyumluluđu ve ilaç dağıtım sisteminde kullanımı açısından bu tez kapsamında kitosen bileşiğinin kullanılmasına karar verilmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve ekipmanlar aşağıdaki Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deney çalışmasında kullanılan malzeme ve ekipmanlar

Ekipman	Malzemeler
Güvenlik Kabini (ESCO, Class II, Type A2)	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium–High Glucose (DMEM) (Sigma Life Science)
Otomatik Hücre Sayım Cihazı (Invitrogen, Countess 3)	RPMI-1640 Media (Sigma Life Science)
Leica DM IL LED Fluo Mikroskobu	Trypsin-EDTA (Sigma Life Science)
Leica DFC295 S 40/0.45 Floresans Mikroskobu	Trypan Blue Boyası (Sigma Life Science)
Vorteks (Velp Scientifica)	L-Glutamin (Sigma Life Science)
Serolojik Pipet (Costar)	Penisilin/Streptomisin (Sigma Life Science)
Ependorf Tüp (İsolab)	FBS (Biological Industries)
Thoma Lamı (Bright-Line)	PBS (CAPRICORN Scientific)
Cryotube (Isolab)	MTT (Metiltiazoldifenil Tetrazolyum Bromid) Boyası (SERVA)

Tablo 3.1. (Devam) Deney çalışmasında kullanılan malzeme ve ekipmanlar

0.5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-100 µL Mikropipet (BRAND)	DMSO (Dimetil Sülfoksit) (SERVA)
25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ² Hücre Kültürü Flask (Corning, NEST)	Methanol (Isolab)
6 Kuyucuklu, 24 Kuyucuklu, 96 Kuyucuklu Kültür Plağı (NEST)	Ethanol (Isolab)
Santrifüj (Micro 200 R Hettich Zentrifugen)	RPMI-1640 Media (w/o Phenol Red) (CAPRICORN Scientific)
Heidolph Unimax 1010	Asetik Asit (Carlo Erba)
Thermo Scientific Multiskan Go	Kitosen (Aldrich Chemistry)
15 mL, 50 mL Santrifüj Tüpü (Isolab)	TTP (Thermo Fisher Scientific)
Hassas Terazi (Denier Instrument)	Water suitable for Cell Culture (CAPRICORN Scientific)
Water-Jacketed US Autoflow Automatic CO ₂ Inkübatör (Nuaire, NU-4950)	Kristal viyole boyası (Bio Basic)
5 mL Steril Enjektör (Beybi)	Sitotoksite Belirleme Kiti (LDH) (Roche)
Işık Kaynağı	eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit PE (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)
UNB 400 Etüv (Mettler)	5 mL Polystyrene Round-Bottom Test Tube with Cell-Strainer Cap (FALCON)
Mikroplaka İnkübatör Çalkalayıcı (BOECO, PST-60 HL)	Attune™ Odaklama Sıvısı (1 ^x Focusing Fluid) (Life Technologies)

3.2. Metod

3.2.1. Hücre kültüre edilmesi ve bileşik dozlarının hazırlanması

3.2.1.1. Hücrelerin kültüre edilmesi

Hücre kültürü aşamasında yapılan bütün işlemler güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi. Hücre kültürü laboratuvarı, meydana gelebilecek tüm kontaminasyonlara karşı riski en aza indirmek için iki günde bir %10'luk çamaşır suyu ile temizlendi. Hücre kültürü ortamı ve güvenlik kabini her kullanımdan önce ve sonra UV ışın uygulandı. Çalışma işlemine başlamadan önce kullanılacak malzemeler %70'lik EtOH ile steril hale getirilerek güvenlik kabini içerisine alındı. İşlem sonunda otoklavlanabilir malzemeler ve tek kullanımlık malzemeler ayrı ayrı otoklavlandı. Tek kullanımlık malzemeler atık kutusuna atılarak uzaklaştırıldı.

Çalışmada kullanılan hücre hatları Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde, Kanser Araştırma Laboratuvarı stoklarından kolorektal kanser hücre hattı HT29 hücre hattı, meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücre hattı ve yumurtalık kanseri hücre hattı OV2008 hücre hattı kullanıldı. Hücre kültürü aşamasında MCF-7 ve OV2008 hücre hatları için %10 FBS (Biological Industries), %1 penisilin/streptomisin (Sigma Life Science), %1 L-glutamin (Sigma Life Science) ile zenginleştirilen RPMI-1640 (Sigma Life Science) besiyeri, HT29 hücre hattı için ise %10 FBS (Biological Industries), %1 penisilin/streptomisin (Sigma Life Science), %1 L-glutamin (Sigma Life Science) ile zenginleştirilen DMEM (Sigma Life Science) besiyeri kullanıldı. Hazırlanan besiyerleri kullanılmak üzere +4 °C'ye kaldırıldı (Berkel ve ark., 2020)(Berkel & Cacan, 2021).

-80 °C dondurucunun içerisinde muhafaza edilen, cryovial tüplerde bulunan MCF-7, OV2008 ve HT29 hücre hatları çıkartıldı. Dondurucudan çıkarılan hücreler 50 ml falkonda önceden hazırlanmış 10 ml besiyeri içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan hücre-besiyeri çözeltisi 3 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında dipte hücre pelletin içerisinde bulunduğu besiyeri dökülerek uzaklaştırıldı. Hücre pelletinin üzerine yeni 22 ml besiyeri ile pipetaj yapılarak homojenlik sağlandı. Daha sonra hücre-besiyeri

72 cm²'lik flasklara aktarıldı. Hazırlanmış olan flasklar etiketlenerek 37°C, %5 CO₂ ve %80-90'lık nem saturasyonuna sahip inkübatöre kaldırılarak adherent hale geçmesi ve çoğalmaları sağlandı. 2-3 günlük inkübasyonun ardından flaskların içerisindeki hücre atığı bulunan eski besiyeri uzaklaştırıldı. Tripsin-EDTA solüsyonunun aktifliğini sağlamak amacıyla flask içerisine 10 ml 1^x fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı ve PBS daha sonra ortamdan uzaklaştırıldı. Flask içerisine hücrelerin protein bağlantılarının parçalanması için hücre yoğunluğuna göre 3-5 ml tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve flask 3-5 dakika 37°C'lik inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon süreci sonrasında mikroskop altında hücrelerin flask zemininden ayrıldığı gözlemlendi. Flask içerisine tripsinin etkisini inaktive etmek için 10 ml yeni besiyeri eklendi ve flask içerisinde pipetaj yapıldı. Daha sonra oluşan hücre çözeltisi 50 ml'lik falkona aktarıldı. 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek hücre ve tripsin-besiyeri ayrılması sağlandı. Oluşan süpernatant kısmı dökülerek uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 10 ml yeni besiyeri eklendi ve pipetaj yapıldı. Hemositometre yardımıyla hücre sayımı yapılarak 1.000.000/ml hücre olacak şekilde besiyeri-hücre çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan hücre çözeltisi yeni kültür ortamına aktarılarak pasajlama işlemi gerçekleştirildi ve inkübasyona bırakıldı.

3-4 günlük inkübasyonun ardından hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işleminin santrifüj basamağına kadar ki olan işlemler (santrifüj dahil olmak üzere) tekrarlandı. Bu adımda oluşan hücre pelleti üzerine hücre yoğunluğuna göre serum freezing medium (dondurma solüsyonu; Biological Industries) eklendi. Oluşan hücre çözeltisi 2 ml'lik cryovial tüplere aktarıldı. İlk olarak içerisinde hücre bulunan cryovial tüpler -20 °C'de 20 dakika bekletildi. Daha sonra tekrar kullanılmak üzere hücreler -80 °C'lik dondurucuya kaldırıldı.

3.2.1.1. Kitosensiz Bileşiklerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak bileşikler Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Kimya Bölümü, Anorganik Kimya Laboratuvarı'nda sentezlendi. Sentezlenen bileşikler ilk olarak DMSO (SERVA) içerisinde çözülerek stok solüsyonları hazırlandı. Daha sonra stok

solüsyonundan 1:5 oranında hazırlanan DMSO-PBS solüsyonu ile her dozaj bir önceki dozajdan seyreltilerek çalışmada final konsantrasyonları sırasıyla 25 μ M, 12.5 μ M, 2.5 μ M ve 0.25 μ M olacak şekilde 1000 μ M, 500 μ M, 100 μ M ve 10 μ M konsantrasyonları hazırlandı. Aşağıdaki Tablo 3.2’de kullanılacak bileşiklerin stok konsantrasyon hesaplamaları detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 3.2. Bileşiklerin stok konsantrasyonlarının hesaplanması

İlaç İsimleri	Konsantrasyon (μ M)	İlaç miktarı (mg)	DMSO	TOTAL
L2	5mM	6.96 mg	1000 μ L	1000 μ L
L2-NİS	5mM	9.48 mg	1000 μ L	1000 μ L
L2-BF ₂	5mM	7.44 mg	1000 μ L	1000 μ L
L2-NİS-BF ₂	5mM	9.95 mg	1000 μ L	1000 μ L
L1	5mM	4.32 mg	1000 μ L	1000 μ L
L1-NİS	5mM	6.83 mg	1000 μ L	1000 μ L
L1-BF ₂	5mM	4.79 mg	1000 μ L	1000 μ L
L1-NİS-BF ₂	5mM	7.31 mg	1000 μ L	1000 μ L
L3	5mM	6.23 mg	1000 μ L	1000 μ L
L3-BF ₂	5mM	8.75 mg	1000 μ L	1000 μ L
L3-BF ₂	5mM	6.71 mg	1000 μ L	1000 μ L
L3-NİS-BF ₂	5mM	9.23 mg	1000 μ L	1000 μ L
Na-L	5mM	4.47 mg	1000 μ M	1000 μ M
Na-L-NİS	5mM	6.99 mg	1000 μ M	1000 μ M
Na-L-BF ₂	5mM	4.95 mg	1000 μ M	1000 μ M
Na-L-NİS-BF ₂	5mM	7.47 mg	1000 μ M	1000 μ M

3.2.1.3. Kitosenli bileşiklerin hazırlanması

0.01 gram kitosen hassas terazi ile tartıldı ve 10mL %1'lik asetik asit içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan bileşiklerin ana stok hacminden 500 µL alındı ve üzerine hazırlanan kitosen çözeltisinden 500 µL eklendi ve 2 mL'lik ependorf içerisinde karışması sağlandı. 0.1 gram TPP tartıldı ve 100 mL su içerisinde çözdürüldü. Daha sonra kitosen çözeltisi eklenmiş bileşiğin üzerine tamamen çökme sağlanacak şekilde hazırlanan TPP çözeltisi kontrollü şekilde eklendi ve vortekslendi. Saydam bir sıvı ortamı kalana kadar bu işlem devam ettirildi. Daha sonra ortamdaki bağlanmayan fazla kitosen ve TPP ortamdan uzaklaşması için 1 dakika 1000 rpm'de santrifüj yapıldı. Oluşan süpernatant kısmı atılarak sadece ependorf içerisinde pelet kısmı bırakıldı. Pelet kısmı içerisinde suda çözünme olasılığı taşıyan kitosen ve TPP olabileceği ihtimali düşünülerek pelet birkaç defa su eklenerek yıkandı ve ardından su ortamdan uzaklaştırıldı. Hazırlanan bileşik-kitosen peletini ilk başta ana stoktan alınan hacim kadar (500 µL) DMSO ile tekrardan çözdürüldü. Oluşan kitosenli ana stok bileşikler kitosen eklenmemiş bileşikler gibi aynı şekilde konsantrasyonları stok solüsyonundan 1:5 oranında hazırlanan DMSO-PBS solüsyonu ile her dozaj bir önceki dozajdan seyreltilerek, çalışmada final konsantrasyonları sırasıyla 25 µM, 12.5 µM, 2.5 µM ve 0.25 µM olacak şekilde 1000 µM, 500 µM, 100 µM ve 10 µM konsantrasyonları hazırlandı. Tablo 3.3'te kullanılacak bileşiklerin konsantrasyon hesaplamaları detaylı olarak verilmiştir. Ancak Na-L serisi suda çözünme özelliğine sahip olmaları nedeniyle kitosenli olarak hazırlanamamıştır.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılacak olan bileşiklerin konsantrasyonlarının hazırlanması

Bileşik	Konsantrasyon (µM)	Bileşik miktarı (µL)	1:5 DMSO-PBS	TOTAL
Konsantrasyon Hazırlama	1000 µM	200 µL	800 µL	1000 µM
	500 µM	500 µL	500 µL	1000 µM
	100 µM	200 µL	800 µL	1000 µM
	10 µM	100 µL	100 µL	1000 µM

3.2.2. Hücre ekimi ve MTT uygulaması

İlaç potansiyeli taşıyan bileşiklerin, belirlenen hücre hatları üzerindeki hücre canlılığını, proliferasyonunu ve sitotoksitesini potansiyellerini belirleyebilmek için MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) testi ile analiz yapıldı. Sarı renkli bir formazan tuzu olan MTT, proliferasyona uğrayan hücrelerdeki artan mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aktivitesiyle suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Sadece canlı hücrelerde gerçekleşen bu durum kuyucuklarda farklı mor renk tonları oluşturur. Oluşan formazan miktarı ve hücre canlılığı doğru orantılıdır. Suda çözünmeyen formazan kristallerinin absorbans ölçümü yapılabilmesi için uygun çözücü olarak seçilen dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürüldü ve spektrofotometrede 540 nm ve 570 nm’de ölçüm yapıldı.

3-4 günlük inkübasyon sonrasında pasajlama işlemindeki hücre sayım aşamasına kadar olan tüm basamaklar gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu plakda kullanılan her bir kuyucuk başına 7500/200 μ L hücre olacak şekilde hesaplama yapıldıktan sonra deneyde kullanılacak her kuyucuğa 200 μ L hücre ekimi yapıldı. Hazırlanan 96 kuyucuklu plak inkübatörde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonrasında kullanılan ilaç potansiyeli taşıyan bileşikler eklenmeden önce karanlık ortamdan çıkartılarak vortekslendi. 1000 μ M, 500 μ M, 100 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlara sahip bileşikler, 200 μ L içerisinde final konsantrasyonları sırasıyla 25 μ M, 12.5 μ M, 2.5 μ M ve 0.25 μ M olacak şekilde 5 μ L hücrelerin bulunduğu kuyucuklara eklendi. Bileşikler kuyucuklara eklendikten sonra plak 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon sonunda MTT basamaklarının son kısmı gerçekleştirildi. Hassas terazi yardımıyla 10 mg MTT tozu tartıldı. 10 mg MTT tozu, laminar kabin içerisinde 2 ml 1^x PBS’de çözdürüldü. Hazırlanan çözelti vorteks yardımıyla homojen hale getirilip, filtreden geçirildi. Daha sonra hazırlanan MTT-PBS çözeltisinden 1100 μ L alınarak 10 ml fenol kırmızısı içermeyen RPMI-1640 besiyeri ile karıştırıldı. İnkübasyon süresi tamamlanan 96’lık plak laminar kabin içerisine alındı ve plak içerisinde bulunan besiyerleri mikropipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra hücre içeren kuyucuklara 100 μ L 1^x PBS eklenerek yıkama işlemi yapıldı ve daha sonra eklenen PBS çözeltisinin tamamı geri çekildi.

Ardından daha önceden hazırlanan MTT çözeltisinden, işlem yapılmış her kuyucuğa 100 µL eklendi ve 4 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinin ardından sarı renkli MTT çözeltisinin canlı hücre bulunan kuyucuklarda mavi/mor renge dönüştüğü görüldü. Eklenen tüm MTT çözeltisi çekilerek kuyucuklara 100 µL DMSO eklendi ve bir saat shakerda (çalkalamalı inkübatöre) bekletildi. 1 saatlik inkübasyonun ardından spektrofotometrede 540 ve 570 nm’de ölçüm yapıldı. Ölçüm sonucu elde edilen verilerin excel ve GraphPad programlarında analizi yapıldı ve grafiğe dönüştürüldü. Elde edilen grafik sonuçlarına göre LDH ve flow sitometride kullanılacak bileşikler ve konsantrasyonları belirlendi.

3.2.3. Test edilecek maddelerin LDH (Laktat dehidrogenaz) deneyi ile sitotoksitelerinin belirlenmesi ve hücre hasarı

İlaç potansiyeli taşıyan bileşiklerin, belirlenen hücre hatları üzerindeki hücre hasarı, hücre zarı hasarı ve hücre dışına salınan LDH miktarını belirlemek için LDH deneyi yapıldı. İlaçların sitotoksik etkilerini ve potansiyel ilaç adaylarını değerlendirmek için hücresel düzeyde bazı sitotoksite deneyleri yapılması gerekmektedir. Sitotoksite deneylerinden biri olan laktat dehidrogenaz deneyi, potansiyel ilaç adayı olan bileşiğin hücre üzerindeki gösterdiği sitotoksitesini değerlendirmek için kullanılabilmektedir. LDH enzimi, hücrelerde anaerobik glikoliz reaksiyonundaki laktik asit oluşumunda görevlidir. LDH deneyinde LDH enzimi aktivitesi belirlenerek hücre zarının bütünlüğünün kaybolması ve hücrede oluşan hasarı belirli bir noktaya kadar belirlenmektedir. Ancak kesin bir sonuç olmamakla birlikte birçok deneyle bulunan sonuçlar desteklenmelidir. Kullanılacak olan bileşiğin hücre zarına verdiği hasar sonucunda LDH enzimi sitoplazmadan dışarı salınmasına neden olmaktadır. MTT deneyinde olduğu gibi bu deneyde de kullanılacak olan bileşiğin birkaç farklı konsantrasyonu hücrelere uygulanır ve deney sonunda LDH aktivitesi ölçülmektedir. MTT uygulamasına kadar olan prosedürün tamamı LDH deneyi içinde tekrar edildi. Ancak MTT’den farklı olarak fenol kırmızısı içermeyen RPMI-1640 besiyeri (%10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin) kullanıldı. 48 saat inkübasyonun ardından plak inkübatörden alınarak laminar kabin içerisine alındı. Karanlık ortamda çalışıldı. Plak içerisindeki besiyerinin tamamı mikropipet yardımıyla çekildi. Daha sonra hücre içeren kuyucuklara 100 µL (%10 FBS, %1 L-glutamin, %1

penisilin/pen-strep içermeyen) RPMI-1640 besiyeri eklendi. Liziz miktarı ölçülecek kontrol grubu içerisine 5 µL liziz buffer eklendi ve 37°C’de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Çalışmada kullanılan kuyucuk başına reaksiyon sayısı belirlenmektedir. Deneyde kullanan kuyucuk başına kit prosedüründe belirtilen 1 ml kataliz/45 mL dye solüsyonu oranına sahip olacak şekilde reaksiyon mix çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden her kuyucuğa 100 µL eklendi. Daha sonra plak 15-25 °C’de 10 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından işlem görmüş her kuyucuğa stop solüsyonundan 50 µL eklendi ve 10 shakerda (çalkalamalı inkübatöre) 10 saniye bekletildi. Ardından plak spektrofometrede 490 ve 695 nm’de ölçüm yapıldı. Ölçüm sonucu elde edilen verilerin excel ve GraphPad programlarında analizi yapıldı ve grafiğe dönüştürüldü.

3.2.4. Flow sitometri analizleri

Belirli yoğunluğa ulaşan HT29 hücreleri inkübatörden çıkartıldı laminar kabin içerisine alındı. Her kuyucuğa 500.000 hücre/mL besiyeri düşecek şekilde hücreler hazırlanarak 6 kuyucuklu plağa hücre ekimi yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. HT29 tümör hücrelerinin apoptotik ve nekrotik durumları, Annexin V-PE 7AAD Apoptosis kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak değerlendirildi. Saptama Kiti I. Hücreler, 12.5 µM L2, 12.5 µM L2-NİS veya 12.5 µM L2-NİS-BF₂ ile tedavi edildi. Hazırlanan plak 4saat karanlık ortamda inkübasyonda bekletildi. Daha sonra karanlık ortamda aydınlık ortama alınarak 1 saat ışığa maruz bırakıldı. Ardından 43 saat karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plak içerisindeki tüm besiyeri çekildi ve 15 mL’lik santrifüj tüplerine alındı. Hücreler 1 mL PBS ile yavaşça yıkandı. Daha sonra hücrelere 1 mL tripsin-EDTA eklenerek 2-3 dakika inkübasyona bırakıldı. Mikroskop altında tüm hücrelerin plak tabanından ayrıldığı belirlendi. Her kuyucuğa 1 mL besiyeri eklenerek tripsin-EDTA aktivitesi inhibe edildi. Hücreler daha önce besiyeri eklenmiş santrifüj tüplerine eklendi ve 2000 rpm’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Ardından süpernatant kısmı atılarak pelet iki defa soğuk PBS ile yıkandı ve santrifüjle PBS ortamdan uzaklaştırıldı. 10X Annexin V bağlama tamponu 1X konsantrasyonda yeniden süspanse edildi. Ardından her santrifüj tüpüne bu tampondan 400 µL eklendi ve pipetaj yapılarak

homojenize edildi. Her tüpten 100 µL çekilerek ayrı ayrı dört flow tüpüne bölündü. Dört tüpün birincisine hiçbir şey eklenmezken, ikinci tüpe 3 µL Annexin V-PE, üçüncü tüpe 5 µL 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) ve en son olarak dördüncü tüpe 3 µL Annexin V-PE ve 5 µL 7-AAD eklendi. Numuneler yavaşça karıştırıldı ve oda sıcaklığında 25 dakika inkübe edildi (Cacan ve ark., 2014). İnkübasyon süresinin ardından tüplerin her birine 400 µL 1X Annexin V bağlayıcı tampon eklendi ve numuneler analiz edildi ve akış sitometrisi (Attune Acoustic Focusing Sitometre, Applied Biosystems) ile elde edilen veriler FlowJo yazılımı kullanılarak analiz edildi. Kullanılan Aneksin V:PE kiti Aneksin V ve 7-AAD içermektedir. Canlı hücreler, Aneksin V ya da 7-AAD için negatif olurken, apoptozun başlangıcındaki hücreler Aneksin V için pozitif olacaktır. Nekrotik hücreler 7-AAD ile pozitif olurken, tamamen apoptoz olmuş ya da ölmüş hücreler hem Aneksin V hemde 7-AAD ile pozitif olacaktır (Cacan, 2017).

3.2.5. Fotoduyarlastırıcı bileşiklerin hücre morfolojisine olan etkilerinin belirlenmesi

MCF-7, OV2008 ve HT29 hücre hatlarından, her kuyucukta 25.000 hücre/1 ml besiyeri olacak şekilde hücre-besiyeri çözeltisi hazırlanarak karanlık ortam ve aydınlık ortam için 24 kuyucuklu plaklara hücre ekimi yapıldı ve ardından plaklar 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında her bir hücre hattı için, MTT çalışmasında anlamlı sonuç veren bileşiklerin 12.5 µM konsantrasyonu eklendi. Karanlık ortam için hazırlanan plaklar karanlık ortamda 48 saat inkübasyona tabii tutulurken, aydınlık ortam için hazırlanan plaklar 4 saatlik karanlık inkübasyonun ardından 1 saat ışığa maruz bırakıldı. Ardından aydınlık ortam plakları 43 saat karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon işlemi sonrasında inkübatörden hücreler, laminar kabin içerisine alındı. Mikropipet yardımıyla kuyucuk içerisindeki besiyerinin tamamı uzaklaştırıldı. Ardından her kuyucuğa 700 µL PBS eklendi ve yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra 1:3 oranında hazırlanan asetik asit:methanol karışımından her kuyuca 400 µL eklendi ve 10 dakika 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından tüm fiksatif mikropipet yardımı ile çekilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra fikse edilmiş hücrelere %5’lik kristal viyole boyası 300 µL eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve fazla boya su ile birkaç defa yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı. Boyanmış olan hücrelerin, Leica DFC295 S

40/0.45 floresans mikroskobu ile görüntüleri bulundu ve Leica Application Suite v+ yazılımı kullanılarak fotoğrafları çekildi.

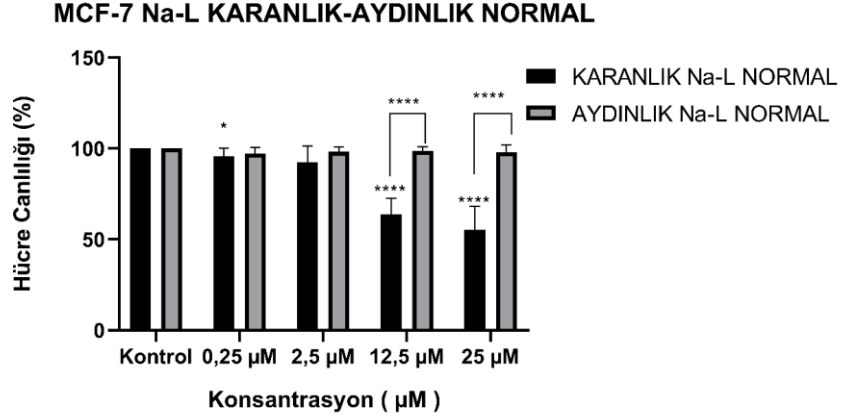
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. MTT Uygulaması-IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Tez kapsamında kullanılan bileşikler Na-L, L3, L1 ve L2 serileri olarak, serinin ilk başlangıç liganlarının isimleri ile kodlandı. Tezde kullanılan her seri bileşik kendi içerisinde başlangıç ligandı (Na-L, L1, L2 vb), NİS ligandı, BF2 kompleksi ve NİS-BF2 kompleksi olarak gruplara ayrıldı. Kullanılan bileşikler arttan dozlar halinde ve üç farklı kanser hücre hattı (MCF-7, OV2008 ve HT29) üzerinde MTT yöntemi kullanılarak farklı dozlardaki canlılık düzeyleri incelendi. Deney kapsamında her bileşiğin normal ve kitosenli formlarının 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları kullanıldı. İnkübasyona bırakılan hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında hücre sayımı yapılarak deneyde gerekli olan hücre miktarı hesaplandı. Daha sonra 96 kuyucuklu plaklara ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı (Al-Janabi ve ark., 2020). İnkübasyon süresinin ardından bileşikler başlangıç ligandı, Nis, BF2 ve NİS-BF2 gruplar halinde hücrelere uygulaması yapıldı. FDT uygulanmayan, karanlık sitotoksitesine bakılacak olan plaklar 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. FDT uygulanacak olan plaklar ilk önce 4 saatlik karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon sürecinde FD'ların hücrelerde birikimi gerçekleştiği düşünüldü ve hücreye nüfuz etmiş oldu. Ardından plak aydınlık ortamda 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonunda plak tekrardan karanlık ortam inkübasyonuna alındı ve 43 saat karanlık ortamda inkübasyona tabii tutuldu. İnkübasyon süreçlerinin ardından her iki hücre-bileşik ekimi uygulanmış plağa da MTT prosedürü uygulandı ve spektrofotometre cihazında ölçüm yapıldı. Her iki uygulamanın ardından üç hücre hattı üzerindeki konsantrasyona ve bileşiğe bağlı yüzde canlılık oranları, MTT testi sonucunda elde edilen verileri analiz edilerek belirlendi. Elde edilen istatistiksel verilerde, kullanılan bileşiklerin bazılarında karanlık-aydınlık sitotoksitelerindeki ve uygulanan dozlarındaki üç hücre hattında da sonuçların farklı olduğu belirlendi. Kullanılan bileşiklerin anlamlı sonuçlarının genellikle 12.5 µM ve 25 µM olduğu ve bu dozların hücre canlılığında yaklaşık %50'lik bir azalma meydana getirdiği gözlemlendi. Analizi yapılan istatistiksel veriler ile kullanılan bileşik serilerinin üç hücre hattında IC₅₀ dozları

belirlendi (Tablo 4.1) (Tablo 4.2) (Tablo 4.3).

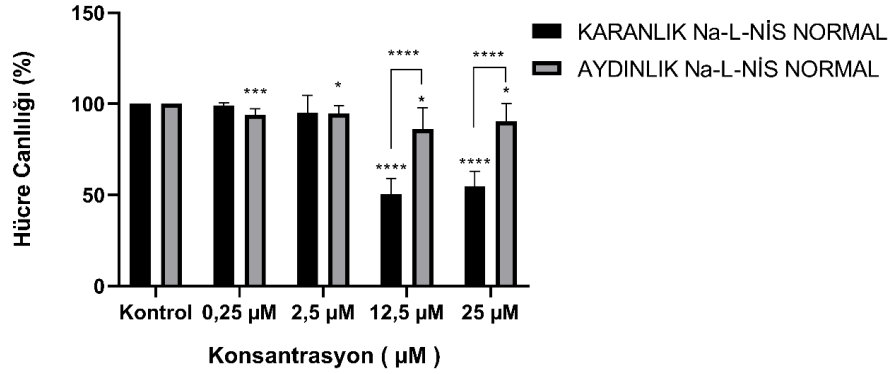
4.1.1. Kitosensiz ligand ve kompleksler



Şekil 4.1. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L ligandı hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında Na-L ligandı karanlık ortamda artan doza bağlı olarak sitotoksik etkisi görüldü. 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında hücrelerde %50'ye yakın azalma gözlemlendi. Ancak FDT uygulanan hücrelerin sağ kalım oranında Na-L beklenen etkiyi göstermedi ve hücre canlılığında en fazla yaklaşık %3'lük bir azalış sağladı (Şekil 4.1).

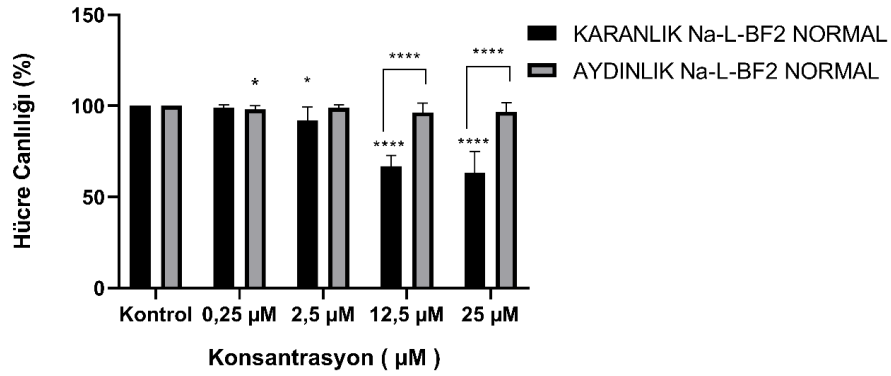
MCF-7 Na-L-NİS KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.2. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-NİS ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında Na-L-NİS ligandı karanlık ortamda artan doza bağlı olarak sitotoksik etkisi görüldü. 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında hücrelerde %50'ye yakın azalma gözlemlendi. Ancak FDT uygulanan hücrelerin sağ kalım oranında başlangıç maddesi Na-L gibi Na-L-NİS'de beklenen fotodinamik etkiyi göstermemiş ve aydınlık ortamda yapılan deney sonucunda hücre canlılığı en fazla yaklaşık %14'lük bir azalış sağladı (Şekil 4.2).

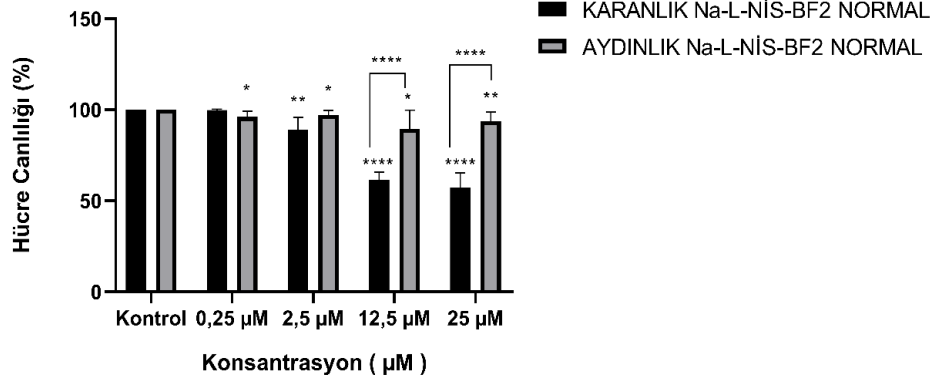
MCF-7 Na-L-BF₂ KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.3. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-BF₂ kompleksi hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında Na-L-BF₂ kompleksi karanlık ortamda artan doza bağlı olarak sitotoksik etkisi görüldü. Na-L-BF₂ kompleksinin 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığında %40'a yakın bir azalış gözlemlendi. Ancak FDT uygulanan hücrelerin sağ kalım oranında başlangıç maddesi Na-L gibi Na-L-BF₂ kompleksi fotodinamik etkiyi göstermedi ve aydınlık ortamda yapılan deney sonucunda hücre canlılığı kontrole kıyasla en fazla yaklaşık %4'lük bir azalış sağladı. Na-L-BF₂, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında karanlık ortamdaki sitotoksik etkisi beklenmedi ve anlamlı bir şekilde aydınlık ortamda göre yaklaşık %30'a varan bir azalış gösterdi (Şekil 4.3).

MCF-7 Na-L-NİS-BF₂ KARANLIK-AYDINLIK NORMAL

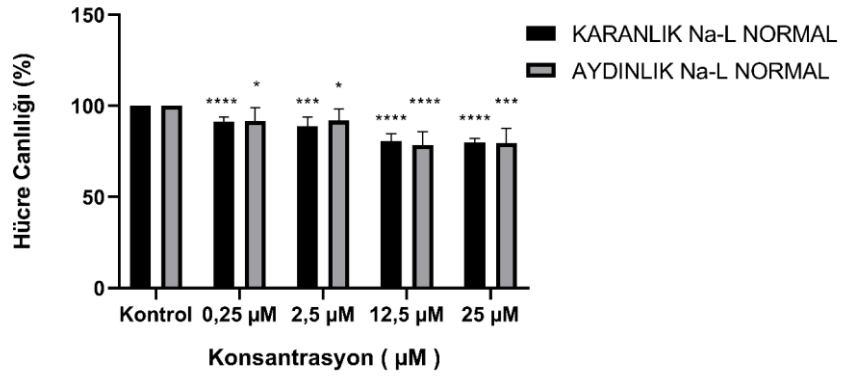


Şekil 4.4. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-NİS-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında Na-L-NİS-BF₂ kompleksi karanlık ortamda artan doza bağlı olarak sitotoksik etkisi görüldü. Na-L-NİS-BF₂ kompleksinin 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığında %40'a yakın bir azalış gözlemlendi. Ancak FDT uygulanan hücrelerin sağ kalım oranında başlangıç maddesi Na-L gibi Na-L-NİS-BF₂ kompleksi fotodinamik etkiyi gösterdi ve aydınlık ortamda yapılan deney sonucunda hücre canlılığı kontrole kıyasla en fazla yaklaşık %11'lik bir azalış sağladı. Na-L-BF₂ 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında karanlık ortamdaki sitotoksik etkisi beklenmedik ve anlamlı bir şekilde aydınlık ortamda yaklaşık %40'a varan bir azalış gösterdi (Şekil 4.4).

MCF-7 hücre hattında yapılan çalışmada Na-L serisinin Na-L ligandına ve Na-L-BF₂ kompleksine iyot eklenmesi sonuçlarda bir farklılık arz etmedi. Na-L-NİS ligandı, Na-L ligandı gibi ve Na-L-NİS-BF₂ kompleksi, Na-L-BF₂ kompleksi gibi bir davranış sergiledi.

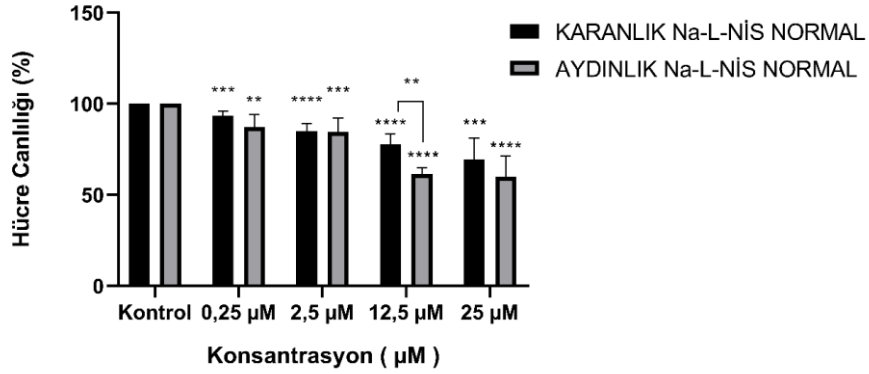
OV2008 Na-L KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.5. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında Na-L ligandının karanlık ve aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak sitotoksik etkisi görüldü. Ancak Na-L ligandının karanlık ortam ve aydınlık ortamdaki sitotoksik etkisi çok benzerdir. Na-L ligandının en yüksek doz olan 25 µM konsantrasyonunun hücre canlılığına etkisi karanlık ve aydınlık ortamda yaklaşık %30'luk bir azalma olarak gözlemlendi (Şekil 4.5). Ancak oluşan azalma karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında FDT için yeterli olmadığı belirlendi.

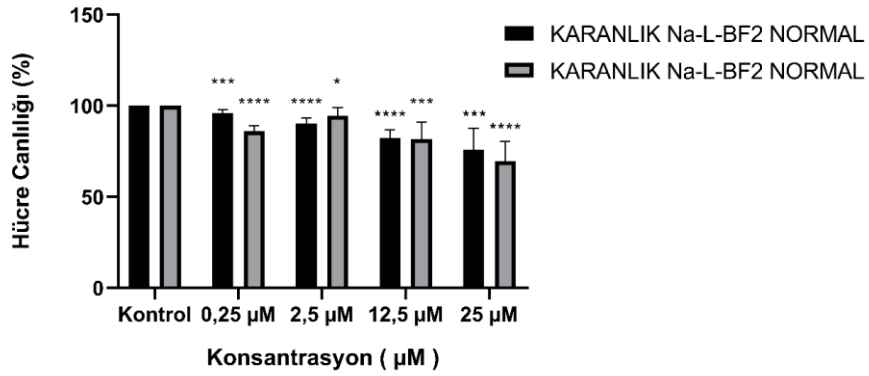
OV2008 Na-L-NİS KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.6. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-NİS ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında Na-L-NİS ligandının karanlık ve aydınlık ortam koşullarında artan doza bağlı olarak sitotoksik etkisi görüldü. NİS ligandı, karanlık ortamda, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarındaki hücre canlılığını yaklaşık %30'luk bir azalma oluştururken aydınlık ortamdaki hücre canlılığı yaklaşık %40 oranında bir azalmaya neden oldu ve 12.5 µM konsantrasyonundaki azalmanın yapılan istatistiksel analizlere göre anlamlı olduğu görüldü (Şekil 4.6).

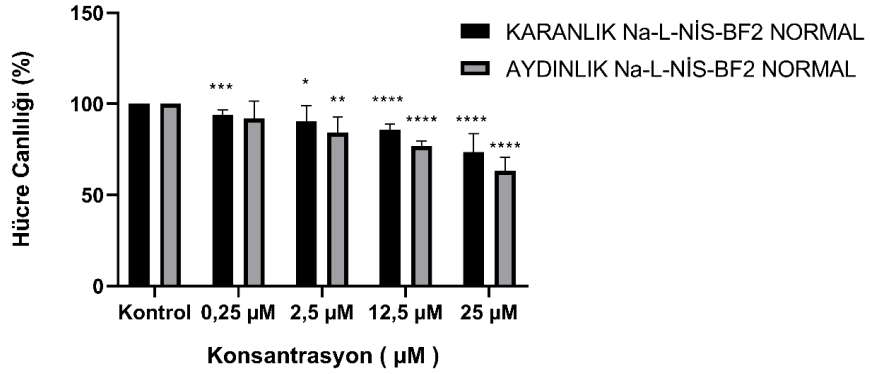
OV2008 Na-L-BF₂ KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.7. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında Na-L-BF₂ kompleksinin aydınlık ortamda 2.5 µM konsantrasyonundaki %7'lik (ns olan) bir artış göz ardı edilirse karanlık ve aydınlık ortam koşullarında artan doza bağlı olarak hücrede bileşiğin sitotoksik etkisiyle hücre canlılığı oranında azalmaya neden oldu (Şekil 4.7). Ancak oluşan azalma karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında FDT için yeterli olmadığı belirlendi.

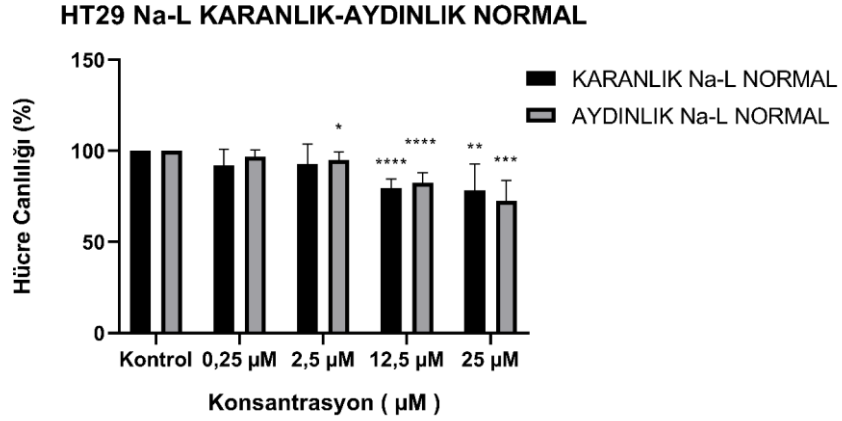
OV2008 Na-L- NİS-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.8. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-NİS-BF2 kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında Na-L-NİS-BF2 kompleksinin yapılan MTT deneylerinin analizleri sonucunda çıkan grafikte görüldüğü gibi hem karanlık hem de aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında azalış meydana getirdi. Ancak yapılan istatistiksel analiz testler ışığında bu karanlık-aydınlık karşılaştırmasındaki azalış anlamlı bulunmadı (Şekil 4.8). Oluşan azalma karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında FDT için yeterli olmadığı belirlendi.

