



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

**FOTOFİZİKSEL ÖZELLİKLERİ BELİRLENEN ALTIN VE
PLATİN İÇEREN BAZI BİLEŞİKLERİN POTANSİYEL ANTI-
KANSER AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağla SEVİNÇ

Danışman: Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN

İkinci Danışman: Prof. Dr. Nihal DELİGÖNÜL

TOKAT- 2023



Bu tez çalışması, 219Z081 nolu, Altın ve Platin İçeren Yeni Nesil Moleküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu adlı, TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu tarafından desteklenmiştir.

Bu tez çalışması, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2020/64 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tez çalışması, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç Dr. Ercan ÇAÇAN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Fotofiziksel Özellikleri Belirlenen Altın ve Platin İçeren Bazı Birleşiklerin Potansiyel Anti Kanser Aktivitelerinin Belirlenmesi” 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.

.../.../...

Çağla SEVİNÇ

JÜRİ KABUL VE ONAY

Çağla SEVİNÇ tarafından hazırlanan “**Fotofiziksel Özellikleri Belirlenen Altın ve Platin İçeren Bazı Bileşiklerin Potansiyel Anti-Kanser Aktivitelerinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 20/07/2023 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programı’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. Ali AYDIN

.....

Üye: Doç. Dr. Hüseyin AKBAŞ

.....

ONAY

...../...../.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, TÜBİTAK 1001 projesi, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu tarafından desteklenen: 219Z081 nolu, “Altın ve Platin İçeren Yeni Nesil Moleküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu” adlı proje kapsamında ve 2210-C öncelikli alanlara yönelik yurt içi yüksek lisans burs programı (2022/1) kapsamında TÜBİTAK bilim insanı destek programları başkanlığı (BİDEB) tarafından desteklenmiştir. Bir parçası olduğumdan dolayı kendimi şanslı hissettiğim değerli TÜBİTAK BİDEB ailesine, çalışmam boyunca gösterdikleri desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışma sürecinde her türlü yol gösterici olan, olumlu tavırlarıyla beni cesaretlendiren, bilgi birikimleriyle çalışmama farklı açılardan bakmamı sağlayan beraber çalışmaktan ve her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocalarım, Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN ve Prof. Dr. Nihal DELİGÖNÜL’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli zamanlarını ayırarak tez savunmamı kabul eden, kattıkları engin bilgileri ve düşünceleri için Sayın Prof. Dr. Şaban TEKİN, Doç. Dr. Ali AYDIN ve Doç. Dr. Hüseyin AKBAŞ’a teşekkür ederim.

Çalışma sürecimde bilgi ve desteklerini esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma ve değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Son olarak tüm hayatım boyunca yanımda olan, aldığım kararları her zaman destekleyen, sadece bu çalışma sürecinde değil her daim beni cesaretlendiren ve moral veren değerli aileme sonsuz şükranlarımı sunar ve teşekkür ederim.

Bu tezi aileme ithaf ediyorum.

Çağla SEVİNÇ

Temmuz 2023

ÖZET

FOTOFİZİKSEL ÖZELLİKLERİ BELİRLENEN ALTIN VE PLATİN İÇEREN BAZI BİLEŞİKLERİN POTANSİYEL ANTİ-KANSER AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Sevinç, Çağla

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ercan Çağan

İkinci Danışman: Prof. Dr. Nihal Deligönül

Temmuz 2023, xiii + 121 sayfa

Kanser dünya çapında başlıca ölüm nedenlerinden biridir ve son on yılda birçok araştırma, geleneksel tedavilerden daha etkin yeni tedaviler bulmaya odaklanmıştır. Kanser ilerlemesi sırasında, tümörler oldukça heterojen hale gelerek farklı moleküler özellikler ve terapilere farklı tepkiler ile karakterize edilen karma bir hücre popülasyonu yaratır. Bu heterojenlik tedavi uygulaması üzerine seçici bir baskı tarafından desteklenen dirençli fenotiplerin gelişiminden sorumlu bir faktör oluşturur. Tümör biyolojisini daha iyi anlamamızı sağlayan ve yeni nesil hedefli ilaçların tasarlanmasına yol açan temel araştırmalardaki ilerlemeye rağmen, kanser için son zamanlarda yapılan büyük klinik deneyler ve bazı dikkate değer istisnalar dışında, tedavi sonuçlarındaki yalnızca küçük farkları tespit edilebildi. Bu dikkatte değer gerçekler, daha fazla ilerleme kaydetmek için var olan ancak hâlâ yeterince takdir edilmeyen diğer terapötik yaklaşımlara vurgu yapılması gerektiğini göstermektedir. Fotodinamik terapi, şu anda karşılanmamış birçok tıbbi ihtiyacı karşılama potansiyeline sahiptir. Bu çalışmada, fotodinamik terapiye uygun, foto duyarlaştırıcı olan bodipy temelli altın ve platin içeren yeni nesil malzemeler ve bu malzemelerin kitosan ile biyoyumlu hale gelen formları kullanılmıştır. Bu yöntem ile yeni nesil metal komplekslerin yüksek toksik etkisini azaltarak, ilaç aktivitesini artırması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, yeni nesil metal komplekslerin ve biyoyumlu hallerinin fotodinamik terapi uygulanmadan ve uygulandıktan sonraki hedef kanser hücreleri (MCF-7, OV2008 ve HT-29) üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacı ile MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) testi yapıldı. MTT testi sonuçlarına göre, çalışmamız doğrultusunda hedeflediğimiz gibi metal içeren bu yeni nesil komplekslerinin biyoyumlu formlarının, metallerden kaynaklı sitotoksiteyi sınırladığı belirlendi. Ardından FDT uygulaması sonrası etkinliği belirlenmiş metal komplekslerin, hücre zarı bütünlüğü ve kanser hücre

hatlarındaki morfolojik farklılıkları belirlemek amacıyla LDH (Laktat Dehidrogenaz) testi ve kristal viyole ile boyama işlemi yapıldı. Bu aşamada hücrelerin ölüm yollarını belirlemek amacıyla apoptoz tahlili yapıldı. Bu tahlil için çalışmamızda FDT ile birlikte kullanılan kimyasalların (L1 ve L2 serisi) en yaygın ve etkin sitotoksik etki gösterdiği HT-29 (kolorektal kanser) hücre hattı seçildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre FDT ile kullandığımız bu yeni nesil metal bileşiklerinin kolorektal kanseri hücrelerinde (HT-29) nekrotik ve apoptotik süreci başlattığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Fotodinamik Terapi, Platin ve Altın, Anti-Kanser, Biyouyumlu Malzemeler, Kitosen, Işığa Duyarlılaştırıcı



ABSTRACT

INVESTIGATION OF POTENTIAL ANTI-CANCER ACTIVITIES OF SOME COMPOUNDS CONTAINING GOLD AND PLATINUM WHICH THE PHOTOPHYSICAL PROPERTIES HAVE BEEN DETERMINED

Sevinc, Cagla

Master's Thesis, Department of Biology

Advisor: Associate Prof. Dr. Ercan Cacan

Second Advisor: Prof. Dr. Nihal Deligonul

July 2023, xiii + 121 Pages

Cancer is one of the main causes of death worldwide, and over the past decade, many studies have focused on finding new treatments that are more effective than traditional treatments. During the progression of cancer, tumors become quite heterogeneous, creating a mixed population of cells characterized by different molecular properties and different responses to therapies. This heterogeneity constitutes a factor responsible for the development of resistant phenotypes supported by a selective pressure on the treatment application. Despite the progress in basic research that has allowed us to better understand tumor biology and led to the design of a new generation of targeted drugs, only small differences in treatment outcomes have been detected by recent large clinical trials for cancer and with some notable exceptions. These sobering facts suggest that in order to make further progress, emphasis should be placed on other therapeutic approaches that exist but are still underappreciated. Photodynamic therapy (PDT) has the potential to address many currently unmet medical needs. In this study, new generation materials containing gold and platinum based on bodipy, which are photosensitizing, suitable for photodynamic therapy, synthesized within the scope of TUBITAK 1001 project No. 219Z081, and forms of these materials that become biocompatible with chitosan were used. With this method, it is aimed to increase the drug activity by reducing the toxicity of new generation metal complexes. For this purpose, the MTT test was performed to determine the cytotoxic effects of new generation metal complexes and their biocompatible states on target cancer cells (MCF-7, OV2008 and HT-29) before and after photodynamic therapy (PDT) was applied. As a result of the MTT test, it was determined that the biocompatible forms of these new generation metal complexes limit the cytotoxicity of metal complexes, as we aimed in the direction of our study. Then, LDH test and crystal violet staining were performed to determine the morphological differences in cell membrane integrity and cancer cell lines of metal complexes whose

effectiveness was determined after PDT application. At this stage, an apoptosis assay was performed to determine the ways of death of the cells. For this analysis, the HT-29 (colorectal cancer) cell line was selected, in which the chemicals used in combination with PDT (L1 and L2 series) showed the most widespread and effective cytotoxic effect in our study. According to the results we obtained, it has been determined that these new generation metal compounds that we use with PDT initiate the necrotic and apoptotic process in colorectal cancer cells (HT-29).

Keywords: Photodynamic Therapy, Platinum and Gold, Anti-Cancer, Biocompatible Materials, Chitocene, Photosensitizer



İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME.....	
JÜRİ KABUL VE ONAY	
TEŞEKKÜR	
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kansere Genel Bakış	3
2.2. Kanser Hücrelerinin Ayırt Edici Özellikleri.....	4
2.3. Kanser Nedenleri.....	5
2.4. Kanser Tedavi Yöntemleri.....	6
2.5. Hücre Ölüm Yolları.....	6
2.5.1. Otofajik Hücre Ölümü	8
2.5.2. Nekrozis.....	8
2.6. Kanser ve Apoptoz	9
2.6.1. Apoptozdaki morfolojik değişiklikler.....	9
2.6.2. Apoptozdaki biyokimyasal değişiklikler	10
2.6.3. Apoptoz Mekanizmaları	14
2.6.4. Kanser tedavisinde apoptozu hedeflemek.....	15
2.7. Kanser Tedavisinde Fotodinamik Terapi	15
2.8. Fotodinamik Terapide Kullanılabilecek Potansiyel İlaçların Özellikleri	20
2.9. Metal Bazlı Fotoduyarlaştırıcıların Özellikleri	21
2.9.1. Azadipirometan (Aza-BODİPY)	21
2.10. Fotodinamik Terapide Metal Komplekslerinin Seçilmesinin Nedenleri.....	22
2.10.1. Altın Kompleksleri	23
2.10.2. Platin Kompleksleri	24
2.11. Biyouyumlu Malzemelerin Kullanım Alanları.....	25
2.12. Biyouyumlu Malzemeler ile İlaç Tasarımında Seçilen Hedefler	27
2.12.1. Şekli ve Boyutu.....	27
2.12.2. Yüzey Özellikleri.....	28
2.12.3. İlaç Yükleme ve Bırakma	28
2.13. Kitosan.....	28
2.13.1. Kanser Tedavisinde Kitosan Çalışmalarına Genel Bakış	29

2.13.2. Kitosan Temelli Hidrojellerin Özellikleri ve Farmasötik Uygulamaları	29
2.14. Çalışmanın Hipotezi	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	31
3.1. Materyal.....	31
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Hücre Kültürü ve Kimyasal Bileşiklerin Dozlarının Hazırlanması	33
3.2.2. Kimyasal Bileşiklerin Kitosen ile Kaplanması	37
3.2.3. Hücre Ekimi ve MTT Uygulaması	37
3.2.4. Fotodinamik Terapi Uygulaması	38
3.2.5. LDH Testi.....	39
3.2.6. Kristal Viyole ile Hücrelerin Boyanması.....	41
3.2.7 Annexin V bağlama deneyi	42
3.2.8. İstatistiksel Analiz ve Veri Görselleştirme	43
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	44
4.1. Hücre Canlılık Testleri (MTT)	44
4.1.1. L1 serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) normal ve kitosanlı hallerinin fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi	47
4.1.2. L1 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) farklı konsantrasyonlarda fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi	51
4.1.3. L2 serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi	55
4.1.4. L2 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) farklı konsantrasyonlarda fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi	59
4.1.5. L3 serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) farklı konsantrasyonlarda fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi	63
4.1.6. L3 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) farklı konsantrasyonlarda fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi	67
4.1.7. L4 serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi	71
4.1.8. L4 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) farklı konsantrasyonlarda fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi	75
4.1.9. L5 serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) normal ve kitosanlı hallerinin fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi	79
4.1.10. L5 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) farklı konsantrasyonlarda fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi	83