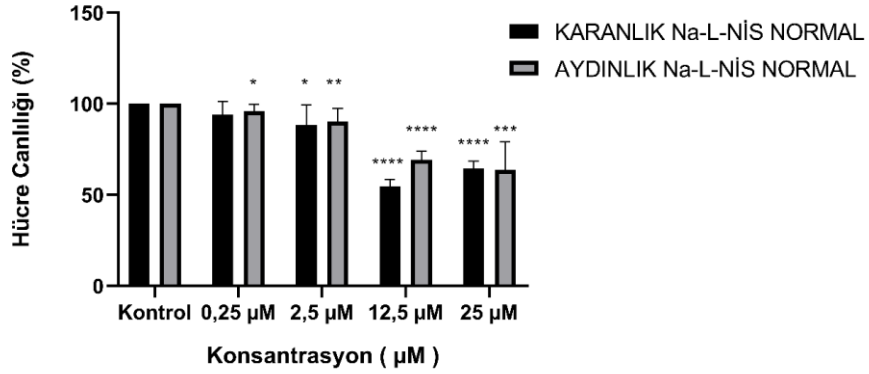
OV2008 hücre hattı üzerinde Na-L serisi ile yapılan çalışmada, liganda ve komplekse iyot eklenmesi aydınlık ortam sitotoksitesini arttırdı. Ancak bu artış Na-L-NİS ligandında 12.5 µM konsantrasyonunda anlamlı olsa dahi serideki hücre canlılığı bu konsantrasyonlar kullanıldığında IC₅₀ değerine ulaşamadı. OV2008 hücre hattındaki hücre canlılığındaki oluşan düşüş eğimi incelendiğinde Na-L serisinin daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılması gerektiği anlaşıldı.



Şekil 4.9. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında Na-L ligandı ile yapılan MTT deneylerinin analizleri sonucunda çıkan grafikte görüldüğü gibi hem karanlık hem de aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında azalış meydana getirdi. Ancak 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM konsantrasyonlarındaki aydınlık ortam ve karanlık ortam karşılaştırılmasında karanlık ortamdaki azalma oranı aydınlık ortamdaki azalma oranından fazla olduğu görüldü. 25 µM konsantrasyonunda ise diğer 4 konsantrasyondaki durum ile kıyaslandığında aydınlık orandaki azalma yaklaşık %30 iken karanlık ortamdaki azalış yaklaşık %22 olduğu saptandı (Şekil 4.9).

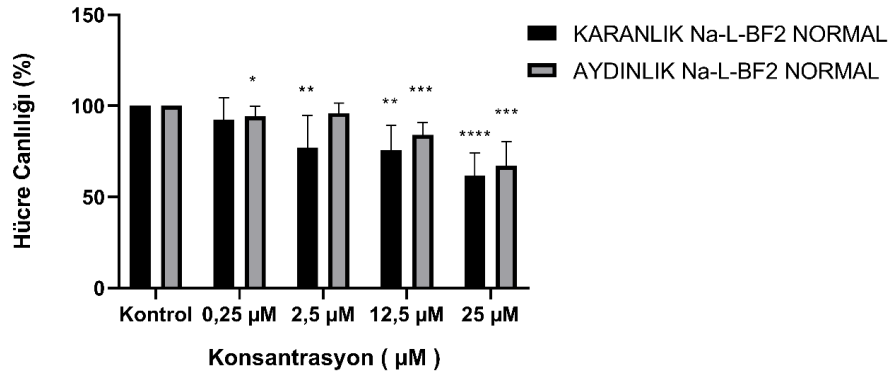
HT29 Na-L- NİS KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.10. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-NİS ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında Na-L-NİS ligandının yapılan MTT deneylerinin analizleri sonucunda aydınlık ortam sitotoksitesi artan doza bağlı olarak hücre canlılığında doğrusal bir azalma gösterdi. Ancak karanlık ortam sitotoksitesi 12.5 µM ile 25 µM konsantrasyonlarının sonuçları karşılaştırıldığında dozajın artması hücre canlılığında %10'luk (ns olarak) bir artışa sebep oldu (Şekil 4.10). Karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında FDT için yeterli olmadığı belirlenmiştir.

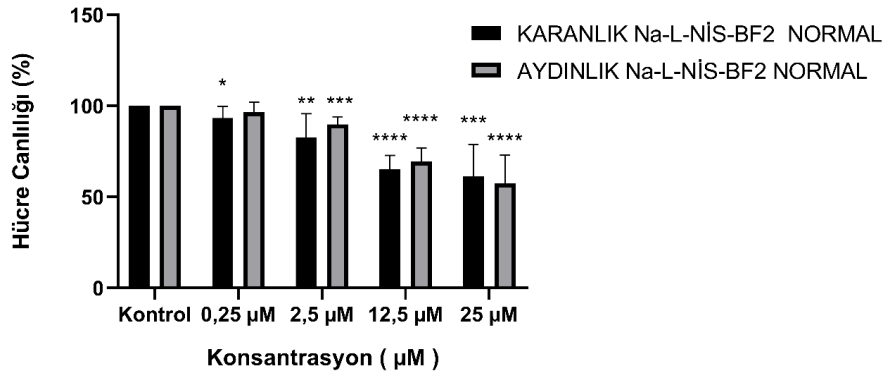
HT29 Na-L-BF₂ KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.11. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-BF₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında Na-L-BF₂ kompleksinin yapılan MTT deneylerinin analizleri sonucunda çıkan grafikte görüldüğü gibi hem karanlık hem de aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında azalış meydana getirdi. Ancak yapılan istatistiksel analiz testler ışığında bu karanlık-aydınlık karşılaştırmadaki azalış anlamlı bulunmadı ve de ilacın karanlık sitotoksitesi FDT uygulandığında oluşan sitotoksite oranından fazla olduğu belirlendi. Ancak bu fark anlamlı olarak görülmedi (Şekil 4.11). Bileşiğin karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında FDT için yeterli olmadığı belirlenmiştir.

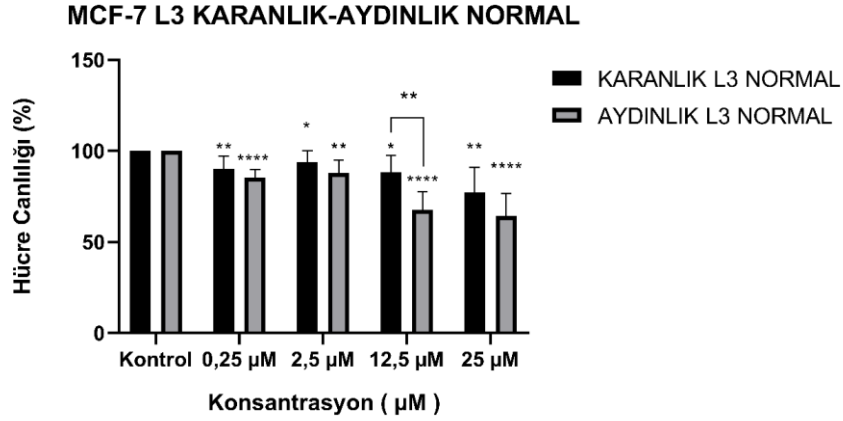
HT29 Na-NİS-BF₂ KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.12. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile Na-L-NİS-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında Na-L-NİS-BF₂ kompleksi ile yapılan MTT deneylerinin analizleri sonucunda çıkan grafikte görüldüğü gibi hem karanlık hem de aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında azalış meydana getirdi. Ancak 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM konsantrasyonlarındaki aydınlık ortam ve karanlık ortam karşılaştırılmasında karanlık ortamdaki azalma oranı aydınlık ortamdaki azalma oranından fazla olduğu görüldü. 25 µM konsantrasyonunda ise diğer 4 konsantrasyondaki durum ile kıyaslandığında aydınlık orandaki azalma yaklaşık %43 iken karanlık ortamdaki azalış yaklaşık %39 olduğu belirlendi (Şekil 4.12).

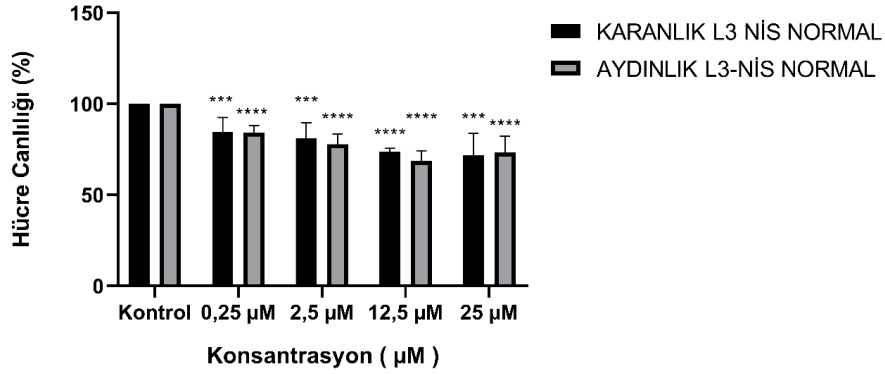
HT29 hücre hattında Na-L serisi ile yapılan deney sonuçlarında istenilen FDT elde edilememiş olduğu belirlendi. Na-L serisindeki bileşiklerin sitotoksik etkilerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri karanlık-aydınlık ortam için kıyaslandığında ve değerlerin anlamlılığı göz önünde bulundurulduğunda yalnızca OV2008 hücre hattında Na-L-NİS ligandının 12.5 µM konsantrasyonunun anlamlı olduğu ancak tüm hücre hatlarında kullanılan hiçbir konsantrasyonunun hücre canlılığında %50'nin altına düşmediği görüldü.



Şekil 4.13. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3 ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L3 ligandı karanlık ortamda artan doza bağlı olarak (2.5µM'daki yaklaşık %3'lük artış göz ardı edildiğinde) sitotoksik etkisi görüldü. L3 ligandının MCF hücre hattında karanlık sitotoksitesinin düşük olduğu gözlemlendi. L3 ligandının bu hücre hattında aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak (2.5 µM'daki yaklaşık %3'lük artış göz ardı edildiğinde) sitotoksik etkisi görüldü. Bu bileşiğin 12.5 ve 25 µM konsantrasyonlarının hücre canlılığında yaklaşık %40'a varan bir azalma meydana getirdiği gözlemlendi. Ayrıca 12.5 µM konsantrasyonundaki sitotoksikite karanlık–aydınlık ortam karşılaştırmasında anlamlı bir düşüş olduğunu ancak bu düşüş %50'nin altında olduğu saptandı. Ayrıca 0.25 µM dozajındaki yaklaşık % 3 hücre canlılığı artışı hem karanlık hem de aydınlık ortamda da olduğu görülmüştür ancak bu deney sonucundaki verilerin analizinde uygulanan sonuçlarda karanlık-aydınlık oranlarının anlamlı olmadığı görüldü (Şekil 4.13).

MCF-7 L3-NİS KARANLIK-AYDINLIK NORMAL

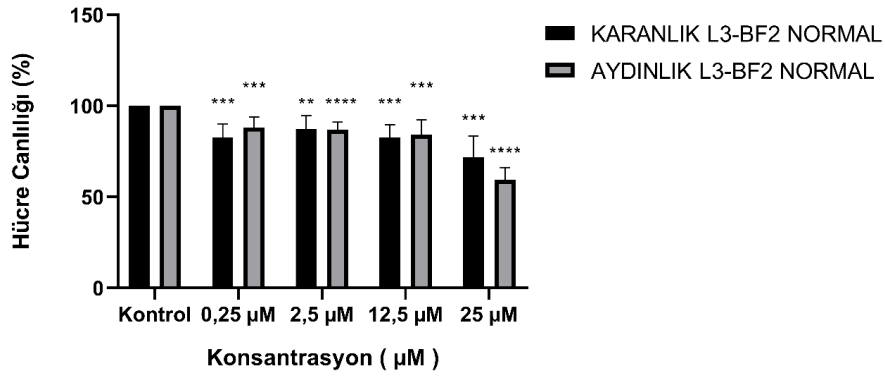


Şekil 4.14. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L3-NİS ligandı karanlık ve aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak (aydınlık ortam 25 µM'daki yaklaşık %5'lik hücre canlılığı artışı hariç) sitotoksik etkisi görüldü. Her ne kadar karanlık ve aydınlık orandaki sitotoksikite oranlarında dozaja bağlı bir artış olsa da karanlık-aydınlık ortamdaki sitotoksitelerin kıyaslanmasında anlamlı bir sonuç elde edilmedi ve de karanlık ve aydınlık ortam yüzde sitotoksikite değerleri birbirine çok yakındır (Şekil 4.14).

MCF-7 hücre hattı üzerinde yapılan çalışmada başlangıç ligandında görülen aydınlık sitotoksitenin, L3 ligandına iyot eklenmesi ile karanlık ortamda oluşan sitotoksikiteye benzer bir durum sergilemesinde neden olduğu görüldü.

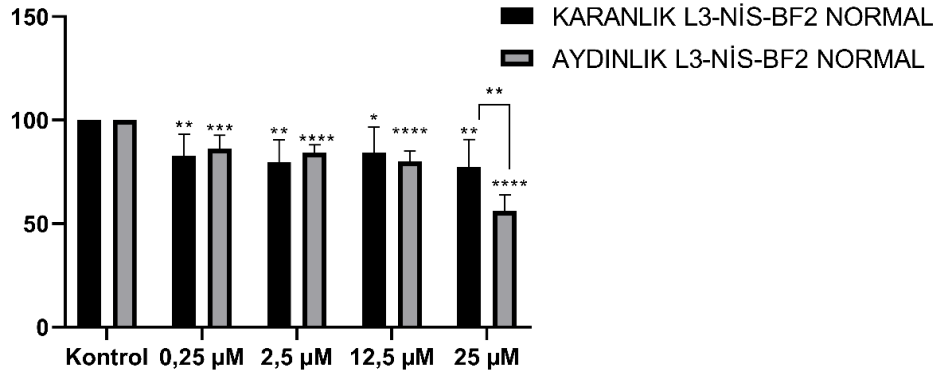
MCF-7 L3-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.15. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF₂ kompleksi hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L3-BF₂ kompleksi karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması grafikte görüldüğü üzere değerler her dozajda farklı etki gösterdi ve yalnızca aydınlık hücre canlılığı karanlık ortamdakine kıyasla 25 µM konsantrasyonunda fark edilebilir bir azalış sergiledi. Ancak bu durum anlamlı bulunmadı (Şekil 4.15).

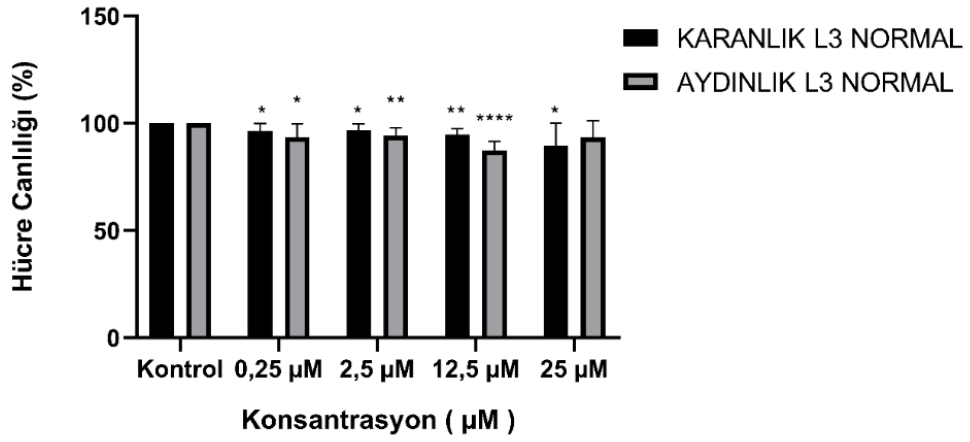
MCF-7 L3-NİS-BF₂ KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.16. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L3-NİS-BF₂ kompleksi aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak sitotoksik etkisi görüldü. L3-NİS-BF₂ kompleksi karanlık ortama kıyasla aydınlık ortamda 12.5 µM konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığında daha fazla bir azalmaya sebep oldu. 25 µM konsantrasyonu kullanılan hücrelerdeki canlılık karanlık ortamda %77'e düşmüşken bu oran FDT uygulandığında %56'ya düşmüş olduğu belirlendi. BF₂ kompleksine iyot eklenmesiyle oluşan L3-NİS-BF₂ kompleksi belirli konsantrasyonlarda aydınlık ortam sitotoksitesinde düşüş meydana getirdi (Şekil 4.16).

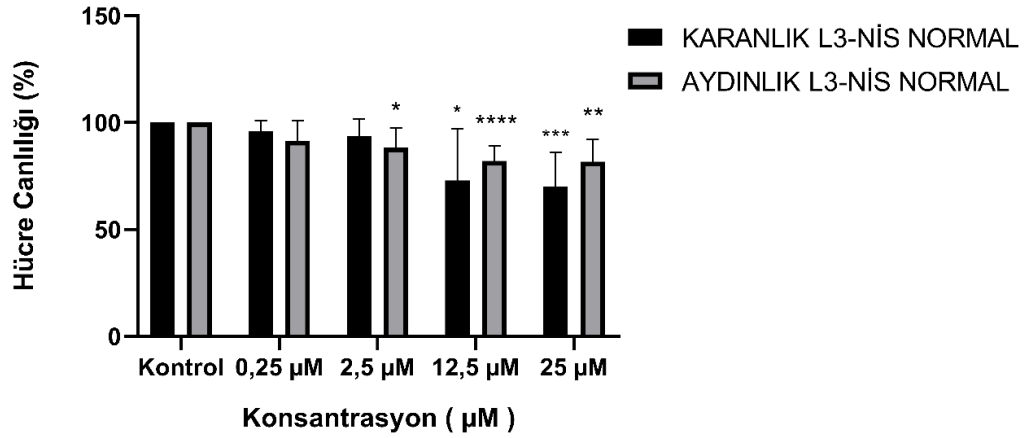
OV2008 L3 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL NORMAL



Şekil 4.17. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3 ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

L3 ligandı OV2008 hücre hattında karanlık ve aydınlık ortamda anlamlı bir artış ya da azalışa neden olmamıştır (Şekil 4.17).

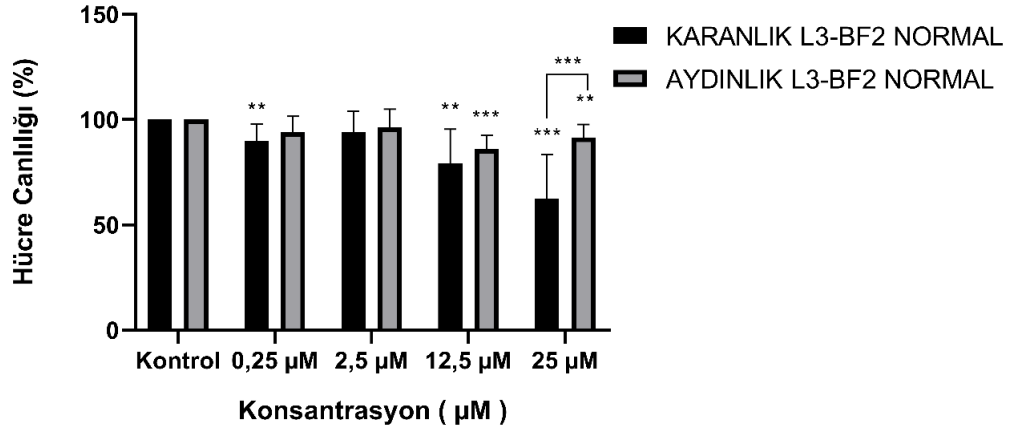
OV2008 L3-NİS KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.18. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L3-NİS ligandı aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak sitotoksik etkisi görüldü. L3-NİS ligandı 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında karanlık ortam sitotoksitesi aydınlık ortama göre hücre canlılığında daha fazla bir düşüşe neden oldu (Şekil 4.18).

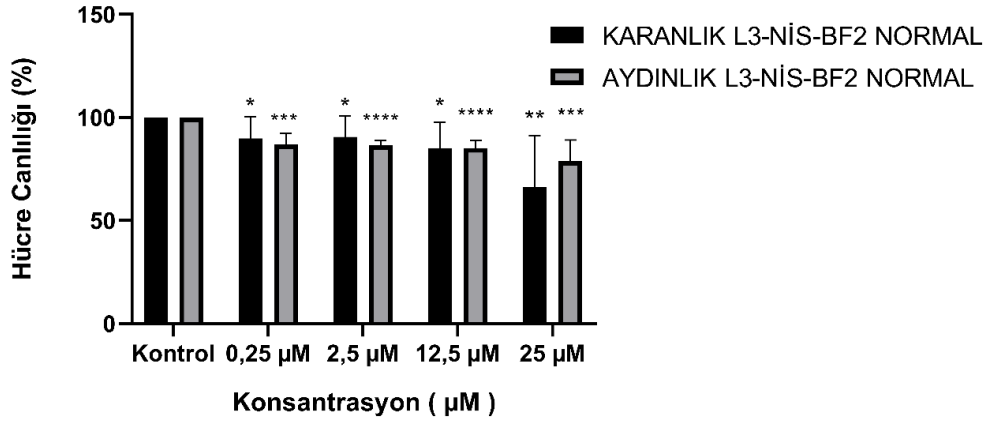
OV2008 L3-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.19. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 μ M, 2.5 μ M, 12.5 μ M ve 25 μ M konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1). Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L3-BF₂ kompleksi hem aydınlık ortamda hem de karanlık ortamda tutarlı bir eğri göstermedi ve OV2008 hücre hattında bu bileşiğin karanlık sitotoksitesi aydınlık ortamdakine göre daha fazladır (Şekil 4.19).

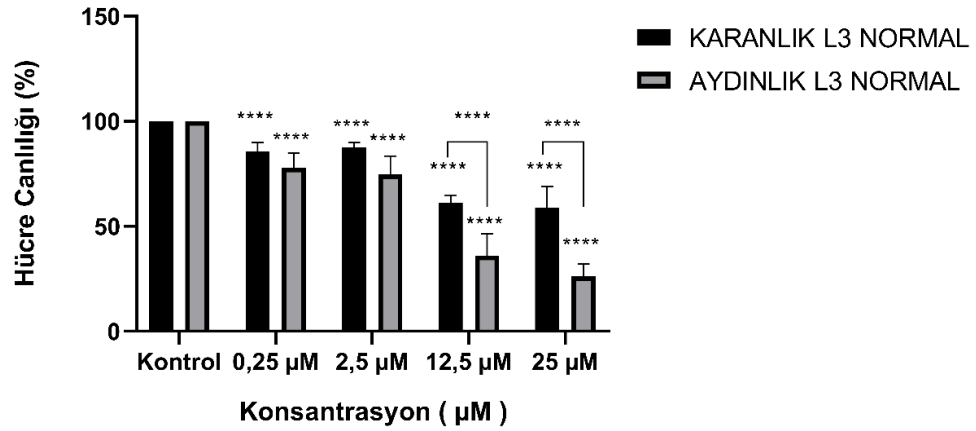
OV2008 L3-NİS-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.20.OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L3-NİS-BF₂ kompleksi aydınlık ortamdaki hücre canlılığı karanlık ortamdaki hücre canlılığına benzer etki gösterdi ancak 25 µM konsantrasyonunda bu bileşiğin karanlık sitotoksitesi aydınlık ortama göre daha fazla etkisini gösterdi. Hücre canlılığı aydınlık ortamda %79'a kadar düşerken karanlık ortamda bu oran %66'a kadar düştüğü görüldü (Şekil 4.20).

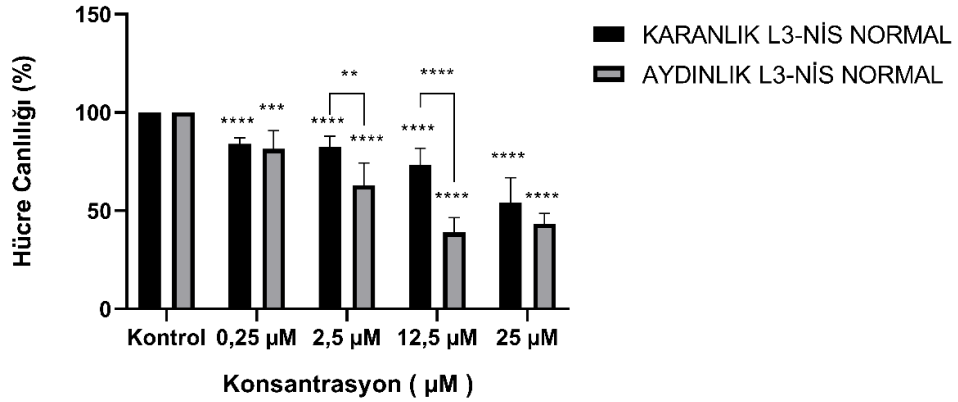
HT29 L3 KARANLIK-AYDINLIK KARŞILAŞTIRMA NORMAL



Şekil 4.21. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3 ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L3 ligandı karanlık ve aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak sitotoksik etkisinin de arttığı görüldü. Bu azalış karanlık ortamda kullanılan en yüksek doz olan 25 µM'da yaklaşık %58'e kadar düşmüşken aydınlık ortamda aydınlık ortamda 12.5 µM %hücre canlılığını %36'a, 25 µM ise hücre canlılığını %26'ya kadar düşürmüştü olduğu gözlemlendi. Aydınlık ortamdaki bu düşüş karanlık ortam ile kıyaslandığında anlamlı olduğu saptandı (Şekil 4.21). FDT için kullanım potansiyeli olduğu belirlendi.

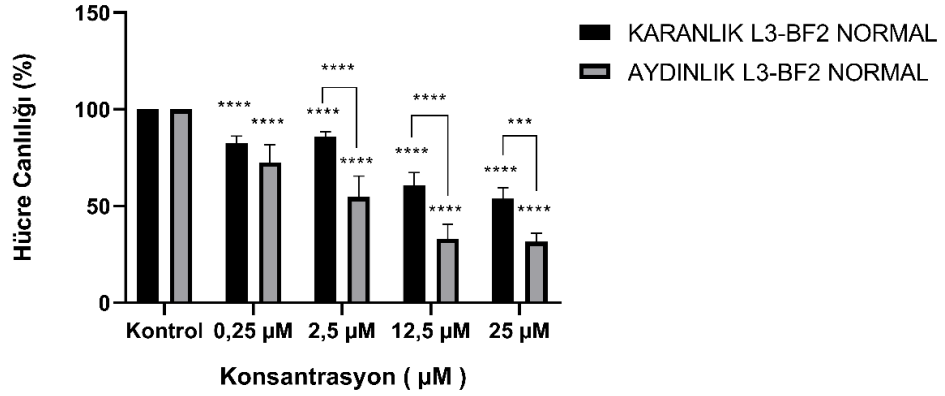
HT29 L3-NİS KARANLIK-AYDINLIK KARŞILAŞTIRMA NORMAL



Şekil 4.22. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L3-NİS ligandı aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak sitotoksik etkisi görüldü. L3-NİS ligandı 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında aydınlık ortam sitotoksiteleri karanlık ortama göre hücre canlılığında daha fazla bir düşüşe neden oldu. 2.5 µM ve 12.5 µM konsantrasyonları aydınlık ve karanlık ortam deneylerini sonuçları kıyaslandığında aydınlık ortam hücre canlılığında anlamlı bir düşüş gösterdi. Karanlık ortamda en fazla 25 µM'da hücre canlılığı %54'e düşerken, aydınlık ortamda 12.5 µM'da bu oran yaklaşık %39'lara düştü (Şekil 4.22). Analizler sonucunda HT29 hücre hattı için 2.5 ve 12.5 µM konsantrasyonlarının anlamlı bir düşüş arz ettiği ve FDT için kullanılabilecek dozaj aralığı olduğu belirlendi.

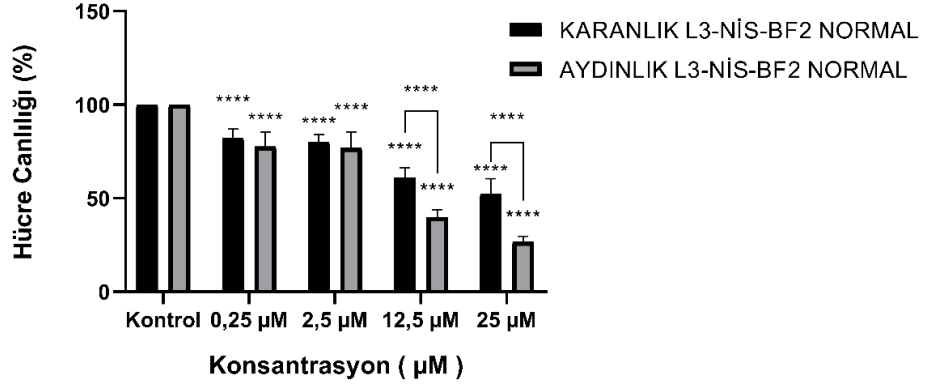
HT29 L3-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KARŞILAŞTIRMA NORMAL



Şekil 4.23. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1). Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L3-BF₂ kompleksi karanlık ortamdaki 2.5 µM konsantrasyonundaki %3'lük artış haricinde hem aydınlık ortamda hem de karanlık ortamda tutarlı bir eğri gösterdi ve HT29 hücre hattında bu bileşiğin aydınlık sitotoksitesi karanlığa göre daha fazla olduğu ve karanlık sitotoksitesinin düşük olduğu görüldü. 0.25 µM konsantrasyonu dışındaki tüm konsantrasyonlardaki karanlık-aydınlık karşılaştırılmasında sonuçların anlamlı olduğu ve aydınlık ortamda 12.5 ile 25 µM dozlarının hücre canlılığını %65'tan daha düşük bir orana indirdiği ve karanlık ortamda en düşük hücre canlılığı 25 µM'da %53'e düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.23).

HT29 L3-NİS-BF₂ KARANLIK-AYDINLIK KARŞILAŞTIRMA NORMAL

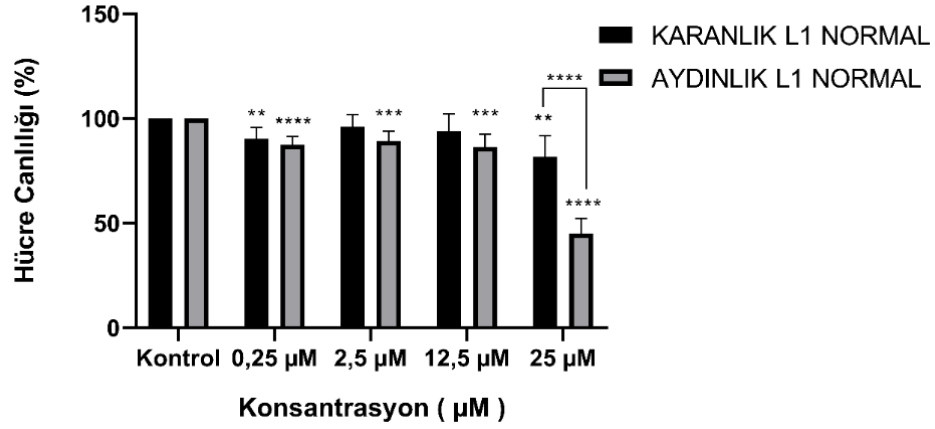


Şekil 4.24. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF₂ kompleksinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L3-NİS-BF₂ kompleksi hem aydınlık ortamda hem de karanlık ortamda tutarlı bir eğri göstermiş ve HT29 hücre hattında bu bileşiğin aydınlık sitotoksitesi karanlığa göre daha fazla olduğu ve karanlık sitotoksitesinin düşük olduğu görüldü. Karanlık ortamda en düşük hücre canlılığı 25 µM'da %52'ye düştüğü ve aydınlık ortamda 12.5 ile 25 µM dozlarının hücre canlılığını %60'tan daha düşük bir orana indirdiği gözlemlendi (Şekil 4.24).

Sonuç olarak L3 serisi bileşiklerin MCF-7 hücre hattında L3 ligandının 12.5 µM konsantrasyonu ve L3-NİS-BF₂ kompleksinin 25 µM konsantrasyonu dışında anlamlı bir düşüş göstermediği, OV2008 hücre hattında serideki herhangi bir bileşiğin anlamlı sonuç vermediği görüldü. Ancak HT29 hücre hattında L3 serisinin karanlık sitotoksitesinin düşük olması ve FDT uygulanan hücrelerde karanlık ortama göre daha fazla sitotoksite gösterdiği belirlendi ve en az 2 konsantrasyonun anlamlı sonuç verdiği görüldü. Anlamlı sonuç veren değerlerinde IC₅₀ değerlerinin altında olması, daha düşük konsantrasyonlarda HT29 hücre hattında kullanım potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir.

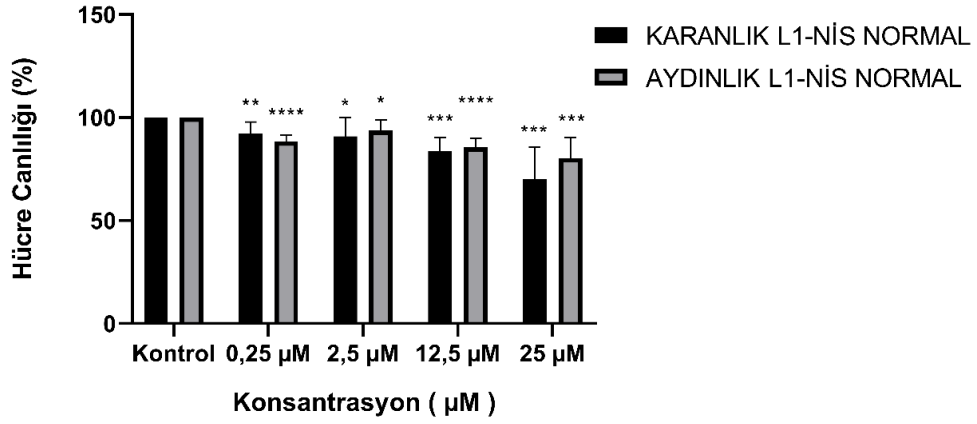
MCF-7 L1 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.25. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1 ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L1 ligandı karanlık ortamda 2.5µM'daki yaklaşık %6 ve aydınlık ortamda 2.5µM'daki yaklaşık %2'lik artış dışında her iki ortamda alınan sonuçlarda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında azalma meydana geldiği görüldü. Bileşiğin 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM dozları hem karanlık ortam hem de aydınlık ortamda, aydınlık ortamdaki tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığı daha az olsa bile, yakın değerler sergilediler. Ancak L1 ligandının 25 µM konsantrasyonu hücre canlılığında karanlık ortamda yaklaşık %20 değerinde bir azalmaya sebep olurken, aydınlık ortamda bu değer yaklaşık %55'e kadar yükseldi. Aydınlık ortamdaki bu değer ile karanlık ortamdaki değer arasındaki bu büyük fark L1 ligandının 25 µM'daki karanlık sitotoksitesinin düşük ve aydınlık ortamda IC₅₀ değerinden daha fazla bir canlılık değerinde düşüş göstermiş olduğu görüldü (Şekil 4.25).

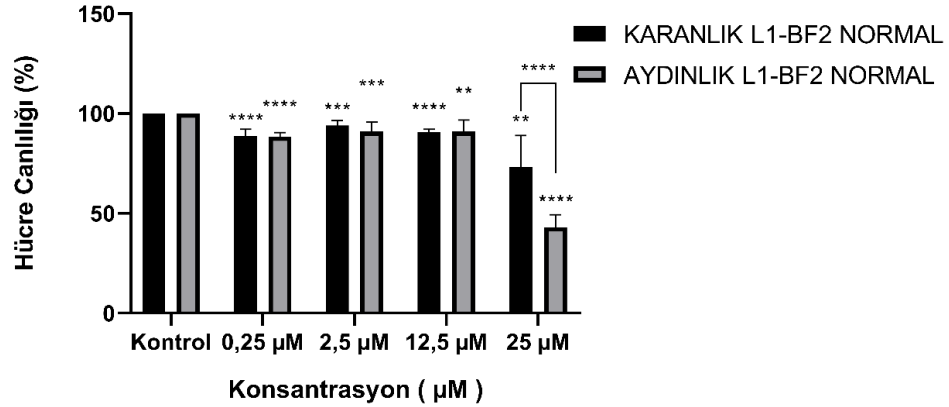
MCF-7 L1-NİS KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.26. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L1-NİS ligandı aydınlık ortamda 2.5 µM'daki yaklaşık %5'lik artış dışında her iki ortamda alınan sonuçlarda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında azalma meydana geldiği görüldü. Yapılan deney sonuçlarının analizlerine göre L1-NİS ligandı beklenen etkiyi göstermeyerek aydınlık ortamda 2.5 µM konsantrasyonundan itibaren karanlık ortam sitotoksitesi aydınlık ortam sitotoksitesinden düşük/yakın bir sitotoksite gösterdi (Şekil 4.26).

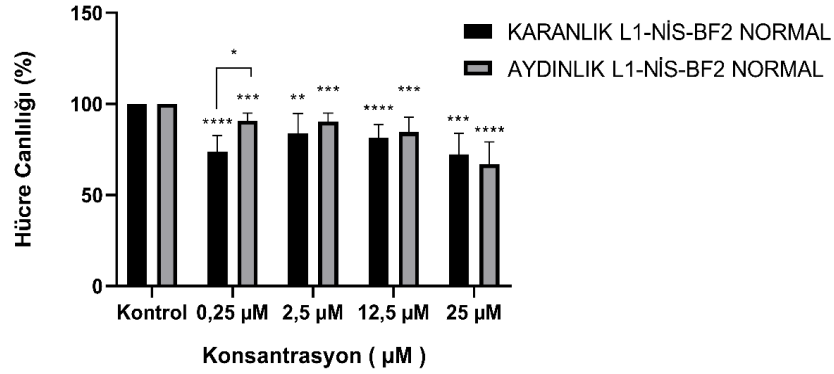
MCF-7 L1-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.27. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L1-BF₂ kompleksi aynı serideki L1 ve L1-NİS'teki gibi 2.5µM'da bir artış söz konusudur ancak bu artış %5'i geçmemektedir. Diğer tüm dozajlar, konsantrasyon artışına bağlı olarak hem karanlık hem de aydınlık ortamda hücre canlılığında bir azalma meydana getirdi. Aydınlık ortamdaki etki 25 µM dışındaki tüm konsantrasyonlardaki etki karanlık ortamla aynı gitmektedir. Ancak bileşiğin konsantrasyonu 25 µM'a ulaştığında karanlık ortamdaki hücre canlılığı %73'ü geçmezken aydınlık ortamda bu değer %43'e kadar düşürdü (Şekil 4.27). Bu düşüş yapılan analizler sonucunda anlamlı olduğu bulunmuştur ve FDT için kullanım potansiyeli bu konsantrasyon için varlığını devam ettirmektedir.

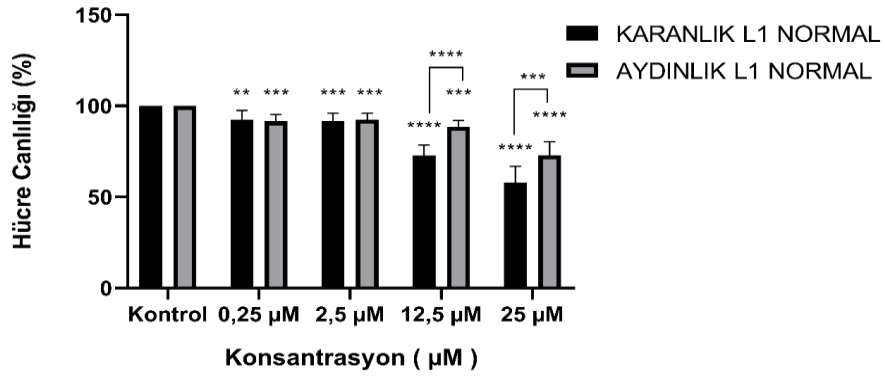
MCF-7 L1-NİS-BF₂ KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.28. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

L1-NİS-BF₂ kompleksi MCF-7 hücre hattında yapılan deney sonucunda diğer L1 serisindeki bileşiklerde de olduğu gibi karanlık ortamda 2.5 µM konsantrasyonu hücre canlılığında bir artış gösterdi. Karanlık ortamdaki 2.5 µM konsantrasyonu dışındaki tüm aydınlık ve karanlık konsantrasyonlar artan doza bağlı olarak hücre canlılığında bir azalmaya sebep oldu. Ancak aydınlık ortamdaki hücre canlılığı konsantrasyonlardan 25 µM hariç tüm konsantrasyonlarda karanlık ortam değerlerinden yüksek olduğu saptanmıştır ve 25 µM da dahil olmak üzere hiçbir konsantrasyon hücre canlılığını %66'dan aşağı düşüremedi (Şekil 4.28). IC₅₀ değeri kullanılan konsantrasyonlardan daha yüksek konsantrasyonda olduğu gözlemlendi.

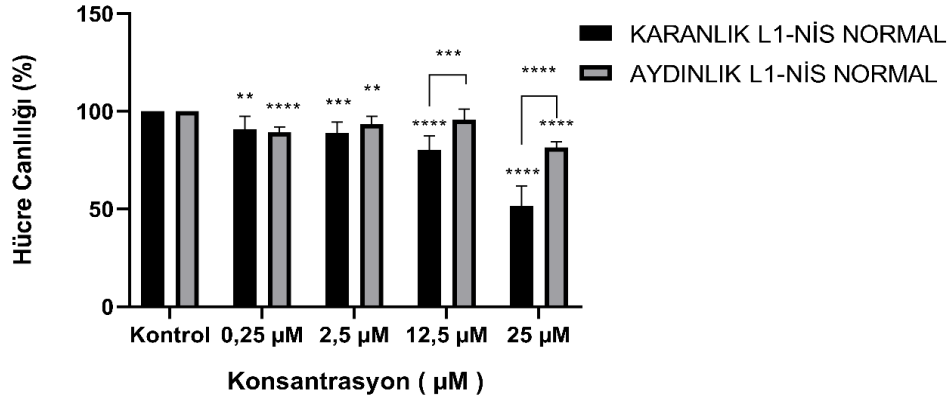
OV2008 L1 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.29. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1 ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L1 ligandı aydınlık ortamdaki 2.5 µM konsantrasyonu (~%1 artış) hariç tüm karanlık ve aydınlık ortamdaki hücre canlılığı artan konsantrasyona bağlı olarak her iki ortamda da düşüş gösterdi. Ancak 0.25 µM konsantrasyonu dışında tüm aydınlık değerler karanlık ortam değerlerine kıyasla daha düşük bir sitotoksite gösterdi. L1 ligandı, OV2008 hücre hattında karanlık ortam sitotoksitesi yüksek olduğu görülüp 25 µM konsantrasyonunda hücre canlılığı yaklaşık %57 oranına kadar düşüp aydınlık ortamda en fazla %72 oranına kadar düşmektedir (Şekil 4.29).

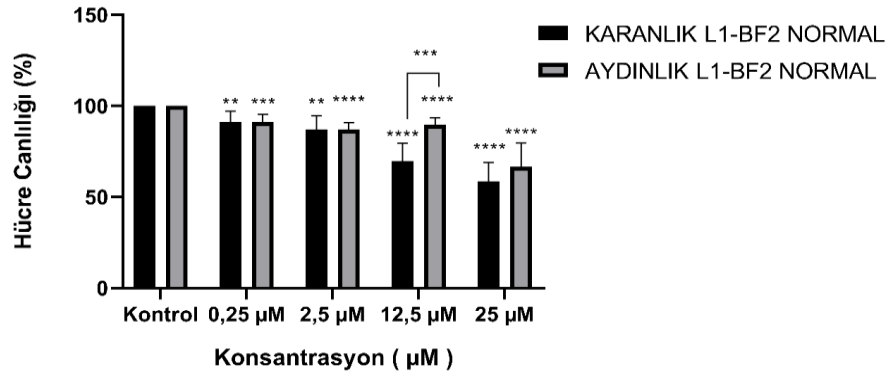
OV2008 L1-NİS KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.30. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L1-NİS ligandı karanlık ortamda artan doza bağlı olarak düşüş göstermiş olup 25 µM konsantrasyonunda hücre canlılığı ~%51'e kadar azalma gözlemlendi. Ancak L1-NİS ligandı 25 µM konsantrasyonu hariç dozaj artışına bağlı olarak hücre 0.25 µM konsantrasyonunda ~%89'dan 12.5 µM konsantrasyonunda ~%95'e kadar yükseldi. Aydınlık ortam 25 µM'da hücre canlılığı %80'lere kadar düşüş göstermesine rağmen karanlık ortamdaki değerlerden yüksek olduğu görüldü. L1-NİS ligandı ile OV2008 hücre hattında yapılan deney sonucunda kullanılan dozlarda karanlık sitotoksitesinin aydınlık sitotoksiteden daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.30). Bu nedenle FDT'de kullanımı yüksek risk taşıyacağı düşünüldü.

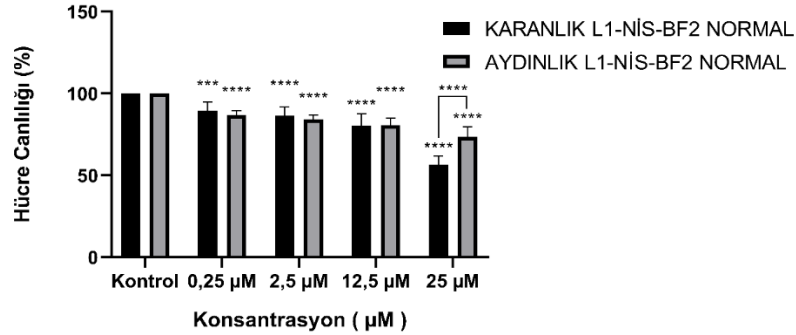
OV2008 L1-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.31. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

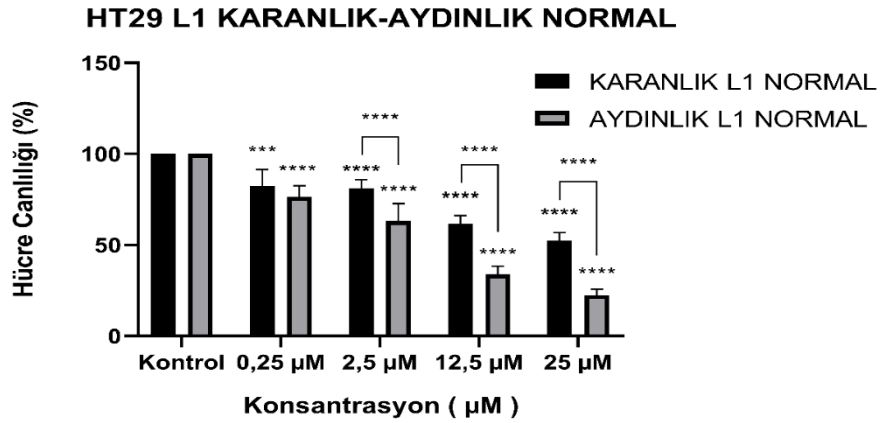
OV2008 hücre hattında L3-BF₂ kompleksi aydınlık (12.5 µM hariç) ve karanlık ortamda artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında bir azalışa neden oldu. Ancak oluşan aydınlık sitotoksite karanlık sitotoksiteden daha düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.31).

OV2008 L1-NİS-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.32. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

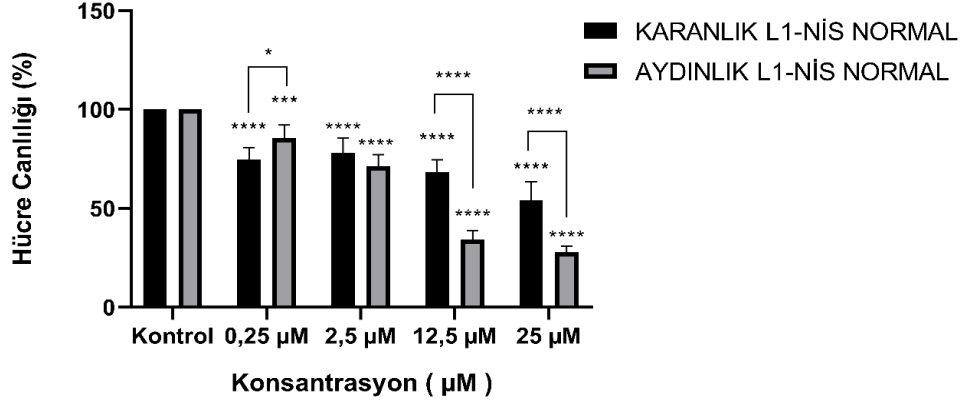
OV2008 hücre hattında L1-NİS-BF₂ kompleksi karanlık ve aydınlık ortamdaki sitotoksitesi artan doza bağlı bir artış sergiledi. Ancak L1-NİS-BF₂ kompleksinin karanlık ortamdaki 25 µM konsantrasyonundaki gösterdiği sitotoksite aydınlık ortamdaki sitotoksiteden yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.32).



Şekil 4.33. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1 ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L1 ligandı, hem karanlık ortamda hem de aydınlık ortamda artan dozaja bağlı olarak hücre canlılığında düşüş oluşturdu. L1 ligandı OV2008 hücre hattında karanlık-aydınlık ortam karşılaştırmasında dikkate değer, anlamlı bir düşüş göstermekle birlikte aydınlık ortamda oluşturduğu sitotoksite karanlık ortamda oluşturduğu sitotoksik etkiden oldukça yüksektir (Şekil 4.33). Karanlık ortamdaki kullanılan en yüksek doz olan 25 µM hücre canlılığını ~%52 ye kadar düşürebilmişken, aydınlık ortamdaki düşük dozlardan olan 2.5 µM konsantrasyonu hücre canlılığını ~%63'e kadar düşürdü. Kullanılan 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları aydınlık ortamda hücre canlılığını sırasıyla ~%33 ve ~%22'e kadar düşürmüş olması IC₅₀ değerinin bu konsantrasyonlardan daha düşük konsantrasyon olduğunu gösterdi. Yapılan analiz sonucunda görülen anlamlı değerler sonucunda L1 ligandı FDT için kullanım potansiyeline sahip olduğu belirlendi.

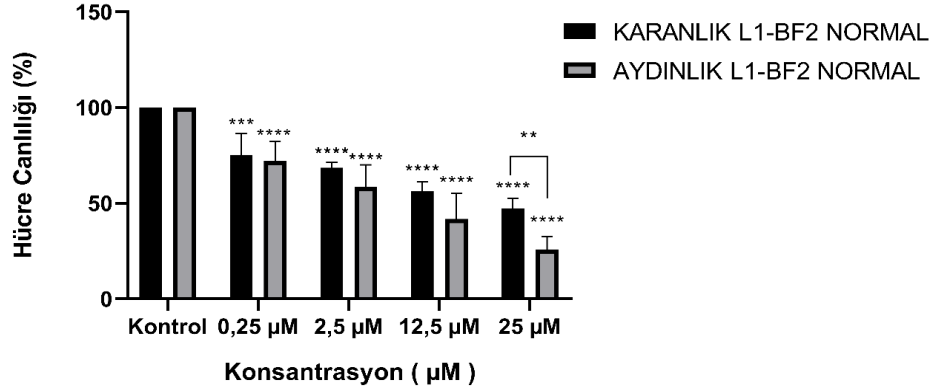
HT29 L1-NİS KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.34. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L1-NİS ligandı, karanlık ortamdaki 2.5 µM konsantrasyonu hariç, karanlık ve aydınlık ortamda artan konsantrasyona bağlı olarak bir düşüş eğrisi oluşturdu. HT29 hücre hattında L1-NİS ligandı için karanlık-aydınlık ortam karşılaştırması yapılırsa 0.25 µM haricinde kullanılan tüm konsantrasyonların aydınlık ortam sitotoksiteleri karanlık ortamda oluşan sitotoksiteden bir hayli yüksek olduğu görüldü. Karanlık ortamdaki en yüksek doz hücre canlılığını ~%55 kadar düşürmüştüken aydınlık ortamda daha düşük doz olan 12,5 µM konsantrasyonu hücre canlılığında ~%70'lik bir düşüş oluşturdu (Şekil 4.34). Yapılan analiz sonucunda görülen anlamlı değerler sonucunda L1 ligandı FDT için kullanım potansiyeline sahip olduğu belirlendi.

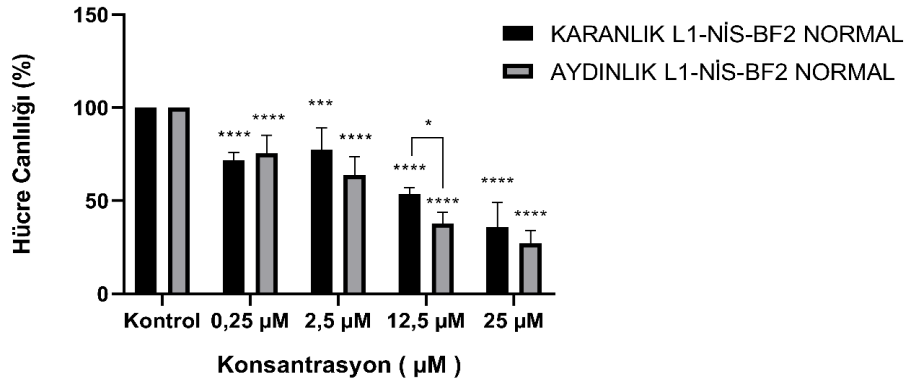
HT29 L1-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.35. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L3-BF₂ kompleksi karanlık ve aydınlık ortamda da artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında düşüş oluşturdu. Karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığı zaman L3-BF₂ kompleksinin aydınlık ortamda oluşturduğu sitotoksite karanlıktan yüksek olduğu görülmüş ancak analizler sonucunda bu değerlerden yalnızca 25 µM konsantrasyonundaki fark anlamlı olduğu gösterildi (Şekil 4.35).

HT29 L1-NİS-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL

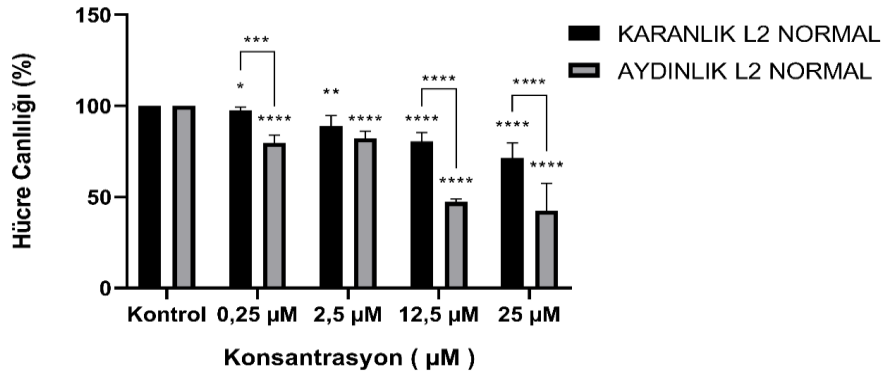


Şekil 4.36. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L1-NİS-BF₂ kompleksi, karanlık ortamdaki 2.5 µM konsantrasyonunda oluşan artış dışında, karanlık ve aydınlık ortamdaki sitotoksitesi artan doza bağlı bir artış sergiledi. Ancak bileşiğin kullanılan konsantrasyonlarda oluşan karanlık sitotoksitesi aydınlıkta oluşturduğu sitotoksite gibi yüksek bir değere sahiptir (Şekil 4.36).

L1 serisi hücre hatlarına göre değerlendirildiğinde MCF-7 hücre hattında yalnızca L1 ligandının ve L1-BF₂ kompleksinin 25 µM konsantrasyonunda anlamlı bir düşüş değeri gözlemlendi. OV2008 hücre hattında anlamlı bir değer göstermeyen L1 serisi HT29 hücre hattında ise tüm bileşikleri belirli konsantrasyonlarda anlamlı sonuçlar verip karanlık sitotoksite değerlerin düşük olduğu görüldü.

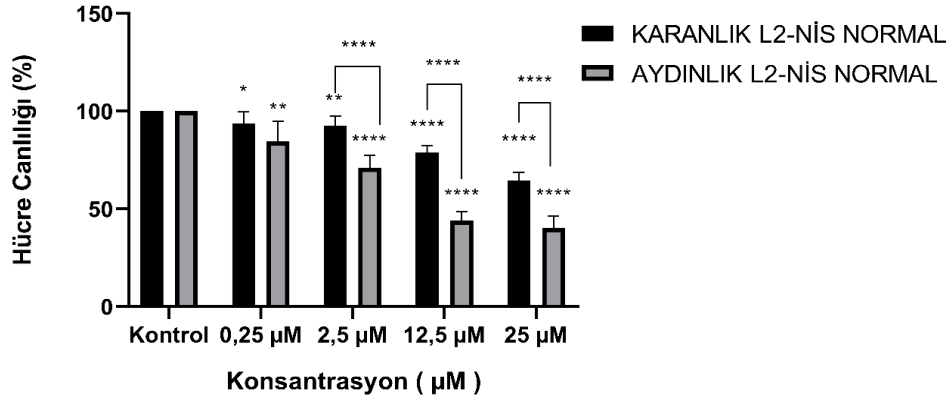
MCF-7 L2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.37. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2 ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0,25 µM, 2,5 µM, 12,5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L2 ligandı aydınlık ortamdaki 2,5 µM'daki ~%3'lük artış hariç hem karanlık hem de aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak bir düşüş eğrisi oluşturdu. Karanlık ortamdaki en yüksek doz olan 25 µM konsantrasyonu hücre canlılığını ~%30 düşürmüştüken aydınlık ortamdaki 12,5 µM konsantrasyonu hücre canlılığını ~%53 oranında bir düşüş gösterdi (Şekil 4.37). Karanlık ortamda oluşturduğu düşük sitotoksite ve karanlık-aydınlık karşılaştırmasında verilen anlamlılık L2 ligandını FDT için kullanılabilecek FD olması yönündeki düşünceleri doğrular yöndedir.

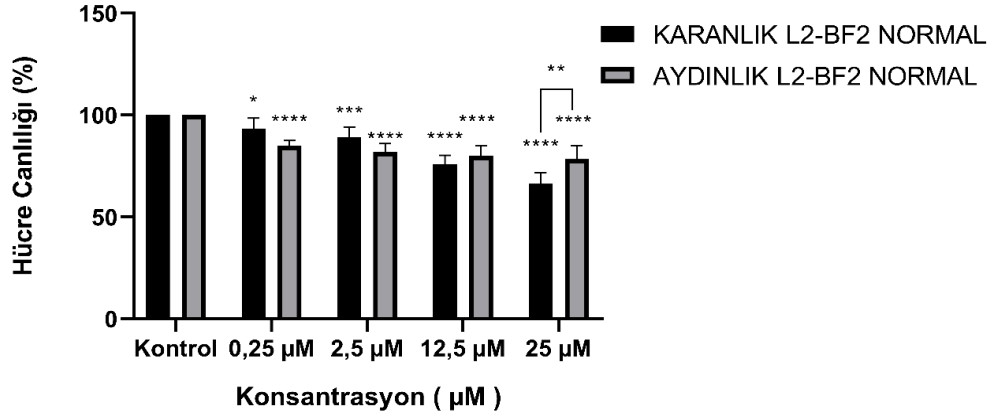
MCF-7 L2-NİS KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.38. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L2-NİS ligandı hem karanlık hem de aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak bir düşüş eğrisi oluşturmaktadır. Bu ligand aydınlık ortamda yüksek sitotoksik etki sergilerken karanlık ortamdaki en yüksek konsantrasyon hücre canlılığını yalnızca ~%30 oranında bir düşüş sergileyebilmiştir. Yapılan analizlerde yüksek anlamlılık gösteren L2-NİS ligandı aydınlık ortamda çalışmada kullanılan 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığını ~%55-60 oranında bir düşüş göstererek IC₅₀ değerinden yüksek sitotoksite oluşturdu (Şekil 4.38).

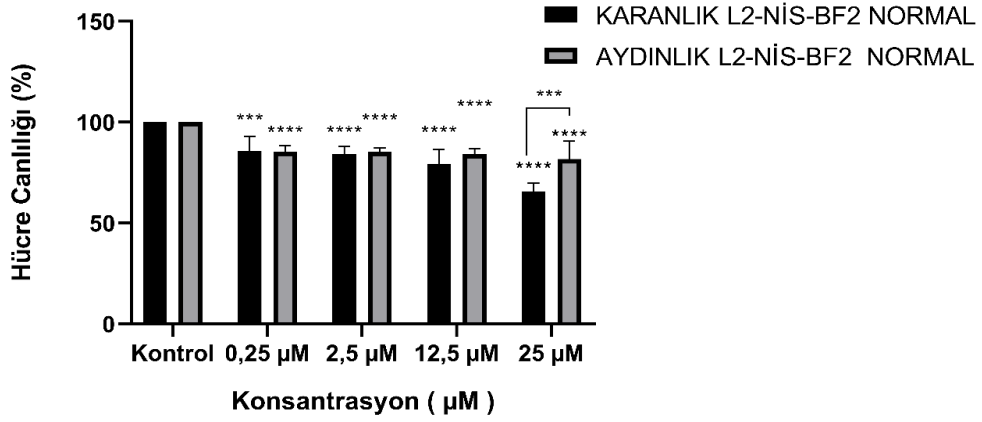
MCF-7 L2-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.39. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L2-BF₂ kompleksi hem karanlık hem de aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak bir düşüş eğrisi oluşturmaktadır. Ancak L2-BF₂ kompleksinin 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları karanlık ortamda aydınlık ortama göre daha yüksek sitotoksik etki gösterdi ve hem aydınlık hem de karanlık ortamda kullanılan konsantrasyonlar hücre canlılığını %50'nin altına düşüremediği belirlendi (Şekil 4.39).

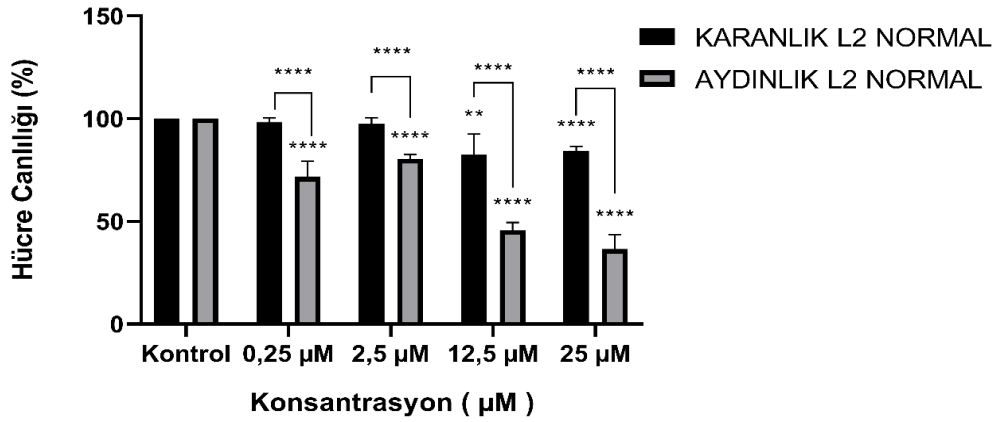
MCF-7 L2-NİS-BF₂ KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.40. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L2-NİS-BF₂ kompleksi hem karanlık hem de aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak bir düşüş eğrisi oluşturdu. Ancak L2-BF₂ kompleksinin 0.25 µM konsantrasyonu hariç tüm konsantrasyonlarda karanlık ortamda aydınlık ortama göre daha yüksek sitotoksik etki gösterdi ve hem aydınlık hem de karanlık ortamda kullanılan konsantrasyonlar hücre canlılığını %50'nin altına düşüremedi (Şekil 4.40).

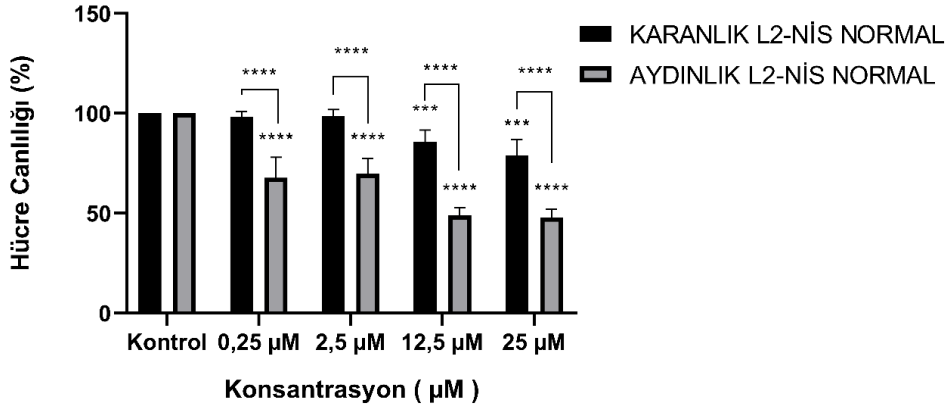
OV2008 L2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.41. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2 ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L2 ligandı aydınlık ortamdaki 2.5 µM konsantrasyonu (~%9 artış) hariç hem karanlık hem de aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak bir düşüş eğrisi oluşturmaktadır (Şekil 4.41). L2 ligandının karanlık ortamdaki sitotoksik etkisinin az olması ve analiz değerlerinin hepsinde anlamlılık göstermesi, L2 ligandını FDT'de kullanılabilecek FD olma yönündeki potansiyelini hala korumaktadır.

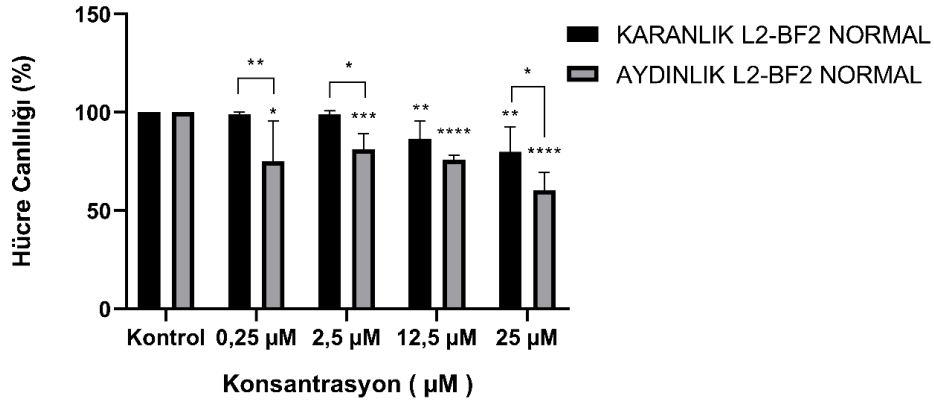
OV2008 L2-NİS KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.42. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında yapılan çalışmada L2-NİS ligandı 2.5 µM konsantrasyonundaki ~%1-2'lik artış dışında hem karanlık hem de aydınlık ortamda artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında bir azalış meydana getirdi. L2-NİS ligandının karanlık ortamdaki düşük sitotoksitesi ve aydınlık ortamdaki oluşturduğu yüksek sitotoksik etkisi tüm konsantrasyonlarda karanlık ve aydınlık karşılaştırması yapıldığında anlamlı bir sonuç gösterdi. Çalışma kapsamında kullanılan en düşük konsantrasyon olan 0.25 µM aydınlık ortamda hücre canlılığını ~%33 oranında azalmasına neden olurken karanlık ortamdaki en yüksek konsantrasyon olan 25 µM konsantrasyonu hücre canlılığında yalnızca ~%22 oranında bir azalış sergiledi (Şekil 4.42).

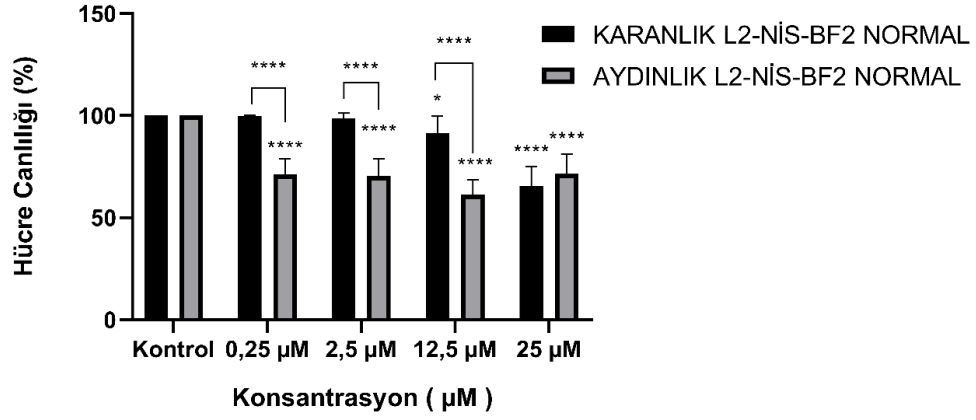
OV2008 L2-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.43. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

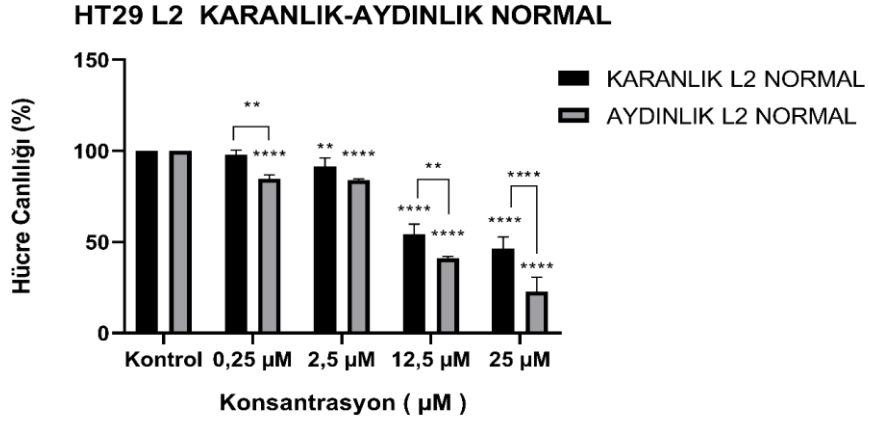
L2-BF₂ kompleksi OV2008 hücre hattında (2.5 µM konsantrasyonunda karanlık ortamda ~%1 ve aydınlık ortamda ~%5 artış dışında) tüm konsantrasyonlarda dozaja bağlı bir ölüm sergilendi. Bu bileşiğin karanlık ortamdaki sitotoksitesi düşük olmasının yanı sıra aydınlık ortamda kullanılan konsantrasyonlar hücre canlılığını en çok ~%60 oranına düşürebildi (Şekil 4.43).

OV2008 L2-NİS-BF₂ KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



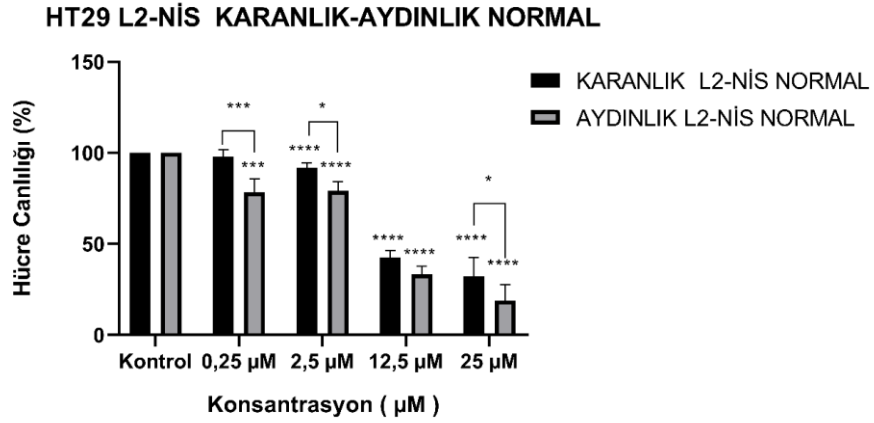
Şekil 4.44. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L2-NİS-BF₂ kompleksi, karanlık ortamda dozaja bağlı olarak hücre canlılığında azalma oluşturdu. Aydınlık ortamda 0.25 µM, 2.5 µM ve 12.5 µM konsantrasyonları hücre canlılığında dozaja bağlı olarak hücre canlılığında düşüşe neden olurken 25 µM konsantrasyonu yaklaşık olarak 0.25 µM konsantrasyondaki hücre canlılığı düzeyinde bir hücre canlılığı oluşmasını sağladı (Şekil 4.44).



Şekil 4.45. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2 ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

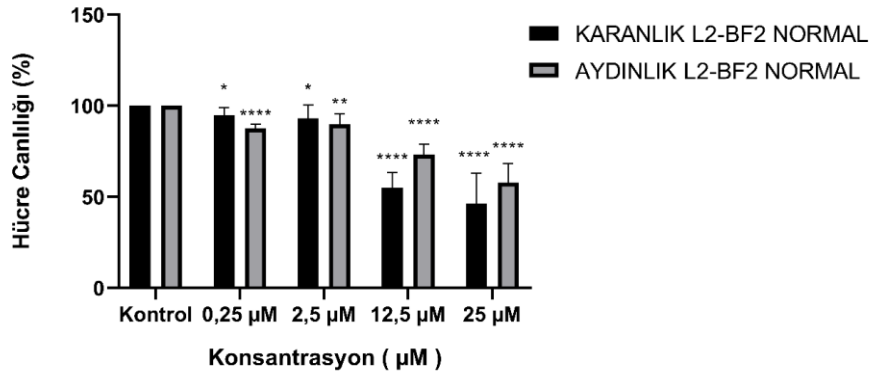
HT29 hücre hattında L2 ligandı, karanlık ve aydınlık ortam uygulamalarında her iki ortamda da dozaj artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüş oluşturdu. L2 ligandı ile HT29 hücre hattında yapılan çalışmada karanlık-aydınlık ortam karşılaştırmasında 2.5 µM konsantrasyonu dışında çalışmada kullanılan tüm konsantrasyonlarda anlamlı değerler oluşturduğu saptandı (Şekil 4.45).



Şekil 4.46. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L2-NİS ligandı, aydınlık ortamda kullanılan 2.5 µM konsantrasyonu (~%1’lik artış) dışında karanlık ve aydınlık ortam uygulamalarında her iki ortamda da dozaj artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüş oluşturdu. L2-NİS ligandı ile HT29 hücre hattında yapılan çalışmada karanlık-aydınlık ortam karşılaştırmasında 12.5 µM konsantrasyonu dışında çalışmada kullanılan tüm konsantrasyonlarda anlamlı değerler oluşturduğu saptandı (Şekil 4.46).

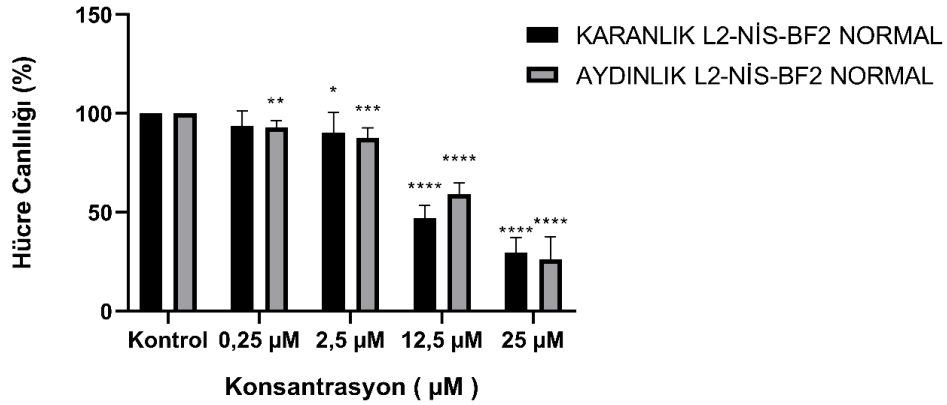
HT29 L2-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL



Şekil 4.47. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L2-BF₂ kompleksi ile yapılan çalışmada, aydınlık ortamda kullanılan 2.5 µM konsantrasyonundaki ~%2'lik artış dışında, karanlık ve aydınlık ortamda konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüş oluştu. Ancak karanlık-aydınlık ortamdaki değerlerin karşılaştırmalı analizi sonucunda anlamlı bir değer oluşturmadığı belirlendi. HT29 hücre hattında L2-BF₂ kompleksi ile yapılan çalışmada, ortamların kendi içerisindeki analizi anlamlı bir düşüş eğrisi göstermesinde rağmen karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması analizinde 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında karanlık ortamda oluşan sitotoksite, aydınlık ortamda oluşan sitotoksiteden daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.47).

HT29 L2-NİS-BF2 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL

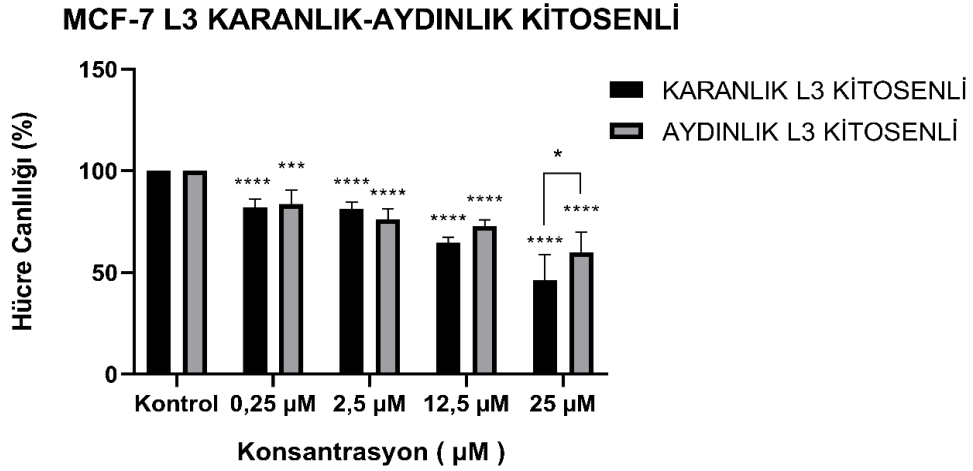


Şekil 4.48. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF₂ kompleksinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L2-NİS-BF₂ kompleksi ile yapılan çalışmada, her iki ortam da kendi içerisinde artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında bir düşüş eğrisi oluşturdu. 12.5 µM konsantrasyon dışında çalışmada kullanılan konsantrasyonlarda karanlık ortam sitotoksiteleri aydınlık ortamda oluşan sitotoksiteden düşüktür. Ancak oluşan bu fark çok az olup anlamlı bir değer ifade etmemektedir (Şekil 4.48).

L2 serisi diğer serilere göre üç hücre hattında da birçok bileşiği anlamlı sonuçlar verdi. L2 ve L2-NİS ligandları üç hücre hattında en az üç konsantrasyon olmak üzere aydınlık ortamda oluşan sitotoksiteler karanlık ortamdaki sitotoksiteden yüksek olup anlamlı değerler oluşturduğu belirlendi.

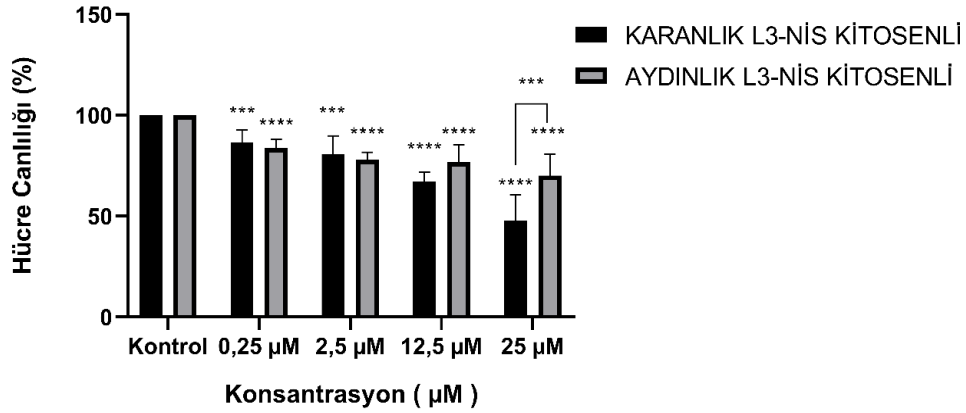
4.1.2. Kitosenli ligand ve kompleksler



Şekil 4.49. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3 kitosenli ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L3 kitosenli ligandı karanlık ve aydınlık ortamda da konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüşe neden oldu. Ancak karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması yapıldığında 2.5 µM konsantrasyonu hariç tüm konsantrasyonlarda aydınlık ortamda oluşan sitotoksik etkinin karanlık ortamdaki hücre canlılığı %50'nin altına düşmüşken aydınlık ortamda bileşiğin bu konsantrasyonundaki etkisi hücre canlılığını ancak ~%59'a kadar düşürdüğü gözlemlendi. İdeal fotoduyarlayıcının en önemli özelliklerinden biri olan; karanlık ortamda düşük sitotoksikite gösterme özelliği bu liganda gözlemlenemediğinden ve aydınlık sitotoksik etki karanlık ortamdaki düşük olması nedeniyle bu ligand FDT için kullanım potansiyelini kaybetmektedir (Şekil 4.49).

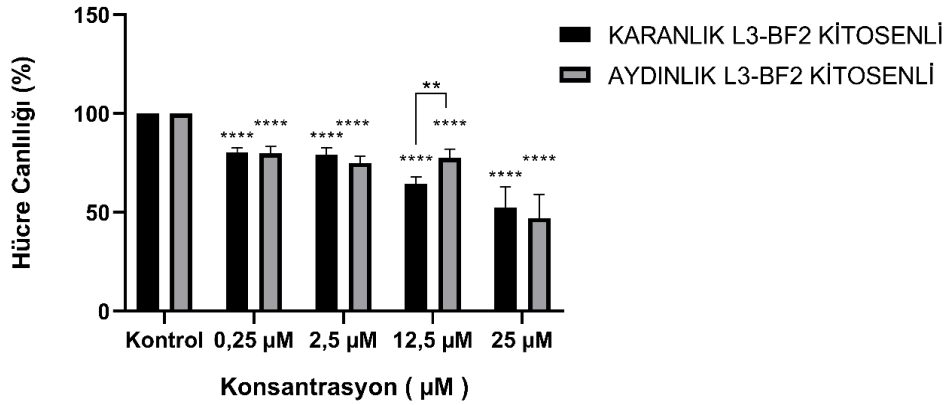
MCF-7 L3-NİS KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.50. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (*****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L3-BF₂ kitosenli bileşiği karanlık ve aydınlık ortamda da konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüşe neden oldu. Ancak karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması yapıldığında 2.5 µM konsantrasyonu hariç tüm konsantrasyonlarda aydınlık ortamda oluşan sitotoksik etkinin karanlık ortamdan daha düşük olduğu belirlendi. En yüksek konsantrasyon olan 25 µM konsantrasyonunda karanlık ortamdaki hücre canlılığı ~%48'e düşürmüştü, aydınlık ortamda bileşiğin bu konsantrasyonundaki etkisi hücre canlılığını ancak ~%70'a kadar düşürdüğü ve aydınlık ortamdaki çalışmada sonucunda hücre canlılığı tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığı %20-30 oranında sabit kaldığı gözlemlendi (Şekil 4.50).