4.2. LDH Salınımı Kullanılarak Plazma Zarı Bütünlüğünün Ölçülmesi.....	87
4.2.1 FDT kullanılan bazı kimyasal ajanların FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra MCF-7 hücre hattındaki laktat dehidrogenaz enzim sızıntısının ölçümü	87
4.2.2. FDT kullanılan bazı kimyasal ajanların FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra OV2008 hücre hattındaki laktat dehidrogenaz enzim sızıntısının ölçümü	88
4.2.3. FDT kullanılan bazı kimyasal ajanların FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra HT-29 hücre hattındaki laktat dehidrogenaz enzim sızıntısının ölçümü	89
4.3. Kimyasal Ajanların İlavesinin Ardından Fotodinamik Terapi (FDT) Uygulanan Kanser Hücrelerindeki Morfolojik Farklılıklar	90
4.4. Akış sitometrisi ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi	94
4.5. FDT ile Kullanılan Kimyasal Bileşiklerin Kitosen ile Kaplanması'nın Temsili TEM Görüntüleri	98
4.6. Verilerin Tartışılması.....	100
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	104
6. KAYNAKLAR.....	107
7. EKLER	120
7.1. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Kimyasallar	120
8. ÖZGEÇMİŞ	120

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Kısaltmalar

AIF:	Apoptozu İndükleyen Faktör
Apaf-1:	Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör
ATP:	Adenozin Tri Fosfat
AZA-BODİPY:	Aza-Bor-Dipirometen
Bcl-2:	B Hücreli Lenfoma-2
CAD:	Kaspaz ile Aktive Olan DNaz
CED-4:	C. elegans Ölüm Geni
DAMP:	Tehlike ile İlişkili Moleküler Modeller
DISC:	Ölüme Neden Olan Sinyal Kompleksi
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
DMSO:	Dimetil sülfoksit
FADD:	Fas ile ilişkili Ölüm Alanı
FBS:	Fetal Bovine Serum
FD:	Foto Duyarlaştırıcı
FDA:	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FDT:	Fotodinamik Terapi
IARC:	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ICE:	İnterlökin-1 β -Dönüştürücü Enzim
IR:	Kızıl Ötesi
MLCT:	Liganddan Metale ve Metalden Liganda Yük Transferi
MTT:	(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür)
NuMa:	Nükleer Mitozla İlişkili Protein
PAMP:	Patojenle ile İlişkili Moleküler Modeller
PBS:	Fosfat Tamponlu Salin
ROS:	Reaksiyon Oksijen Türleri
Smac:	İkinci Mitokondri Kaynaklı Kaspaz Aktivatörü
TGI:	Tümör büyümesinin inhibisyonu
TNF:	Tümör Nekroz Faktör
TPP:	Tripoli Fosfat
TRADD:	TNF-1 ile ilişkili Ölüm Alanı
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 2.1. Global kanser vakaları (WHO - World Health Organization, 2020).	3
Şekil 2.2. GLOBOCAN 2020 verilerine göre, Türkiye’de her iki cinsiyet ve her yaştan yeni vaka sayısı (WHO - World Health Organization, 2020).	4
Şekil 2.3. Kanser ayırt edici özellikleri ile bu özellikleri etkinleştirici diğer tamamlayıcı ek özellikleri (Hanahan, 2022’den modifiye edildi).....	5
Şekil 2.4. Farklı Kanser Tedavisi Türleri (<i>BioRender</i> , 2023)	6
Şekil 2.5. Kanser Hücrelerinde Hücre Ölümü Türleri (<i>BioRender</i> , 2023).....	7
Şekil 2.6. Apoptozun başlıca moleküler yolları ile apoptotik ve apoptotik olmayan hücre ölümü arasındaki ilişkileri (Saraste & Pulkki, 2000)	12
Şekil 2.7. FDT’nin hastalar üzerinde uygulanmasının şematik gösterimi (<i>BioRender</i> , 2023).....	16
Şekil 2.8. Fotodinamik terapiye genel bakış (Hong ve ark., 2016a)	16
Şekil 2.9. Dokular boyunca ışık yayılımı (Ray ve ark., 2007)	17
Şekil 2.10. Basitleştirilmiş Jablonski diyagramı (Dai ve ark., 2012).....	18
Şekil 2.11. FDT yanıt veren kanser hücrelerinin apoptoz yolu ile ölümü (<i>BioRender</i> , 2023).....	19
Şekil 2.12. Metal komplekslerde gözlenen uyarılmış hal enerji transferi (tip II) (ChemDraw, 2023).....	20
Şekil 2.13. Azadipirometan-Aza-BODİPY kimyasal bileşiklerinin açık yapıları (ChemDraw, 2023).....	21
Şekil 2.14. Terapötik altın kompleksi (ChemDraw, 2023)	24
Şekil 2.15. Terapötik platin kompleksleri (ChemDraw, 2023).	25
Şekil 3.1. Kanserli hücre hatlarına kimyasal bileşiklerin ilavesi sonrası fotodinamik terapi uygulaması.....	39
Şekil 3.2. LDH enzim sızıntısı testinin 48. saatteki renk değişim görüntüsü.....	40
Şekil 3.3. Kanserli hücre hatlarının kristal viyole ile boyanması.....	41
Şekil 4.1. MCF-7 meme kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L1, L1-Au ve L1-Pt fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	48
Şekil 4.2. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L1, L1-Au ve L1-Pt fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	49
Şekil 4.3. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L1, L1-Au ve L1-Pt fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	50
Şekil 4.4. Şekil 4.4. MCF-7 meme kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L1 kitosanlı, L1-Au kitosanlı ve L1-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi..	52

Şekil 4.5. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L1 kitosanlı, L1-Au kitosanlı ve L1-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi..	53
Şekil 4.6. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L1 kitosanlı, L1-Au kitosanlı ve L1-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi.	54
Şekil 4.7. MCF-7 meme kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L2, L2-Au ve L2-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi.	56
Şekil 4.8. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L2, L2-Au ve L2-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	57
Şekil 4.9. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L2, L2-Au ve L2-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi	58
Şekil 4.10. MCF-7 meme kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L2 kitosanlı, L2-Au kitosanlı ve L2-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi..	60
Şekil 4.11. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L2 kitosanlı, L2-Au kitosanlı ve L2-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi.	61
Şekil 4.12. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L2 kitosanlı, L2-Au kitosanlı ve L2-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi.	62
Şekil 4.13. MCF-7 meme kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L3, L3-Au ve L3-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi.	64
Şekil 4.14. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L3, L3-Au ve L3-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi..	65
Şekil 4.15. HT-29 kolorektal kanser hücre hattında MTT yöntemi ile L3, L3-Au ve L3-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi.	66
Şekil 4.16. MCF-7 meme kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L3 kitosanlı, L3-Au kitosanlı ve L3-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi.	68
Şekil 4.17. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L3 kitosanlı, L3-Au kitosanlı ve L3-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi .	69

Şekil 4.18. HT-29 kolorektal kanser hücre hattında MTT yöntemi ile L3 kitosanlı, L3-Au Kitosanlı ve L3-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi.	70
Şekil 4.19. MCF-7 meme kanser hücre hattında MTT yöntemi ile L4, L4-Au ve L4-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	72
Şekil 4.20. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L4, L4-Au ve L4-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi.	73
Şekil 4.21. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L4 kitosanlı, L4-Au kitosanlı ve L4-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi.	74
Şekil 4.22. MCF-7 meme kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L4 kitosanlı, L4-Au kitosanlı ve L4-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi.	76
Şekil 4.23. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L4, L4-Au ve L4-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi.	77
Şekil 4.24. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L4 kitosanlı, L4-Au kitosanlı ve L4-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi.	78
Şekil 4.25. MCF-7 meme kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L5, L5-Au ve L5-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	80
Şekil 4.26. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L5, L5-Au ve L5-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi.	81
Şekil 4.27. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L5, L5-Au ve L5-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi	82
Şekil 4.28. MCF-7 meme kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L5 kitosanlı, L5-Au kitosanlı ve L5-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi.	84
Şekil 4.29. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L5 kitosanlı, L5-Au kitosanlı ve L5-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi.	85
Şekil 4.30. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L5 kitosanlı, L5-Au kitosanlı ve L5-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi..	86
Şekil 4.31. MCF-7 meme kanseri hücre hattında MTT testi sonucuna göre FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra IC50 değeri verdiği belirlenen kimyasal bileşikler	

ile muamele edilen MCF-7 hücre hatlarının, FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonraki durumlarının LDH enzim sızıntısı üzerine etkileri.....	88
Şekil 4.32. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında MTT testi sonucuna göre FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra IC50 değeri verdiği belirlenen kimyasal bileşikler ile muamele edilen OV2008 hücre hatlarının, FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra ki durumlarının LDH enzim sızıntısı üzerine etkileri.....	89
Şekil 4.33. HT-29 kanseri hücre hattında MTT testi sonucuna göre FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra IC50 değeri verdiği belirlenen kimyasal bileşikler ile muamele edilen HT-29 hücre hatlarının, FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonraki durumlarının LDH enzim sızıntısı üzerine etkileri.....	90
Şekil 4.34. MCF-7 meme kanseri hücre hattında kimyasal ajan ilavesi ile FDT uygulaması sonrası yumurtalık kanseri hücre hattındaki morfolojik farklılıkların mikroskop görüntüleri	91
Şekil 4.35. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında kimyasal ajan ilavesi ile FDT uygulaması sonrası yumurtalık kanseri hücre hattındaki morfolojik farklılıkların mikroskop görüntüleri	92
Şekil 4.36. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında kimyasal ajan ilavesi ile FDT uygulaması sonrası kolorektal kanserli hücre hattındaki morfolojik farklılıkların mikroskop görüntüleri	93
Şekil 4.37. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında L1-Au bileşiği ilavesi ile FDT uygulaması sonrası bu hücre hattındaki Annexin V bağlanması ile apoptoz ve nekrozun kantitasyonunun akış sitometrisi ile ölçümü.	95
Şekil 4.38. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında L1-Pt bileşiği ilavesi ile FDT uygulaması sonrası bu hücre hattındaki Annexin V bağlanması ile apoptoz ve nekrozun kantitasyonunun akış sitometrisi ile ölçümü.	96
Şekil 4.39. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında L2-Au bileşiği ilavesi ile FDT uygulaması sonrası bu hücre hattındaki Annexin V bağlanması ile apoptoz ve nekrozun kantitasyonunun akış sitometrisi ile ölçümü.	97
Şekil 4.40. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında L2-Pt bileşiği ilavesi ile FDT uygulaması sonrası bu hücre hattındaki Annexin V bağlanması ile apoptoz ve nekrozun kantitasyonunun akış sitometrisi ile ölçümü.	98
Şekil 4.41. L2 serisinden platinli bileşiğinin kitosen ile kaplanması sonucunda taramalı elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri.	99

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan makine ve teçhizat listesi.....	31
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler.....	32
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan kitler	33
Tablo 3.4. Kimyasal bileşiklerin moleküler ağırlıkları	35
Tablo 3.5. Kimyasal bileşiklerin stok çözeltilerin hazırlanması	35
Tablo 3.6. Kimyasal bileşiklerin dozlarının hazırlanması.....	36
Tablo 4.1. Kimyasal bileşiklerin normal ve kitosanlı hallerinin fotodinamik terapi uygulamadan gösterdikleri IC ₅₀ değerleri (N=Normal, K=Kitosanlı)	45
Tablo 4.2. Kimyasal bileşiklerin normal ve kitosanlı hallerinin fotodinamik terapi uygulaması sonrası gösterdikleri IC ₅₀ değerleri (N=Normal, K=Kitosanlı)	46

1. GİRİŞ

Teknoloji ve tıptaki gelişmelere rağmen, kanser dünyadaki en ölümcül hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir (Bradbury ve ark., 2003). Kanser tedavileri üzerine yaklaşık bir asırlık araştırmadan sonra bile, gelişmiş ülkelerdeki tüm kanser hastalarının üçte birinden fazlası teşhis konulduktan sonra beş yıl hayatta kalmayı başaramadığı bildirilmiştir (Gordon ve ark., 2018). Kanser insidansı artmaya devam ettikçe, kanser hastalarını teşhis etmek, önlemek ve tedavi etmek için mevcut teknikleri iyileştirmek ve yeni yöntemler bulmak oldukça önemli hale gelmiştir. Tam remisyona ulaşmak için en iyi fırsat erken teşhis olsa da, birçok kanser türü en erken aşamalarda belirgin semptomlar göstermez (Siegel ve ark., 2017). Sonuç olarak, kanser hastaları için her aşamada mümkün olan en etkili tedavileri geliştirmek ve uygulamak önemlidir.