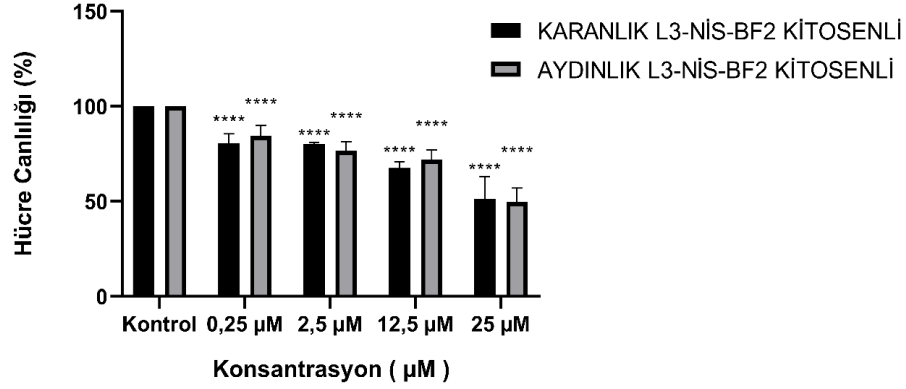
MCF-7 L3-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSEN Lİ



Şekil 4.51. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L3-BF₂ kitosenli bileşiği aydınlık ortamda 12.5 µM konsantrasyonundaki ~%1'lik artış dışında karanlık ve aydınlık ortamda da konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüşe neden oldu. Ancak karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması yapıldığında yalnızca 2.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında aydınlık ortamda oluşan sitotoksik etkinin karanlık ortamdaki daha fazla oranda olduğu belirlendi ama bu oran yapılan karanlık-aydınlık karşılaştırma analizlerinde anlamlı olarak değerlendirilmedi. En yüksek konsantrasyon olan 25 µM konsantrasyonunda aydınlık ortamdaki hücre canlılığı %50'nin altına düşmüşken aydınlık ortamda bileşiğin bu konsantrasyonundaki etkisi hücre canlılığını ancak ~%52'ye kadar düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 4.51).

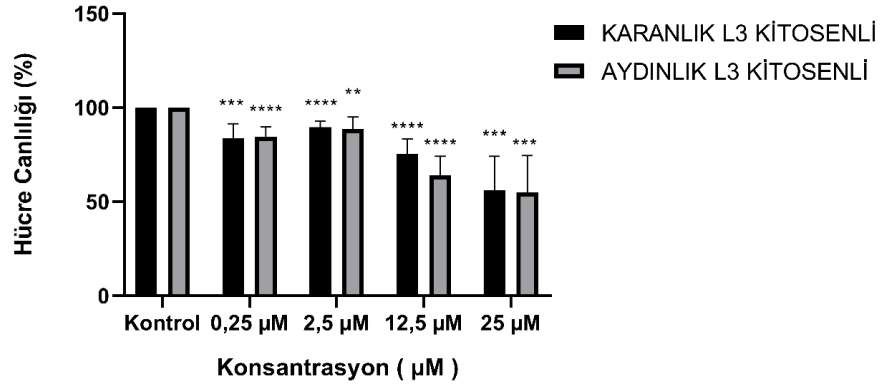
MCF-7 L3-NİS-BF₂ KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.52. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L3-NİS-BF₂ kitosenli bileşiği karanlık ve aydınlık ortamda da konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüşe neden oldu. Ancak karanlık-aydınlık karşılaştırması yapıldığında yalnızca 2.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında aydınlık ortamdaki hücre canlılığındaki azalış karanlık ortamdakinden yüksek olduğu görüldü ama yine de bu fark %4'ü geçmediği saptandı. Sonuç olarak L3-NİS-BF₂ kitosenli bileşiği her iki ortamda da farklar olsa bile benzer bir oranlarda hücrede sitotoksik etki gösterdiği görüldü (Şekil 4.52).

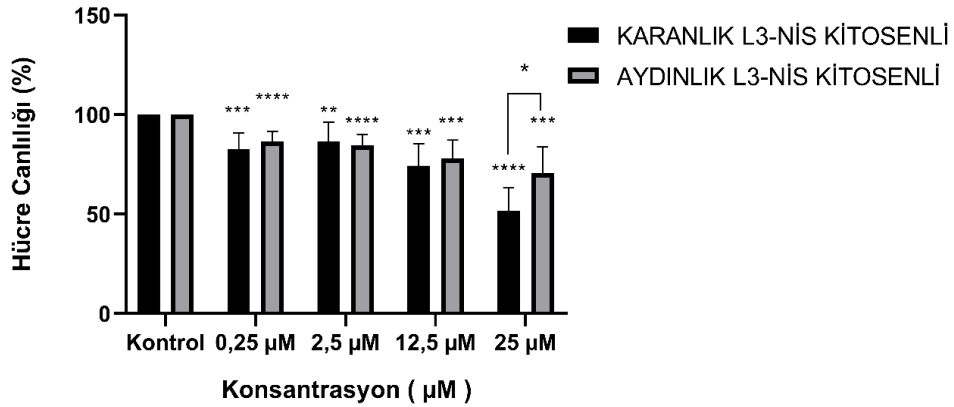
OV2008 L3 KARANLIK-AYDINLIK NORMAL KİTOSEN Lİ



Şekil 4.53. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3 kitosenli ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L3 kitosenli bileşiği karanlık ve aydınlık ortamda da 2.5 µM konsantrasyonunda ~%5'lik artış dışında konsantrasyondaki artışa bağlı olarak hücre canlılığında düşüşe neden oldu. Ancak karanlık-aydınlık karşılaştırması yapıldığında yalnızca 12.5 µM konsantrasyonundaki ~%10'luk fark dışında karanlık ve aydınlık ortamdaki hücre canlılığındaki azalış benzerlik gösterdi ve tüm konsantrasyonlardaki fark analizler sonucunda anlamlı bir sonuç oluşturmadığı görüldü (Şekil 4.53).

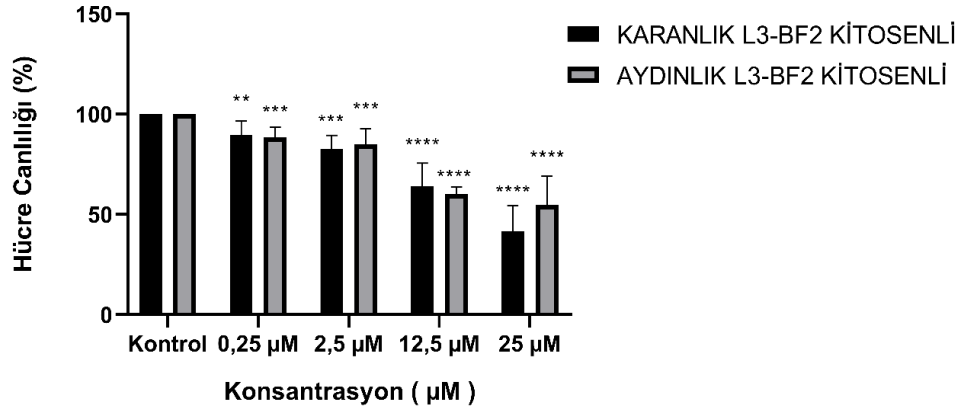
OV2008 L3-NİS KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.54. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L3-BF₂ kitosenli bileşiği karanlıktaki 2.5 µM konsantrasyonundaki ~%4'lük artış oranı dışında karanlık ve aydınlık ortamda da konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüşe neden oldu. 25 µM konsantrasyonu dışında tüm konsantrasyonlarda karanlık ve aydınlık ortamlardaki hücre canlılığı oranında benzer sonuçlar gösterdi. Ancak karanlık-aydınlık karşılaştırması yapıldığında yalnızca 25 µM konsantrasyonunda anlamlı değer elde edilirken istenmeyen şekilde bu konsantrasyonda karanlık ortamdaki oluşan sitotoksik etki aydınlık ortamda oluşan sitotoksik etkiden daha fazla olup yapılan analizler sonucunda bu sonucun anlamlı bir artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 4.54).

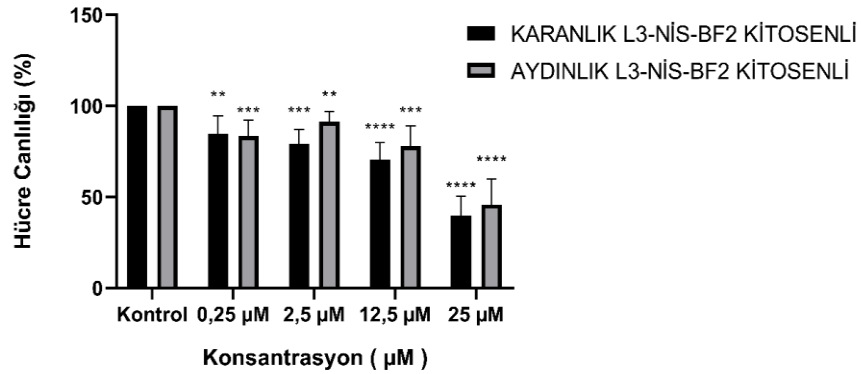
OV2008 L3-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.55. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L3-BF₂ kitosenli bileşiği karanlık ve aydınlık ortamda da konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüşe neden oldu. Ancak karanlık-aydınlık karşılaştırması yapıldığında yalnızca 0.25 µM ve 12.5 µM konsantrasyonlarında aydınlık ortamdaki hücre canlılığındaki azalış karanlık ortamdakinden yüksek olduğu görüldü ama yine de bu fark %3'ü geçmediği saptandı. Karanlık ve aydınlık ortamlarda 25 µM konsantrasyonun oluşturduğu sitotoksite ~%13'lük bir fark oluştururken karanlık-aydınlık ortam analizlerinde bu farkın anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 4.55).

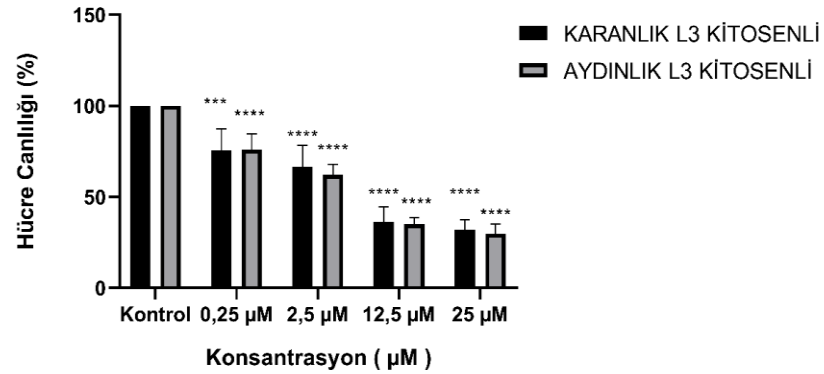
OV2008 L3-NİS-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.56. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L3-NİS-BF₂ kitosenli bileşiği aydınlık ortamdaki 2.5 µM konsantrasyonundaki ~%8'lik artış dışında karanlık ve aydınlık ortamda da konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığında düşüşe neden oldu. Ancak karanlık-aydınlık karşılaştırması yapıldığında yalnızca 0.25 µM konsantrasyonunda aydınlık ortamdaki hücre canlılığındaki azalış karanlık ortamdakinden yüksek olduğu görüldü ama yine de bu fark %2'ü geçmediği saptandı. Karanlık ve aydınlık ortamlarda 25 µM konsantrasyonun oluşturduğu sitotoksite hücre canlılığını ~%50'nin altına düşürdüğü gözlemlendi. Her iki ortamda oluşan hücre canlılığı oranlarının karşılaştırılmasında farklar olsa dahi karanlık-aydınlık ortam analizlerinde bu farkların anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 4.56).

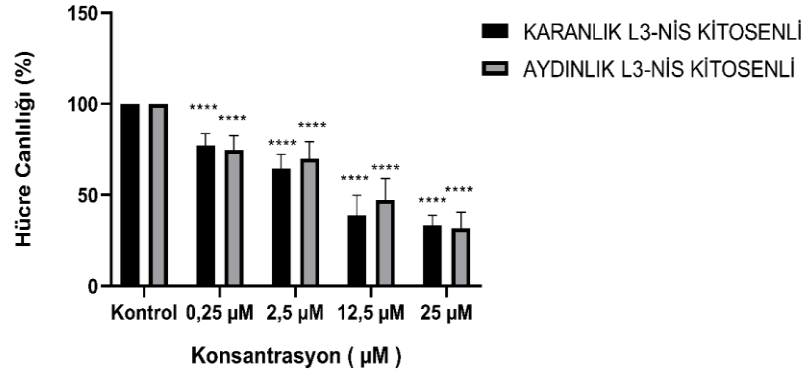
HT29 L3 KİTOSEN Lİ KARANLIK-AYDINLIK KARŞILAŞTIRMA



Şekil 4.57. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3 kitosenli ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L3 kitosenli bileşiği karanlık ve aydınlık ortamdaki çalışmalarda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında bir azalışa neden olmuştur. Ancak karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında sonuçlar arasında maksimum %4'lük fark olduğu belirlenmiştir. FDT için gerekli olan aydınlık ortamdaki yüksek sitotoksite oluşmamış neredeyse karanlık ortam kadar bir sitotoksite oluşturmuş olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.57).

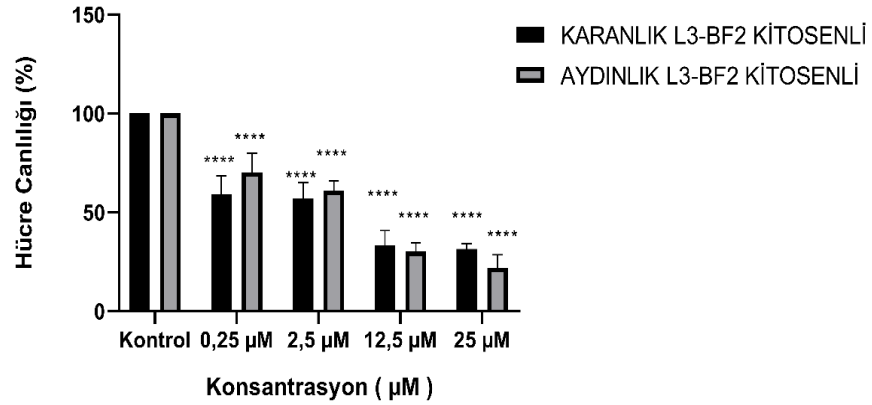
HT29 L3-NİS KİTOSEN Lİ KARANLIK-AYDINLIK KARŞILAŞTIRMA



Şekil 4.58. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS kitosenli ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L3-NİS ligandı ile yapılan çalışmada konsantrasyon artışına bağlı olarak her iki ortamda da hücre canlılığında düşüş gözlemlenirken, karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında yalnızca 0.25 µM ve 25 µM konsantrasyonlarındaki aydınlık ortam sitotoksitesi karanlık ortamdakinden daha fazla olduğu görüldü ancak bu fark ~%3'ü geçmedi. 2.5 µM ve 12.5 µM konsantrasyonlarının karanlık ortamdaki oluşturduğu hücre canlılığındaki azalış aydınlık ortamdaki azalıştan yüksek olsa bile bu fark %9'u geçmediği ve yapılan analizlerde oluşan azalış ve artışlar anlamlı bir değer olarak gösterilmediği saptandı (Şekil 4.58).

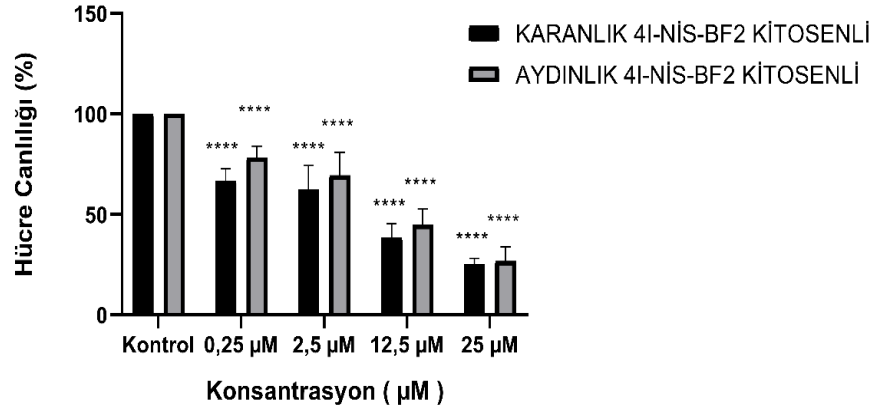
HT29 L3-BF2 KİTOSENİ KARANLIK-AYDINLIK KARŞILAŞTIRMA



Şekil 4.59. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L3-BF₂ kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmada her iki ortamda da artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında bir düşüş oluşturduğu görüldü. Karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında yalnızca 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarının oluşturduğu hücre canlılığındaki düşüş oranı aydınlık ortamdaki değerlerin karanlık ortamdaki değerlerden yüksek olduğu belirlendi. Her iki ortamda analizi yapılan değerler en yüksek anlam değerine sahip olduğu görülürken, karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında sonuçlar arasındaki farkın anlamlı görülmediği belirlendi (Şekil 4.59).

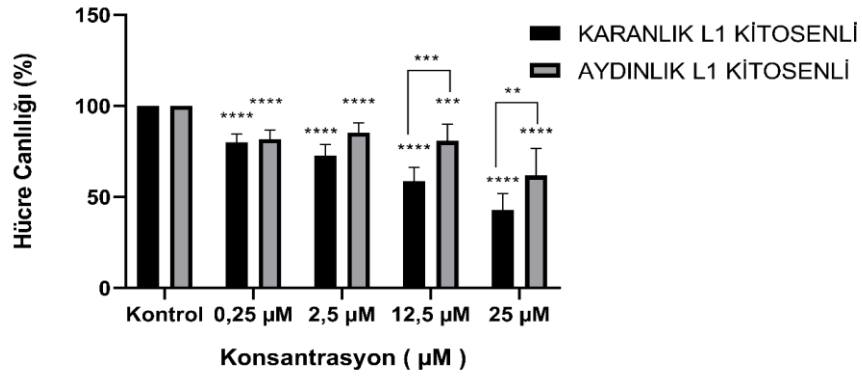
HT29 L3-NİS-BF2 KİTOSENLİ KARANLIK-AYDINLIK KARŞILAŞTIRMA



Şekil 4.60. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L3-NİS-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L3-NİS-BF₂ kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmada her iki ortamda da artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında bir düşüş oluşturduğu görüldü. Ancak karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında tüm konsantrasyonlarının oluşturduğu hücre canlılığındaki düşüş oranı aydınlık ortamdaki değerlerin karanlık ortamdaki değerlerden daha düşük bir orana sahip olduğu belirlendi. Her iki ortamda analizi yapılan değerler en yüksek anlam değerine sahip olduğu görülürken, karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında sonuçlar arasındaki farkın anlamlı görülmediği belirlendi (Şekil 4.60).

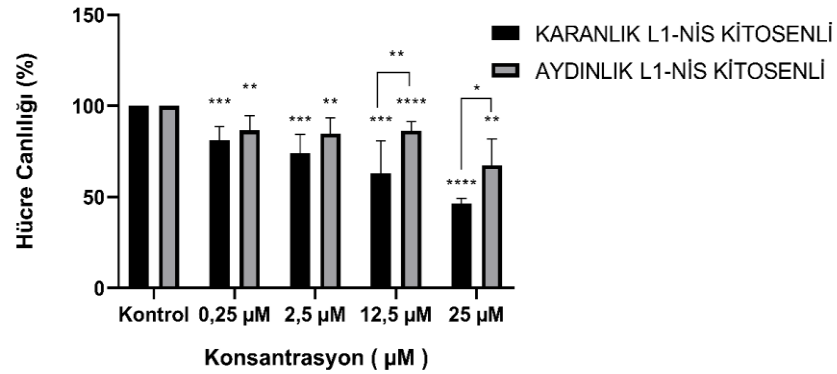
MCF-7 L1 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.61. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1 kitosenli ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L1 kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmada aydınlık ortamdaki 2.5 µM konsantrasyonundaki ~%4'lük artış dışında hem karanlık hem de aydınlık ortamda artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında bir azalış görüldü. Ancak karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında tüm konsantrasyonlarda karanlık ortamdaki hücre canlılığı aydınlık ortamdaki hücre canlılığından daha az olduğu görüldü. Karanlık ve aydınlık ortam karşılaştırılmasında %hücre canlılığı farkı 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında ~%20 olduğu ve yapılan analizler sonucunda bu farkların anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.61).

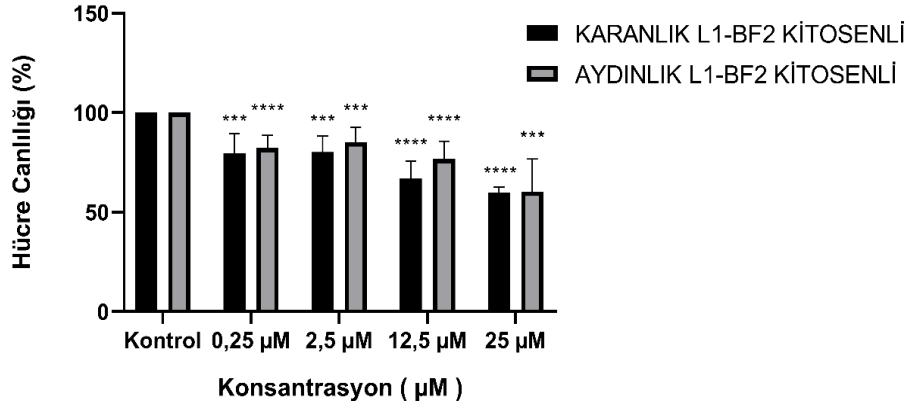
MCF-7 L1-NİS KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.62. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS kitosenli bileşiğinin hücre sel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L1-NİS kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmada aydınlık ortamdaki 12.5 µM konsantrasyonundaki ~%2'lik artış dışında artan doza bağlı olarak her iki ortamda da hücre canlılığında bir azalma oluşturduğu görüldü. Aydınlık ortamda hücre canlılığında en fazla azalış 25 µM konsantrasyonunda olduğu ve bu azalış oranı ~%37 olarak belirlendi. Ancak karanlık ortamda bu azalış çok yüksek olup 25 µM konsantrasyonunda yaklaşık olarak bu azalma oranı %64 olduğu gözlemlendi. Karanlık-aydınlık ortam verilerinin karşılaştırması yapıldığında tüm konsantrasyonlarda karanlık ortamda oluşan sitotoksite, aydınlık ortamda oluşan sitotoksiteden yüksek olduğu belirlendi ve 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarındaki bu fark yapılan analizler sonucunda anlamlı bir sonuç oluşturduğu görüldü (Şekil 4.62).

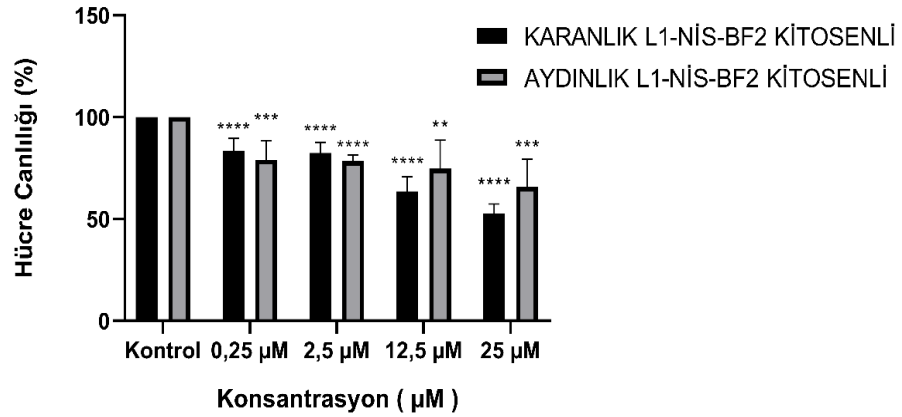
MCF-7 L1-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.63. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L1-BF₂ kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmada karanlık ve aydınlık ortamda 2.5 µM konsantrasyonunda ~%2'lik artış dışında tüm konsantrasyonlarda artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalma meydana getirdiği belirlendi. karanlık-aydınlık karşılaştırılması yapıldığında tüm konsantrasyonlarda karanlık ortamda L1-BF₂ kitosenli bileşiğinin gösterdiği sitotoksitenin (en yüksek fark ~%9) karanlık ortamda aydınlık daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.63).

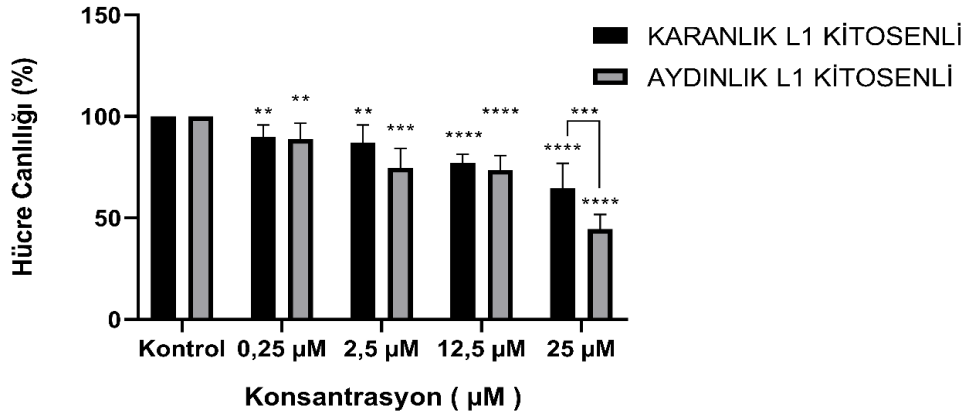
MCF-7 L1-NİS-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.64. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L1-NİS-BF₂ kitosenli bileşiği, karanlık ve aydınlık ortamda yapılan çalışmada artan doza bağlı olarak hücre canlılığında bir düşüş olduğu gözlemlendi. Karanlık-aydınlık ortam karşılaştırması yapıldığında 0.25 µM ve 2.5 µM konsantrasyonlarında aydınlık ortamda oluşan sitotoksite karanlık ortama göre daha fazla olduğu, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında ise karanlık ortamda oluşan sitotoksite aydınlık ortama göre daha fazla olduğu görüldü (Şekil 4.64). Ancak bu iki ortam arasında oluşan fark yapılan analizler sonucunda anlamlı bulunmadı.

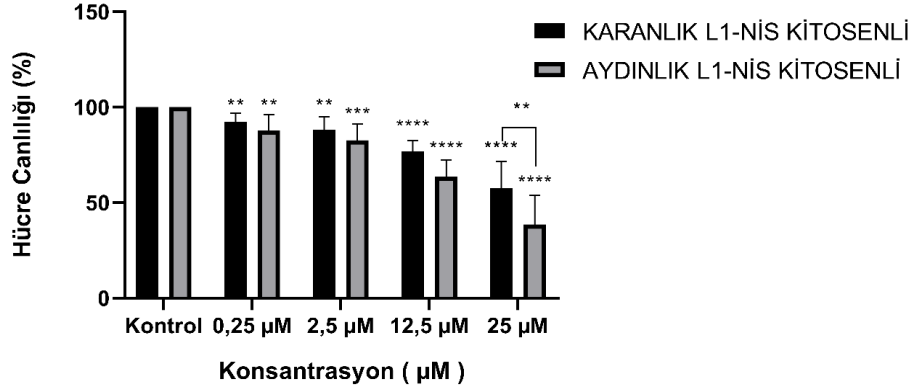
OV2008 L1 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSEN Lİ



Şekil 4.65. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1 kitosenli ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L1 kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmada her iki ortamda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında bir düşüş oluşturmıştır. Karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması yapıldığında tüm dozlarda aydınlık ortamdaki hücre canlılığının her konsantrasyonda karanlık ortamdaki hücre canlılığından daha az olduğu belirlendi. Ancak yapılan analizler sonucunda yalnızca 25 µM konsantrasyonundaki oluşan farkın anlamlı olduğu gözlemlendi. Bu konsantrasyonda hücre canlılığı karanlık ortamda ~%64'e kadar düşebilmişken aydınlık ortamda bu değer ~%44'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.65).

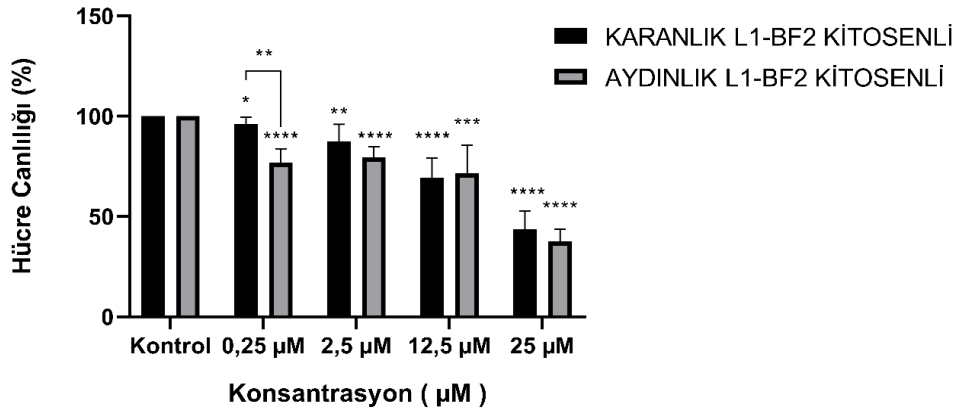
OV2008 L1-NİS KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.66. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L1-NİS kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmada her iki ortamda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında bir düşüş oluşturmıştır. Karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması yapıldığında tüm dozlarda aydınlık ortamdaki hücre canlılığının her konsantrasyonda karanlık ortamdaki hücre canlılığından daha az olduğu belirlendi. Ancak yapılan analizler sonucunda yalnızca 25 µM konsantrasyonundaki oluşan farkın anlamlı olduğu gözlemlendi. Bu konsantrasyonda hücre canlılığı karanlık ortamda ~%57'e kadar düşebilmişken aydınlık ortamda bu değer ~%38'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.66).

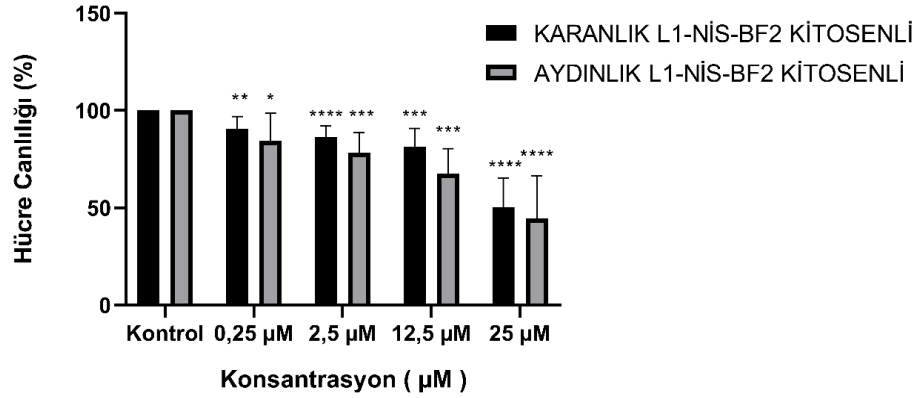
OV2008 L1-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSEN Lİ



Şekil 4.67. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L1-BF₂ kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmada her iki ortamda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında bir düşüş oluşturmıştır. Karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması yapıldığında 12.5 µM konsantrasyonu dışında tüm dozlarda aydınlık ortamdaki hücre canlılığının her konsantrasyonda karanlık ortamdaki hücre canlılığından daha az olduğu belirlendi. Ancak yapılan analizler sonucunda yalnızca 0.25 µM konsantrasyonundaki oluşan farkın anlamlı olduğu gözlemlendi. Her iki ortamda da hücre canlılığı en fazla düşüş 25 µM konsantrasyonunda görüldü ve hücre canlılığı karanlık ortamda ~%43'e kadar düşebilmişken aydınlık ortamda bu değer ~%37'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.67).

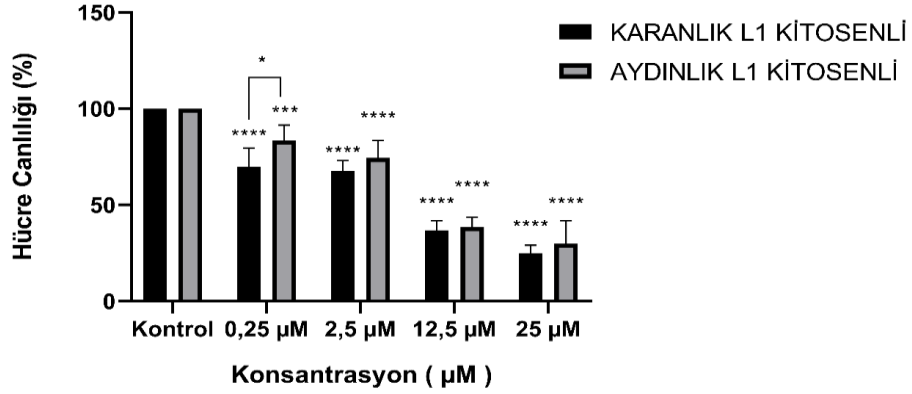
OV2008 L1-NİS-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.68. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L1-NİS-BF₂ kitosenli ile yapılan çalışmada her iki ortamda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında bir düşüş oluşturmıştır. Karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması yapıldığında tüm dozlarda aydınlık ortamdaki hücre canlılığının her konsantrasyonda karanlık ortamdaki hücre canlılığından daha az olduğu belirlendi. Ancak karanlık-aydınlık karşılaştırılmasında yapılan analizler sonucunda tüm konsantrasyonlarda oluşan farkların anlamlı olmadığı görüldü. Her iki ortamda da hücre canlılığı en fazla düşüş 25 µM konsantrasyonunda görüldü ve hücre canlılığı karanlık ortamda ~%50'e kadar düşebilmişken aydınlık ortamda bu değer ~%44'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.68).

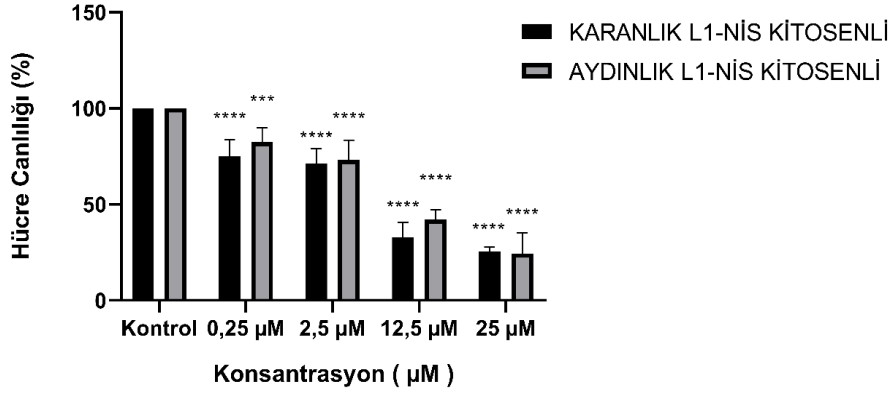
HT29 L1 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSEN Lİ



Şekil 4.69. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1 kitosenli ligandının hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L1 kitosenli ligandı ile yapılan çalışmada artan doza bağlı olarak her iki ortamda da hücre canlılığında düşüş meydana geldiği belirlendi. Ancak karanlık-aydınlık ortam karşılaştırması yapıldığında tüm dozlarda karanlık ortamın oluşturduğu sitotoksite aydınlık ortamda oluşan sitotoksiteden daha fazla olduğu belirlendi ve yapılan analizle sonucunda yalnızca 0.25 µM konsantrasyonunda oluşan fark anlamlılık arz ettiği belirlendi. 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığı sırasıyla karanlık ortamda ~%36 ve ~%24'e, aydınlık ortamda ~%38 ve ~%30'a kadar azaldığı belirlendi (Şekil 4.69).

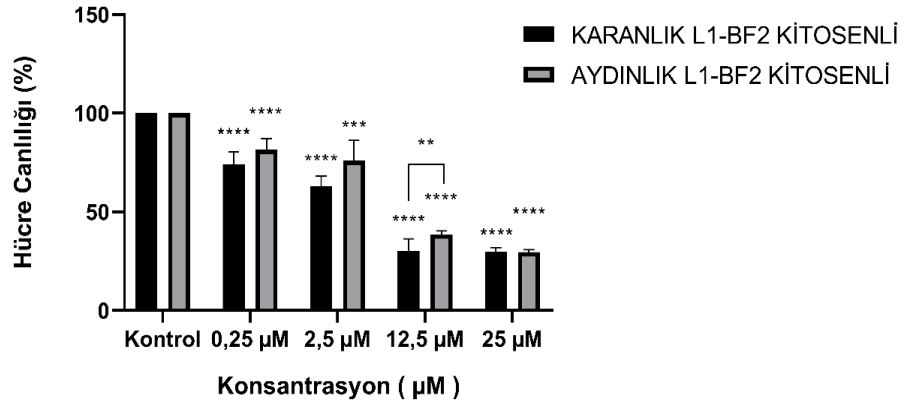
HT29 L1-NİS KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.70. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L1-NİS ligandı ile yapılan çalışmada artan doza bağlı olarak her iki ortamda da hücre canlılığında düşüş meydana geldiği belirlendi. Ancak karanlık-aydınlık ortam karşılaştırması yapıldığında 25 µM konsantrasyonu dışında tüm dozlarda karanlık ortamın oluşturduğu sitotoksite aydınlık ortamda oluşan sitotoksiteden daha fazla olduğu belirlendi ve yapılan analizle sonucunda tüm konsantrasyonlarda oluşan fark anlamlılık ifade etmediği belirlendi. 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığı sırasıyla karanlık ortamda ~%32 ve ~%25'e, aydınlık ortamda ~%42 ve ~%24'a kadar azaldığı belirlendi (Şekil 4.70).

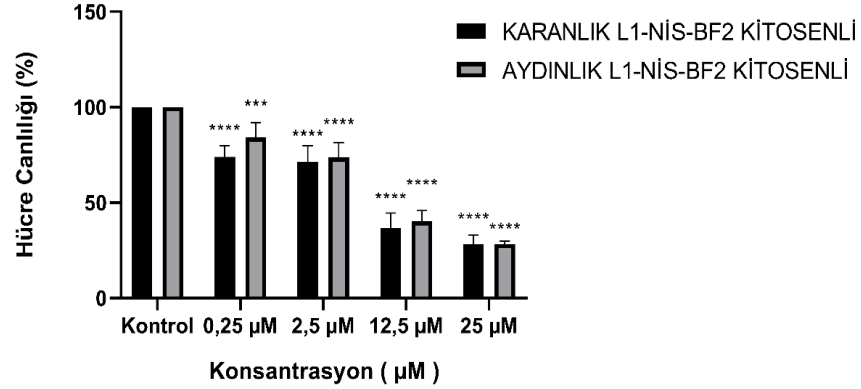
HT29 L1-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.71. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında L1-BF₂ kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmada artan doza bağlı olarak her iki ortamda da hücre canlılığında düşüş meydana geldiği belirlendi. Ancak karanlık-aydınlık ortam karşılaştırması yapıldığında 25 µM konsantrasyonu dışında (~%0.3) tüm dozlarda karanlık ortamın oluşturduğu sitotoksite aydınlık ortamda oluşan sitotoksiteden daha fazla olduğu belirlendi ve yapılan analizle sonucunda yalnızca 12.5 µM konsantrasyonunda oluşan fark anlamlılık ifade ettiği belirlendi. 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığı sırasıyla karanlık ortamda ~%30 ve ~%29'e, aydınlık ortamda ~%38 ve ~%29'a kadar azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.71).