Kanserin klinik yönetimi için terapötiklerin keşfi ve geliştirilmesi geleneksel olarak, *in vitro* testler, klinik öncesi hayvan çalışmaları ve klinik denemeler dahil olmak üzere birkaç farklı aşamada tanımlanır. Sonraki aşamaların odak noktası, hem güvenliği hem de etkinliği değerlendirmek olsa da, ilaç geliştirmenin erken aşamalarındaki çoğu çalışma, tek başına etkinliği belirlemeye odaklanır. Tümörden türetilen hücre dizileri, 1950'lerden beri anti-kanser ilaç keşfi ve *in vitro* etkinlik değerlendirmesi için temel dayanak noktası olmuştur (Goodspeed ve ark., 2016).

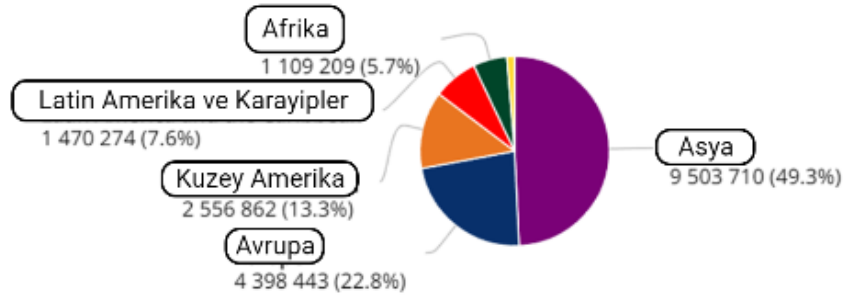
Bu tez çalışması kapsamında da fotodinamik terapi (FDT) yöntemine uygun yeni nesil BODİPY temelli metal komplekslerin ve bu komplekslerin biyoyumlu malzeme ile entegre edilmiş hallerinin *in vivo* yöntemler ile kanser hücre dizileri üzerindeki potansiyel anti-kanser aktivitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun için önce FDT'nin, kanser tedavisindeki rolünün iyi anlaşılması gerekmektedir. Fotodinamik terapi (FDT), malign hücrelere karşı seçici bir sitotoksik aktivite uygulayabilen, klinik olarak onaylanmış, minimal invaziv bir terapötik prosedürdür. Prosedür, bir ışığa duyarlı hale getirici ajan olan duyar arttırıcının uygulanmasını ve ardından bir absorbans bandına karşılık gelen bir dalga boyunda ışınlamayı içerir. Bu çalışma kapsamında BODİPY ve AZA-BODİPY esaslı duyar arttırıcılar kullanılmıştır. Duyar arttırıcılar FDT ve oksijen varlığında bir dizi olayı aktif hale getirerek doğrudan tümör hücresi ölümüne, mikrovaskülatürde hasara ve lokal bir inflamatuvar reaksiyonun indüklenmesine yol açar. Klinik çalışmalar, FDT'nin özellikle erken evre tümörlerde küratif olabileceğini ortaya koymuştur. Minimal normal

doku toksisitesi, ihmal edilebilir sistemik etkiler, büyük ölçüde azaltılmış uzun vadeli morbidite, içsel veya kazanılmış direnç mekanizmalarının olmaması ve bu tedavinin organ fonksiyonlarını koruyucu etkileri, onu kombinasyon tedavileri için değerli bir terapötik seçenek haline getirmiştir. Son biyoteknolojik gelişme ile FDT, kanser tedavisinin ana akımındaki tedavi yöntemleriyle birlikte kullanılma potansiyeline sahip olduğu öğrenilmiştir (Agostinis ve ark., 2011). Bu tez çalışması kapsamında FDT, metal (altın-platin) içeren yeni nesil malzemelerin, biyouyumlu malzeme olan kitosan ile birlikte entegre edilerek FDT’de kullanılmıştır. Metal bazlı kompleksler hakkında sisplatinin keşfinden bu yana terapötik uygulamalarda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Metal bileşiklerinin klinik kullanımından kaynaklanan zorluklara rağmen, kanser tedavisinde metal bazlı bileşiklere yönelik artan bir talep vardır. Bunun nedeni, metal bazlı bileşiklerin, özellikle yakın zamanda sentezlenenlerin sergilediği *in vitro* sitotoksik etkilerin seviyesi etkili olmuştur. Ancak metal bazlı birleşiklerin ağır atom etkilerinden kaynaklı toksisite özellikleri de mevcuttur. Bu yüzden ki metal içeren anti kanser özellik gösteren potansiyel ilaçların hedef kanser hücrelerine karşı *in vitro* sitotoksik aktivite gösterirken bir yandan da sağlıklı hücreler için toksik özelliklerini sınırlamak gereklidir. Bu noktada biyouyumlu malzemeler toksik etkiyi sınırlamamıza yardımcı olmuştur. Ayrıca bu çalışma kapsamında FDT ile birlikte kullanılan L2-Pt adlı bileşiğinin kolorektal kanser hücrelerini belirgin ölçüde apoptoza götürdüğü bulunmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kansere Genel Bakış

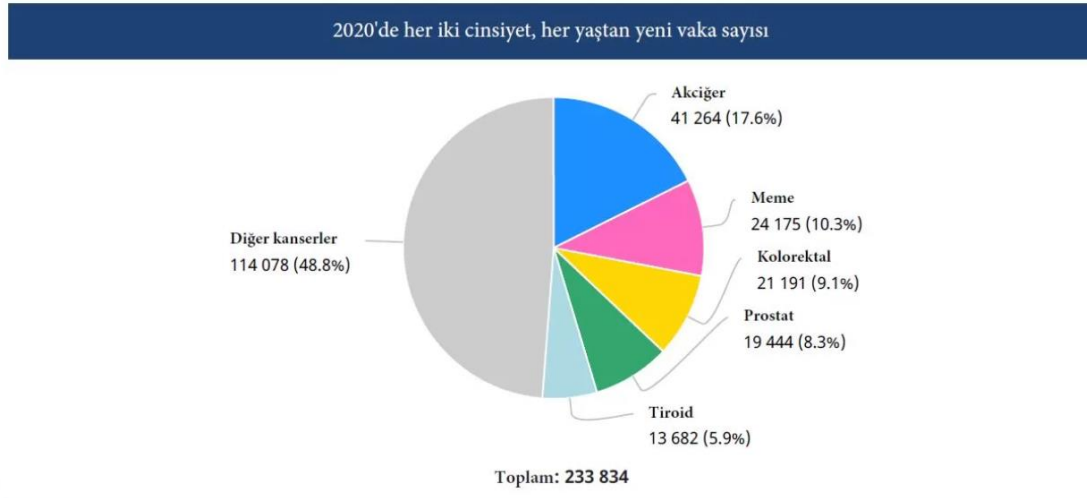
Hücrelerde meydana gelen DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalması kanser olarak tanımlanmaktadır. Çağımızın en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser yılda yüzbinlerce insanın ölümüne sebep olmakta ve kanser vakaları gün geçtikçe artmaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından üretilen GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında dünya çapında tahmini 19.3 milyon yeni kanser vakası (18,1 milyon melanom dışı cilt kanseri hariç) ve yaklaşık 10.0 milyon kanser ölümü (9.9 milyon melanom dışı cilt kanseri hariç) meydana gelmiştir. Yeni kanser vakalarında; kadın meme kanseri, en sık teşhis edilen kanser olarak 2.3 milyon yeni vaka (%11.7) ile akciğer kanserini geride bırakmıştır. Ardından akciğer (%11.4), kolorektal (%10.0), prostat (%7.3) ve mide (%5.6) kanserleri bu sıralamayı izlemiştir. Kanser ilişkili ölümlerde ise sırasıyla; akciğer kanseri, tahminen 1.8 milyon ölümle (%18) kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olmaya devam etmiş, bunu kolorektal (%9.4), karaciğer (%8.3), mide (%7.7) ve kadın meme (%6.9) kanserleri izlemiştir (Sung ve ark., 2021).



Şekil 2.1. Global kanser vakaları (DSÖ – Dünya Sağlık Örgü, 2020).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından üretilen GLOBOCAN verilerine göre, 2020 yılında ülkemizde en sık görülen ilk 5 kanser türü, akciğer kanseri, meme kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri ve tiroit kanseri olduğu bildirilmiştir. Bu 5

kanser türü, tüm kanserlerin %50'den fazlasını oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2.2), (GLOBOCAN, 2020).



Şekil 2.2. GLOBOCAN 2020 verilerine göre, Türkiye’de her iki cinsiyet ve her yaştan yeni vaka sayısı (DSÖ – Dünya Sağlık Örgütü, 2020).

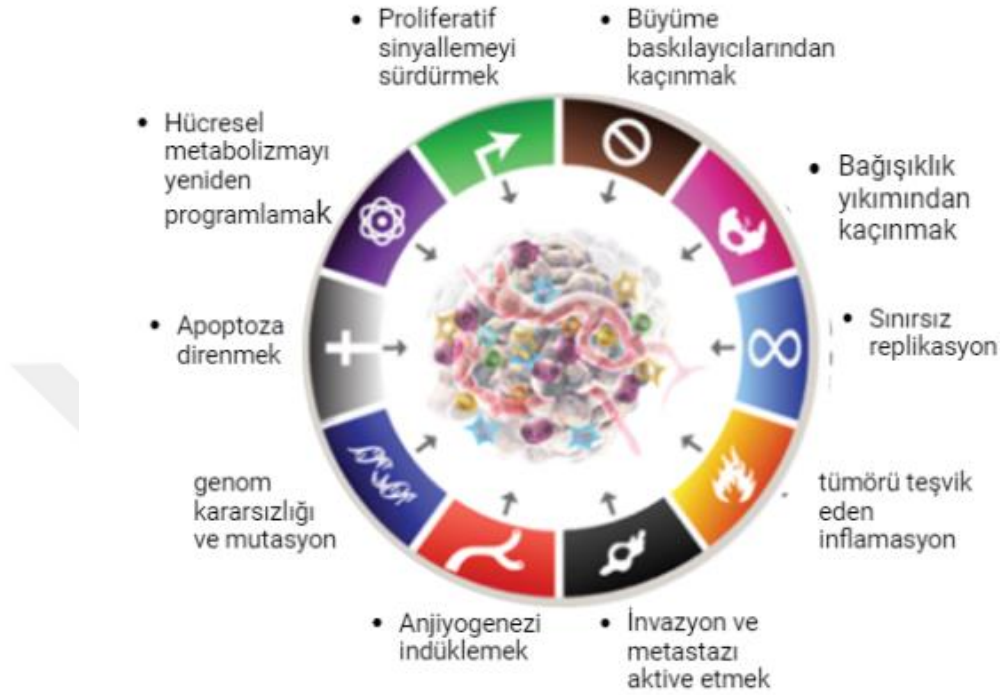
Bu çalışma kapsamında dünyada ve ülkemizde en sık görülen kanser türlerinden olan; meme kanseri, kolorektal kanseri ve diğerlerine kıyasla daha az insidansa sahip olsada bu kanser türüne sahip kişilerde ölüm oranı yüksekliği ile bilinen yumurtalık kanseri türleri seçilmiştir. 2020 GLOBOCAN verilerine göre, yumurtalık kanseri türünde 313.959 yeni vaka ile birlikte, 207.252 yeni ölüm sayısı bildirilmiştir (Sung ve ark., 2021).

2.2. Kanser Hücrelerinin Ayırt Edici Özellikleri

Kanserli hücreler kendilerine özel bazı ayırt edici karakteristik özellikler taşımaktadır. Bu ayırt edici özellikler, insan tümörlerinin çok aşamalı gelişimi sırasında kazanılan bazı biyolojik yetenekleri içermektedir (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000). Bu ayırt edici özellikler; proliferatif sinyallemeyle sürdürmek, büyüme baskılayıcılarından kaçınmak, apoptoza direnmek, sınırsız replikasyon, anjiyogenezi indüklemek, invazyon ve metastazı aktive etmek, hücre metabolizmayı yeniden programlamak ve bağışıklık yıkımından kaçınmak olarak tanımlanmıştır.

Bu özelliklerin yanı sıra ayrıca tümör büyümesi ve ilerlemesi için gerekli olan sekiz ayırt edici (işlevsel) yeteneğin etkinleştirilmesinde temel olarak yer alan kapsamı tamamlayan ikinci bir etkinleştirme özelliği olarak “genom kararsızlığı ve mutasyonu” ile “tümörü

teşvik eden inflamasyon” ilave ek özellik olarak belirtilmiştir (Hanahan, 2022b) (Şekil 2.3).



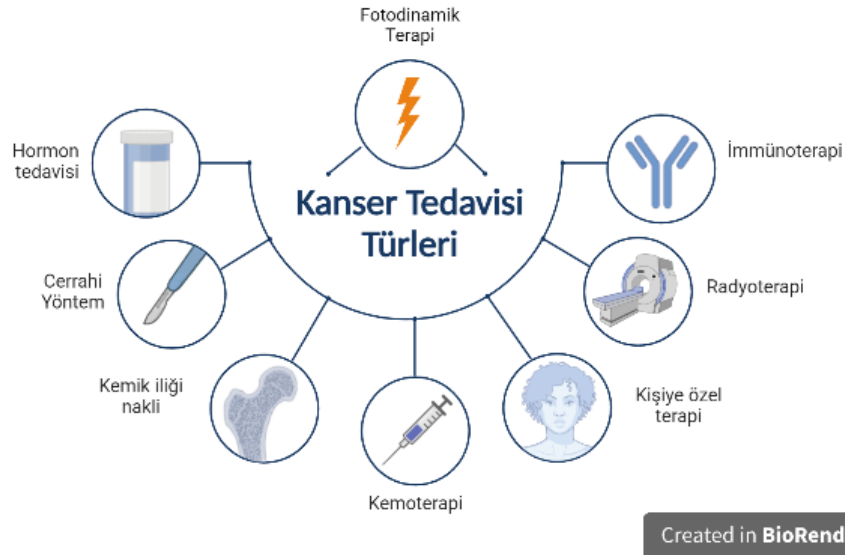
Şekil 2.3. Kanserin ayırt edici özellikleri ile bu özellikleri etkinleştirici diğer tamamlayıcı ek özellikleri (Hanahan, 2022’den modifiye edildi).

2.3. Kanserin Nedenleri

Kanserin kökeni ve ilerlemesi, hücre içindeki birçok faktöre (mutasyonlar, bağışıklık koşulları ve hormonlar) bağlı olduğu kadar çevreden gelen dış faktörlere de (sigara, kimyasallar, bulaşıcı organizmalar ve radyasyonlar) bağlıdır. Tüm bu unsurlar, anormal hücre davranışına ve kontrolsüz çoğalmaya neden olmak için birlikte hareket etmektedir. Vücutta ortaya çıkan kontrolsüz çoğalan hücreler büyür ve çevresindeki normal dokuları etkilemeye başlar. Bazen de metastatik özellik kazanarak vücuttaki diğer bölgelere de yayılmaya başlarlar (Ames ve ark., 1995).

2.4. Kanserde Tedavi Yöntemleri

Kanser, gelişmekte olan ülkeleri büyük ölçüde etkileyen küresel bir sorundur. Kanseri tedavi etmek ve yönetmek için kullanılabilen farklı geleneksel tedavi yöntemleri vardır. Bununla birlikte, dünya çapında mevcut tüm deneysel çalışmaların %60'ından fazlası tümör tedavisine odaklandığından, yeni kanser tedavisi seçenekleri sürekli olarak araştırılmaktadır. Tedavinin başarısı kanserin tipine, tümörün lokalitesine ve ilerleme aşamasına bağlıdır. Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi gibi geleneksel ve en yaygın kullanılan tedavi seçeneklerinden bazılarıdır. Modern tedavi yöntemlerinden bazıları ise hormon bazlı terapi, anti-anjiyojenik modaliteler, kök hücre terapileri ve dendritik hücre bazlı immünoterapiyi içermektedir (Abbas ve ark., 2018). Bunların yanı sıra son zamanlarda oldukça dikkat çeken ve bazı kanser türlerini tedavi etmek için şu anda ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onay almış olan tedavi yöntemlerinden biride fotodinamik terapidir (FDT). FDA tarafından onay almış olan ve FDT ile kullanılan porfimer sodyum (photofrin), yemek borusu kanserini ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserini tedavi etmek için kullanılmaktadır (Simone ve ark., 2012; Yano ve ark., 2014).



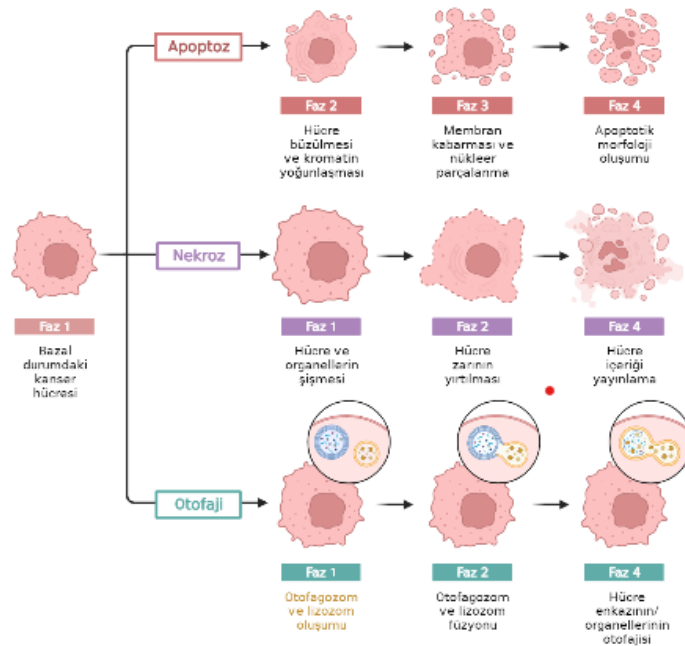
Şekil 2.4. Farklı Kanser Tedavisi Türleri (BioRender, 2023)

2.5. Hücre Ölüm Yolları

Hücre ölümünün fizyolojik ve patolojik işlevleri vardır. Birçok fizyolojik süreç, işlevleri gereği için hücre ölümünü gerektirir. Bu nedenle, her gün milyarlarca hücre ölür ve

fagositler tarafından hızla uzaklaştırılır. Bu ölü hücre temizleme mekanizması, normal koşullar altında sorunsuz bir şekilde çalışır. Bununla birlikte, enfeksiyon, kronik iltihaplanma ve doku hasarı gibi durumlarda çok sayıda hücre aniden öldüğünde ve biriktiğinde bu sisteme aşırı yüklenebilir. Ani ve kontrolsüz hücre ölümü, hücre içeriğinin hücre dışı boşluğa yoğun bir şekilde salınmasına neden olur. Serbest kalan moleküller, hasar sinyalleri olarak hareket eder, tehlike ile ilişkili moleküler modeller olarak bilinen, DAMP'ları uyarır.

Hücre dışı boşlukta DAMP'ların varlığı, tehdidi ortadan kaldırmak ve doku onarımını desteklemek için ek fagositleri ve diğer bağışıklık hücrelerini toplayan sağlam bir bağışıklık tepkisini ortaya çıkarır. Enfeksiyonlar sırasında, patojenle ilişkili moleküler modellerin (PAMP'ler) varlığı, enfeksiyonu kontrol etmek için spesifik antimikrobiyal bağışıklık tepkilerini ortaya çıkarır. Belirli durumlarda hücreler, bağışıklık tepkilerini uyarlamak için ölümlerini düzenleyebilir (veya "programlayabilir"), böylece ölümlerinin çevre üzerindeki etkisini değiştirebilir. FDT, üç ana hücre ölüm yolunu uyandırabilir. Bunlar: apoptotik, nekrotik ve otofaji ile ilişkili hücre ölümleridir. (Bertheloot ve ark., 2021) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Kanser Hücrelerinde Hücre Ölümü Türleri (BioRender, 2023)

2.5.1. Otofajik Hücre Ölümü

Otofaji, hücresel bileşenleri parçalamaya ve geri dönüştürmeye adanmış karmaşık, fizyolojik bir süreçtir. Proteinler ve organeller önce otofagozomlar tarafından fagosite edilir, daha sonra lizozomlarda sindirilir ve son olarak hücresel metabolizma sırasında tekrar kullanılmak üzere geri dönüştürülebilir. Otofajik hücre ölümü büyük hücre içi veziküllerin ortaya çıkması ve kendini yeme mekanizmasının birleşmesi ile karakterize edilmektedir. Otofaji terimi, makrootofaji, şaperon aracılı otofaji (CMA) ve mikrootofajiyi içeren, çeşitli hücrelerin bozulmasıyla sitoplazmik içerikleri lizozomlara iletmek için kullandığı, mekanik olarak farklı bir dizi işlemi tanımlar (Fleming ve ark., 2022). Makrootofaji, uzun ömürlü, kümelenmeye eğilimli proteinleri ve protein kompleksleri ile hasarlı haldeki işlevsiz organelleri parçalar (Russo & Russo, 2018). Mikrootofaji, lizozom zarının iç tarafa doğru çökmesi ile sitoplazmanın lizozom aracılığıyla direkt olarak alınması ve salgılarının lizozom içinde sindirilmesi işleminden sorumludur. Şaperon aracılı otofaji ise yanlış katlanmış proteinleri ve yanlışlıkla meydana gelmiş sitozolik proteinlerin bir grubunu indirgeyerek işlev yapmaktadır (Xie & Klionsky, 2007).

Otofaji birçok hastalığın fizyopatolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Kanser alanındaki çalışmalar, tümör biyolojisinde otofajinin ikili işlevlerini göstermiştir: otofaji aktivasyonu, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını (koruyucu otofaji) destekleyebilir veya kanser hücresi ölümüne katkıda bulunabilir (sitotoksik/koruyucu olmayan otofaji). Otofajinin kanser biyolojisindeki ikili rollerinin daha iyi anlaşılması, otofajik akışı indükleyebilen/geliştirebilen veya bloke edebilen yeni ilaçları tanımlamaya ve tasarlamaya yardımcı olabilir. Bu özelliklerin dokuya bağlı olması ve belirli bir tedavi süresiyle sınırlı olması gerekir. Birkaç ümit verici sentetik ve doğal bileşik tanımlanmıştır (Russo & Russo, 2018).

2.5.2. Nekrozis

Nekroz, sitoplazma ve organellerin şişmesi ve plazma zarı bütünlüğünün bozulması gibi karakteristik morfolojilerle tanımlanan hücre ölümüdür. Tarihsel olarak, nekroz genellikle fiziksel strese veya şiddetli sıcaklık, ozmotik değişim, oksijen ve besinlerin tükenmesi gibi aşırı hücre dışı koşullara maruz kalmanın neden olduğu hücre hasarı ile ilişkilendirilir. Bu gözlemler, nekrozun pasif ve düzensiz hücre ölümü olduğu

varsayımına yol açmaktadır. Kaspaz bağımlı apoptozun keşfi, nekrozun düzensiz olduğu fikrini daha da güçlendirdi. Bununla birlikte, son on yılda yapılan bir dizi çalışma, fizyolojik ve patolojik nekrozun düzenli bir şekilde ortaya çıkarılabileceğini göstermiştir (Chan, 2012).