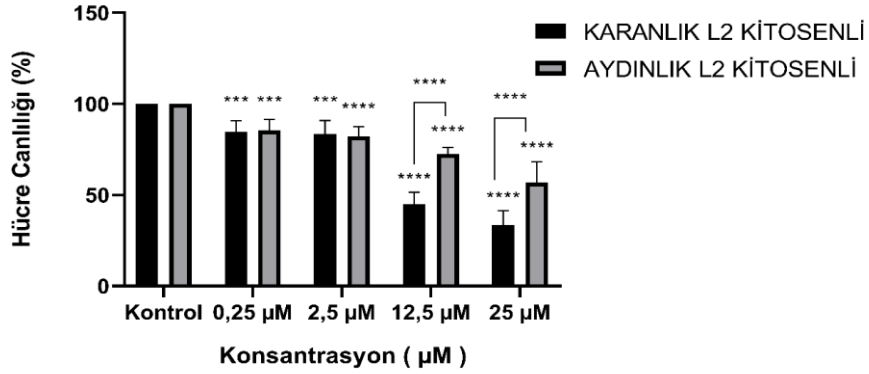
HT29 L1-NİS-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



Şekil 4.72. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L1-NİS-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

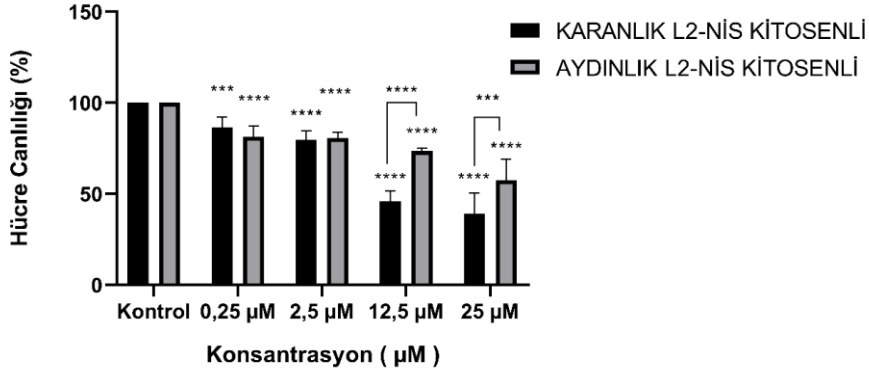
HT29 hücre hattında L1-NİS-BF₂ kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmada artan doza bağlı olarak her iki ortamda da hücre canlılığında düşüş meydana geldiği belirlendi. Ancak karanlık-aydınlık ortam karşılaştırması tüm dozlarda, karanlık ortamın oluşturduğu sitotoksite aydınlık ortamda oluşan sitotoksiteden daha fazla olduğu belirlendi ve yapılan analizle sonucunda tüm konsantrasyonlarda oluşan fark anlamlılık ifade etmediği belirlendi. 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığı sırasıyla karanlık ortamda ~%36 ve ~%28.2'ye, aydınlık ortamda ~%40 ve ~%28.3'a kadar azaldığı belirlendi (Şekil 4.72).

MCF-7 L2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSEN Lİ



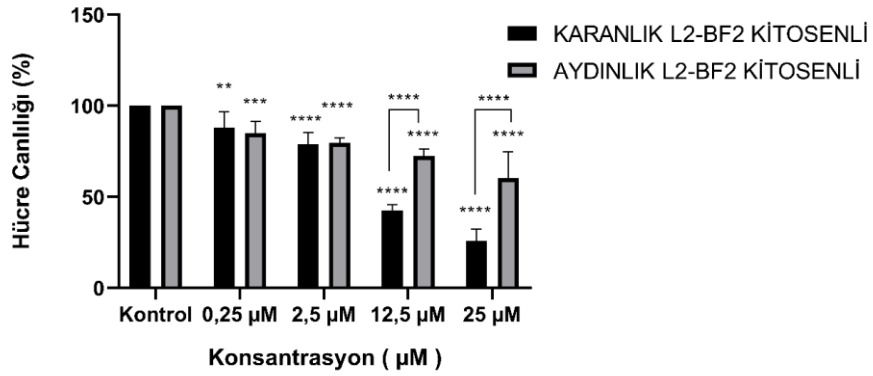
Şekil 4.73. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2 kitoseni ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 L2-NİS KARANLIK-AYDINLIK KİTOSEN Lİ



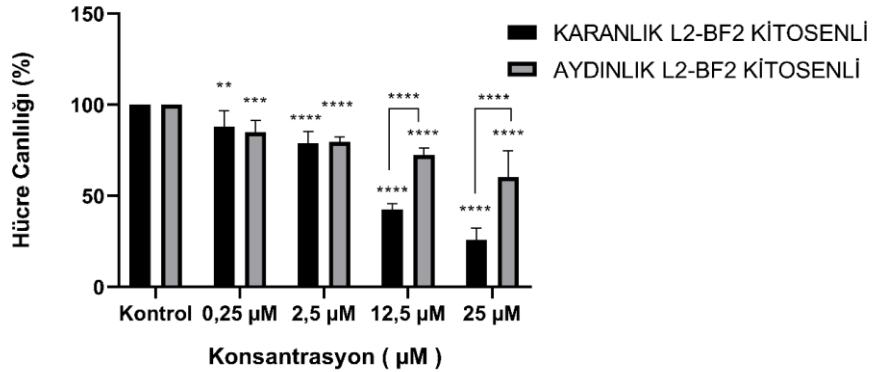
Şekil 4.74. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS kitoseni bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 L2-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSEN Lİ



Şekil 4.75. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF₂ kitosensin bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

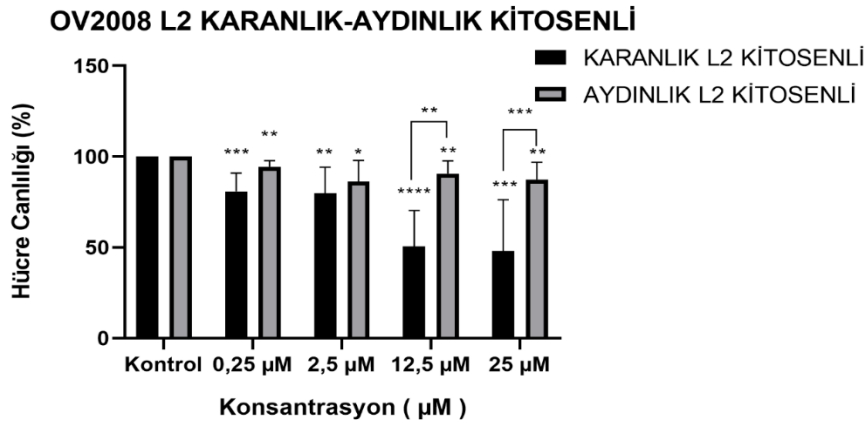
MCF-7 L2-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSEN Lİ



Şekil 4.76. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF₂ kitosensin bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

MCF-7 hücre hattında L2 serisi ile yapılan çalışmada serideki tüm bileşikler artan doza bağlı olarak hücre canlılığında her iki ortamda da azalma meydana getirmiştir (Şekil 4.73)

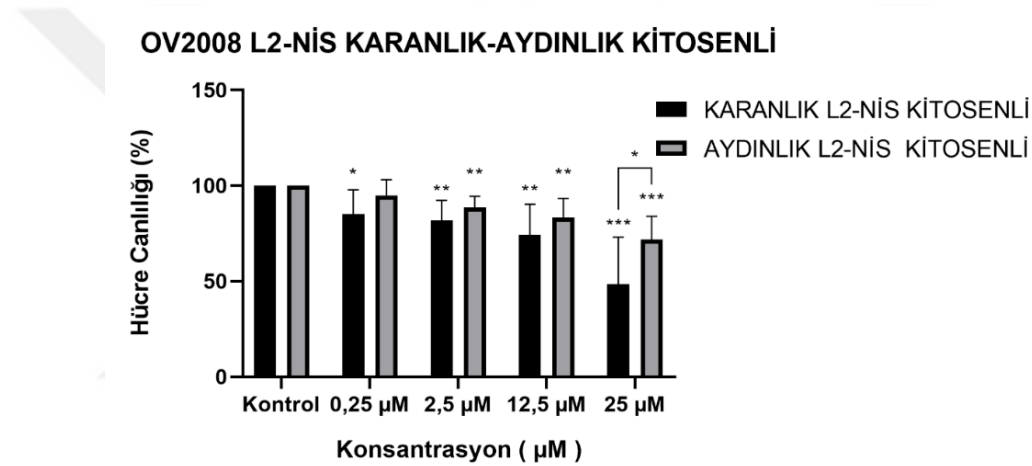
(Şekil 4.74) (Şekil 4.75) (Şekil 4.76). Ancak karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması yapıldığında L2 serisinin tüm 0.25 μM konsantrasyonun ve L2 serisinin 2.5 μM konsantrasyonu uygulanmasında aydınlık ortamdaki hücre canlılığı, karanlık ortamdaki hücre canlılığından daha az olduğu belirlendi. Bu karşılaştırmanın analizi yapıldığında 0.25 μM ve 2.5 μM konsantrasyonlarındaki oluşan fark anlamlı bulunmadı fakat 12.5 μM ve 25 μM konsantrasyonlarındaki yapılan analizler sonucunda serinin tüm bileşikler bu değerlerde anlamlılık oluşturduğu belirlendi. L2 serisinde 0.25 μM ve 2.5 μM konsantrasyonlarındaki oluşan fark $\sim\%0.6$ - $\%5$ aralığında oluşurken 12.5 μM ve 25 μM konsantrasyonlarındaki oluşan fark sırasıyla $\sim\%27$ - $\%30$ ve $\sim\%18$ - $\%36$ aralığında olduğu saptandı.



Şekil 4.77. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2 kitosenli ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 μM , 2.5 μM , 12.5 μM ve 25 μM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: $P < 0.0001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.1$) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L2 kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmada, aydınlık ortamdaki 12.5 μM konsantrasyonu dışında, hem karanlık ortamda hem de aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında bir düşüş oluşturdu. Karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması yapıldığı zaman, tüm konsantrasyonlarda, karanlık ortamdaki hücre canlılığı aydınlık ortamda oluşan hücre canlılığından daha az olduğu gözlemlendi. Ancak

FDT’de bir FD karanlık ortamda oluşturduğu sitotoksitenin düşük olması ve aydınlık ortamda yüksek sitotoksite oluşturup kanser hücrelerini maksimum seviyede öldürmesi istenmektedir. Bu bileşiğin kitosenli hali tam ter etkiyi göstermektedir. 12.5 μM ve 25 μM konsantrasyonları hücre canlılığını karanlık ortamda hücre canlılığını sırasıyla ~%50 ve %48’e kadar düşürebilirken, aydınlık ortamda bu kitosenli ligand hücre canlılığını bu iki konsantrasyonda sırasıyla ~%90 ve ~%87’e kadar azaltabildi. OV2008 hücre hattında L2 kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmadaki karanlık-aydınlık karşılaştırmasında en yüksek olarak 12.5 μM ve 25 μM konsantrasyonlarında sağlandı ve bu fark yapılan analizler sonucunda anlamlılık arz ettiği belirlendi (Şekil 4.77).

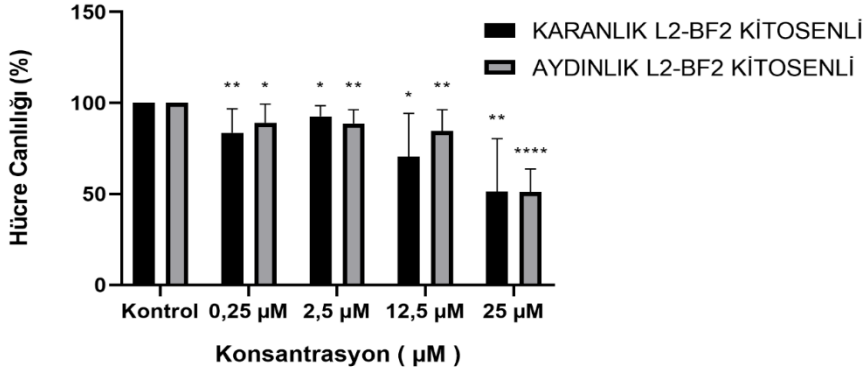


Şekil 4.78. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 μM , 2.5 μM , 12.5 μM ve 25 μM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: $P < 0.0001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.1$) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L2-NİS kitosenli bileşiği artan doza bağlı olarak hem karanlık ortamda hem de aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında bir düşüş oluşturdu. OV2008 hücre hattında L2-NİS ligandı, L2 ligandına benzer bir şekilde etki gösterdi ve karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması yapıldığı zaman, tüm konsantrasyonlarda, karanlık ortamdaki hücre canlılığı aydınlık ortamda oluşan hücre canlılığından daha az olduğu gözlemlendi. Her iki ortamda da kontrole kıyasla 25 μM

konsantrasyonunda hücre canlılığındaki oluşan düşüş en yüksektir. Bu konsantrasyonda hücre canlılığı karanlık ortamda ~%48, aydınlık ortamda ~%71 olarak gözlemlendi. karanlık-aydınlık ortamda oluşan bu fark yapılan analizler sonucunda anlamlılık arz ettiği belirlendi (Şekil 4.78).

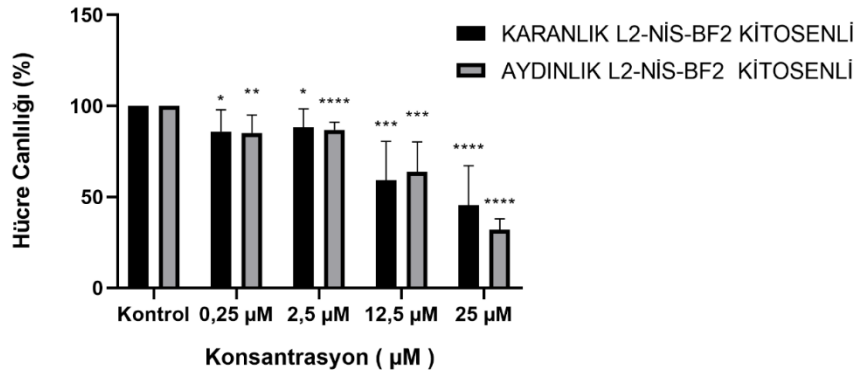
OV2008 L2-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENİ



Şekil 4.79. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

OV2008 hücre hattında L2-BF₂ kitosenli bileşiği ile yapılan çalışmada, karanlık ortamdaki 2.5 µM konsantrasyonundaki oluşan artış dışında, artan doza bağlı olarak hem karanlık ortamda hem de aydınlık ortamda artan doza bağlı olarak hücre canlılığında bir düşüş oluşturdu. Bu çalışmada karanlık-aydınlık ortam karşılaştırılması yapıldığı zaman, 2.5 µM konsantrasyonu ve 25 µM konsantrasyonlarında aydınlık ortamda hücre canlılığı daha az olduğu görülürken, 0.25 µM ve 12.5 µM konsantrasyonlarında ise karanlık ortamdaki hücre canlılığı aydınlık ortamda oluşan hücre canlılığından daha az olduğu gözlemlendi. Karanlık-aydınlık karşılaştırılması için yapılan analizler sonucunda tüm konsantrasyonlardaki bu farklılık anlamlı bir değer belirtmedi (Şekil 4.79).

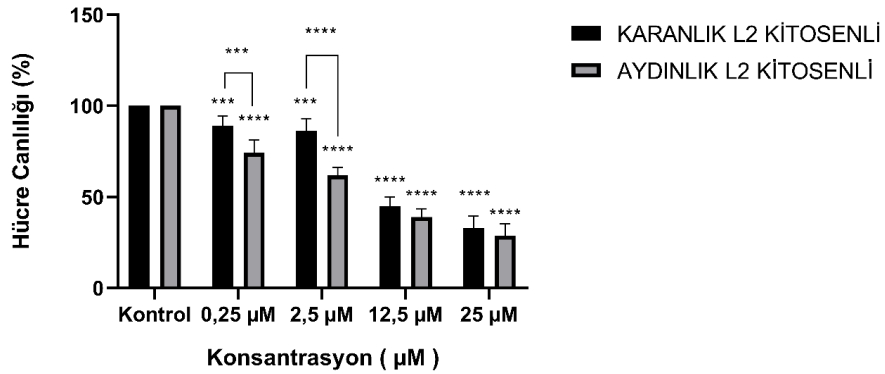
OV2008 L2-NİS-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENİ



Şekil 4.80. OV2008 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF₂ kitosenli bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

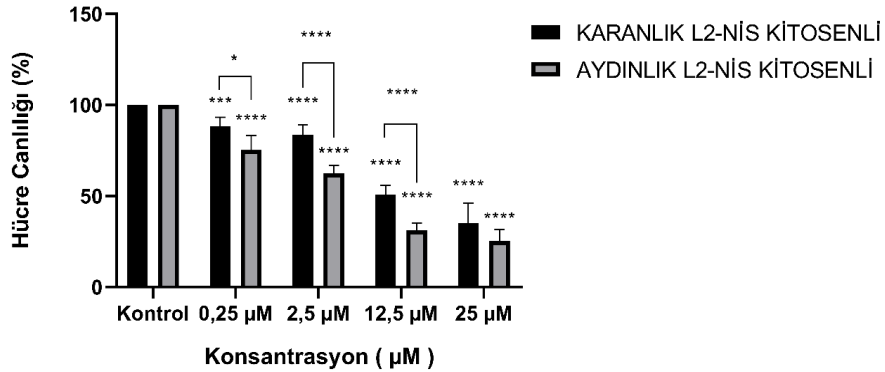
OV2008 hücre hattında L2-NİS-BF₂ kitosenli bileşiği, her iki ortamda da 2.5 µM konsantrasyonu dışında artan doza bağlı olarak hücre canlılığında bir azalma meydana getirdi. Karanlık-aydınlık karşılaştırması yapıldığında ise 12.5 µM konsantrasyonu dışında tüm konsantrasyonlarda aydınlık ortamdaki hücre canlılığı karanlık ortamda oluşan hücre canlılığından az olduğu belirlendi. Çalışmadaki en yüksek konsantrasyon olan 25 µM konsantrasyonunda hücre canlılığı %50'nin altına düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.80).

HT29 L2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



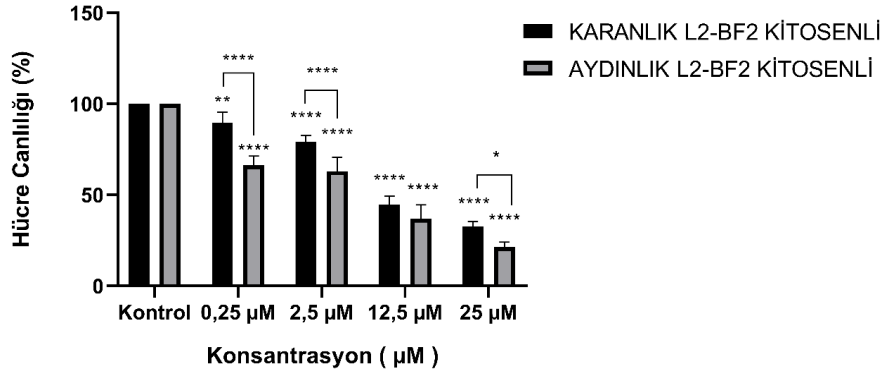
Şekil 4.81. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2 kitosenli ligandının hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 L2-NİS KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENLİ



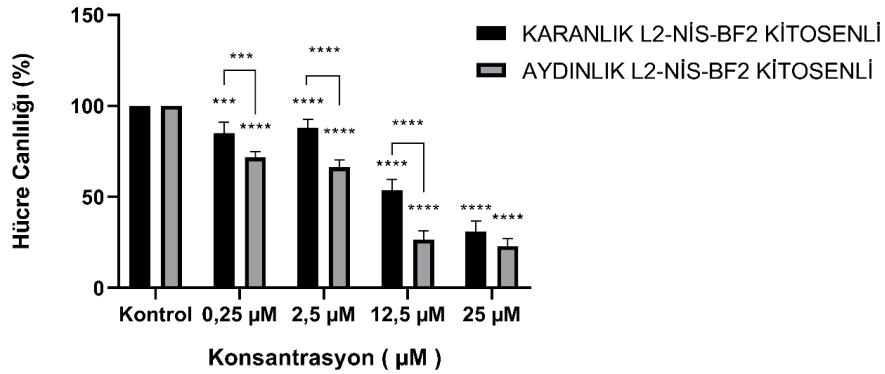
Şekil 4.82. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS kitosenli bileşiğinin hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 L2-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENİ



Şekil 4.83. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-BF₂ kitoseni bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 L2-NİS-BF2 KARANLIK-AYDINLIK KİTOSENİ



Şekil 4.84. HT29 hücre hattında MTT yöntemi ile L2-NİS-BF₂ kitoseni bileşiğinin hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM, 2.5 µM, 12.5 µM ve 25 µM konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, ***: P < 0.001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

HT29 hücre hattında kitoseni L2 serisi ile yapılan çalışmada L2-NİS-BF₂ kitoseni kompleksinde 2.5 konsantrasyonu hariç bu serideki tüm bileşikler karanlık ve aydınlık

ortamda artan doza bağılı olarak hücre canlılığında bir düşüş oluşturmıştır. Karanlık aydınlık karşılaştırılması yapıldığında serideki tüm bileşiklerin aydınlık ortamdaki bütün konsantrasyonlarında oluşan hücre canlılığı aydınlık ortama göre yüksektir. Bu karşılaştırmanın analizinde her bileşiğin en az iki konsantrasyonu anlamlılık arz ederken, çalışmada kullanılan L2 serisinin tüm bileşikleri aydınlık ortamda 12.5 μ M konsantrasyonunda hücre canlılığını en yüksek ~%38 olduğu görülürken, en düşük ~%26 olduğu belirlendi (Şekil 4.81) (Şekil 4.82) (Şekil 4.83) (Şekil 4.84).

Tablo 4.1. Tez kapsamında kullanılan ligand ve komplekslerin MCF-7 hücre hattında IC₅₀ değerinin belirlenmesi

IC ₅₀ (MCF-7)				
BİLEŞİKLER	KARANLIK	AYDINLIK	KARANLIK KİTOSENİ	AYDINLIK KİTOSENİ
L2	>25	11.291	10.669	>25
L2-NİS	>25	6.829	10.390	>25
L2-BF ₂	>25	>25	9.359	>25
L2-NİS-BF ₂	>25	>25	14.364	>25
L3	>25	>25	22.879	>25
L3-NİS	>25	>25	23.981	>25
L3-BF ₂	>25	>25	>25	24.269
L3-NİS-BF ₂	>25	>25	>25	24.932
L1	>25	23.869	21.052	>25
L1-NİS	>25	>25	23.159	>25
L1-BF ₂	>25	23.627	>25	>25
L1-NİS-BF ₂	>25	>25	>25	>25
Na-L	>25	>25	>25	>25
Na-L-NİS	>25	>25	>25	>25
Na-L-BF ₂	>25	>25	>25	>25
Na-L-NİS-BF ₂	>25	>25	>25	>25

Yapılan MTT testleri sonucunda kitosensiz L2 ligandları üç hücre hattında da aydınlık ortamda daha düşük hücre canlılığı gösterdi (bkz. Şekil 4.37)(bkz. Şekil 4.38)(bkz. Şekil 4.41)(bkz. Şekil 4.42)(bkz. Şekil 4.45)(bkz. Şekil 4.46).

Tablo 4.2. Tez kapsamında kullanılan ligand ve komplekslerin OV2008 hücre hattında IC₅₀ değerinin belirlenmesi

IC ₅₀ (OV2008)				
BİLEŞİKLER	KARANLIK	AYDINLIK	KARANLIK KİTOSENLİ	AYDINLIK KİTOSENLİ
L2	>25	10.806	13.121	>25
L2-NİS	>25	9.163	24.450	>25
L2-BF ₂	>25	>25	>25	>25
L2-NİS-BF ₂	>25	>25	18.783	18.217
L3	>25	>25	20.914	>25
L3-NİS	>25	>25	>25	>25
L3-BF ₂	>25	>25	>25	>25
L3-NİS-BF ₂	>25	>25	21.918	23.564
L1	>25	>25	>25	23.528
L1-NİS	>25	>25	>25	19.966
L1-BF ₂	>25	>25	22.568	21.564
L1-NİS-BF ₂	>25	>25	>25	22.873
Na-L	>25	>25	>25	>25
Na-L-NİS	>25	>25	>25	>25
Na-L-BF ₂	>25	>25	>25	>25
Na-L-NİS-BF ₂	>25	>25	>25	>25

L2 serisinin kitosenli durumundaki ligandlar ve kompleksler HT29 hücre hattında anlamlı sonuç verdi ve aydınlık ortamda daha düşük hücre canlılığı gösterdi (Şekil 4.81) (Şekil 4.82) (Şekil 4.83) (Şekil 4.84). LDH testi için bu anlamlı veriler sonucunda kullanımı kitosensiz L2 ligandları ve kitosenli L2 serisi HT29 hücre hattında çalışılması belirlendi.

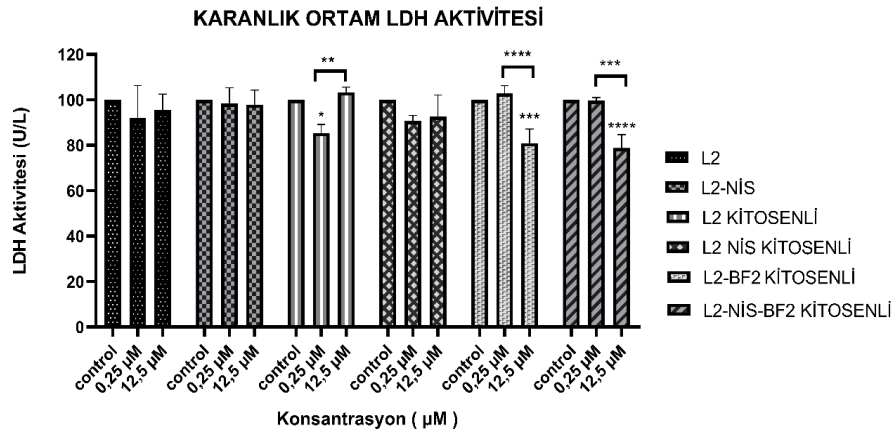
Tablo 4.3. Tez kapsamında kullanılan ligand ve komplekslerin HT29 hücre hattında IC₅₀ değerinin belirlenmesi

IC ₅₀ (HT29)				
BİLEŞİKLER	KARANLIK	AYDINLIK	KARANLIK KİTOSENLİ	AYDINLIK KİTOSENLİ
L2	14.626	9.971	10.884	3.912
L2-NİS	10.649	8.106	12.915	3.883
L2-BF ₂	14.869	>25	9.813	4.259
L2-NİS-BF ₂	11.641	16.106	13.966	4.640
L3	>25	7.348	4.885	3.902
L3-NİS	>25	4.032	4.461	8.174

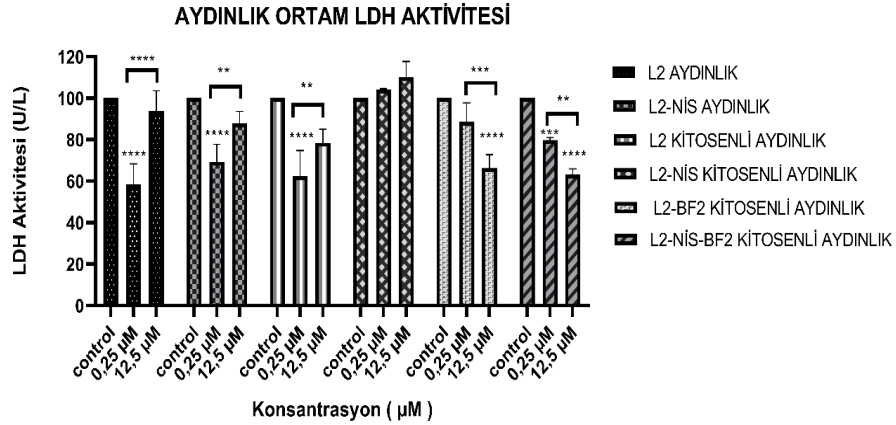
Tablo 4.3. (Devam) Tez kapsamında kullanılan ligand ve komplekslerin HT29 hücre hattında IC50 değerinin belirlenmesi

L3-BF ₂	>25	2.796	3.047	3.680
L3-NİS-BF ₂	>25	8.565	4.079	6.748
L1	>25	4.112	5.573	7.364
L1-NİS	>25	5.873	6.133	7.714
L1-BF ₂	22.794	3.346	3.968	7.871
L1-NİS-BF ₂	15.100	4.292	6.428	7.356
Na-L	>25	>25	>25	>25
Na-L-NİS	>25	>25	>25	>25
Na-L-BF ₂	>25	>25	>25	>25
Na-L-NİS-BF ₂	>25	>25	>25	>25

4.2.LDH (Laktat Dehidrogenaz) Deneyi- LDH Aktivitesi



Şekil 4.85. HT29 hücre hattında, karanlık ortamda, LDH yöntemi ile MTT testinde anlamlı sonuç veren L2 serisi bileşiklerin LDH aktivitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattında, karanlık ortamda, LDH yöntemi ile MTT testinde anlamlı sonuç veren L2 serisi bileşiklerin LDH aktivitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM ve 12.5 µM ve konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre ve konsantrasyonların 0.25 µM-12 µM karşılaştırması t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.



Şekil 4.86. HT29 hücre hattında, aydınlık ortamda, LDH yöntemi ile MTT testinde anlamlı sonuç veren L2 serisi bileşiklerin LDH aktivitesinin belirlenmesi. HT29 hücre hattına 0.25 µM ve 12.5 µM ve konsantrasyonları ile işlem yapıldı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. Kolonların istatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre ve konsantrasyonların 0.25 µM-12 µM karşılaştırması t-testi ile karanlık-aydınlık kolonlarının karşılaştırmalı istatistiksel analizi GraphPad programında aynı dozun karanlık-aydınlık gruplarına göre Two-Way ANOVA (or Mixed Model) ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

LDH aktivitesi için ayrıca liziz kontrol grubu da kullanıldı ancak yukarıda gösterilen grafiğe eklenilmedi. Karanlık ortamda yapılan LDH deneyi sonucunda liziz kontrol ~%902 çıkarken, aydınlık ortamda liziz kontrol grubu ~%496 olarak belirlendi.

Tablo 4.4. Karanlık- aydınlık ortam LDH aktivitesi değerlendirilmesi

Kullanılan bileşik	0.25 µM		12.5 µM	
	Karanlık	Aydınlık	Karanlık	Aydınlık
L2	~% 91.9	~% 58.6	~% 95.5	~% 93.8
L2-NİS	~% 98.3	~% 69.3	~% 97.9	~% 87.9
L2 Kitosenli	~% 85.4	~% 62.5	~% 103.3	~% 78.4
L2-NİS Kitosenli	~% 90.7	~% 104	~% 92.6	~% 110.1
L2-BF₂ Kitosenli	~% 102.8	~% 88.7	~% 80.9	~% 66.3
L2-NİS-BF₂ Kitosenli	~% 99.6	~% 79.8	~% 78.8	~% 63.2

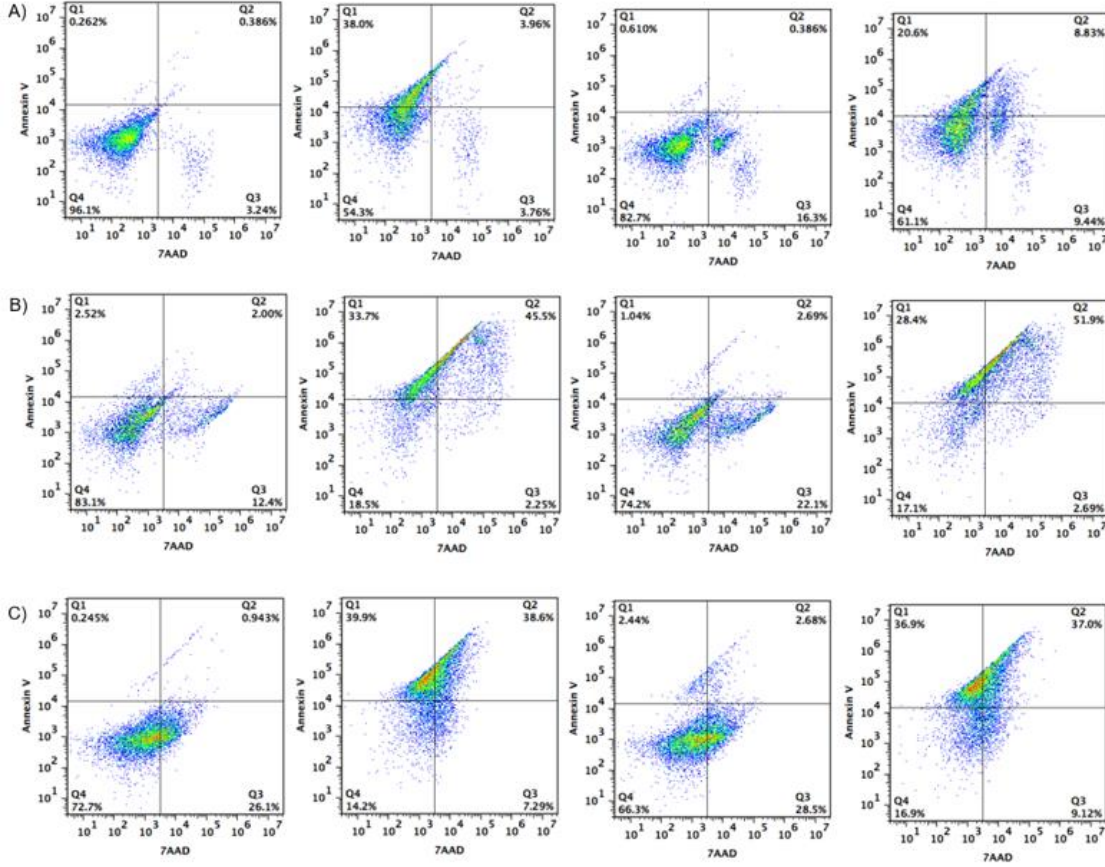
Tablo 4.4'te belirtildiği üzere yalnızca L2-NİS ligandının her iki konsantrasyonunda da aydınlık ortamda, karanlık ortamdaki LDH aktivitesin göre artma meydana geldiği görüldü. Bu bileşik dışında tüm bileşiklerde aydınlık ortamda karanlık ortama göre LDH

aktivitesinde azalma meydana gelmiştir. Konsantrasyonlar arasındaki artışa bağlı LDH aktivitesinde değişikliğe bakılacak olursa, karanlık ortamda, L2, L2-NİS, kitosenli L2 ve kitosenli L2-NİS ligandlarında sırasıyla yaklaşık %4, %1, %18 ve %2 oranında artış meydana geldiği görüldü. Ancak L2-BF₂ ve L2-NİS-BF₂ kompleksleri LDH aktivitesinde karanlık ortamda sırasıyla yaklaşık olarak %18 ve %2 azalış meydana gelmiştir. Aydınlik ortamda LDH aktivitesinde değişikliğe bakılacak olursa, konsantrasyonlar arasındaki artışa bağlı olarak LDH aktivitesi karanlık ortamda da olduğu gibi yalnızca L2-BF₂ ve L2-NİS-BF₂ komplekslerinde azalma meydana geldiği görüldü ve bu azalış oranı yaklaşık olarak sırasıyla %22 ve %16 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.85) (Şekil 4.86).

Halojen bağlanmasına bağlı olarak LDH aktivitesindeki değişimlere bakılmak istenirse, L2 ve L2-NİS karşılaştırılmasında karanlık ortamda kitosensiz bileşiklerde her iki konsantrasyonda da LDH aktivitesinde artış olurken, kitosenli bileşiklerinde 0.25 µM konsantrasyonunda artış meydana geldiği ve 12.5 µM konsantrasyonunda LDH aktivitesinde azalma meydana geldiği görüldü. Aydınlik ortamda ise kitosensiz bileşiklerinde 0.25 µM konsantrasyonunda artış meydana geldiği ve 12.5 µM konsantrasyonunda LDH aktivitesinde azalma meydana geldiği görüldü. Kitosenli bileşiklerinde her iki konsantrasyonda da artış saptandı. LDH deneyinde BF₂ ve NİS-BF₂ komplekslerinin yalnızca kitosenli kompleksleri kullanıldı. BF₂ ve NİS-BF₂ karşılaştırması yapıldığında ise kitosenli BF₂ ve NİS-BF₂ kompleksleri HT29 hücre hattında neden olduğu LDH aktivite seviyesi her iki ortam ve konsantrasyonda da azalmaya yol açtığı belirlendi.

Apoptoz ölüm mekanizmasında genellikle hücre zarı yapısı ve bütünlüğü korunduğu görülür ancak nekroz ölüm yolağında hücre zarları bütünlüğünü koruyamaz ve hücre içeriği dışarıya salınır. LDH enzimi hücre içinde bulunan bir enzim olup hücre zarı hasara uğrayıp bütünlüğünü kaybettiği zaman hücre dışına salınarak hücre dışı LDH miktarını arttırmış olur. LDH deneyinde ölçülen LDH aktivitesi verisiyle hücrenin hangi ölüm yolunu seçtiğine dair bir fikir edinmemizi sağlamaktadır.

4.3. Flow Sitometri-Apoptoz Analizi (Fotoduyarlastırıcı Bileşiklerin Apoptotik, Nekrotik ve Hücre Döngüsüne Olan Etkilerinin Akış (Flow) Sitometrisi ile Belirlenmesi



Şekil 4.87. L2 (A), L2-NİS (B) ve L2-NİS-BF₂ (C) bileşiklerinin, HT29 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri. X eksen, 7-AAD-pozitif hücrelerin sayısını gösterirken Y eksen, Annexin V-pozitif hücrelerin sayısını göstermektedir. Ligand ve kompleks muamele koşulları her panel serisinin başında belirtilmektedir. Her bölgedeki hücrelerin yüzdesi karşılık gelen köşede yer almaktadır. Q2 bölgesi, Annexin V ve 7-AAD pozitif hücreleri göstermektedir. A: L2, B: L2-NİS, C: L2-NİS-BF₂

HT29 hücre hattında L2, NİS VE NİS-BF₂ bileşikleri kullanılarak, hücrenin bu bileşiklere karşı canlılık durumunu ve bu bileşiklerin HT29 hücre hattını hangi ölüm yoluyla öldürdüğü belirlenmek istendi. Annexin-PE kiti apoptoz ve hücre zarı bütünlüğünün bozulmasına neden olan nekroz gibi ölüm yollarının analizi için kullanılan bir kitledir. Kit içeriğinde var olan Annexin V ve PE floresan boyaları apoptozu belirlemek için kullanılırken, 7-AAD hücre zarı hasarını değerlendirmek için kullanılır. Annexin V, hücre zarında yer alan fosfolipidlerden fosfatidilserine bağlanmaktadır. Bu boyanın

kullanılmasındaki temel mantık apoptoza giden hücrelerin zarındaki bu fosfolipid sağlıklı hücrede, hücre zarının iç kısmındayken apoptozda hücre zarının dışına doğru hareket eder ve Annexin V fosfatidilserine bağlanır. 7-AAD boyası ise hücrede DNA'ya bağlanmaktadır. Hücre zarı seçici geçirgen özelliğe sahiptir, bu nedenle 7-AAD boyasının DNA'ya bağlandığının görülmesi hücre zarında hasar meydana geldiği ve hücrenin nekroz ölüm yoluna gittiğini gösterir. Bu çalışmada Annexin V ve 7-AAD içermeyen kontrol grubu canlı, hasar görmemiş canlı hücre grubunu gösterir ve bu boyalar negatif olduğunda ortamdaki diğer hücrelerdeki apoptoz ve nekroz belirlenemez. Annexin V içeren ikinci grup erken apoptoza giden hücreleri göstermektedir yani hücrelerde apoptoz sürecinin başladığı belirtir. 7-AAD boyası içermeyen bu grup hücrelerin hala canlı olduğunu ve hücre zarı hala bir bütün olarak görülmektedir. Üçüncü grupta ise 7-AAD boyası pozitif Annexin V negatiftir. Bu grup hücrelerde apoptozun meydana gelmediği ve hücre zarında hasar oluştuğunu ve geçirgen hale geldiği hücreleri göstermektedir. Son olarak dördüncü grup ise iki boyada pozitiftir. Bu grupta hem geç apoptoz ve nekroz ölüm yoluna giden hücreleri görebilirken hem de apoptoz sürecinden nekroz ölüm yoluna geçen hücreleri görmek mümkündür.

Her panel içerisinde aynı dört bölgeyi barındırır. Q₁ bölgesi erken apoptoza, Q₂ bölgesi geç apoptoza, Q₃ nekroz vb. ölüm yollarına giden hücreleri gösterirken, Q₄ bölgesi ise canlı hücreleri göstermektedir. Her bileşik için dört durum söz konusudur. Birincisi Annexin (-) 7-AAD (-) ikincisi Annexin (+) 7-AAD (-) üçüncüsü Annexin (-) 7-AAD (+), dördüncüsü Annexin (+) 7-AAD (+) olduğu durumları göstermektedir.