2.6. Kanser ve Apoptoz

Apoptoz, fizyolojik ve patolojik koşullarda ortaya çıkan düzenli bir hücrel süreçtir (Wong, 2011). Hücre ölümü, özellikle apoptoz, muhtemelen hücre biyologları arasında en çok çalışılan konulardan biridir. Hastalık koşullarında apoptozu anlamak, yalnızca bir hastalığın patogenezi hakkında bilgi vermekle kalmaz, aynı zamanda hastalığın nasıl tedavi edilebileceğine dair ipuçları da bırakabileceği için çok önemlidir. Kanserde hücre bölünmesi ile hücre ölümü arasında bir denge kaybı vardır ve ölmesi gereken hücreler bu sinyalleri alamazlar. Bu sorun, apoptoz yolundaki herhangi bir adımda ortaya çıkabilmektedir. Bir örnek verecek olursak, bir tümör baskılayıcı gen olan *TP53*'ün aşağı regülasyonu, apoptozun azalmasına, tümörün büyümesine ve gelişiminin artmasına neden olmaktadır (Bauer & Helfand, 2006). Ayrıca bu konudan bağımsız olarak *TP53*'ün etkisizleştirilmesi bir çok insan kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Gasco ve ark., 2002; Morton ve ark., 2010). Böylelikle apoptoz, sorunun çözümü olduğu kadar sorunun da nedeni olabilir, çünkü artık birçok kişi apoptozun çeşitli yönlerini hedef alan yeni ilaçlar arayışına girmiştir (Baritaki ve ark., 2011; Jensen ve ark., 2008). Bu nedenle, apoptoz hem karsinogenezde hem de kanser tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır.

2.6.1. Apoptozdaki morfolojik değişiklikler

Apoptozun tanımı ilk olarak 1972'de Kerr ve diğerleri tarafından açıklanan elektron mikroskobu ile belirgin bir morfolojik özellik dizisine dayanıyordu (Allen & Newland, 1996; Kerr ve ark., 1972). Apoptozun başlangıcı, hücre ve çekirdeğin büzülmesi ve nükleer kromatinin, nükleer zarlara karşı marjinal hale gelen keskin bir şekilde sınırlandırılmış kütleler halinde yoğunlaşması ile karakterize edilir. Daha sonra, çekirdek giderek yoğunlaşır ve parçalanır (karyoreksis). Hücre çevre dokudan ayrılır ve dış hatları kıvrımlı hale gelerek uzantılar oluşturur. Tomurcuklanma terimi, uzantıların ayrıldığı ve plazma zarının, ayrılan katı hücrel materyalin etrafında ayrı bir zar oluşturmak üzere sızdırmaz hale geldiği bir işlem için türetilmiştir. Bu apoptotik cisimler, yakından paketlenmiş hücrel organeller ve çekirdek parçaları ile doludur. Zarlar ve mitokondri

dahil olmak üzere ince yapılar vücutların içinde iyi korunur. Parçalanmış hücre fagosite edilmezse, sekonder nekroz adı verilen bir süreçte nekroza benzeyen bir degradasyona uğrayabilir (Kerr ve ark., 1972).

Son araştırmalar, bir dizi anahtar proteinin aktive edilmiş kaspaz proteazlar tarafından proteolitik bölünmesinin, apoptotik morfolojinin gerçekleştirilmesinde rol oynadığını göstermektedir (Martin & Green, 1995a). Bu proteinlerin parçalanmasının apoptotik morfolojiye nasıl yol açtığının tam mekanizması bilinmemekle birlikte, kaspazların birçok hedef proteini, hücre şeklinin önemli bir belirleyicisi olan zarla ilişkili kortikal mikrofilament hücre iskeletinin oluşumuna ve düzenlenmesine katılmaktadır (Brown ve ark., 1997; Rudel & Bokoch, 1997). Gas2 veya gelsolin'in kaspazla bölünmüş formlarının aşırı ekspresyonu, apoptozu andıran hücre şeklinde değişikliklerle sonuçlanır (Brancolini ve ark., 1995; Kothakota ve ark., 1997). Ayrıca kalpainler gibi diğer proteazlar, hücre iskeletindeki apoptotik değişikliklerin sinyalleşmesinde yer almıştır (Wang ve ark., 1998).

Hücreden hücreye ve hücreden matrise bağlanma yerlerindeki iki protein kinaz da kaspazların hedefleridir. Kaspazlarla parçalanmaları, proapoptotik sinyalleşmenin daha da artmasına ve muhtemelen hücrenin çevre dokudan ayrılmasına yol açmaktadır (Cardone ve ark., 1997; Wen ve ark., 1997). Nükleer zarfın destekleyici yapısı olan nükleer laminanın parçalanması da apoptozda nükleer parçalanmanın önemli bir özelliğidir (Lazebnik ve ark., 1993). Bu süreç nükleer lamin A ve B'nin kaspaz aracılı yıkımına bağlıdır (Martin ve ark., 1996; Vanags ve ark., 1996). Kromatin yapısının düzenlenmesinde yer alan proteinler veya nükleer mitozla ilişkili protein (NuMa) gibi kromatin ve nükleer matriks proteinleri arasındaki etkileşimler de bölünür. Kaspaz proteazları, apoptotik cisimlerin komşu hücreler tarafından tanınmasına aracılık eden fosfatidil serinin dışsallaştırılmasında bile rol oynamıştır (Martin ve ark., 1996; Vanags ve ark., 1996).

2.6.2. Apoptozdaki biyokimyasal değişiklikler

Genel olarak, apoptozda üç ana tip biyokimyasal değişiklik gözlemlenebilir:

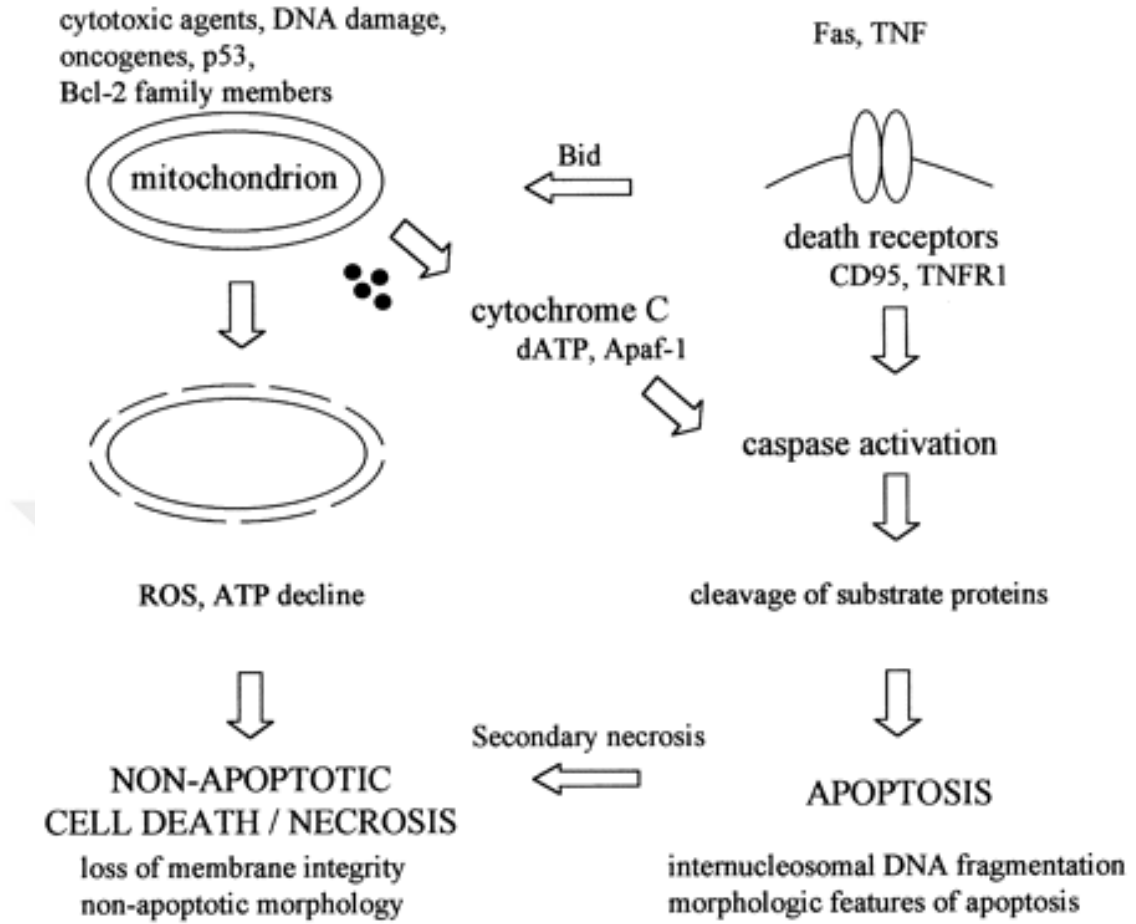
1. Kaspazların aktivasyonu
2. DNA ve protein parçalanması
3. Membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınma

Erken apoptozda, hücre zarının dış katmanlarında, iç katmanlardan "fırlatılmış" fosfatidilserin (PS) ekspresyonu vardır. Bu, ölü hücrelerin makrofajlar tarafından erken tanınmasına izin vererek, proinflatuar hücresel bileşenlerin salınması olmadan fagositozla sonuçlanır (Hengartner, 2001). Apoptozun diğer bir özelliği, kaspazlar olarak adlandırılan sistein proteaz ailesine ait bir grup enzimin aktivasyonudur (Kumar ve ark., 2014).

2.6.2.1. Kaspaz aktivasyonu

İnterlökin-1 β -dönüştürücü enzimin (ICE) yapısal olarak apoptoz oluşumu için gerekli olan *Caenorhabditis elegans* hücre ölüm proteini CED-3 ile ilişkili olması, ilk olarak ICE ve ilgili enzimlerin memelilerde apoptozda rol oynayabileceğini düşündürmüştür (Thornberry ve ark., 1992; Yuan ve ark., 1993). ICE , apoptozun yürütülmesinde önemli bir rol oynayan kaspazlar olarak adlandırılan bir proteaz ailesinin ilk üyesidir (Kuida ve ark.,; S. Kumar ve ark., 1994). Bir dizi genetik ve biyokimyasal çalışma, hücre ölümünün apoptotik fenotipinin ortaya çıkması için kaspaz aktivasyonunun gerekli olduğunu göstermektedir (Jänicke ve ark., 1998; McCarthy ve ark., 1997). Bununla birlikte, hücre ölümü kendi başına mutlaka kaspazlara bağlı değildir, çünkü kaspaz aktivitesi inhibe edildiğinde bile hücreler apoptotik olmayan bir morfoloji yoluyla ölür (Brunet ve ark., 1998; Hirsch ve ark., 1997; McCarthy ve ark., 1997).

Kaspazlar, substrat proteinlerini spesifik olarak bir aspartat kalıntısının arkasına ayıran sistein proteazlardır. Yapısal olarak oluşurlar ve normalde inaktif proenzimler olarak bulunurlar. Tam enzimatik aktivitenin indüksiyonu için, büyük ve küçük alt birimleri birbirinden ayıran spesifik iç aspartat kalıntılarında bölünmeye ihtiyaç duyarlar (Thornberry & Lazebnik, 1998a). Substrat özgüllüğü, prodomain yapısı ve biyolojik fonksiyon üzerine çalışmalar kaspazların apoptoz sırasında kendi kendini büyüten bir kaskadda aktive edildiğini ortaya çıkardılar (Slee ve ark., 1999). Proapoptotik sinyaller tarafından kaspazlar 2, 8, 9 ve 10 gibi yukarı akış kaspazlarının aktivasyonu, aşağı akış veya efektör kaspazlar 3, 6 ve 7'nin proteolitik aktivasyonuna yol açmaktadır. Efektör kaspazlar aslında bir dizi hayati proteini ayırır ve böylece DNA bozunması ve tipik morfolojik özellikler dahil olmak üzere apoptotik bozunma fazını başlatır ve yürütür (Martin & Green, 1995b; Thornberry & Lazebnik, 1998b).



Şekil 2.6. Apoptozun başlıca moleküler yolları ile apoptotik ve apoptotik olmayan hücre ölümü arasındaki ilişkileri (Saraste & Pulkki, 2000)

Kaspaz aktivasyonunun iki ana yolu karakterize edilmiştir. Biri, Fas ve TNF reseptörlerini içeren ölüm reseptörlerinin ligasyonu ile başlatılır. Kaspaz 8, bu yoldaki en apikal kaspazdır (Hirata ve ark., 1998; Srinivasula ve ark., 1996), reseptörlerdeki bir sinyal kompleksi tarafından aktive edilir (Ashkenazi & Dixit, 1998). Diğeri, mitokondriyal yol çeşitli sitotoksik ajanların, anormal onkogen ekspresyonunun ve p53'ün neden olduğu apoptotik sinyalleri entegre etmektedir (DR & JC, 1998; Kroemer ve ark., 1997). Bcl-2 ailesinin bazı apoptoz düzenleyici proteinlerinin hedefidir (Kluck ve ark., 1997; Yang ve ark., 1997). Aynı zamanda reseptör aracılı apoptozu güçlendirir (H. Li ve ark., 1998). Bu yolun ana kontrol noktası, sitokrom C'nin ve apoptozu indükleyen faktör AIF gibi diğer kaspaz aktive edici faktörlerin mitokondriyal transmembran boşluktan sitozole salınmasıdır (DR & JC, 1998b; Kluck, Martin, ve ark.,

1997; Kroemer ve ark., 1997b; X. Liu ve ark., 1996). Kaspaz 9, bu mitokondriyal apoptotik yoldaki en üst kaspazdır. Pro-kaspaz 9'un aktivasyonu, sitokrom C, apoptoz proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve dATP olarak adlandırılan *C. elegans* ölüm geni CED-4 homologu içeren bir sitozolik kompleks gerektirir (P. Li ve ark., 1997; Srinivasula ve ark., 1998). Mitokondriyal morfoloji bozulmadan kaldığından (Kerr ve ark., 1972b), apoptoz sırasında sitokrom C salınımının mekanizmaları tartışma konusu olmuştur. Mitokondriyal membran geçirgenliği geçişi ve ardından geçirgenlik geçişiyle ilişkili gözeneklerin açılması ve mitokondriyal matrisin şişmesi, dış mitokondriyal zarın yırtılması ve geçirgenlik geçişi öncesinde seçici salım kanallarının açılması önerilmiştir (P. Li ve ark., 1997a; Srinivasula ve ark., 1998a).

2.6.2.2. İnternükleozomal DNA fragmentasyonu

Apoptozun biyokimyasal ayırt edici özelliği, internükleozomal bölgeleri 180-200 baz çiftinden (bp) oluşan çift sarmallı DNA fragmanlarına bölen endojen DNazlar tarafından DNA'nın parçalanmasıdır (Wyllie, 1980). DNA fragmanları küt uçlar ve ayrıca tek baz 3' sarkıntıları içerir (Schwartzman & Cidlowski, 1993; Didenko & Hornsby, 1996). İnternükleozomal fragmentasyon, çok çeşitli durumlarda ve hücre tiplerinde iyi karakterize edilmiş apoptotik morfoloji ile gösterilmiştir (Bortner ve ark., 1995).

Çeşitli kaspaz substratları, DNA yapısının, onarımının ve replikasyonunun düzenlenmesinde yer alır (Nicholson & Thornberry, 1997). Apoptoz sırasında parçalanmadan sorumlu olan DNaz enzimleri arasında DNA parçalanma faktörü (DFF40) (X. Liu ve ark., 1998), kaspaz ile aktive olan DNaz (CAD) (Enari ve ark., 1998; Sakahira ve ark., 1998) ve hematopoietik hücrelerde NUC70 yer alır (Urbano ve ark., 1998). DFF40 ve CAD, normal hücrelerde inhibitör proteinler DFF45 ve ICAD (CAD inhibitörü) ile inaktif heterodimerler olarak bulunur. Bu enzimler, kaspaz 3 veya kaspaz ailesinin diğer üyeleri tarafından bölündükten sonra seçici olarak aktive edilir (X. Liu ve ark., 1997; Sakahira ve ark., 1998). Çekirdeklerin aktif CAD veya DFF40'a maruz kalması, apoptoza özgü nükleer morfolojik değişiklikleri indüklemek için yeterlidir (Enari ve ark., 1998b; X. Liu ve ark., 1998b). Büyük boyutlu (50-300 kbp) DNA fragmanlarının oluşumu, internükleozomal fragmentasyondan önce gelir, ancak yukarıda belirtilen DNazların bu süreçteki rolü araştırılmamıştır (Bortner ve ark., 1995b).

2.6.3. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz mekanizmalarını anlamak çok önemlidir ve düzensiz apoptozun bir sonucu olarak durumların patogenezinin anlaşılmasına yardımcı olur. Bu da, belirli apoptotik genleri veya yolları hedefleyen ilaçların geliştirilmesine yardımcı olabilir. Kaspazlar, hem başlatıcı hem de uygulayıcı oldukları için apoptoz mekanizmasının merkezinde yer almaktadır. Kaspazların aktive edilebileceği üç yol vardır. Yaygın olarak açıklanan iki başlatma yolu, apoptozun içsel (veya mitokondriyal) ve dışsal (veya ölüm reseptörü) yollarıdır. Her iki yol da sonunda ortak bir yola yani apoptozla sonlanır. Daha az bilinen üçüncü bir başlatma yolu ise intrinsik endoplazmik retikulum yoludur (O'Brien & Kirby, 2008).

2.6.3.1. Dışsal ölüm reseptörü yolu

Ekstrinsik ölüm reseptörü yolu, adından da anlaşılacağı gibi, ölüm ligandları bir ölüm reseptörüne bağlandığında başlar. Birkaç ölüm reseptörü tanımlanmış olmasına rağmen, en iyi bilinen ölüm reseptörleri tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve Fas (CD95) olarak adlandırılan ilgili bir proteindir ve bunların ligandları sırasıyla TNF ve Fas ligandı (FasL) olarak adlandırılır (Hengartner, 2001). Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) gibi adaptör proteinlerin yanı sıra kaspaz 8 gibi sistein proteazları alan bir hücre içi ölüm alanına sahiptir (Schneider & Tschopp, 2000). Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanması, bir adaptör protein için bir bağlanma sahasının oluşumuyla sonuçlanır ve tüm ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi, ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinir (Karp & Patton, 2009a; Schneider & Tschopp, 2000).

2.6.3.2. İçsel mitokondriyal yol

Adından da anlaşılacağı gibi, içsel yol hücre içinde başlatılır. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, son derece yüksek sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonları ve şiddetli oksidatif stres gibi dahili uyarılar, içsel mitokondriyal yolun başlatılmasının bazı tetikleyicileridir (Karp & Patton, 2009b). Uyarandan bağımsız olarak, bu yol, artan mitokondriyal geçirgenliğin ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınmasının sonucu gerçekleşir (Danial & Korsmeyer, 2004). Bu yol, foliküler non-Hodgkin lenfomada kromozom 18 ile 14'ün translokasyonunun kromozomal kırılma noktasında orijinal olarak gözlenen BCL2

geninden sonra adlandırılan Bcl-2 ailesine ait bir protein grubu tarafından yakından düzenlenir (Tsujimoto ve ark., 1984). Bcl-2 proteinlerinin iki ana grubu vardır, bunlardan biri proapoptotik proteinler (örn. Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk) diğeri ise anti-apoptotik proteinlerdir (örn. Bcl-2, Bcl-XL , Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1) Anti-apoptotik proteinler, sitokrom-c'nin mitokondriyal salınımını bloke ederek apoptozu düzenlerken, pro-apoptotik proteinler bu tür salınımı teşvik ederek etki gösterir. Apoptozun başlatılıp başlatılmayacağını belirleyen mutlak miktar değil, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengedir. Mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler arasında apoptoz indükleyici faktör (AIF), ikinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü (Smac), Düşük pI'li (DIABLO) doğrudan IAP Bağlayıcı protein ve Omi/A (HtrA2) bulunur. Sitokrom c'nin sitoplazmik salımı, sitokrom c, Apaf-1 ve kaspaz 9'dan oluşan apoptozom olarak bilinen bir kompleksin oluşumu yoluyla kaspaz 3'ü aktive etmektedir. Öte yandan Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2, apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) inhibitörüne bağlanarak kaspaz aktivasyonunu teşvik eder ve bu da daha sonra IAP'lerin kaspaz-3 veya kaspaz-9 ile etkileşiminde bozulmaya yol açmaktadır (LaCasse ve ark., 2008).

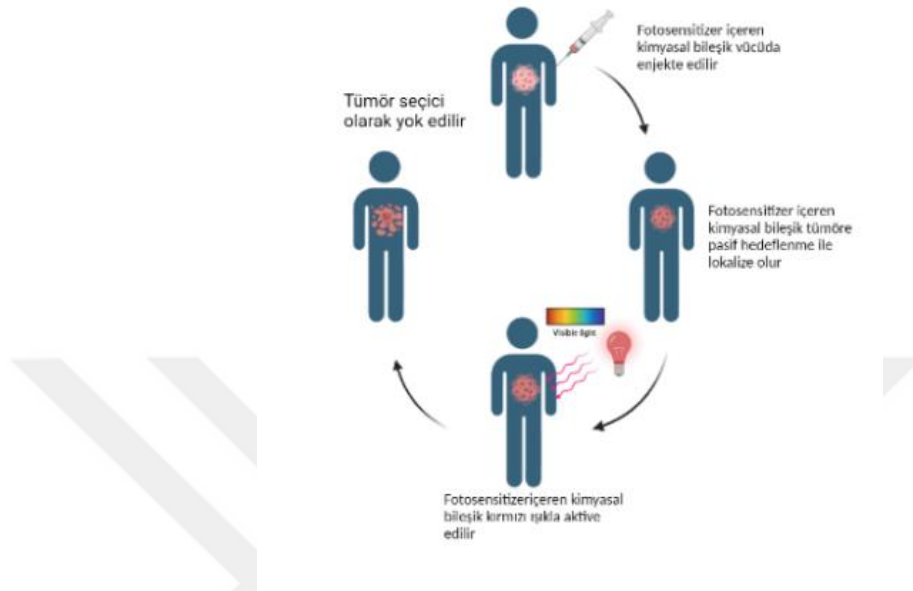
2.6.4. Kanser tedavisinde apoptozu hedeflemek

Kanseri tedavi etmenin bir yolu, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini kontrol altına almak ve sonlandırmaktır. Ölüm için hücrenin kendi mekanizmasını kullanmak oldukça etkili bir yöntemdir. Apoptozu hedeflemenin en başarılı yolları cerrahi olmayan tedavilerdir. Apoptozdan kaçınma, kanserin ayırt edici özelliği olduğundan ve kanserin nedenine veya türüne özgü olmadığından, apoptozu hedeflemek tüm kanser türleri için etkili bir yöntemdir (Bao ve ark., 2017; Liu & Zhu, 2017; Villa-Pulgarín ve ark., 2017). Hem içsel hem de dışsal yollarda çeşitli aşamaları hedefleyen birçok tedavi yöntemi vardır bunlardan biride fotodinamik terapidir (FDT).

2.7. Kanser Tedavisinde Fotodinamik Terapi

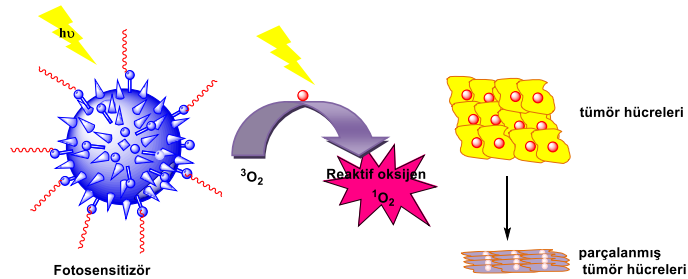
FDT, tümör hedefleme, minimal invazivlik, azaltılmış sistemik sitotoksisite, düşük maliyet ve maruz kalınan ışığın uzay-zamansal kontrolü gibi çeşitli avantajlara sahip olduğundan, diğer tedavilerin (cerrahi ve radyasyon tedavisi gibi) yanı sıra kanser tedavisinde giderek artan bir şekilde gelişmekte olan bir klinik araç olarak kabul edilmektedir (Dang ve ark., 2017). FDT, üç bileşenle ilişkilidir: toksik olmayan PS'ler,

ışık ve doku oksijenidir. FDT'deki genel iki ana adım, FD'lerin hastalara verilmesini ve ardından FD'leri aktive etmek için tümör dokularının belirli bir dalga boyunda bir ışıqla ışınlanmasını içermektedir (Şekil 2.6) (Agostinis ve ark., 2011).



Şekil 2.7. FDT'nin hastalar üzerinde uygulanmasının şematik gösterimi (BioRender, 2023).