Tablo 4.5. L2, L2-NİS ve L2-NİS-BF₂ bileşiklerinin, HT29 hücre hattı üzerindeki etkisini incelemek için Annexin V ve 7-AAD ile akış sitometri analizi tablosu

LİGAND- KOMPLEKS İSMİ/Q _?	Durumlar			
	Annexin (-) 7-AAD (-)	Annexin (+) 7-AAD (-)	Annexin (-) 7-AAD (+)	Annexin (+) 7-AAD (+)
L2/Q ₁	% 0.262	% 38	% 0.610	% 20.6
L2/Q ₂	% 0.386	% 3.96	% 0.386	% 8.83
L2/Q ₃	% 3.24	% 3.76	% 16.3	% 9.44
L2/Q ₄	% 96.1	% 54.3	% 82.7	% 61.1
L2-NİS/Q ₁	% 2.52	% 33.7	% 1.04	% 28.4
L2-NİS/Q ₂	% 2	% 45.5	% 2.69	% 51.9
L2-NİS/Q ₃	% 12.4	% 2.25	% 22.1	% 2.69
L2-NİS/Q ₄	% 83.1	% 18.5	% 74.2	% 17.1
L2-NİS-BF ₂ /Q ₁	% 0.245	% 39.9	% 2.44	% 36.9
L2-NİS-BF ₂ /Q ₂	% 0.943	% 38.6	% 2.68	% 37
L2-NİS-BF ₂ /Q ₃	% 26.1	% 7.29	% 28.5	% 9.12
L2-NİS-BF ₂ /Q ₄	% 72.7	% 14.2	% 66.3	% 16.9

Flowjo ile yapılan analiz sonucunda Annexin V (-) ve 7-AAD(-) olduğu durum canlı hücre oranını göstermektedir. Q₄'te ifade edilen canlı hücre yüzdesinin başlangıç ligandında (%96.1) en yüksek olduğu görüldü. Annexin V (+) ve 7-AAD(-) olduğu durum erken apoptotik süreci göstermektedir. Q₁'de ifade edilen erken apoptoza giden hücrelerin yüzdesinin, NİS-BF₂ kompleksinde (%39.9) en yüksek olduğu görüldü. Nekroz gibi hücre zarını hasara uğrayan hücrelerin yüzdesi Q₃'te ifade edilmektedir. Annexin V (-) ve 7-AAD(+) olduğu durumda nekroz gibi hücre zarında hasar oluşumuna dayanan ölüm yüzde olarak NİS-BF₂ kompleksinde Q₃'te ifade edilen değer diğer bileşiklerin Q₃

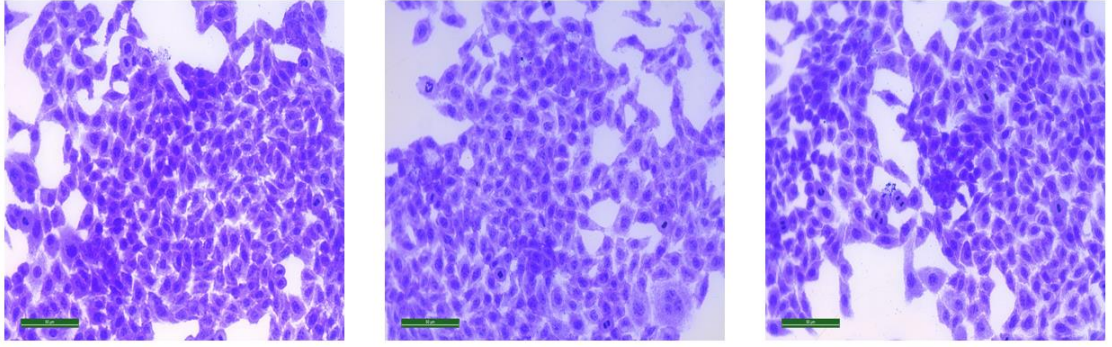
değeri (%28.5) en yüksek değer olduğu görüldü. Q₂ bölgesi için, Annexin V (+) ve 7-AAD (+) kombo olarak kullanıldığında geç apoptoz bölgesi olup en yüksek yüzdesel oran %51.9 olarak NİS ligandında saptanmıştır (Tablo 4.5) (Şekil 4.87).

Kullanılan L2, L2-NİS ve L2-NİS-BF₂ bileşikleri HT29 hücre hattında, hücreleri daha çok apoptoz ölüm sürecine girmesine neden olduğu gözlemlendi. L2 ligandında beklendiği üzere en yüksek canlılık seviyesi gösterdi. Bileşiğe halojen eklenmesi ve/veya BF₂ kompleksi halinde kullanımı ile birlikte hücrelerdeki canlılık seviyesinde daha fazla bir düşüş olduğu gözlemlendi. Hücre zarı hasarı meydana gelen, nekroz ölüm sürecine giren hücrelerin yüzdesinin %29-%16 arasında olduğu ve en çok L2-NİS-BF₂ kompleksinde meydana geldiği görüldü.

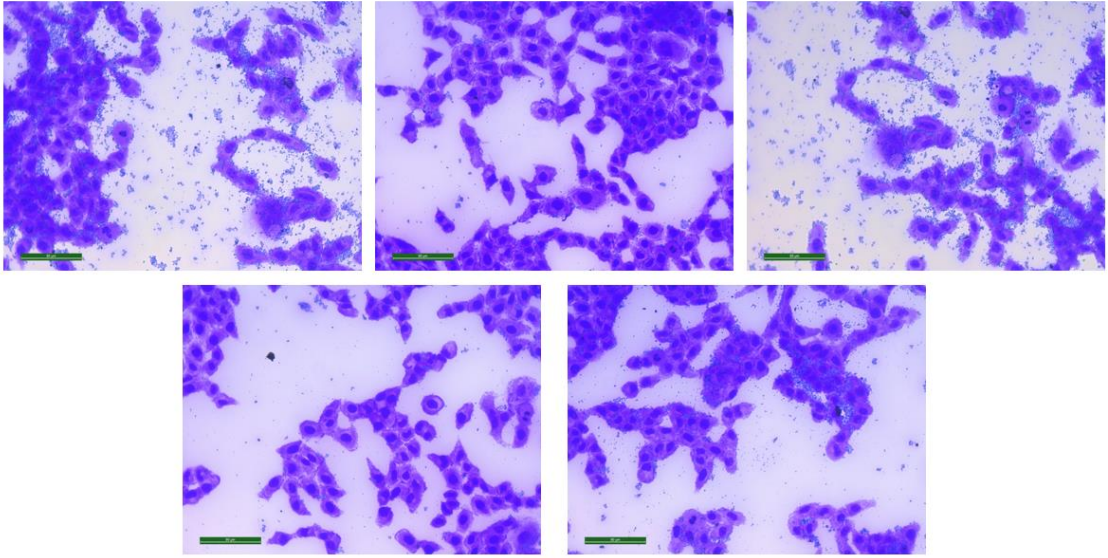
4.4. Fotoduyarlayıcı Bileşiklerin Hücre Morfolojisine Olan Etkilerinin Belirlenmesi (Hücre Boyama)

Kristal viyole boyama çalışmasında 24 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına 25.000 hücre ekimi yapıldı. Uygulama aydınlık ortam prosedürü olarak gerçekleştirildi. Bileşik uygulaması olarak genel anlamda bileşiklerde anlamlı sonuç veren 12.5 µM konsantrasyonu kullanıldı. Boyanmış hücreler mikroskop altında incelendi. Apoptoz sürecine girmiş hücreler yoğun bir şekilde boyanmış ve küçülmüş (apoptotik cisimcik) olduğu gözlemlendi. Nekrotik hücreler ise hücrede şişme ve hücre zarında hasar meydana geldiği görüldü.

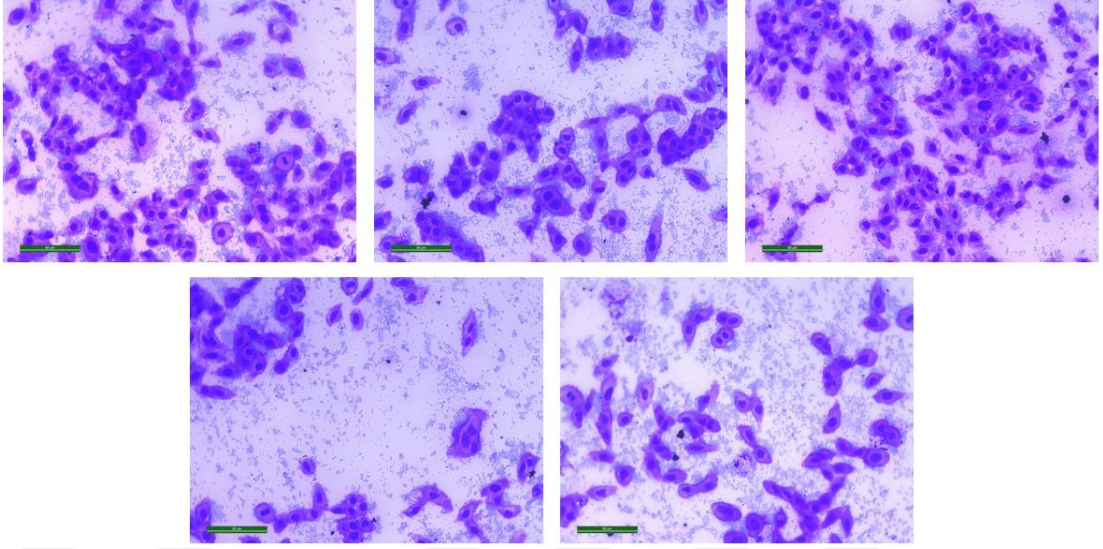
MCF-7 hücre hattında ile yapılan çalışmada daha çok hücre zarı bütünlüğünü korunurken, OV2008 ve HT29 hücre hattında kullanılan bileşikler hücre zarı hasarı ve apoptotik cisimcikler meydana gelmesine yol açtığı görüldü. Kitosenli bileşikler HT29 hücre hattında hücre canlılığını önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlendi. Elde edilen görüntüler Şekil 4.88-4.113 olarak gösterildi.



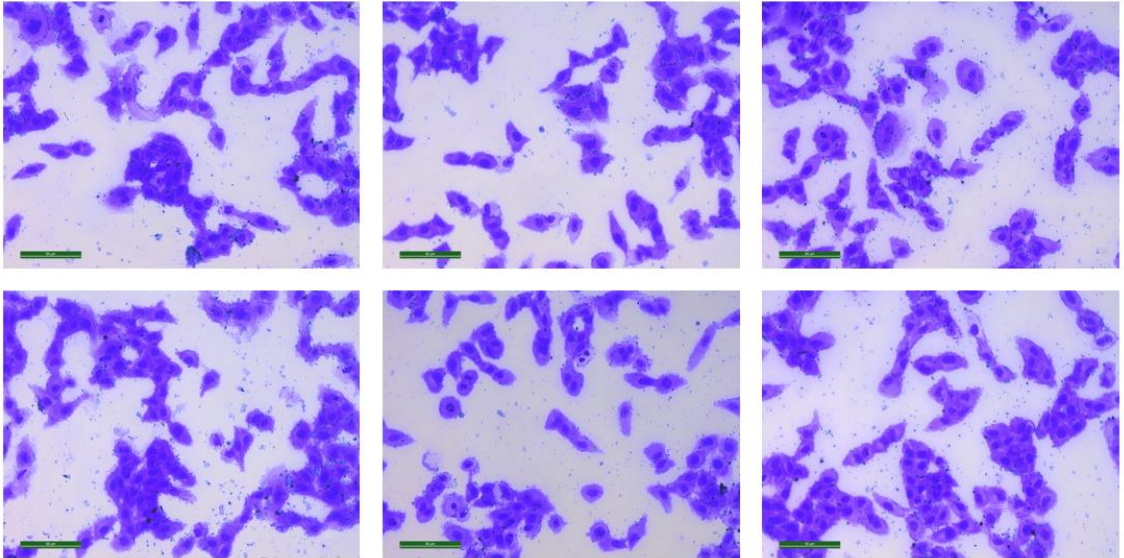
Şekil 4.88. Kristal viyole boyama ile MCF-7 kontrol



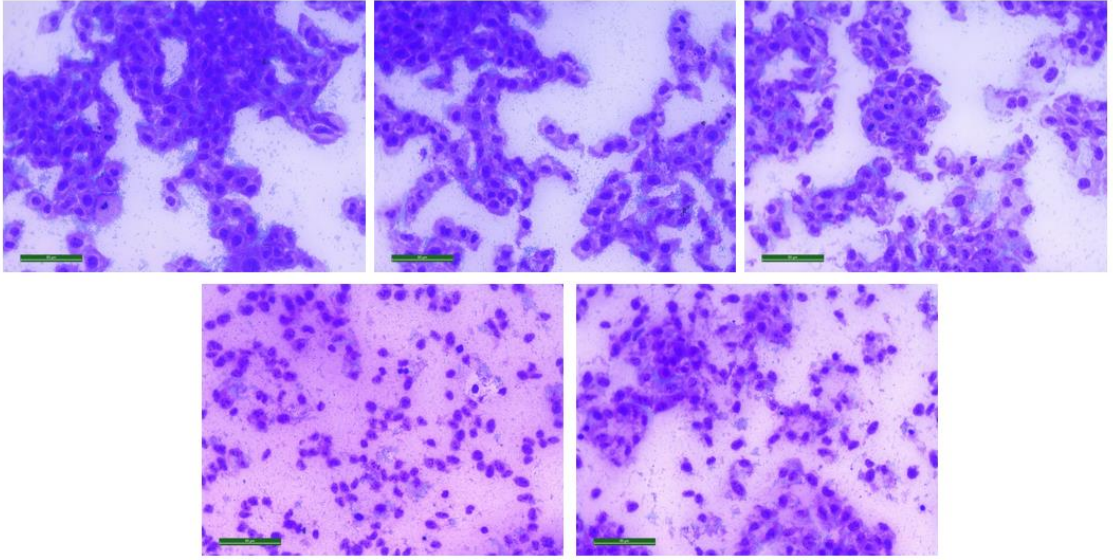
Şekil 4.89. L3 ligandı uygulanmış MCF-7 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



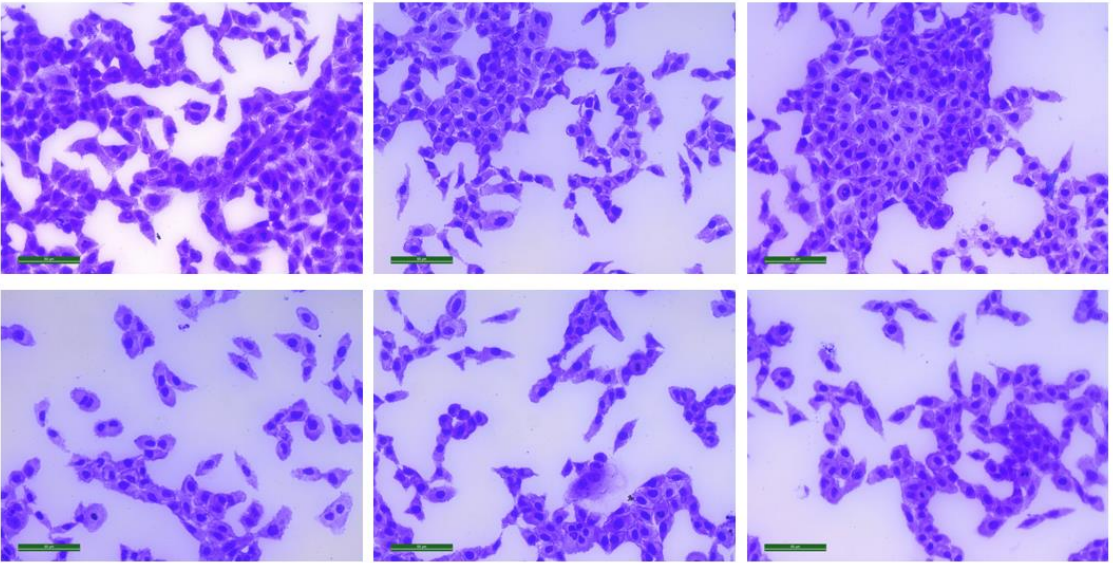
Şekil 4.90. L3-NİS- BF₂ uygulanmış MCF-7 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



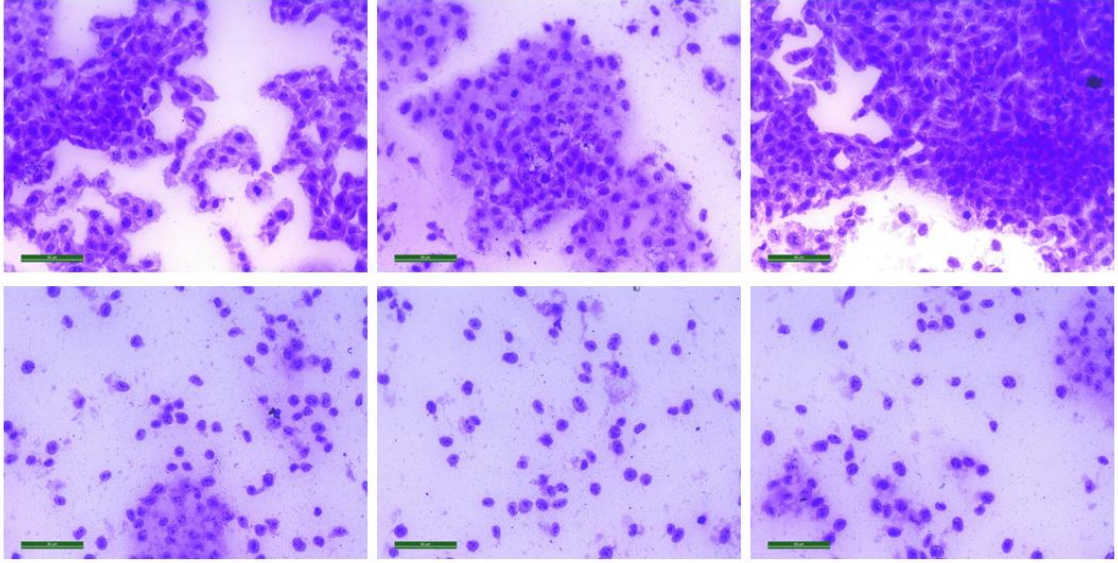
Şekil 4.91. L1 uygulanmış MCF-7 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



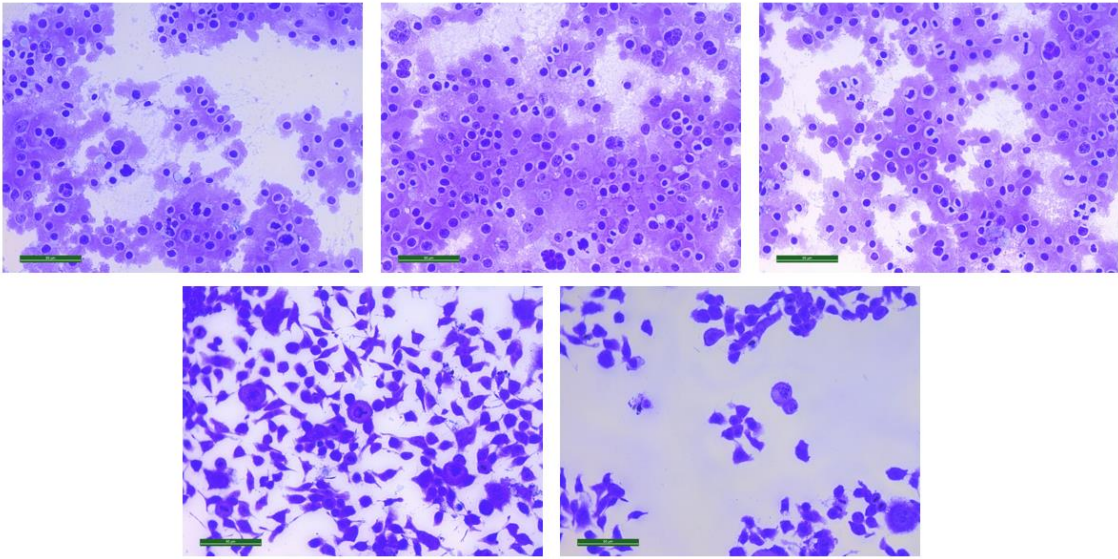
Şekil 4.92. L1-BF₂ kompleksi uygulanmış MCF-7 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



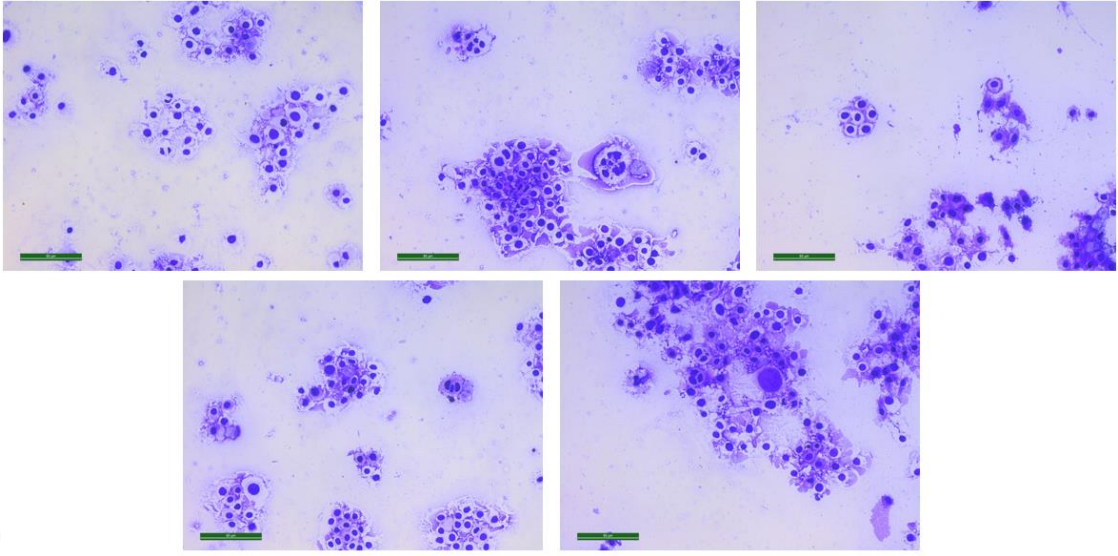
Şekil 4.93. L2 uygulanmış MCF-7 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



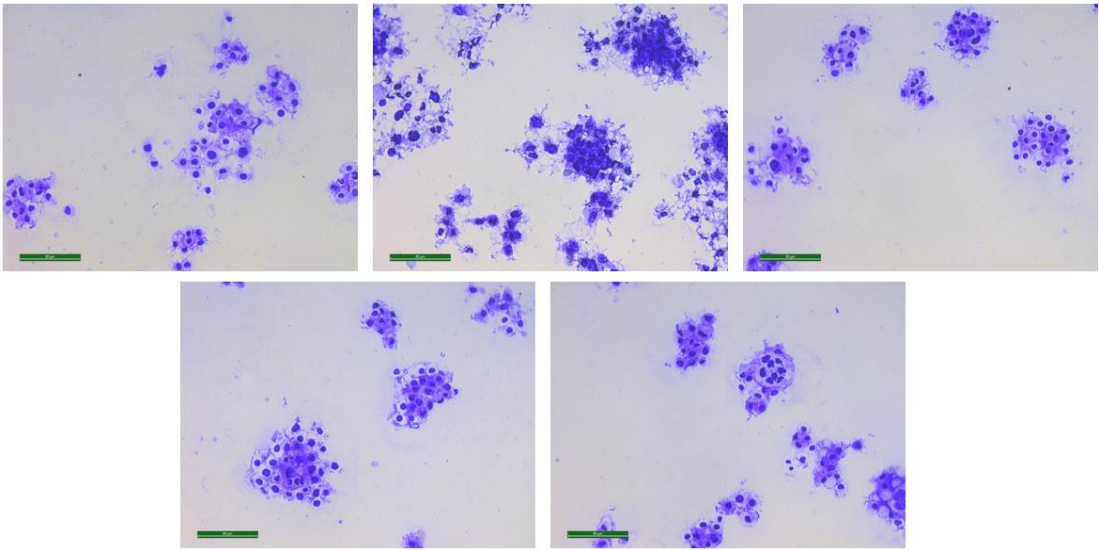
Şekil 4.94. L2-NİS uygulanmış MCF-7 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



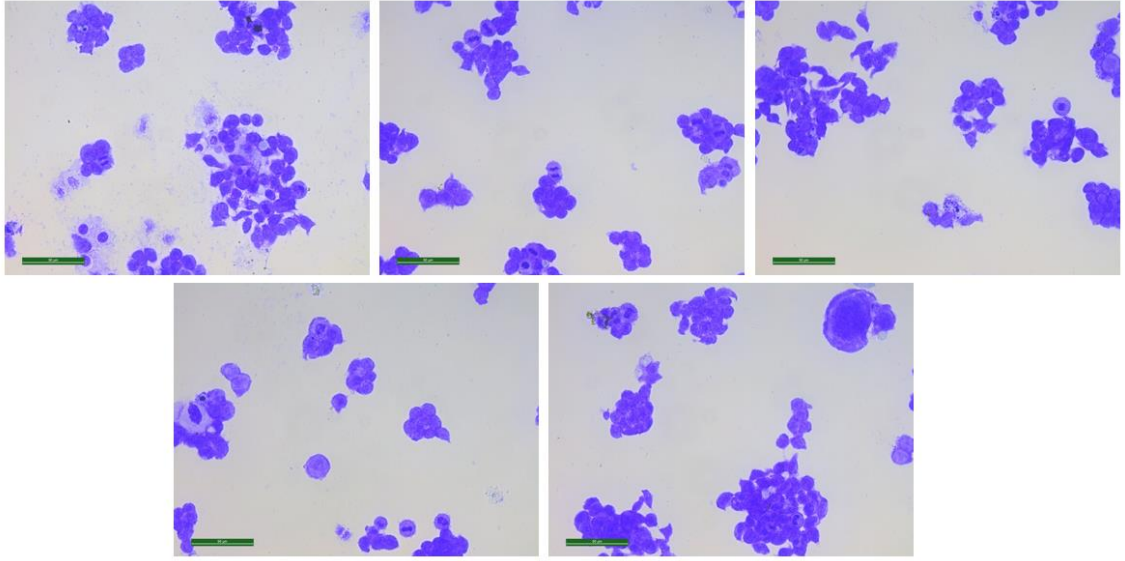
Şekil 4.95. OV2008 aydınlık ortam kontrolü



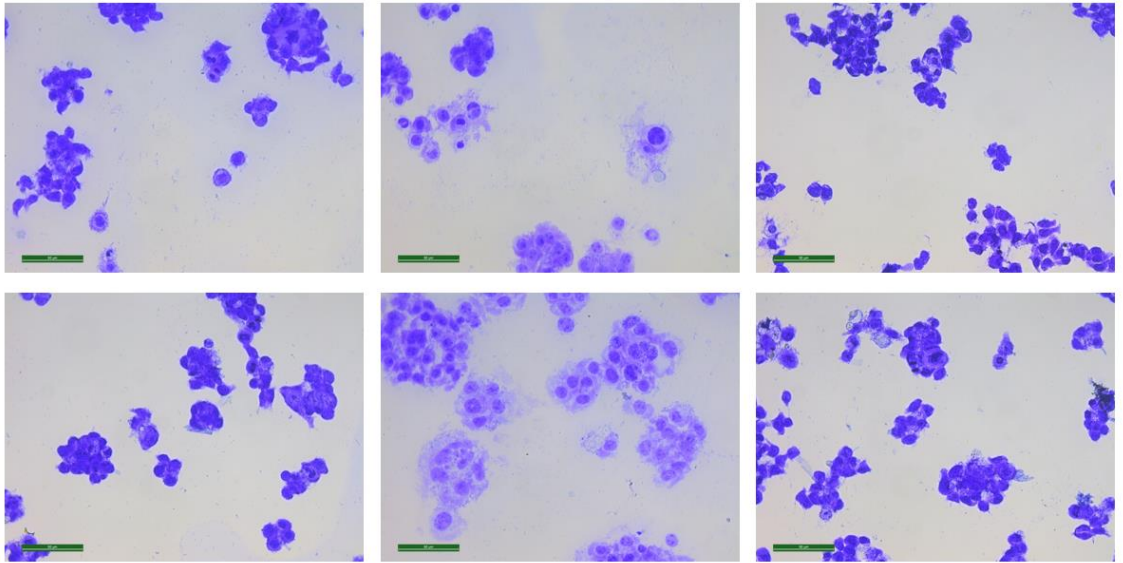
Şekil 4.96. L2 uygulanmış OV2008 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



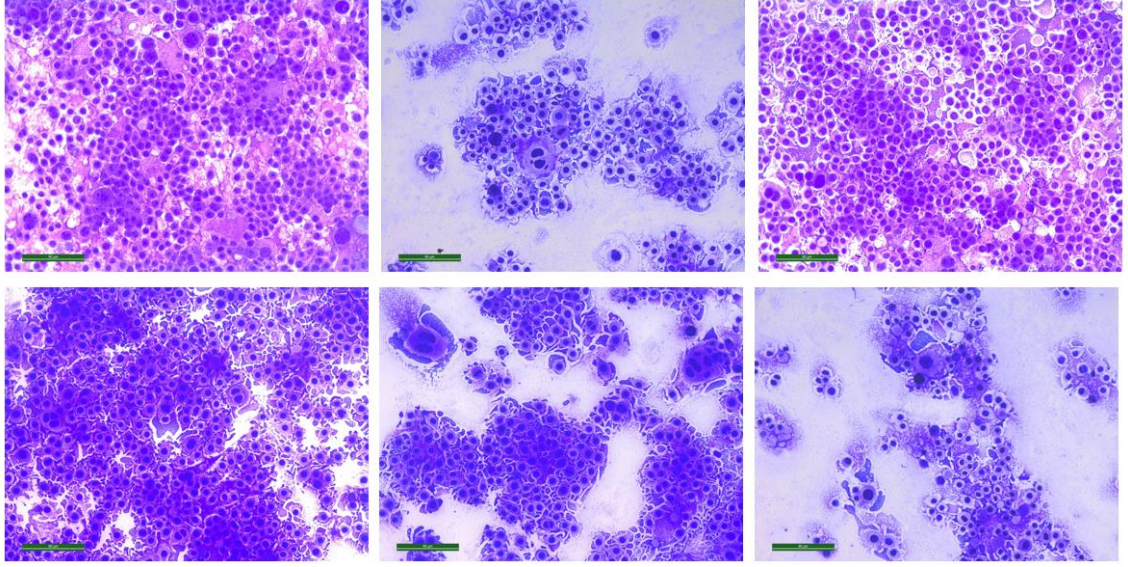
Şekil 4.97. L2-NİS uygulanmış OV2008 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



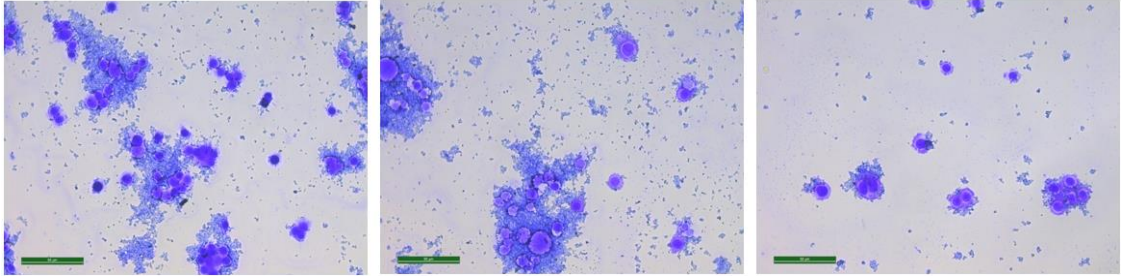
Şekil 4.98. L2-BF₂ uygulanmış OV2008 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



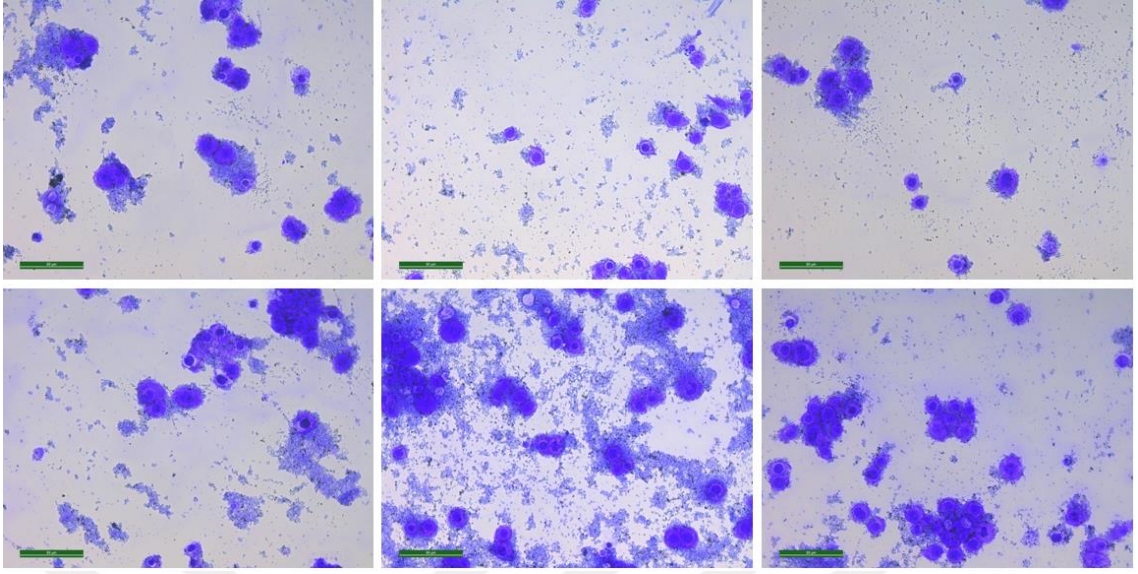
Şekil 4.99. L2-NiS-BF₂ uygulanmış OV2008 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



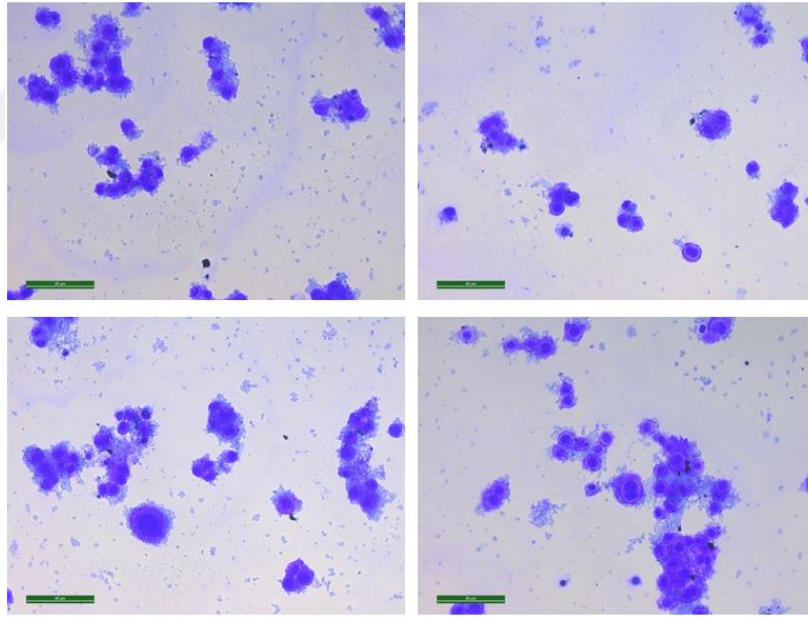
Şekil 4.100. HT29 hücre hattı kontrol



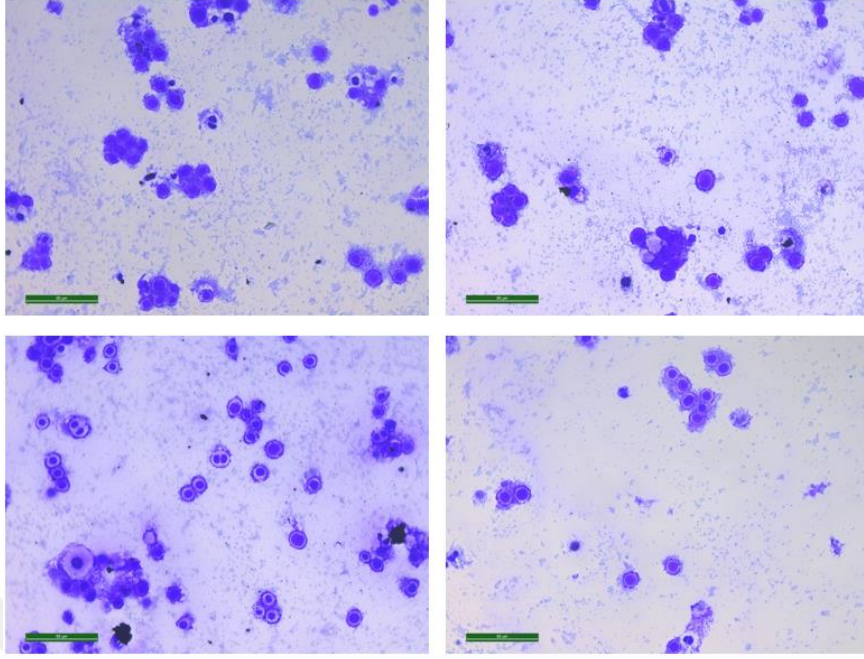
Şekil 4.101. L3 uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



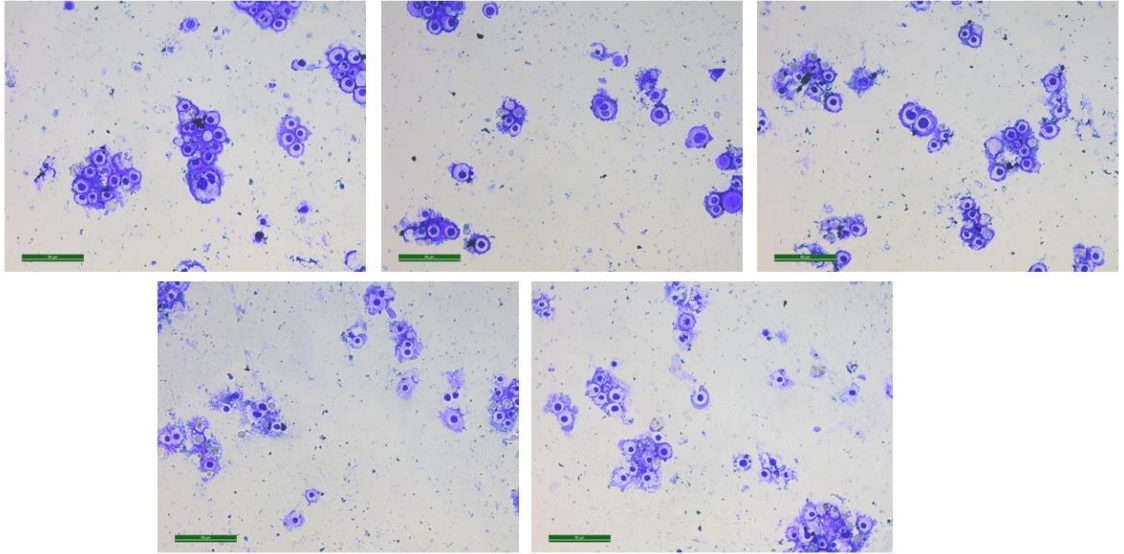
Şekil 4.102. L3-NİS uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



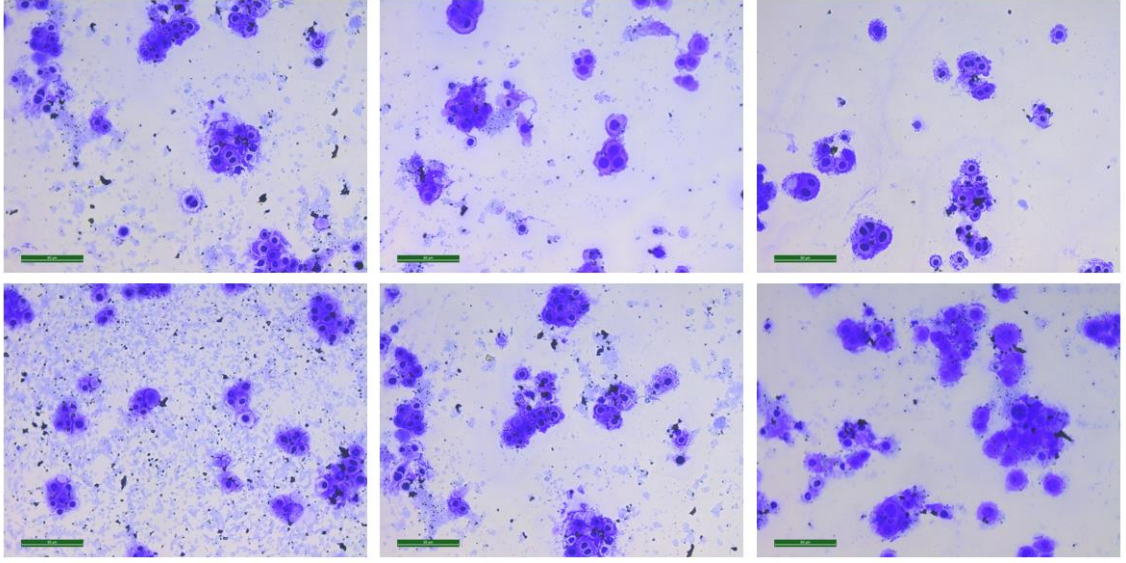
Şekil 4.103. L3-BF₂ uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



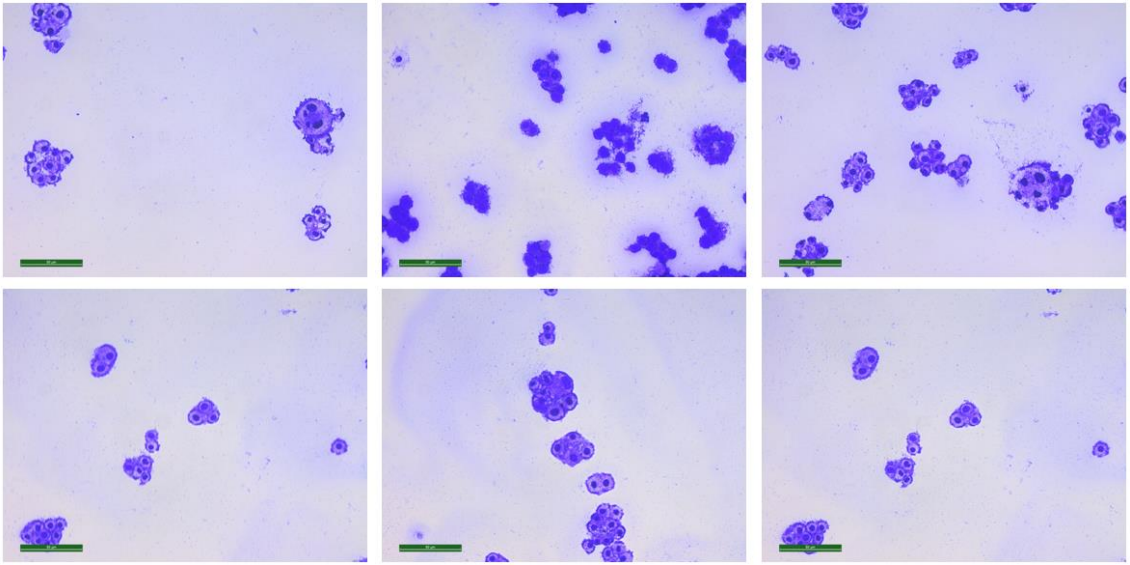
Şekil 4.104. L3-NIS-BF₂ uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