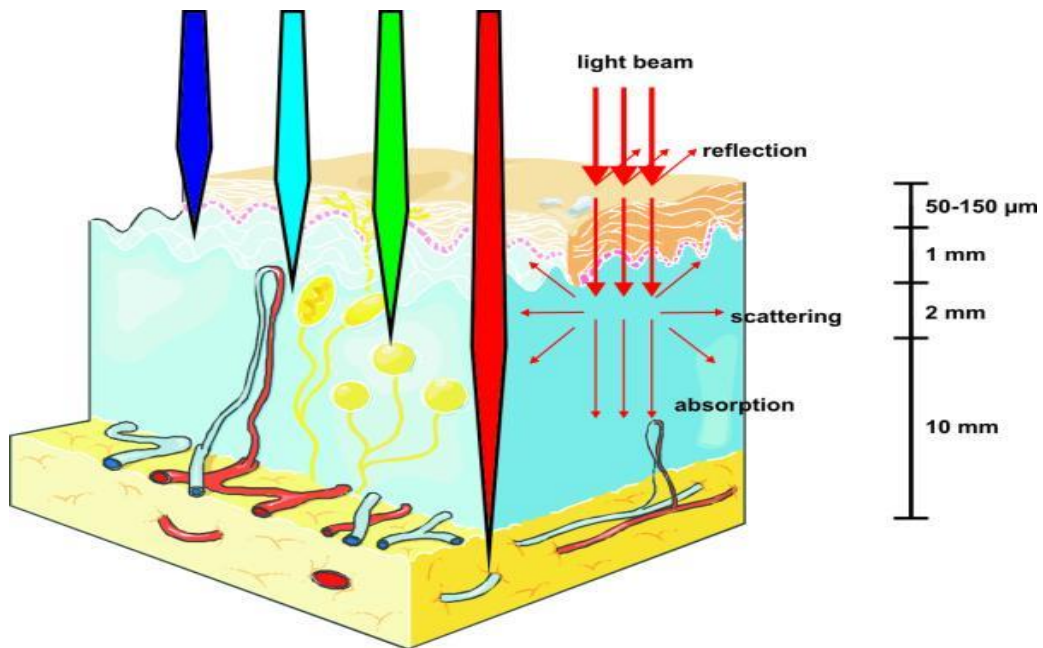
Bir boyayı foto duyarlaştırıcı olarak kullanma fikri, Prof. Dr. H. Tappeiner'in öğrencisi olan Oscar Raab tarafından yapılan bir gözlem sonucunda ortaya çıkmıştır. Profesör H. Tappeiner, fotobiyolojinin öncülerinden biri olarak kabul edilmektedir. H. Tappeiner ve ark. 1903-1905 yılları arasında FDT'nin etkinliğini araştırmaya başlamış ve "Fotodinamik Eylem" terimini (Photodynamische Wirkung) tanıtmışlardır. Aynı yıllarda H. Tappeiner ve grubu, FDT'nin tümörler, deri ve kondilomata lupus gibi diğer cilt hastalıkları üzerindeki etkisini araştırmaya başlamıştır (Abdel-Kader, 2014)



Şekil 2.8. Fotodinamik terapiye genel bakış (Hong ve ark., 2016a)

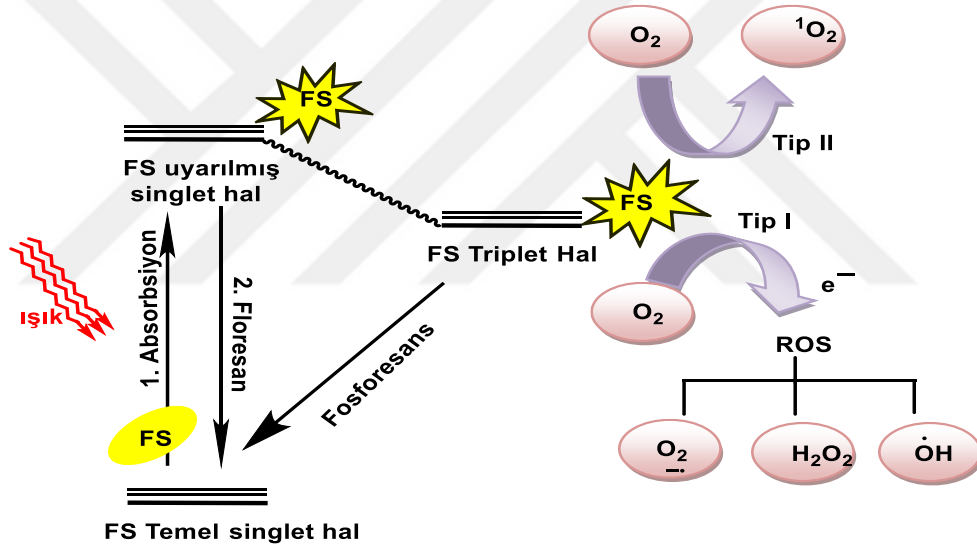
Günümüze kadar yapılan bu araştırmalar beraberinde FDT hakkında birtakım endişeleri de cevaplandırmaya başlamıştır. Örneğin, mevcut olan kanser tedavilerindeki önemli bir endişe kanserli hücreler dışında sağlıklı hücrelerinde bu süreçte hasar görebilmesidir. Yeni kanser tedavi çalışmaları bu endişelerin aşılması için yeni yöntemler geliştirmeyi hedeflemiştir. Fotodinamik terapi (FDT) de bu tedavi yöntemlerinden biridir. Fotodinamik terapi, fotoduyarlastırıcı ve ışık kaynağı kullanılarak kanserli hücreleri, sağlıklı hücrelere zarar vermeden tedavi edebilmektedir (Bonnett, 2002; DeRosa, 2002; Hong ve ark., 2016b)

Ayrıca fotodinamik terapi (FDT), sağlıklı hücrelere verilen zararı sınırlar çünkü ışığa duyarlastırıcılar anormal hücrelerde birikme eğilimindedir ve ışık doğrudan hastalıklı hücreye odaklanır. FDT'nin anormal hücrelere karşı etkili olabilmesi için ışığın dalga boyu oldukça önemlidir. Kırmızı ve kızılötesi radyasyonlar daha derine nüfuz ederken, mavi ışık dokudan en az verimli şekilde nüfuz etmektedir (Şekil 2.8). 600 ile 1200 nm arasındaki bölge genellikle dokunun optik penceresi olarak adlandırılır. Bununla birlikte, daha uzun dalga boyları bir fotodinamik reaksiyonu başlatmak için yetersiz enerjiye sahip olduğundan, yalnızca yaklaşık 800 nm'ye kadar olan ışık singlet oksijen ($^1O_2$) üretebilmektedir. Fotodinamik terapi böylelikle doku hasarına neden olmayacağı için bu yöntemin cilt kanserleri ve öncülleri bulunan insanların tedavisinde kullanımına uygun kılmaktadır (Agostinis ve ark., 2011).



Şekil 2.9. Dokular boyunca ışık yayılımı (Ray ve ark., 2007)

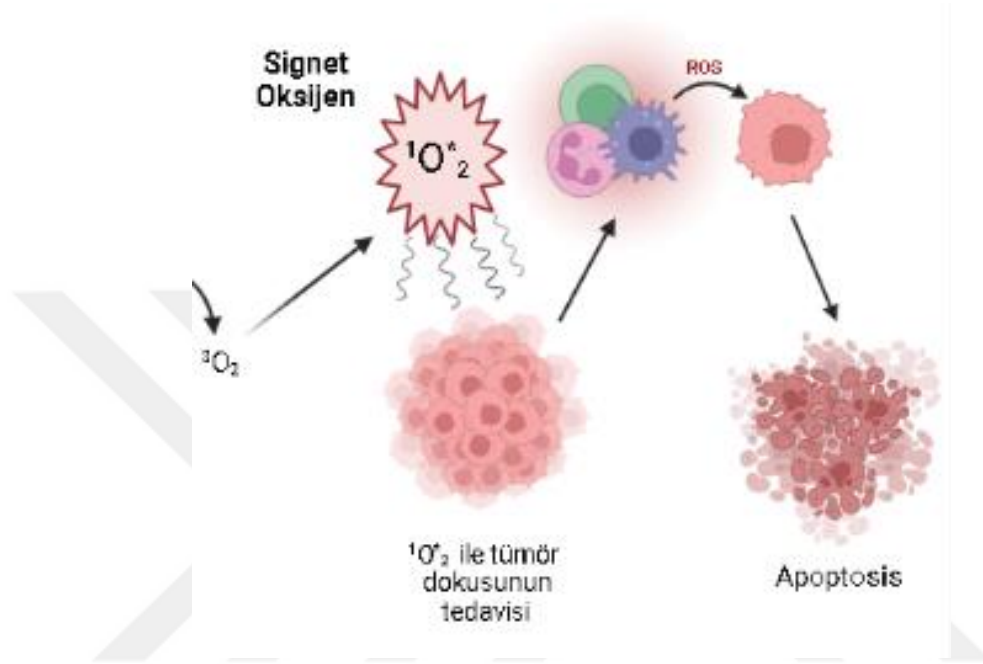
FDT, FDA tarafından aktinik keratoz, ileri kutanöz T hücreli lenfoma, barrett yemek borusu, bazal hücreli cilt kanseri, yemek borusu (boğaz) kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, skuamöz hücreli cilt kanseri (Evre 0) tedavisi için onaylanmıştır. FDT, ayrıca boğazı tıkadığında yemek borusu kanseri ve hava yollarını tıkadığında küçük hücreli olmayan akciğer kanseri semptomlarını hafifletmek içinde kullanılabilmektedir (Photodynamic Therapy to Treat Cancer - National Cancer Institute, 2023). FDT’ de kullanılan ilaçlar iki farklı yol üzerinden elektron ve enerji transferi sayesinde DNA hasarına sebep olurlar. Fotoduyarlastırıcıların çalışma mekanizmalarına göre tip I ve tip II reaksiyonlar olarak bilinirler. Tip I reaksiyonların işleyiş mekanizmaları hücrede reaktif oksijen oluşumu (ROS) üzerinden meydana gelmektedir (Şekil 2.9) (Ray ve ark., 2007)



Şekil 2.10. Basitleştirilmiş Jablonski diyagramı (Dai ve ark., 2012)

Işığa maruz kalma, bir ışığa duyarlastırıcı molekülü temel singlet durumundan (S_0) uyarılmış singlet durumuna (S_1) alır. S_1 'deki molekül, uyarılmış bir üçlü duruma (T_1) sistemler arası çaprazlama geçirebilir ve daha sonra tip I reaksiyon yoluyla radikaller oluşturabilir veya daha büyük olasılıkla enerjisini moleküler oksijene ($^3O_2$) aktarır. Singlet oksijen ($^1O_2$), FDT'de yer alan başlıca sitotoksik ajandır. Ancak, singlet oksijenin ($^1O_2$) ömrü çok kısadır ($\sim 10-320$ ns) ve hücrelerde difüzyonunu sadece yaklaşık 10-55 nm olduğundan sitotoksik özelliği böylelikle sınırlanmış olur (Dysart & Patterson, 2005). Işığa duyarlastırıcı ile yüklü tümör hücrelerinin ışık aracılı uyarılması,

bu hücreler içinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine yol açarak hücre ölümüne (ağırlıklı olarak apoptotik ve nekrotik) yol açmaktadır. FDT, üç ana hücre ölüm yolunu uyandırabilir. Bunlar: apoptotik, nekrotik ve otofaji ile ilişkili hücre ölümleridir. Apoptoz, FDT'ye yanıt veren hücrelerde genellikle önemli bir hücre ölümü modelidir. (Şekil 2.10)



Şekil 2.11. FDT yanıt veren kanser hücrelerinin apoptoz yolu ile ölümü (BioRender, 2023)

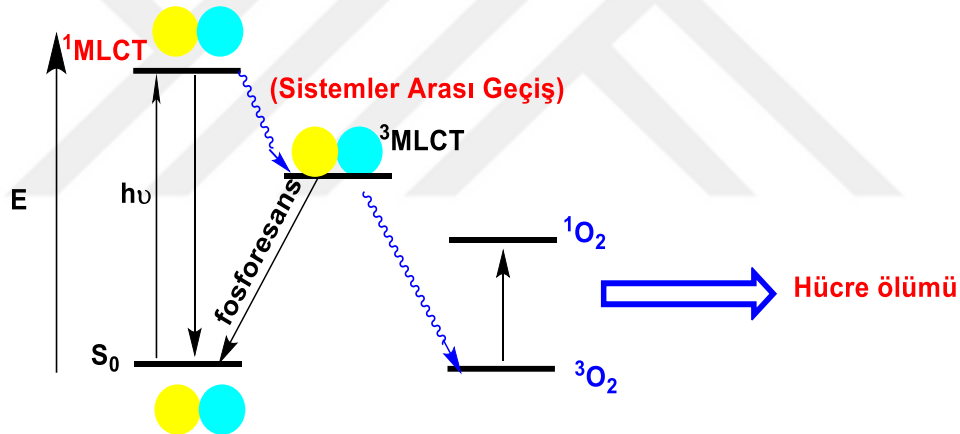
Apoptoz, morfolojik olarak kromatin yoğunlaşması, kromozomal DNA'nın internükleozomal parçalara bölünmesi, hücre büzülmesi, zar taşması ve plazma zarı parçalanmadan apoptotik cisimlerin oluşumu ile karakterize edilir. Tipik olarak apoptotik hücreler, kalan atıkların fagositik hücreler tarafından temizlenmesi için gerekli olan "beni bul" ve "beni ye" sinyallerini serbest bırakır. Biyokimyasal düzeyde, apoptoz, yüksek oranda korunmuş bir sistein bağımlı aspartat spesifik proteaz ailesi olan kaspazların aktivasyonunu gerektirir (Yano ve ark., 2014).