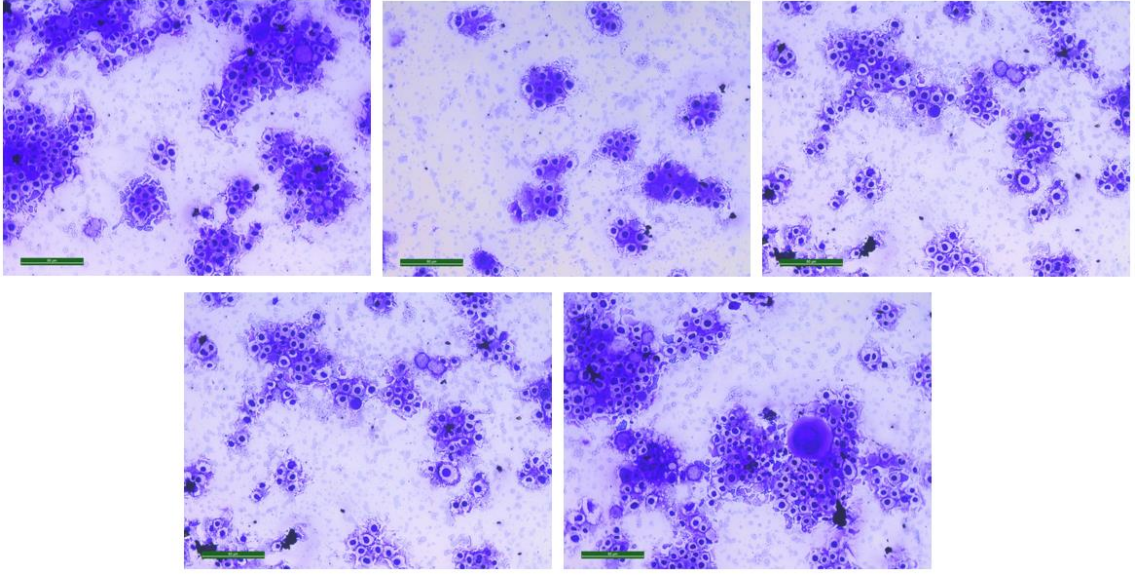
Şekil 4.105. L1 uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



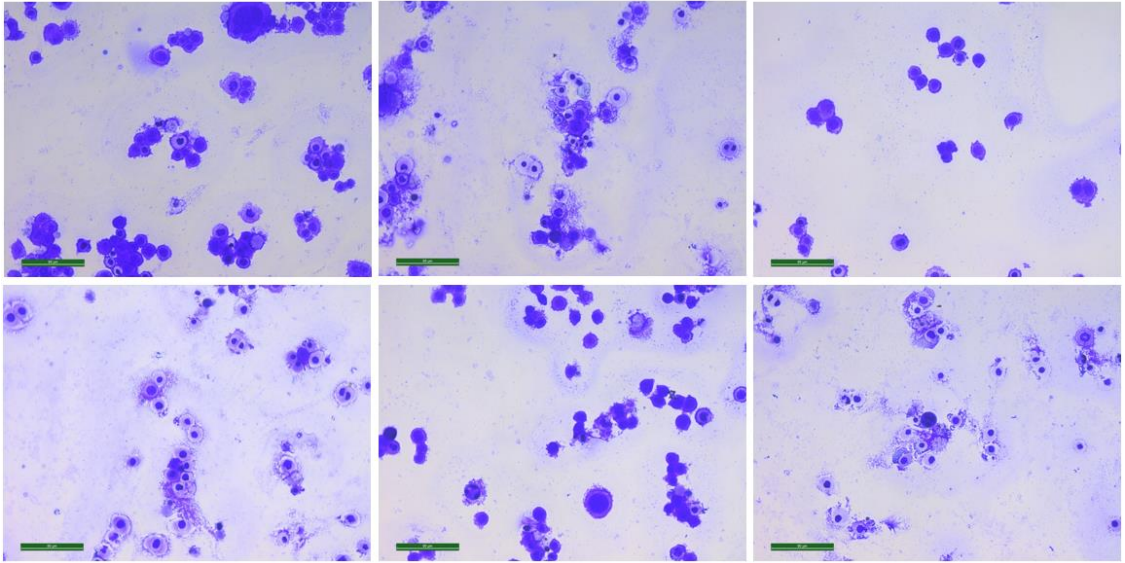
Şekil 4.106. L1-NİS uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



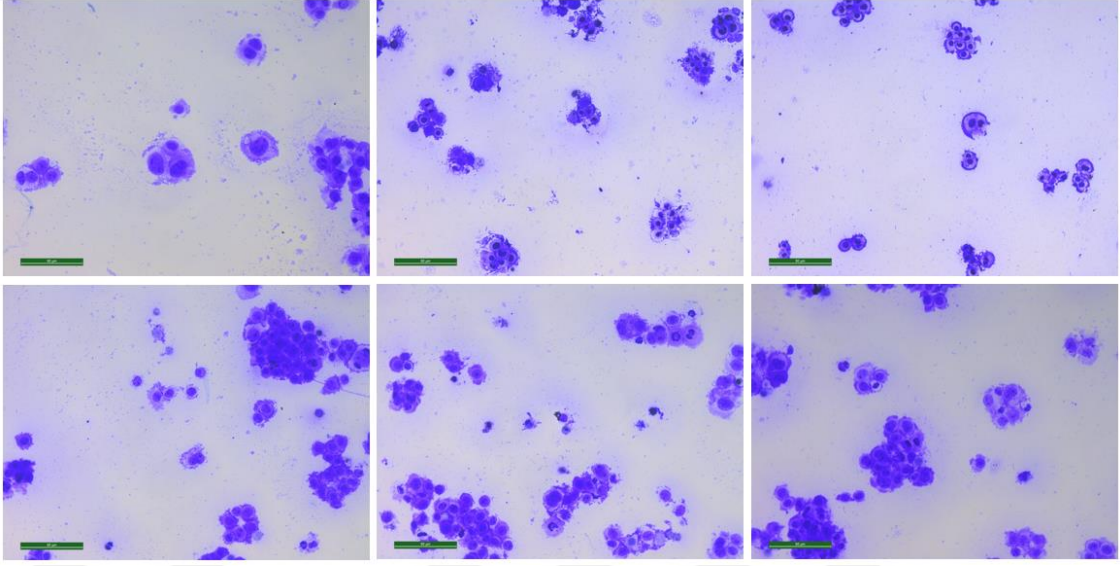
Şekil 4.107. L1-BF₂ uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



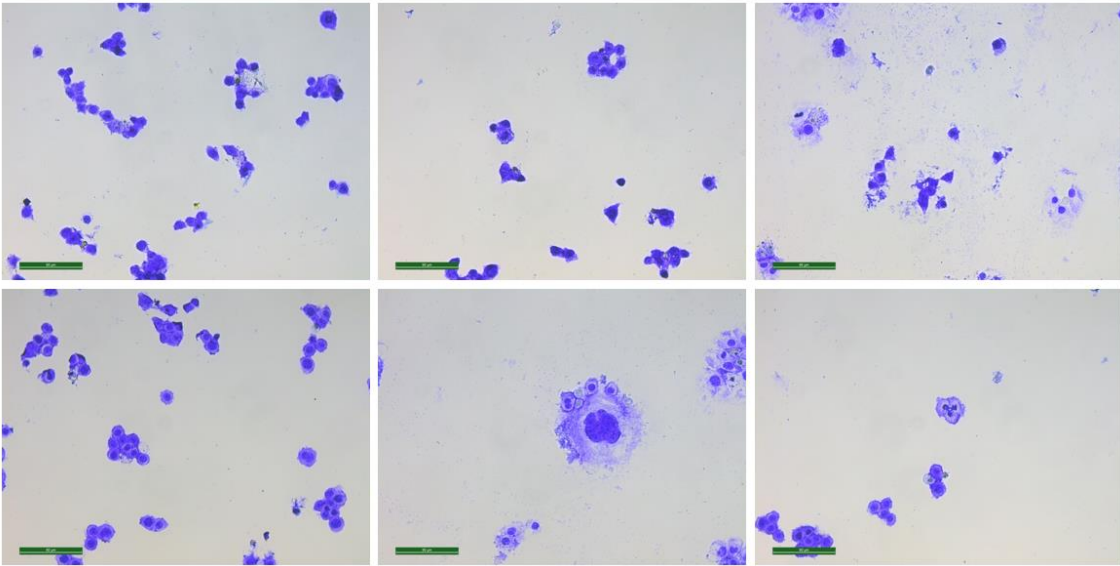
Şekil 4.108. L1-NIS-BF₂ uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



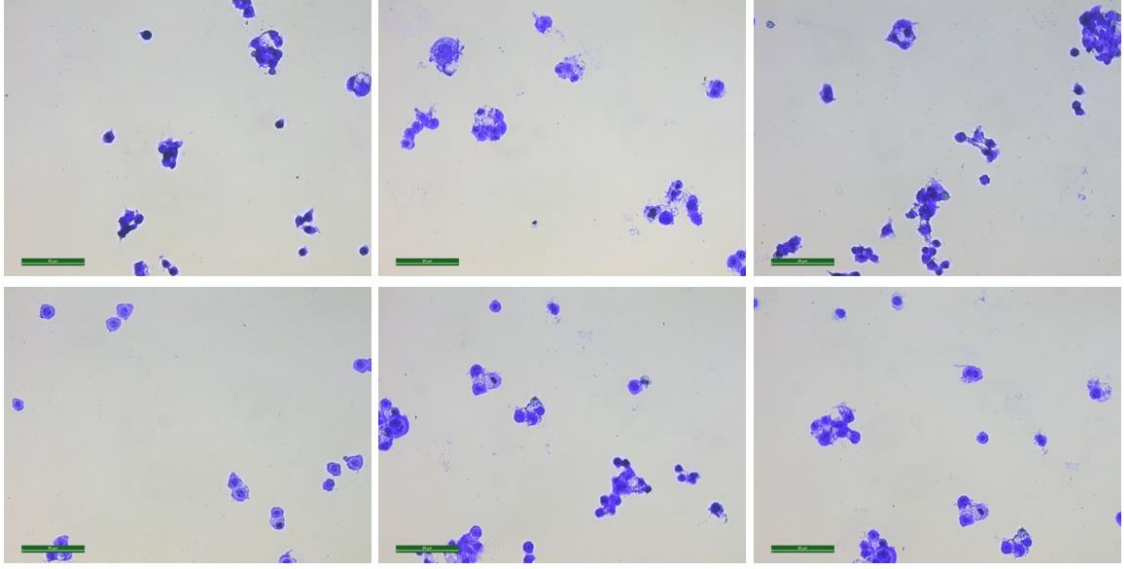
Şekil 4.109. L2 uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



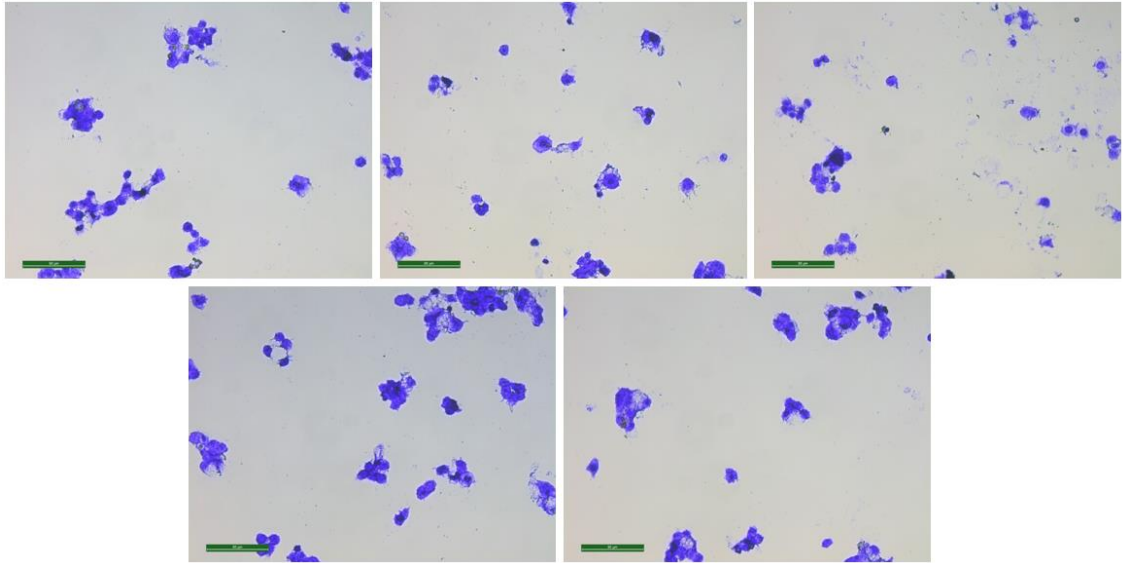
Şekil 4.110. L2-NİS uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



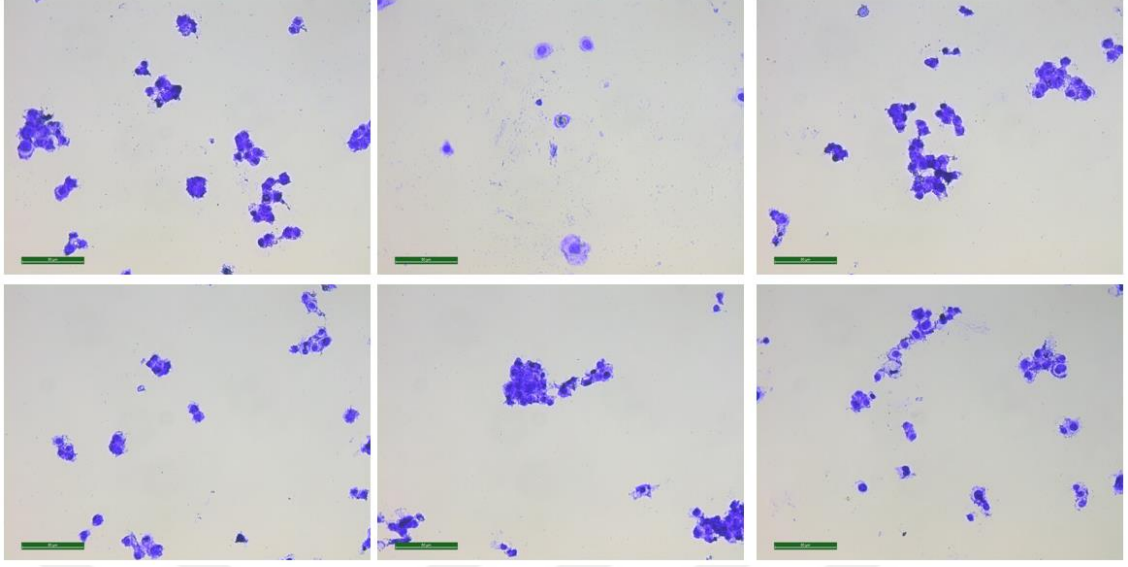
Şekil 4.111. L2 kitosenli uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



Şekil 4.112. L2-NİS kitosenli uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



Şekil 4.113. L2-BF₂ kitosenli uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri



Şekil 4.114. L2-NIS-BF₂ uygulanmış HT29 hücre hattında kristal viyole boyası ile hücre morfolojileri görüntüleri

4.5. Verilerin Tartışılması

Geleneksel tedavilerin kanserin tedavisinde sınırlı seçenekler sunması bu alanda farklı perspektifler içeren çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Fotodinamik terapinin geleneksel tedavi türlerine göre birçok avantaja sahip olduğu düşünülmektedir. FDT’de kullanılan üç bileşenin birlikte var olduğunda toksik etki göstermesi, FD’ların büyük oranda kanser hücrelerinde birikmesi ve lokalize olduğu bölgelerde etki göstermesi nedeniyle sağlıklı hücrelere olan zararın minimize olması, oluşturabileceği yan etkilerin genellikle geçici ve bölgesel oluşu, tedavinin tekrarlanabilirliğe sahip olması gibi kanser tedavisi için sunduğu birçok avantaj, kanser tedavisinde tek başına veya kombinasyon tedavisi için FDT’nin tercih edilme sebeplerindendir (McDowell, 2019; Yoo & Ha, 2012). Ancak şuana kadar FDT için onay almış FD’ların az miktarda gösterdiği yan etkiler ve bazı FD’ların düşük verimli singlet oksijen oluşturmaları nedeniyle yeni FD keşfi için çalışmalar yapılmaktadır. Tasarlanabilir olması ve Yakın Infrared bölgede absorpsiyon yapmaları gibi özelliklere sahip olması ve FDT kullanılabilmeğe uygun olan minimum invaziv özelliğe sahip aza-BODİPY molekülünün tez çalışmasında, tercih edilme sebepleri arasında sayılabilmektedir (Carpenter ve ark., 2015; Fan ve ark., 2014).

Bu tez çalışmasında, antikanser özelliğe sahip olmaları nedeniyle Aza-BODİPY esaslı yeni nesil fotoduyarlayıcı moleküllerin tüm dünyada kanser yükü oluşturan kolorektal kanser hücre hattı (HT29), meme kanseri hücre hattı (MCF-7) ve yumurtalık kanseri hücre hattında (OV2008) oluşturduğu sitotoksik hücre canlılığı ve metabolik aktivitesinin incelenmesi için belirli konsantrasyonlar (0.25, 2.5, 12.5, 25 μ M) seçilerek MTT testi yapıldı.

Son zamanlarda yapılan çalışmaların gösterdiği kanıtlar, ilk yanıt olarak otofajinin, organellerde oluşan fotohasarı onarmak ve hayatta kalmak için FDT tarafından indüklenebileceğini ve bu yanıtın başarısız olması durumunda bir hücre ölüm sinyaline dönüştürülebileceğini göstermektedir (Buytaert ve ark., 2007). MTT deneyi sonucun göre tezde kullanılan bazı FD'ların, bazı konsantrasyonların daha düşük konsantrasyonlara ve aydınlık ortamın karanlık ortama göre daha yüksek hücre canlılığı oranına sahip olduğu görülmektedir. FDT'nin deneydeki bu yanıtı ilk yanıtın başarılı olabilme ihtimalini bizlere göstermektedir.

Suda çözünme özelliğine sahip olan Na-L serisi hücrede yalnızca toksik etki olarak FDT etkinliğinin göstereceği düşünüldü ancak seride yalnızca Na-L-NİS kompleksi OV2008 hücre hattında 12.5 μ M aydınlık ortamda oluşturduğu düşüşle anlamlı değer gösterdi. Aynı zamanda kitosenli molekülleri hazırlarken su kullanılması nedeniyle bu serinin kitosenli hali hazırlanamadı.

Kitosenin iyonik çapraz bağlar oluşturma özelliği sayesinde kontrollü ilaç salımını süresi zarfında ilacı salan kararlı komplekslerin oluşumuna sebep olabilmektedir (Jhaveri ve ark., 2021). Kitosen, tedavi sürecinde FD'ların, stabilitesini koruyarak etkin bir biçimde çalışmasını ve hücreye rahatça girebilmesini sağlayabilmektedir (Pandya ve ark., 2020). Tez kapsamında hazırlanan kitosenli ligandlar ve komplekslerde istenilen etki kontrollü bir şekilde karanlık ortam sitotoksitesini düşük tutup, aydınlık ortam sitotoksitesinde lineer bir düşüş eğrisi oluşturmaya çalışıldı. Ancak beklenen etki yalnızca OV2008 hücre hattında kitosenli L1 serisinin bazı konsantrasyonlarında ve HT29 hücre hattında kitosenli L2 serisinde anlamlı olarak görüldü. Diğer bileşiklerde kitosen eklenmesi genellikle

karanlık ve aydınlık ortamda görülen sitotoksik etkiyi eş değere yakın tutuğu veya yüksek konsantrasyonlarda (12.5 μ M ve/veya 25 μ M) karanlık sitotoksik etkisinin, aydınlıktakinden daha yüksek olduğu belirlendi.

Tez kapsamında kullanılan aza-BODİPY ligandların ve komplekslerin, aza-BODİPY'nin tasarlanabilirlik özelliği avantajı sayesinde ağır atomlar ile modifiye edilmesi ile ISC geçişin kolaylaştırılacağı ve bunun sonucunda singlet oksijen oluşum verimini arttırabileceği düşüncesini oluşturdu (Abrahamse & Hamblin, 2017; Kamkaew ve ark., 2013). Deneyler sonucunda çıkan verilere göre tüm hücre hatlarında (MCF-7, OV2008 ve HT29) yalnızca L2 ligandı ile L2-NİS ligandı anlamlı ve konsantrasyon artışına bağlı olarak hücresel sitotoksite gösterdiği gözlemlendi. MTT testi sonucuna bağlı olarak tez çalışmasında kullanılan moleküllerin IC₅₀ değerleri belirlenerek IC₅₀ tablosu oluşturuldu. Tez kapsamında kullanılan bileşiklerin konsantrasyonları IC₅₀ değerinde olmaması nedeniyle çalışmada genellikle moleküllerin IC₅₀ değerine en yakın olan 12.5 μ M konsantrasyonu kullanıldı. Tüm MTT testi sonuçlarına bakıldığında genel olarak, 0.25 ve 12.5 μ M konsantrasyonlarında karanlık ortam sitotoksitesinin düşük olması ve aydınlık ortam sitotoksik etkisinin karanlık ortama göre daha yüksek olması, tezde kullanılan bileşiklerin genelinin en fazla HT29 hücre hattında istenilen etkiyi göstermesi, L2 ve L2-NİS liganlarının tüm hücre hatları üzerinde aydınlık ortamdaki toksik etkinin karanlık ortama göre daha yüksek olması ve kitosenli L2 serisinin HT29 hücre hattında istenilen etkiyi gösterdiğinden dolayı LDH testi için bu bileşikler ve hücre hattı olarak HT29 hücre hattı seçildi. LDH deneyi ile MTT deneyinin farklı sonuçlar vermesinin en önemli sebeplerinden biri ise LDH deneyinin hücre ve hücre membranındaki hasar sonucunda sitoplazmadan hücre dışına LDH sızmasına bağlı bir deney olmasıdır (Tabernilla ve ark., 2021).

Apoptoz sürecinde hücre zarında genellikle hasar meydana gelmediğinden dolayı hücre dışı ortama LDH sızıntısı gerçekleşmemektedir. LDH testi için iki farklı konsantrasyon seçimi ile ilaca bağlı olarak karşılaştırılmasının yanı sıra dozaja bağlı olarakta karşılaştırma yapılmıştır. LDH testi sonucuna bağlı olarak aydınlık ortamdaki fodinamik etkiyle bağlı olarak yalnızca kitosenli L2-NİS ligandı her iki konsantrasyonuda LDH

aktivitesi kontrole kıyasla, kontrolün üzerinde değer gösterdi. Bu sonuca göre kullanılan moleküllerden L2-NİS ligandı uygulanan hücrelerde FDT uygulandığında nekroz ölüm yolunu indüklediği diğer moleküllerde ise kontrole kıyasla LDH aktivitesindeki düşüş, kullanılan moleküllerin hücreyi apoptoz ölüm yoluna teşvik ettiğini düşünmemizi sağladı.

Bazı porfirin ve ftalosiyanın türevleri ile yapılan FDT çalışmalarda çeşitli tümör hücrelerinde kontrollü ölüm mekanizması olan apoptoz meydana geldiği bildirildi. Ancak FDT kaynaklı hücre ölümü mekanizmasını kontrol eden faktörler henüz tam olarak tanımlanmamıştır (Fabris ve ark., 2001). Deneyde kullanılan moleküllerin kanser hücresi için apoptoz ve nekroz ölüm yollarından hangisini indüklediğini belirlemek için Annexin V-PE kiti kullanılarak flow sitometri testi yapıldı. Hücre hatlarında FDT uygulandığında en yüksek sitotoksik etkiyi gösteren L2 serisi içerisinde L2 ligandı ve NİS içeren L2-NİS ligandı ve L2-NİS BF₂ kompleksi seçildi. L2 ligandı hücreleri, %9.44 oranında nekroz ölüm yoluna girmesini sağlarken, liganda -NİS ve -NİS-BF₂ eklenmesi hücrenin apoptotik hücre ölüm yolunun indüklenmesini sağladığı görüldü. Halojenasyona uğramış aza-BODİPY (iyotlu-aza-BODİPY) bileşiklerinin ligand molekülünün neden olduğu nekrozu azaltmış ve hücreleri daha çok apoptoz ölüm yoluna gitmesine neden olduğu görüldü. Bu sitotoksik testlerde elde edilmiş sonuçlara destek olarak, MTT testinde anlamlı sonuç veren ligand ve komplekslerin IC₅₀ değeri en yakın konsantrasyon olan 12.5 µM konsantrasyonu kullanılarak kristal viyole boyama yapıldı ve gözlemlenen sonuçlarda bileşiklerin hem farklı hücre hatlarında hem de aynı hücre hattında, hücrelerde çeşitli ölüm yollarını tetiklediği görüldü. Bu etkinin sebebi kullanılan ligand ve komplekslerin Hücrede farklı yerlerde lokalize olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu düşüncenin oluşma sebebi ise FDT'de hücre ölüm şekli FD'nin hücre içinde nereye lokalize olduğuna bağlıdır. FDT'nin farklı hücre ölümü türlerinin oluşumuna katkısı, ışığa duyarlılaştırıcının hücre içi konumuna bağlıdır. (Mroz ve ark., 2011). Mitokondride lokalize olan FD, mitokondri membranının geçirgenliğinde bir kayıp oluşturur. Bu kayıp proapoptotik araçların salınmasına yol açar. Endoplazmik retikulumda (ER) lokalize olan bir FD, ER'de bir hasara yol açarak hücrel kalsiyum birikintilerinin serbest kalmasına yol açar. Lizozomda lokalize olan FD, proteolitik

enzimlerin serbest kalmasına neden olur. Aynı zamanda lizozomlar otofagozomlarla birleşerek hasarlı organelleri hidrolize etmeyi ve otofaji esnasında geri dönüşümü sağlamayı amaçlar (Mroz ve ark., 2011). Mitokondri hasarı apoptoza yol açabilirken, hücre zarı yıkımları ve bütünlük kaybı nekrozu indükleyebilir ve lizozomların veya endoplazmik retikulumun hasarı otofajiye neden olabilir. Bu etkileşim lizozomal membran ile mitokondri kökenli apoptoza ve vasküler hasara neden olur. Reaksiyonlar kanserli hücrenin ölümüyle sonuçlanır (Kwiatkowski ve ark., 2018; Maharjan & Bhattarai, 2022).



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmada üç farklı hücre hattı (MCF-7, OV2008 ve HT29) üzerinde, on altı adet yeni sentezlenen FD adayının, kitosenli ve kitosensiz hali ile bu adayların dört farklı dozajı (0.25 μ M, 0.25 μ M, 12.5 μ M ve 25 μ M) gibi birçok farklı etkenin karanlık ve aydınlık ortamdaki hücre canlılığı ve sitotoksik etkileri incelendi. Sonuç olarak FDT ile tedavi edilmek istenen kanser hücrelerinde, aydınlık ortam çalışmalarında tez kapsamında kullanılan FD'lar deneylerin analizleri yapıldığında bazı bileşiklerde ve bazı konsantrasyonlarda hücre ölümünü destekleyen bileşikler belirlendi. Ancak yüksek ve düşük konsantrasyonlarda ışığa maruz bırakılan bazı FD'nın hücre proliferasyonunu da tetikleyebildiği görüldü. Deneyler kapsamında elde edilen hücre proliferasyonunu indüklenmesi gibi sonuçların altında yatan nedenleri ilerleyen zamanlarda daha fazla araştırılması gerektiği anlaşıldı. FDT'de kullanılmak için aday olduğunu düşündüğümüz bu fotoduyarlayıcıların bazılarının hücre proliferasyonunu tetiklemesinin altında yatan mekanizmaları anlamak gerekmektedir. Bu sonuçlara etki eden çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bunlardan bazıları tezde kullanılan FD adaylarının kimyasal yapıları ve fotofiziksel özelliklerinin gibi kimyasal özelliklerin yanı sıra bu adayların hücre alım mekanizmaları, hücrede nerede lokalize olduğu ve ne kadar birikim gösterdiği gibi çeşitli biyolojik etkenlerde incelenmelidir. Ayrıca FDT'nin temel üç bileşeninden biri olan ışığın, yoğunluğu ve FD uygulanan hücrelerin bu ışığa maruz kalma sürelerinin hücre proliferasyon ve ölüm mekanizmaları üzerindeki etkileri tez kapsamı dışında incelenmesi gerektiği ve istenilen terapötik sonuca ulaşmak için ideal parametreler belirlenmelidir (Couto ve ark., 2020). Yapılan bazı araştırmalar sonucunda sebeplerden birinin, FD'ların aktivasyonu sonucu oluşan ROS, kansere karşı terapötik tekniklerde kullanılırken kanser hücrelerinin proliferasyonuna-kanserin ilerlemesine veya hücre ölümüne-kanserin gerilemesine neden olma gibi karşıt hücrel etkilere neden olabileceği düşünüldü (Chiaviello ve ark., 2011; Vidujith ve ark., 2022). Oluşan singlet oksijenin derişimine göre kanser hücrelerinin proliferasyonu ve ölümü tetiklenebilir. Singlet oksijenin yüksek konsantrasyonda üretimi hücre ölümüne neden olurken, singlet oksijenin düşük konsantrasyonlarda ise tam tersine hücrelerin hayatta kalmalarını tetikleyen COX-2, VEGF, MMPs, AKT proteinleri aktifleşebilmektedir (Bozkulak, 2009). FDT'nin hangi ölüm yolunu tetikleyeceğinin belirlenmesinde en etkili iki özellik ışığın ve FD'nın

dozudur. Yüksek dozda ışık ve/veya FD kullanılması hücreyi normal dozunun tetiklediği ölüm yolunu değişimine sebep olabilir. Genellikle bu yüksek dozlar kanser hücrelerini nekroz ölüm yolunu indüklemektedir. İlerleyen zamanlarda Tez kapsamında kullanılan bileşiklerin yapılan çalışmalar hücredeki etkilerini daha anlamlı ve kesin bir şekilde açıklanabilmesi için singlet oksijen verimi çalışması, hücre ölümünü tam anlamıyla anlamak için ise kullanılan bileşiklerin hücredeki lokalizasyonunu belirleme çalışmaları yapılması hedeflenmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2017). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>.New
- Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2001). The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), 656. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0656:thopap>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0656:thopap>2.0.co;2)
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, ; Mladen, Moan, J., Pawel Mroz, ; Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, ; Jakub. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J Clin*, 61, 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>
- Akeren, Z., & Hindistan, S. (2021). Kanser Hastalarinin Semptom Yönetiminde Aromaterapi Kullanımı. *Sakarya Üniversitesi Holistik Sağlık Dergisi*, 4(3), 136–154. <https://doi.org/10.54803/sauhsd.837654>
- Al-Janabi, A. S. M., Alheety, M. A., Al-Samrai, O. A. Y., Shaaban, S., Kibar, B., & Cacan, E. (2020). Anti-cancer and anti-fungal evaluation of novel palladium(II) 1-phenyl-1H-tetrazol-5-thiol complexes. *Inorganic Chemistry Communications*, 121(May), 108193. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2020.108193>
- Algorri, J. F., Ochoa, M., Roldán-Varona, P., Rodríguez-Cobo, L., & López-Higuera, J. M. (2021). Photodynamic therapy: A compendium of latest reviews. *Cancers*, 13(17). <https://doi.org/10.3390/cancers13174447>
- Ali, A., & Ahmed, S. (2018). A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 273–286. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.12.078>
- Alkan, C., Coe, P., & Eichler, E. (2011). Photoactivation Switch from Type II to Type I Reactions by Electron-Rich Micelles for Improved Photodynamic Therapy of Cancer Cells Under Hypoxia. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.019>.Photoactivation
- Amjad MT, Chidharla A, K. A. (2023). *Cancer Chemotherapy - StatPearls - NCBI Bookshelf*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>
- Angeles-Boza, A. M., Bradley, P. M., Fu, P. K.-L., Wicke, S. E., Bacsá, J., Dunbar, K. R., & Turro, C. (2004). DNA binding and photocleavage in vitro by new dirhodium(II) dppz complexes: correlation to cytotoxicity and photocytotoxicity. *Inorganic chemistry*, 43(26), 8510–8519. <https://doi.org/10.1021/ic049091h>
- Apel, A., Herr, I., Schwarz, H., Rodemann, H. P., & Mayer, A. (2008). Blocked

- autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Research*, 68(5), 1485–1494. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0562>
- Barnard, P. J., & Berners-Price, S. J. (2007). Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 251(13–14), 1889–1902. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.04.006>
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. (2012). *Cancer and Radiation Therapy : Current Advances and Future Directions*. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>
- Baykara, O. (2016). Current Modalities in Treatment of Cancer. *Balıkesir Health Sciences Journal*, 5(3), 154–165. <https://doi.org/10.5505/bsbd.2016.93823>
- Berg, K., & Moan, J. (1994). Lysosomes as photochemical targets. *International Journal of Cancer*, 59(6), 814–822. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910590618>
- Berkel, C., & Cacan, E. (2021). Involvement of ATMIN-DYNLL1-MRN axis in the progression and aggressiveness of serous ovarian cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 570, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.07.004>
- Berkel, Ç., Küçük, B., Usta, M., Yılmaz, E., & Çağan, E. (2020). The Effect of Olaparib and Bortezomib Combination Treatment on Ovarian Cancer Cell Lines. *European Journal of Biology*, 79(2), 115–123. <https://doi.org/10.26650/eurjbiol.2020.0035>
- Bjornsti, M. A., & Houghton, P. J. (2004). The TOR pathway: A target for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(5), 335–348. <https://doi.org/10.1038/nrc1362>
- Bonnett, R., & Berenbaum, M. C. (1983). HPD - a study of its components and their properties. *Advances in experimental medicine and biology*, 160, 241–250. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4406-3_21
- Bonnett, R. (2002). Progress with heterocyclic photosensitizers for the photodynamic therapy (PDT) of tumours. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 39(3), 455–470. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570390303>
- Bozkulak, Ö. (2009). Kanser Tedavisinde Fotodinamik Terapi. *Bilim ve Teknik*, 62–65. https://bilimteknik.tubitak.gov.tr/system/files/biltek_arsiv/S-498-62.pdf
- Buytaert, E., Callewaert, G., Hendrickx, N., Scorrano, L., Hartmann, D., Missiaen, L., Vandenheede, J. R., Heirman, I., Grooten, J., & Agostinis, P. (2006). Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *The FASEB Journal*, 20(6), 756–758. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4305fje>
- Buytaert, E., Dewaele, M., & Agostinis, P. (2007). *Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy*. 1776, 86–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001>

- Cacan, E. (2017). Enhancing sensitivity of chemoresistant ovarian cancer cells to TRAIL and FAS mediated apoptosis by radiation. *Turk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 74(3), 185–192. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2017.12499>
- Cacan, E., Ali, M. W., Boyd, N. H., Hooks, S. B., & Greer, S. F. (2014). Inhibition of HDAC1 and DNMT1 modulate RGS10 expression and decrease ovarian cancer chemoresistance. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087455>
- Cancer: Overview, causes, treatments, and types.* (y.y.). Tarihinde 09 Kasım 2022, adresinden erişildi <https://www.medicalnewstoday.com/articles/323648>
- Carpenter, B. L., Situ, X., Scholle, F., Bartelmess, J., Weare, W. W., & Ghiladi, R. A. (2015). Antiviral, antifungal and antibacterial activities of a BODIPY-based photosensitizer. *Molecules*, 20(6), 10604–10621. <https://doi.org/10.3390/molecules200610604>
- Caruso, J. A., Mathieu, P. A., Joiakim, A., Leeson, B., Kessel, D., Sloane, B. F., & Reiners, J. J. (2004). Differential Susceptibilities of Murine Hepatoma 1c1c7 and Tao Cells to the Lysosomal Photosensitizer NPe6: Influence of Aryl Hydrocarbon Receptor on Lysosomal Fragility and Protease Contents. *Molecular Pharmacology*, 65(4), 1016–1028. <https://doi.org/10.1124/mol.65.4.1016>
- Castano, Ana P, Deidova Tatiana N., Hamblin, M. R. (2005). *Mechanisms in PDT: part three.* 2(2), 91–106. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00060-8).Mechanisms
- Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), 279–293. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)
- Chen, D., Zhong, Z., Ma, Q., Shao, J., Huang, W., Dong, X., & Dong, X. (2020). Aza-BODIPY-Based Nanomedicines in Cancer Phototheranostics. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(24), 26914–26925. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c05021>
- Chen, H. H. W., & Kuo, M. T. (2017). Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget*, 8(37), 62742–62758. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18409>
- Chiaviello, A., Postiglione, I., & Palumbo, G. (2011). Targets and mechanisms of photodynamic therapy in lung cancer cells: A brief overview. *Cancers*, 3(1), 1014–1041. <https://doi.org/10.3390/cancers3011014>
- Chlu, S. M., & Olelnick, N. L. (2001). Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. *British Journal of Cancer*, 84(8), 1099–1106. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1714>
- Connor, A. E. O., Gallagher, W. M., & Byrne, A. T. (2009). *Invited Review Porphyrin*

- and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology : Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy*. 17, 1053–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x>
- Coupienne, I., Fettweis, G., Rubio, N., Agostinis, P., & Piette, J. (2011). 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 10(12), 1868–1878. <https://doi.org/10.1039/c1pp05213f>
- Couto, G. K., Seixas, F. K., Iglesias, B. A., & Collares, T. (2020). Perspectives of photodynamic therapy in biotechnology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 213, 112051. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2020.112051>
- Criollo, A., Maiuri, M. C., Tasdemir, E., Vitale, I., Fiebig, A. A., Andrews, D., Molgó, J., Díaz, J., Lavandero, S., Harper, F., Pierron, G., di Stefano, D., Rizzuto, R., Szabadkai, G., & Kroemer, G. (2007). Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell Death and Differentiation*, 14(5), 1029–1039. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402099>
- Criollo, Alfredo, Vicencio, J. M., Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Lavandero, S., & Kroemer, G. (2007). The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. *Autophagy*, 3(4), 350–353. <https://doi.org/10.4161/auto.4077>
- Dahle, J., Steen, H. B., & Moan, J. (1999). The mode of cell death induced by photodynamic treatment depends on cell density. *Photochemistry and Photobiology*, 70(3), 363–367. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb08150.x>
- Dang, Y., & Guan, J. (2020). Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Materials in Medicine*, 1(March), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2020.04.001>
- Debela, D. T., Muzazu, S. G. Y., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). *New approaches and procedures for cancer treatment : Current perspectives*. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>
- Diamond, I., Granelli, S. G., McDonagh, A. F., Nielsen, S., Wilson, C. B., & Jaenicke, R. (1972). Photodynamic therapy of malignant tumours. *The Lancet*, 2(7788), 1175–1177.
- Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korblik, M., Moan, J., & Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12), 889–905. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.12.889>
- DSÖ Kanser Verileri Tablo Çevirisi 1. (2020).
- Erdem, S. S. (2017). Photodynamic Therapy Application in SKOV-3 Overian Cancer Cell Line. *Haydarpasa Numune Training and Research Hospital Medical Journal*, 57(3),

119–124. <https://doi.org/10.14744/hnhj.2017.25238>

- 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.
- Fan, G., Yang, L., & Chen, Z. (2014). Water-soluble BODIPY and aza-BODIPY dyes: synthetic progress and applications. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 8(4), 405–417. <https://doi.org/10.1007/s11705-014-1445-7>
- Fargnoli, M. C., & Peris, K. (2015). Photodynamic therapy for basal cell carcinoma. *Future Oncology*, 11(22), 2991–2996. <https://doi.org/10.2217/fon.15.208>
- Felsher, D. W. (2003). Cancer revoked: Oncogenes as therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 375–380. <https://doi.org/10.1038/nrc1070>
- Güven, Ş. Y. (2014). Biyouyumluluk ve Biyomalzemelerin Seçimi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 2(3), 303-311–311.
- Hamblin, Michael R., Huang, Y. (2014). Handbook of Photomedicine - Google Kitaplar. İçinde CRC Press. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=kBDSBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=fn2pW65Uhf&sig=WuqULDVA-eCJXtADydTGS6Kr9Gk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Hamblin, M. R. (2020). Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue. *Photochemistry and Photobiology*, 96(3), 506–516. <https://doi.org/10.1111/php.13190>
- He, G. F., Bian, M. L., Zhao, Y. W., Xiang, Q., Li, H. Y., & Xiao, C. (2010). A study on the mechanism of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in vitro and in vivo in cervical cancer. *Oncology Reports*, 21(4), 861–868. <https://doi.org/10.3892/or>
- Hofman, J.-W., van Zeeland, F., Turker, S., Talsma, H., Lambrechts, S. A. G., Sakharov, D. V, Hennink, W. E., & van Nostrum, C. F. (2007). Peripheral and axial substitution of phthalocyanines with solketal groups: synthesis and in vitro evaluation for photodynamic therapy. *Journal of medicinal chemistry*, 50(7), 1485–1494. <https://doi.org/10.1021/jm061136w>
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(6), 907–920. <https://doi.org/10.1189/jlb.71.6.907>
- Islam, S., Bhuiyan, M. A. R., & Islam, M. N. (2017). Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *Journal of Polymers and the Environment*, 25(3), 854–866. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0865-5>
- Jhaveri, J., Raichura, Z., Khan, T., Momin, M., & Omri, A. (2021). Chitosan

- nanoparticles-insight into properties, functionalization and applications in drug delivery and theranostics. *Molecules*, 26(2). <https://doi.org/10.3390/molecules26020272>
- Kamkaew, A., Lim, S. H., Lee, H. B., Kiew, L. V., Chung, L. Y., & Burgess, K. (2013). BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, 42(1), 77–88. <https://doi.org/10.1039/c2cs35216h>
- Kanser Tedavisi ve Yöntemleri | Anadolu Sağlık Merkezi.* (y.y.). Tarihinde 06 Mayıs 2023, adresinden erişildi <https://www.anadolusaglik.org/kanserde-tedavi-yontemleri>
- Kelly, J. F., & Snell, M. E. (1976). Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *The Journal of urology*, 155(2), 150–151. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)59108-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)59108-9)
- Kessel, D. (1986). Proposed Structure of the Tumor-Localizing Fraction of HpD (Hematoporphyrin Derivative). *Photochemistry and Photobiology*, 44(2), 193–196. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1986.tb03585.x>
- Kessel, D. (2006). Death pathways associated with photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, 21(4), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.mla.2006.05.006>
- Kessel, D., & Arroyo, A. S. (2007). Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 6(12), 1290–1295. <https://doi.org/10.1039/b707953b>
- Kessel, D., & Poretz, R. D. (2000). Sites of Photodamage Induced by Photodynamic Therapy with a Chlorin e6 Triacetoxymethyl Ester (CAME). *Photochemistry and Photobiology*, 71(1), 94. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)071<0094:sopibp>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)071<0094:sopibp>2.0.co;2)
- Kessel, D., & Reiners, J. J. (2007). Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochemistry and Photobiology*, 83(5), 1024–1028. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00088.x>
- Kessel, D., Vicente, M. G. H., & Reiners, J. J. (2006). Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38(5), 482–488. <https://doi.org/10.1002/lsm.20334>
- Kitsis, R. N., & Molkentin, J. D. (2010). Apoptotic cell death “nixed” by an ER-mitochondrial necrotic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), 9031–9032. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003827107>
- Koval', J., Mikeš, J., Jendželovský, R., Kello, M., Solár, P., & Fedoročko, P. (2010). Degradation of HER2 receptor through hypericin-mediated photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 86(1), 200–205. <https://doi.org/10.1111/j.1751->

- Kroemer, G., & Jäätelä, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Reviews Cancer*, 5(11), 886–897. <https://doi.org/10.1038/nrc1738>
- Kue, C. S., Ng, S. Y., Voon, S. H., Kamkaew, A., Chung, L. Y., Kiew, L. V., & Lee, H. B. (2018). Recent strategies to improve boron dipyrromethene (BODIPY) for photodynamic cancer therapy: An updated review. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 17(11), 1691–1708. <https://doi.org/10.1039/c8pp00113h>
- Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106(June), 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
- Lan, M., Zhao, S., Liu, W., Lee, C. S., Zhang, W., & Wang, P. (2019). Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 8(13). <https://doi.org/10.1002/adhm.201900132>
- Lavie, G , Kaplinsky, C, Toren A, Aizman I, Meruelo D, Mazur Y, & M. M. (1999). A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyl tetrahydroxyhelianthrone and hypericin in leukaemic cell: possible relevance to photodynamic therapy. 79, 423–432.
- Li, B., & Wilson, B. C. (2015). Editorial: Introduction to the special issue on photodynamic therapy. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 8(1), 8–10. <https://doi.org/10.1142/S1793545815020010>
- Lipson RL, Baldes EJ, O. A. (1961). Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 42, 623–629.
- Maharjan, P. S., & Bhattarai, H. K. (2022). Singlet Oxygen, Photodynamic Therapy, and Mechanisms of Cancer Cell Death. *Journal of Oncology*, 2022(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2022/7211485>
- Maiuri, M. C., Criollo, A., & Kroemer, G. (2010). Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *EMBO Journal*, 29(3), 515–516. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.377>
- Mallidi, S., Anbil, S., Bulin, A. L., Obaid, G., Ichikawa, M., & Hasan, T. (2016). Beyond the barriers of light penetration: Strategies, perspectives and possibilities for photodynamic therapy. *Theranostics*, 6(13), 2458–2487. <https://doi.org/10.7150/thno.16183>
- Manganiello, L. O., & Figge, F. H. (1951). *Cancer detection and therapy. II. Methods of preparation and biological effects of metallo-porphyrins*. 36(1), 3–7.

- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., & White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(12), 961–967. <https://doi.org/10.1038/nrc2254>
- Mcdonnell, S. O., & Shea, D. F. O. (2006). Near-Infrared Sensing Properties of BF 2 – Azadipyrrromethenes. *Organic Letters*, 8(16), 3493–3496.
- McDowell, S. (2019). Immunotherapy How Immunotherapy Is Used to Treat. *Cancer*, 1–26. <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/6678.00.pdf>
- Moan, J., Sandberg, S., Christensen, T., & Elander, S. (1983). Hematoporphyrin derivative: chemical composition, photochemical and photosensitizing properties. *Advances in experimental medicine and biology*, 160, 165–179. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4406-3_16
- Mokoena, D. R., George, B. P., & Abrahamse, H. (2021). Photodynamic therapy induced cell death mechanisms in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910506>
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 3(2), 2516–2539. <https://doi.org/10.3390/cancers3022516>
- Nagata, S., Obana, A., Gohto, Y., & Nakajima, S. (2003). Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). *Lasers in Surgery and Medicine*, 33(1), 64–70. <https://doi.org/10.1002/lsm.10190>
- Obeidin, V. A., Parlar, R. E., & ŞahİN, U. (2018). *Overinterne yönelik fotodinami terapi temelli kombinasyon terapi uygulaması*. 49(1), 36–43.
- Oleinick, N. L., Morris, R. L., & Belichenko, I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 1(1), 1–21. <https://doi.org/10.1039/b108586g>
- Özlük, A. A., Oytun, M. G., & Günenç, D. (2017). *Kanser immünoterapisi*. 2(1), 21–23. <https://doi.org/10.5606/fng.transplantasyon.2017.004>
- Pandya, A. D., Øverbye, A., Sahariah, P., Gaware, V. S., Høgset, H., Masson, M., Høgset, A., Mælandsmo, G. M., Skotland, T., Sandvig, K., & Iversen, T. G. (2020). Drug-Loaded Photosensitizer-Chitosan Nanoparticles for Combinatorial Chemo- And Photodynamic-Therapy of Cancer. *Biomacromolecules*, 21(4), 1489–1498. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00061>
- Peck, G. C., Mack, H. P., Holbrook, W. A., & Figge, F. H. (1955). Use of hematoporphyrin fluorescence in biliary and cancer surgery. *The American surgeon*, 21(3), 181–188. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14350210/>
- Periayah, M. H., Halim, A. S., & Saad, A. Z. M. (2016). Chitosan: A promising marine

- polysaccharide for biomedical research. *Pharmacognosy Reviews*, 10(19), 39–42. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.176545>
- Pettigrew, C.A., Cotter, T. G. (2009). Deregulation of cell death (apoptosis): Implications for tumor development. *Discovery Medicine*, 8(41), 61–63.
- Photodynamic Therapy (PDT): Procedure, Uses & Recovery*. (2022). <https://my.clevelandclinic.org/health/treatments/17922-photodynamic-therapy-pdt>
- Photodynamic therapy (PDT) - NHS*. (y.y.). Tarihinde 02 Ekim 2022, adresinden erişildi <https://www.nhs.uk/conditions/photodynamic-therapy/>
- Photodynamic Therapy to Treat Cancer-National Cancer Institute*. (2021). <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/photodynamic-therapy>
- Proskuryakov, S., & Gabai, V. (2009). Mechanisms of Tumor Cell Necrosis. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1), 56–68. <https://doi.org/10.2174/138161210789941793>
- Raab, O. (1900). Über die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien. *Zeitschr Biol*, 39, 524–546.
- Rathmell, J. C., & Thompson, C. B. (1999). The central effectors of cell death in the immune system. *Annual Review of Immunology*, 17(D), 781–828. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.781>
- Redmond, R. W., & Kochevar, I. E. (2006). Symposium-in-Print: Singlet Oxygen Invited Review Spatially Resolved Cellular Responses to Singlet Oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, 82, 1–178. <https://doi.org/10.1562/2006-04-14-1R-874>
- Reiners, J. J., Caruso, J. A., Mathieu, P., Chelladurai, B., Yin, X. M., & Kessel, D. (2002). Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves bid cleavage. *Cell Death and Differentiation*, 9(9), 934–944. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401048>
- Reiners, John J., Agostinis, P., Berg, K., Oleinick, N. L., & Kessel, D. (2010). Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*, 6(1), 7–18. <https://doi.org/10.4161/auto.6.1.10220>
- Rizeq, B. R., Younes, N. N., Rasool, K., & Nasrallah, G. K. (2019). Synthesis, bioapplications, and toxicity evaluation of chitosan-based nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22). <https://doi.org/10.3390/ijms20225776>
- Robertson, C. A., Evans, D. H., & Abrahamse, H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>

- Rustin, P. (2002). Mitochondria, from cell death to proliferation. *Nature Genetics*, 30(4), 352–353. <https://doi.org/10.1038/ng0402-352>
- Sarbadhikary, P., George, B. P., & Abrahamse, H. (2021). Recent advances in photosensitizers as multifunctional theranostic agents for imaging-guided photodynamic therapy of cancer. *Theranostics*, 11(18), 9054–9088. <https://doi.org/10.7150/thno.62479>
- Sasmal, P. K., Patra, A. K., Nethaji, M., & Chakravarty, A. R. (2007). DNA cleavage by new oxovanadium(IV) complexes of N-salicylidene alpha-amino acids and phenanthroline bases in the photodynamic therapy window. *Inorganic chemistry*, 46(26), 11112–11121. <https://doi.org/10.1021/ic7011793>
- Sasnauskiene, A., Kadziauskas, J., Vezelyte, N., Jonusiene, V., & Kirveliėne, V. (2009). Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis*, 14(3), 276–286. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0292-8>
- Savill, J., & Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407(October), 784–788. <https://doi.org/10.1038/35037722>
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., & Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO Journal*, 26(7), 1749–1760. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601623>
- Semyachkina-Glushkovskaya, O. V., Sokolovski, S. G., Goltsov, A., Gekaluyk, A. S., Saranceva, E. I., Bragina, O. A., Tuchin, V. V., & Rafailov, E. U. (2017). Laser-induced generation of singlet oxygen and its role in the cerebrovascular physiology. *Progress in Quantum Electronics*, 55, 112–128. <https://doi.org/10.1016/j.pquantelec.2017.05.001>
- Shakil, M. S., Mahmud, K. M., Sayem, M., Niloy, M. S., Halder, S. K., Hossen, M. S., Uddin, M. F., & Hasan, M. A. (2021). Using Chitosan or Chitosan Derivatives in Cancer Therapy. *Polysaccharides*, 2(4), 795–816. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2040048>
- Sheng, W., Cui, J., Ruan, Z., Yan, L., Wu, Q., Yu, C., Wei, Y., Hao, E., & Jiao, L. (2017). [a]-Phenanthrene-fused BF₂ azadipyromethene (AzaBODIPY) dyes as bright near-infrared fluorophores. *Journal of Organic Chemistry*, 82(19), 10341–10349. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01803>
- Shi, Z., Han, X., Hu, W., Bai, H., Peng, B., Ji, L., Fan, Q., Li, L., & Huang, W. (2020). Bioapplications of small molecule Aza-BODIPY: From rational structural design to: From vivo investigations. *Chemical Society Reviews*, 49(21), 7533–7567. <https://doi.org/10.1039/d0cs00234h>
- Strømhaug, P. E., Berg, T. O., Berg, K., & Seglen, P. O. (1997). A novel method for the study of autophagy: Destruction of hepatocytic lysosomes, but not autophagosomes, by the photosensitizing porphyrin tetra(4-sulphonatophenyl)porphine. *Biochemical*

- Journal*, 321(1), 217–225. <https://doi.org/10.1042/bj3210217>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Surgery for Cancer* - NCI. (2015). <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery>
- Szacilowski, K., Macyk, W., Drzewiecka-Matuszek, A., Brindell, M., & Stochel, G. (2005). Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. *Chemical reviews*, 105(6), 2647–2694. <https://doi.org/10.1021/cr030707e>
- Szeimies, R. M. (2007). Methyl Aminolevulinate-photodynamic Therapy for Basal Cell Carcinoma. *Dermatologic Clinics*, 25(1), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.det.2006.09.008>
- Szumiel, I. (2005). L5178Y sublines: A look back from 40 years. Part 2: Response to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 81(5), 353–365. <https://doi.org/10.1080/09553000500143534>
- Tabernilla, A., Rodrigues, B. D. S., Pieters, A., Caufriez, A., Leroy, K., Campenhout, R. Van, Cooreman, A., Gomes, A. R., Arnesdotter, E., Gijbels, E., & Vinken, M. (2021). In vitro liver toxicity testing of chemicals: A pragmatic approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22095038>
- Tan, S., Li, D., & Zhu, X. (2020). Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 124(November 2019). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109821>
- Tohme, S., Simmons, R. L., & Tsung, A. (2018). *Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases*. 77(7), 1548–1552. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1536>.Surgery
- Vento, S., & Cainelli, F. (2003). *Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: aetiology, prevention, and treatment*. 4, 595–604.
- Vidujith, A. V. A., Jayasinghe, C. D., De Costa, M. D. P., & Senthilnithy, R. (2022). Photodynamic Therapy: An Overview and Insights into a Prospective Mainstream Anticancer Therapy. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 9(3), 821–848. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.1000980>
- Weyergang, A., Berg, K., Kaalhus, O., Peng, Q., & Selbo, P. K. (2009). Photodynamic therapy targets the mTOR signaling network in Vitro and in Vivo. *Molecular Pharmaceutics*, 6(1), 255–264. <https://doi.org/10.1021/mp800156e>

- Xue, L. Y., Chiu, S. M., Azizuddin, K., Joseph, S., & Oleinick, N. L. (2007). The death of human cancer cells following photodynamic therapy: Apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy. *Photochemistry and Photobiology*, 83(5), 1016–1023. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00159.x>
- Yanat, M., & Schroën, K. (2021). Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging. *Reactive and Functional Polymers*, 161(February). <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.104849>
- Yangin, S., Tanman, Ü., & Cansaran-Duman, D. (2019). Pharmaceutical applications based on next generation sequencing technology in oncologic drug development. *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 76(4), 473–486. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.33576>
- Ye, Y., Wang, L. X., Zhang, D. P., Yan, Y. J., & Chen, Z. L. (2015). Studies on photodynamic mechanism of a novel chlorine derivative (TDPC) and its antitumor effect for photodynamic therapy in vitro and in vivo. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1142/S1793545815400015>
- Yoo, J. O., & Ha, K. S. (2012). New Insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death. İçinde *International Review of Cell and Molecular Biology* (1. baskı, C. 295). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394306-4.00010-1>
- Zou, J., Yin, Z., Ding, K., Tang, Q., Li, J., Si, W., Shao, J., Zhang, Q., Huang, W., & Dong, X. (2017). BODIPY Derivatives for Photodynamic Therapy: Influence of Configuration versus Heavy Atom Effect. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(38), 32475–32481. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b07569>
- Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2017). New photossensitizersfor photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942.New>
- Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2001). The History of Photodetection and Photodynamic Therapy¶. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), 656. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0656:thopap>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0656:thopap>2.0.co;2)
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, ; Mladen, Moan, J., Pawel Mroz, ; Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, ; Jakub. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J Clin*, 61, 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>
- Akeren, Z., & Hindistan, S. (2021). Kanser Hastalarinin SemptoYönetimindeAromaterapi Kullanimi. *Sakarya Üniversitesi Holistik Sağlık*

- Dergisi*, 4(3), 136–154. <https://doi.org/10.54803/sauhsd.837654>
- Al-Janabi, A. S. M., Alheety, M. A., Al-Samrai, O. A. Y., Shaaban, S., Kibar, B., & Cacan, E. (2020). Anti-cancer and anti-fungal evaluation of novel palladium(II) 1-phenyl-1H-tetrazol-5-thiol complexes. *Inorganic Chemistry Communications*, 121(May), 108193. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2020.108193>
- Algorri, J. F., Ochoa, M., Roldán-Varona, P., Rodríguez-Cobo, L., & López-Higuera, J. M. (2021). Photodynamic therapy: A compendium of latest reviews. *Cancers*, 13(17). <https://doi.org/10.3390/cancers13174447>
- Ali, A., & Ahmed, S. (2018). A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 273–286. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.12.078>
- Alkan, C., Coe, P., & Eichler, E. (2011). Photoactivation Switch from Type II to Type I Reactions by Electron-Rich Micelles for Improved Photodynamic Therapy of Cancer Cells Under Hypoxia. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.019>. Photoactivation
- Amjad MT, Chidharla A, K. A. (2023). *Cancer Chemotherapy - StatPearls - NCBI Bookshelf*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>
- Angeles-Boza, A. M., Bradley, P. M., Fu, P. K.-L., Wicke, S. E., Bacsa, J., Dunbar, K. R., & Turro, C. (2004). DNA binding and photocleavage in vitro by new dirhodium(II) dppz complexes: correlation to cytotoxicity and photocytotoxicity. *Inorganic chemistry*, 43(26), 8510–8519. <https://doi.org/10.1021/ic049091h>
- Apel, A., Herr, I., Schwarz, H., Rodemann, H. P., & Mayer, A. (2008). Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Research*, 68(5), 1485–1494. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0562>
- Barnard, P. J., & Berners-Price, S. J. (2007). Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 251(13–14), 1889–1902. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.04.006>
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. (2012). *Cancer and Radiation Therapy : Current Advances and Future Directions*. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>
- Baykara, O. (2016). Current Modalities in Treatment of Cancer. *Balıkesir Health Sciences Journal*, 5(3), 154–165. <https://doi.org/10.5505/bsbd.2016.93823>
- Berg, K., & Moan, J. (1994). Lysosomes as photochemical targets. *International Journal of Cancer*, 59(6), 814–822. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910590618>
- Berkel, C., & Cacan, E. (2021). Involvement of ATMIN-DYNLL1-MRN axis in the progression and aggressiveness of serous ovarian cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 570, 74–81.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.07.004>

- Berkel, Ç., Küçük, B., Usta, M., Yılmaz, E., & Çağan, E. (2020). The Effect of Olaparib and Bortezomib Combination Treatment on Ovarian Cancer Cell Lines. *European Journal of Biology*, 79(2), 115–123. <https://doi.org/10.26650/eurjbiol.2020.0035>
- Bjornsti, M. A., & Houghton, P. J. (2004). The TOR pathway: A target for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(5), 335–348. <https://doi.org/10.1038/nrc1362>
- Bonnett, R., & Berenbaum, M. C. (1983). HPD - a study of its components and their properties. *Advances in experimental medicine and biology*, 160, 241–250. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4406-3_21
- Bonnett, R. (2002). Progress with heterocyclic photosensitizers for the photodynamic therapy (PDT) of tumours. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 39(3), 455–470. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570390303>
- Bozkulak, Ö. (2009). Kanser Tedavisinde Fotodinamik Terapi. *Bilim ve Teknik*, 62–65. https://bilimteknik.tubitak.gov.tr/system/files/biltek_arsiv/S-498-62.pdf
- Buytaert, E., Callewaert, G., Hendrickx, N., Scorrano, L., Hartmann, D., Missiaen, L., Vandenheede, J. R., Heirman, I., Grooten, J., & Agostinis, P. (2006). Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *The FASEB Journal*, 20(6), 756–758. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4305fje>
- Buytaert, E., Dewaele, M., & Agostinis, P. (2007). *Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy*. 1776, 86–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001>
- Cacan, E. (2017). Enhancing sensitivity of chemoresistant ovarian cancer cells to TRAIL and FAS mediated apoptosis by radiation. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 74(3), 185–192. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2017.12499>
- Cacan, E., Ali, M. W., Boyd, N. H., Hooks, S. B., & Greer, S. F. (2014). Inhibition of HDAC1 and DNMT1 modulate RGS10 expression and decrease ovarian cancer chemoresistance. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087455>
- Cancer: Overview, causes, treatments, and types.* (y.y.). Tarihinde 09 Kasım 2022, adresinden erişildi <https://www.medicalnewstoday.com/articles/323648>
- Carpenter, B. L., Situ, X., Scholle, F., Bartelmess, J., Weare, W. W., & Ghiladi, R. A. (2015). Antiviral, antifungal and antibacterial activities of a BODIPY-based photosensitizer. *Molecules*, 20(6), 10604–10621. <https://doi.org/10.3390/molecules200610604>
- Caruso, J. A., Mathieu, P. A., Joiakim, A., Leeson, B., Kessel, D., Sloane, B. F., & Reiners, J. J. (2004). Differential Susceptibilities of Murine Hepatoma 1c1c7 and

- Tao Cells to the Lysosomal Photosensitizer NPe6: Influence of Aryl Hydrocarbon Receptor on Lysosomal Fragility and Protease Contents. *Molecular Pharmacology*, 65(4), 1016–1028. <https://doi.org/10.1124/mol.65.4.1016>
- Castano, Ana P, Deidova Tatiana N., Hamblin, M. R. (2005). *Mechanisms in PDT: part three*. 2(2), 91–106. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00060-8).Mechanisms
- Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), 279–293. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)
- Chen, D., Zhong, Z., Ma, Q., Shao, J., Huang, W., Dong, X., & Dong, X. (2020). Aza-BODIPY-Based Nanomedicines in Cancer Phototheranostics. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(24), 26914–26925. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c05021>
- Chen, H. H. W., & Kuo, M. T. (2017). Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget*, 8(37), 62742–62758. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18409>
- Chiaviello, A., Postiglione, I., & Palumbo, G. (2011). Targets and mechanisms of photodynamic therapy in lung cancer cells: A brief overview. *Cancers*, 3(1), 1014–1041. <https://doi.org/10.3390/cancers3011014>
- Chlu, S. M., & Olelnick, N. L. (2001). Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. *British Journal of Cancer*, 84(8), 1099–1106. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1714>
- Connor, A. E. O., Gallagher, W. M., & Byrne, A. T. (2009). *Invited Review Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology : Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy*. 17, 1053–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x>
- Coupienne, I., Fettweis, G., Rubio, N., Agostinis, P., & Piette, J. (2011). 5-ALA-PDT induces RIP3-dependent necrosis in glioblastoma. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 10(12), 1868–1878. <https://doi.org/10.1039/c1pp05213f>
- Couto, G. K., Seixas, F. K., Iglesias, B. A., & Collares, T. (2020). Perspectives of photodynamic therapy in biotechnology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 213, 112051. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2020.112051>
- Criollo, A., Maiuri, M. C., Tasdemir, E., Vitale, I., Fiebig, A. A., Andrews, D., Molgó, J., Díaz, J., Lavandero, S., Harper, F., Pierron, G., di Stefano, D., Rizzuto, R., Szabadkai, G., & Kroemer, G. (2007). Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell Death and Differentiation*, 14(5), 1029–1039. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402099>

- Criollo, Alfredo, Vicencio, J. M., Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Lavandero, S., & Kroemer, G. (2007). The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. *Autophagy*, 3(4), 350–353. <https://doi.org/10.4161/auto.4077>
- Dahle, J., Steen, H. B., & Moan, J. (1999). The mode of cell death induced by photodynamic treatment depends on cell density. *Photochemistry and Photobiology*, 70(3), 363–367. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb08150.x>
- Dang, Y., & Guan, J. (2020). Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Materials in Medicine*, 1(March), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2020.04.001>
- Debela, D. T., Muzazu, S. G. Y., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). *New approaches and procedures for cancer treatment : Current perspectives.* <https://doi.org/10.1177/205031212111034366>
- Diamond, I., Granelli, S. G., McDonagh, A. F., Nielsen, S., Wilson, C. B., & Jaenicke, R. (1972). Photodynamic therapy of malignant tumours. *The Lancet*, 2(7788), 1175–1177.
- Dougherty, T. J., Gomer, C. J., Henderson, B. W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J., & Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12), 889–905. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.12.889>
- DSÖ Kanser Verileri Tablo Çevirisi 1. (2020).
- Erdem, S. S. (2017). Photodynamic Therapy Application in SKOV-3 Overian Cancer Cell Line. *Haydarpasa Numune Training and Research Hospital Medical Journal*, 57(3), 119–124. <https://doi.org/10.14744/hnhj.2017.25238>
- 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.
- Fan, G., Yang, L., & Chen, Z. (2014). Water-soluble BODIPY and aza-BODIPY dyes: synthetic progress and applications. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 8(4), 405–417. <https://doi.org/10.1007/s11705-014-1445-7>
- Fargnoli, M. C., & Peris, K. (2015). Photodynamic therapy for basal cell carcinoma. *Future Oncology*, 11(22), 2991–2996. <https://doi.org/10.2217/fon.15.208>
- Felsher, D. W. (2003). Cancer revoked: Oncogenes as therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 375–380. <https://doi.org/10.1038/nrc1070>
- Güven, Ş. Y. (2014). Biyouyumluluk ve Biyomalzemelerin Seçimi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 2(3), 303-311–311.

- Hamblin, Michael R., Huang, Y. (2014). Handbook of Photomedicine - Google Kitaplar. Içinde CRC Press. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=kBDSBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=fn2pW65Uhf&sig=WuqULDVA-eCJXtADydTGS6Kr9Gk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Hamblin, M. R. (2020). Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue. *Photochemistry and Photobiology*, 96(3), 506–516. <https://doi.org/10.1111/php.13190>
- He, G. F., Bian, M. L., Zhao, Y. W., Xiang, Q., Li, H. Y., & Xiao, C. (2010). A study on the mechanism of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in vitro and in vivo in cervical cancer. *Oncology Reports*, 21(4), 861–868. <https://doi.org/10.3892/or>
- Hofman, J.-W., van Zeeland, F., Turker, S., Talsma, H., Lambrechts, S. A. G., Sakharov, D. V, Hennink, W. E., & van Nostrum, C. F. (2007). Peripheral and axial substitution of phthalocyanines with solketal groups: synthesis and in vitro evaluation for photodynamic therapy. *Journal of medicinal chemistry*, 50(7), 1485–1494. <https://doi.org/10.1021/jm061136w>
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(6), 907–920. <https://doi.org/10.1189/jlb.71.6.907>
- Islam, S., Bhuiyan, M. A. R., & Islam, M. N. (2017). Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *Journal of Polymers and the Environment*, 25(3), 854–866. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0865-5>
- Jhaveri, J., Raichura, Z., Khan, T., Momin, M., & Omri, A. (2021). Chitosan nanoparticles-insight into properties, functionalization and applications in drug delivery and theranostics. *Molecules*, 26(2). <https://doi.org/10.3390/molecules26020272>
- Kamkaew, A., Lim, S. H., Lee, H. B., Kiew, L. V., Chung, L. Y., & Burgess, K. (2013). BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, 42(1), 77–88. <https://doi.org/10.1039/c2cs35216h>
- Kanser Tedavisi ve Yöntemleri | Anadolu Sağlık Merkezi.* (y.y.). Tarihinde 06 Mayıs 2023, adresinden erişildi <https://www.anadolusaglik.org/kanserde-tedavi-yontemleri>
- Kelly, J. F., & Snell, M. E. (1976). Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *The Journal of urology*, 155(2), 150–151. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)59108-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)59108-9)
- Kessel, D. (1986). Proposed Structure of the Tumor-Localizing Fraction of Hpd (Hematoporphyrin Derivative). *Photochemistry and Photobiology*, 44(2), 193–196. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1986.tb03585.x>

- Kessel, D. (2006). Death pathways associated with photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, 21(4), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.mla.2006.05.006>
- Kessel, D., & Arroyo, A. S. (2007). Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 6(12), 1290–1295. <https://doi.org/10.1039/b707953b>
- Kessel, D., & Poretz, R. D. (2000). Sites of Photodamage Induced by Photodynamic Therapy with a Chlorin e6 Triacetoxymethyl Ester (CAME). *Photochemistry and Photobiology*, 71(1), 94. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)071<0094:sopibp>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)071<0094:sopibp>2.0.co;2)
- Kessel, D., & Reiners, J. J. (2007). Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochemistry and Photobiology*, 83(5), 1024–1028. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00088.x>
- Kessel, D., Vicente, M. G. H., & Reiners, J. J. (2006). Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38(5), 482–488. <https://doi.org/10.1002/lsm.20334>
- Kitsis, R. N., & Molkentin, J. D. (2010). Apoptotic cell death “nixed” by an ER-mitochondrial necrotic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), 9031–9032. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003827107>
- Koval', J., Mikeš, J., Jendželovský, R., Kello, M., Solár, P., & Fedoročko, P. (2010). Degradation of HER2 receptor through hypericin-mediated photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 86(1), 200–205. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00639.x>
- Kroemer, G., & Jäätelä, M. (2005). Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Reviews Cancer*, 5(11), 886–897. <https://doi.org/10.1038/nrc1738>
- Kue, C. S., Ng, S. Y., Voon, S. H., Kamkaew, A., Chung, L. Y., Kiew, L. V., & Lee, H. B. (2018). Recent strategies to improve boron dipyrromethene (BODIPY) for photodynamic cancer therapy: An updated review. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 17(11), 1691–1708. <https://doi.org/10.1039/c8pp00113h>
- Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106(June), 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
- Lan, M., Zhao, S., Liu, W., Lee, C. S., Zhang, W., & Wang, P. (2019). Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 8(13). <https://doi.org/10.1002/adhm.201900132>

- Lavie, G , Kaplinsky, C, Toren A, Aizman I, Meruelo D, Mazur Y, & M. M. (1999). A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyl tetrahydroxyhelianthrone and hypericin in leukaemic cell: possible relevance to photodynamic therapy. 79, 423–432.
- Li, B., & Wilson, B. C. (2015). Editorial: Introduction to the special issue on photodynamic therapy. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 8(1), 8–10. <https://doi.org/10.1142/S1793545815020010>
- Lipson RL, Baldes EJ, O. A. (1961). Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 42, 623–629.
- Maharjan, P. S., & Bhattarai, H. K. (2022). Singlet Oxygen, Photodynamic Therapy, and Mechanisms of Cancer Cell Death. *Journal of Oncology*, 2022(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2022/7211485>
- Maiuri, M. C., Criollo, A., & Kroemer, G. (2010). Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *EMBO Journal*, 29(3), 515–516. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.377>
- Mallidi, S., Anbil, S., Bulin, A. L., Obaid, G., Ichikawa, M., & Hasan, T. (2016). Beyond the barriers of light penetration: Strategies, perspectives and possibilities for photodynamic therapy. *Theranostics*, 6(13), 2458–2487. <https://doi.org/10.7150/thno.16183>
- Manganiello, L. O., & Figge, F. H. (1951). *Cancer detection and therapy. II. Methods of preparation and biological effects of metallo-porphyrins*. 36(1), 3–7.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., & White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(12), 961–967. <https://doi.org/10.1038/nrc2254>
- Mcdonnell, S. O., & Shea, D. F. O. (2006). Near-Infrared Sensing Properties of BF 2 – Azadipyromethenes. *Organic Letters*, 8(16), 3493–3496.
- McDowell, S. (2019). Immunotherapy How Immunotherapy Is Used to Treat. *Cancer*, 1–26. <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/6678.00.pdf>
- Moan, J., Sandberg, S., Christensen, T., & Elander, S. (1983). Hematoporphyrin derivative: chemical composition, photochemical and photosensitizing properties. *Advances in experimental medicine and biology*, 160, 165–179. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4406-3_16
- Mokoena, D. R., George, B. P., & Abrahamse, H. (2021). Photodynamic therapy induced cell death mechanisms in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910506>
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 3(2), 2516–2539.

<https://doi.org/10.3390/cancers3022516>

- Nagata, S., Obana, A., Gohto, Y., & Nakajima, S. (2003). Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). *Lasers in Surgery and Medicine*, 33(1), 64–70. <https://doi.org/10.1002/lsm.10190>
- Obeidin, V. A., Parlar, R. E., & ŞahİN, U. (2018). *Overinterne yönelik fotodinami terapi temelli kombinasyon terapi uygulaması*. 49(1), 36–43.
- Oleinick, N. L., Morris, R. L., & Belichenko, I. (2002). The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 1(1), 1–21. <https://doi.org/10.1039/b108586g>
- Özlük, A. A., Oytun, M. G., & Günenç, D. (2017). *Kanser immünoterapisi*. 2(1), 21–23. <https://doi.org/10.5606/fng.transplantasyon.2017.004>
- Pandya, A. D., Øverbye, A., Sahariah, P., Gaware, V. S., Høgset, H., Masson, M., Høgset, A., Mælandsmo, G. M., Skotland, T., Sandvig, K., & Iversen, T. G. (2020). Drug-Loaded Photosensitizer-Chitosan Nanoparticles for Combinatorial Chemo- And Photodynamic-Therapy of Cancer. *Biomacromolecules*, 21(4), 1489–1498. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00061>
- Peck, G. C., Mack, H. P., Holbrook, W. A., & Figge, F. H. (1955). Use of hematoporphyrin fluorescence in biliary and cancer surgery. *The American surgeon*, 21(3), 181–188. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14350210/>
- Periayah, M. H., Halim, A. S., & Saad, A. Z. M. (2016). Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research. *Pharmacognosy Reviews*, 10(19), 39–42. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.176545>
- Pettigrew, C.A., Cotter, T. G. (2009). Deregulation of cell death (apoptosis): Implications for tumor development. *Discovery Medicine*, 8(41), 61–63.
- Photodynamic Therapy (PDT): Procedure, Uses & Recovery*. (2022). <https://my.clevelandclinic.org/health/treatments/17922-photodynamic-therapy-pdt>
- Photodynamic therapy (PDT) - NHS*. (y.y.). Tarihinde 02 Ekim 2022, adresinden erişildi <https://www.nhs.uk/conditions/photodynamic-therapy/>
- Photodynamic Therapy to Treat Cancer-National Cancer Institute*. (2021). <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/photodynamic-therapy>
- Proskuryakov, S., & Gabai, V. (2009). Mechanisms of Tumor Cell Necrosis. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1), 56–68. <https://doi.org/10.2174/138161210789941793>
- Raab, O. (1900). Über die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien. *Zeitschr Biol*,

39, 524–546.

- Rathmell, J. C., & Thompson, C. B. (1999). The central effectors of cell death in the immune system. *Annual Review of Immunology*, 17(D), 781–828. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.781>
- Redmond, R. W., & Kochevar, I. E. (2006). Symposium-in-Print: Singlet Oxygen Invited Review Spatially Resolved Cellular Responses to Singlet Oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, 82, 1–178. <https://doi.org/10.1562/2006-04-14-1R-874>
- Reiners, J. J., Caruso, J. A., Mathieu, P., Chelladurai, B., Yin, X. M., & Kessel, D. (2002). Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves bid cleavage. *Cell Death and Differentiation*, 9(9), 934–944. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401048>
- Reiners, John J., Agostinis, P., Berg, K., Oleinick, N. L., & Kessel, D. (2010). Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*, 6(1), 7–18. <https://doi.org/10.4161/auto.6.1.10220>
- Rizeq, B. R., Younes, N. N., Rasool, K., & Nasrallah, G. K. (2019). Synthesis, bioapplications, and toxicity evaluation of chitosan-based nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22). <https://doi.org/10.3390/ijms20225776>
- Robertson, C. A., Evans, D. H., & Abrahamse, H. (2009). Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>
- Rustin, P. (2002). Mitochondria, from cell death to proliferation. *Nature Genetics*, 30(4), 352–353. <https://doi.org/10.1038/ng0402-352>
- Sarbadhikary, P., George, B. P., & Abrahamse, H. (2021). Recent advances in photosensitizers as multifunctional theranostic agents for imaging-guided photodynamic therapy of cancer. *Theranostics*, 11(18), 9054–9088. <https://doi.org/10.7150/thno.62479>
- Sasmal, P. K., Patra, A. K., Nethaji, M., & Chakravarty, A. R. (2007). DNA cleavage by new oxovanadium(IV) complexes of N-salicylidene alpha-amino acids and phenanthroline bases in the photodynamic therapy window. *Inorganic chemistry*, 46(26), 11112–11121. <https://doi.org/10.1021/ic7011793>
- Sasnauskiene, A., Kadziauskas, J., Vezelyte, N., Jonusiene, V., & Kirveliėne, V. (2009). Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis*, 14(3), 276–286. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0292-8>
- Savill, J., & Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407(October), 784–788. <https://doi.org/10.1038/35037722>

- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., & Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO Journal*, 26(7), 1749–1760. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601623>
- Semyachkina-Glushkovskaya, O. V., Sokolovski, S. G., Goltsov, A., Gekaluyk, A. S., Saranceva, E. I., Bragina, O. A., Tuchin, V. V., & Rafailov, E. U. (2017). Laser-induced generation of singlet oxygen and its role in the cerebrovascular physiology. *Progress in Quantum Electronics*, 55, 112–128. <https://doi.org/10.1016/j.pquantelec.2017.05.001>
- Shakil, M. S., Mahmud, K. M., Sayem, M., Niloy, M. S., Halder, S. K., Hossen, M. S., Uddin, M. F., & Hasan, M. A. (2021). Using Chitosan or Chitosan Derivatives in Cancer Therapy. *Polysaccharides*, 2(4), 795–816. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2040048>
- Sheng, W., Cui, J., Ruan, Z., Yan, L., Wu, Q., Yu, C., Wei, Y., Hao, E., & Jiao, L. (2017). [a]-Phenanthrene-fused BF₂ azadipyromethene (AzaBODIPY) dyes as bright near-infrared fluorophores. *Journal of Organic Chemistry*, 82(19), 10341–10349. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01803>
- Shi, Z., Han, X., Hu, W., Bai, H., Peng, B., Ji, L., Fan, Q., Li, L., & Huang, W. (2020). Bioapplications of small molecule Aza-BODIPY: From rational structural design to: From vivo investigations. *Chemical Society Reviews*, 49(21), 7533–7567. <https://doi.org/10.1039/d0cs00234h>
- Strømhaug, P. E., Berg, T. O., Berg, K., & Seglen, P. O. (1997). A novel method for the study of autophagy: Destruction of hepatocytic lysosomes, but not autophagosomes, by the photosensitizing porphyrin tetra(4-sulphonatophenyl)porphine. *Biochemical Journal*, 321(1), 217–225. <https://doi.org/10.1042/bj3210217>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Surgery for Cancer - NCI.* (2015). <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery>
- Szaciłowski, K., Macyk, W., Drzewiecka-Matuszek, A., Brindell, M., & Stochel, G. (2005). Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. *Chemical reviews*, 105(6), 2647–2694. <https://doi.org/10.1021/cr030707e>
- Szeimies, R. M. (2007). Methyl Aminolevulinate-photodynamic Therapy for Basal Cell Carcinoma. *Dermatologic Clinics*, 25(1), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.det.2006.09.008>
- Szumiel, I. (2005). L5178Y sublines: A look back from 40 years. Part 2: Response to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 81(5), 353–365.

<https://doi.org/10.1080/09553000500143534>

- Tabernilla, A., Rodrigues, B. D. S., Pieters, A., Caufriez, A., Leroy, K., Campenhout, R. Van, Cooreman, A., Gomes, A. R., Arnesdotter, E., Gijbels, E., & Vinken, M. (2021). In vitro liver toxicity testing of chemicals: A pragmatic approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22095038>
- Tan, S., Li, D., & Zhu, X. (2020). Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 124(November 2019). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109821>
- Tohme, S., Simmons, R. L., & Tsung, A. (2018). *Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases*. 77(7), 1548–1552. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1536>. Surgery
- Vento, S., & Cainelli, F. (2003). *Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: aetiology, prevention, and treatment*. 4, 595–604.
- Vidujith, A. V. A., Jayasinghe, C. D., De Costa, M. D. P., & Senthilnithy, R. (2022). Photodynamic Therapy: An Overview and Insights into a Prospective Mainstream Anticancer Therapy. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 9(3), 821–848. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.1000980>
- Weyergang, A., Berg, K., Kaalhus, O., Peng, Q., & Selbo, P. K. (2009). Photodynamic therapy targets the mTOR signaling network in Vitro and in Vivo. *Molecular Pharmaceutics*, 6(1), 255–264. <https://doi.org/10.1021/mp800156e>
- Xue, L. Y., Chiu, S. M., Azizuddin, K., Joseph, S., & Oleinick, N. L. (2007). The death of human cancer cells following photodynamic therapy: Apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy. *Photochemistry and Photobiology*, 83(5), 1016–1023. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00159.x>
- Yanat, M., & Schroën, K. (2021). Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging. *Reactive and Functional Polymers*, 161(February). <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.104849>
- Yangin, S., Tanman, Ü., & Cansaran-Duman, D. (2019). Pharmaceutical applications based on next generation sequencing technology in oncologic drug development. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 76(4), 473–486. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.33576>
- Ye, Y., Wang, L. X., Zhang, D. P., Yan, Y. J., & Chen, Z. L. (2015). Studies on photodynamic mechanism of a novel chlorine derivative (TDPC) and its antitumor effect for photodynamic therapy in vitro and in vivo. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1142/S1793545815400015>

- Yoo, J. O., & Ha, K. S. (2012). New Insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death. İçinde *International Review of Cell and Molecular Biology* (1. baskı, C. 295). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394306-4.00010-1>
- Zou, J., Yin, Z., Ding, K., Tang, Q., Li, J., Si, W., Shao, J., Zhang, Q., Huang, W., & Dong, X. (2017). BODIPY Derivatives for Photodynamic Therapy: Influence of Configuration versus Heavy Atom Effect. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(38), 32475–32481. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b07569>



7. ÖZGEÇMİŞ