Tümör hücresi ölümü, oksijen ve besin tedarikini daha da kısıtlayan mikrovaskülatürdeki hasarla daha da güçlenir. Tümör hücre ölümüne kompleman kaskadının aktivasyonu, proinflamatuvar sitokinlerin salgılanması, nötrofillerin, makrofajların ve dendritik hücrelerin (DC'ler) hızlı alımı eşlik eder. Ölmekte olan tümör hücreleri ve tümör hücresi enkazı, yerel lenf düğümlerine göç eden ve profesyonel antijen sunan hücrelere

farklılaşan DC'ler dahil fagositik hücreler tarafından böylelikle fagosit edilir (Agostinis ve ark., 2011) Alternatif etki mekanizmalarından diğeri olan tip II reaksiyonlarında ise DNA hasarı; Foto duyarlaştırıcı (FD) olarak adlandırılan boyar maddenin ışıktan aldığı enerjiyi hücrelerde bulunan oksijene aktarabilmesi sayesinde meydana gelir. Tip II reaksiyonlarında, DNA hasarı; FD olarak adlandırılan boyar maddenin ışıktan aldığı enerjiyi hücrelerde bulunan oksijene aktarabilmesi sayesinde meydana gelir (Şekil 2.9). (Hofman ve ark., 2007)

2.8. Fotodinamik Terapide Kullanılabilecek Potansiyel İlaçların Özellikleri

Metal bazlı moleküller FDT kullanılan diğ grup FD türevlerindendir. Geçiş metali kompleksleri, yoğun görünür ışık Emilimi nedeniyle oldukça umut verici FDT ajanlarıdır. Genellikle platin ve palladyum ihtiva eden metal kompleksleri FD olarak kullanılmaktadır (Doherty ve ark., 2016)



Şekil 2.12. Metal komplekslerde gözlenen uyarılmış hal enerji transferi (tip II) (ChemDraw, 2023).

Metal esaslı FDT ajanları genişletilmiş π -sistemleri ve DNA ile yaptıkları güçlü etkileşimi sayesinde DNA hasarına sebep olurlar. Şekil 2.12’de verilmiş olan diyagram metal esaslı komplekslerin singlet oksijen oluşumunu göstermektedir. Metalden liganda olan yük transfer geçişlerinin düşük enerjide gerçekleşmesi (3MLCT) ve uyarılmış haldeki ömrün uzunluğu sayesinde reaktivitesi yüksek olan singlet oksijen ($^1O_2$) oluşumu metal esaslı fotoduyarlaştırıcılarda daha kolaydır. Bu da metal-bazlı bileşiklerin FDT ajanı olarak kullanılma potansiyelini artırmaktadır (Brenneman ve ark., 2002; Tang ve ark., 2009).

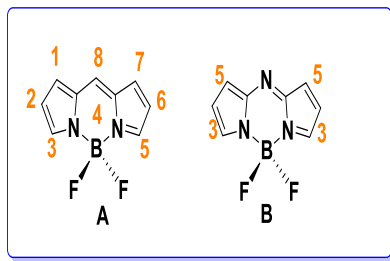
2.9. Metal Bazlı Fotoduyarlastırıcıların Özellikleri

Fotoduyarlastırıcı özellik gösterilen moleküllerin fotodinamik terapide ilaç olarak kullanılabilmesi için moleküllerde aranan özellikler aşağıdaki gibi sıralanır:

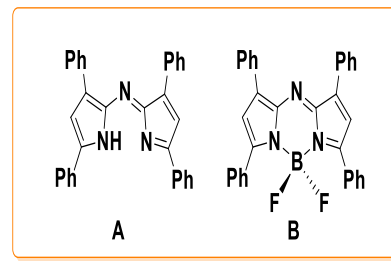
- 1) Fotoduyarlastırıcı'larda (FD) aranan en önemli özelliklerden biri kanserli hücrelerin karanlık toksisitelerinin düşük olmasıdır. Bu FD moleküllerinin kanserli hücrede kalarak diğer sağlıklı dokulara zarar vermeden vücuttan atılması için önem arz etmektedir (Detty ve ark., 2004).
- 2) Doku penetrasyonunun maksimuma çıkabilmesi ve doku hasarının minimuma indirilmesi için fotoduyarlastırıcı (FD) boyar maddelerinin yakın infrared (IR) bölgede emisyon yapabilme potansiyeline sahip olması beklenmektedir (Jaworski ve ark., 2014).
- 3) Fotoduyarlastırıcının ışıktan aldığı enerjiyi hücrelerde bulunan oksijene aktararak aktif hale getirebilmesi için, singlet uyarılmış halinden, triplet hale olan sistemler arası geçişlerin etkin olması gerekmektedir (Gorman ve ark., 2004).

2.9.1. Azadipirometan (Aza-BODİPY)

Azadipirrometanler 70 yıl önce mavi pigmentler olarak tanımlanmıştı, ancak şimdi yüksek molar absorbtivite katsayısı ve yakın IR bölgesindeki emisyon yapabilme kapasitesi ile öne çıkmış bir bileşik grubudur. 1940'ların başında aril grupları ile substitüe edilmiş ilk azadipirrometan bileşiği literatüre girmiştir (Rogers, 1943) Bu bileşiklerin altın çağı O'Shea grubunun yeni sentez yöntemleri kullanarak bu molekülleri literatüre tekrar tanıtması ile başlamıştır. Azadipirometan ligandının porfirin molekülüne olan benzerliği ve zengin foto fiziksel özellikleri birçok araştırmacının bu moleküllerle ilgili çalışma yapmasına sebeplerinden biri olmuştur (Gorman ve ark., 2004)



(A) BODIPY ve (B) Aza-BODIPY iskeleti



(A) azadipirometan, (B) BF₂-azadipirometan

Şekil 2.13. Azadipirometan-Aza-BODİPY kimyasal bileşiklerinin açık yapıları (ChemDraw, 2023)

2.10. Fotodinamik Terapide Metal Komplekslerinin Seçilmesinin Nedenleri

Geçmişte, metal bazlı bileşikler hastalık durumlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılıyordu, ancak terapötik ve toksik dozlar arasında net bir ayrım yapılmaması büyük bir zorluktu. 1960 yılında Barnett Rosenberg tarafından sisplatinin keşfi ile metal bazlı antikanser ilaçların modern çağının temelini oluşturmuştur. Sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin gibi platin ilaçları kanser tedavisinde kullanılan metal bazlı bileşiklerin başında gelmektedir (ve ark., 2017).

Etki mekanizması sisplatin gibi bilinen ilaçlardan farklı olan metal bazlı bileşiklerin ve klasik olmayan platin komplekslerinin diğer formlarını iyileştirmeyi ve geliştirmeyi amaçlamaktadır. Buna uygun olarak, ligand yerine kullanma yoluyla mevcut kimyasal yapı yeniden tasarlanarak veya yeni bileşiğin tamamının geliştirilmiş güvenlik ve sitotoksik profil ile oluşturulmasıyla daha birçok metal bazlı bileşik sentezlenmiştir. Bununla birlikte, metal bazlı komplekslerin klinik önemine artan vurgu nedeniyle, bu ilaçlardan birkaçı şu anda klinik deney aşamasındadır ve daha birçoğu araştırmaya katılmak için etik onay beklemektedir (Ndagi ve ark., 2017a).

Bazı metal bazlı bileşikler umut verici antikanser özelliklere sahip olduğundan sentezlenmiştir, bunların bazıları klinik uygulamada teşhis ve tedavi için halihazırda kullanımdayken bazıları klinik deneylerden geçmektedir (Ndagi ve ark., 2017b) Son zamanlarda sentezlenen metal bazlı bileşikler, orijinal bileşiğin ulaşamadığı belirli hedeflere ulaşmayı hedefleyen ilaç tasarımı ürünleridir ve bu tür bileşikler, farklı bir sitotoksikite spektrumu sergilemektedir. Bu gruptaki bileşikler aşağıdakileri bahsedilen özellikleri içermektedir.

Triplet fotosensitizör: singlet oksijen üretimini artırmada başvuru en önemli yöntemlerden birisidir. Triplet sensitizörler organik reaksiyonların katalizlenmesinde, foto-hidrojen üretimi ve fotodinamik terapide sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca triplet fotosensitizörlerin üretiminde ilk uyarılmış triplet halin dolu olması gerekir bu da ancak sistemler arası geçişlerle mümkün olur. Platin, altın, rutenyum vb. metal merkezlerinin varlığı bu geçişleri ve kuantum verimini artırır (Mai ve ark., 2022; Nardon ve ark., 2014).

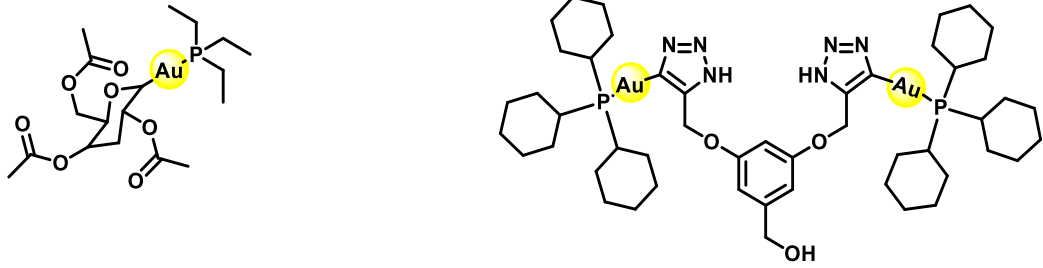
Görünür bölgede kısa dalga boylu ve kısa ömürlü zayıf absorpsiyon yapan moleküller FDT uygulamaları için uygun olmadığından, görünür bölgede güçlü absorpsiyon yapabilen ve uzun ömürlü güçlü floresan özelliğe sahip moleküllerin tasarlanması her zaman FDT uygulamaları için ana hedef olmuştur (Li ve ark., 2020). Sistemler arası geçişler fotosensitizörler için önem arz eden parametrelerdendir. Proje kapsamında kanser hücre hatlarında denenmesi hedeflenen metal merkezleri FDA tarafından insan deneylerinde kullanılmasına izin verilen metal merkezleridir (*Novel Drug Approvals for 2015* | FDA, 2015).

2.10.1 Altın Kompleksleri

Altın komplekslerinin sitotoksik özelliği son zamanlarda dikkatleri üzerine çekmiştir. Altın(III) kompleksleri, sisplatine alternatif potansiyel antitümör özelliklere sahip, gelişmekte olan bir metal kompleksleri sınıfıdır. Bu esas olarak, sisplatine olmayan antitümör mekanizması yoluyla sergilenen olağanüstü sitotoksik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu ilaçları tasarlamamanın temel amacı, çok etkili, daha az toksik ve enzimlerin aktif bölgesine seçici olarak bağlanan bir ürüne sahip olmaktır (Zou ve ark., 2015). Altın(III) komplekslerinin tioredoksin redüktaz (TrxR) gibi tiyol içeren enzimlere seçicilik potansiyeli, onu enzimin aktif bölgesindeki kalıntılara seçici olarak bağlanabilen bileşiklerin tasarlanmasında çekici bir sonda yapar (Gao ve ark., 2012; Zou ve ark., 2015).

‘Ridaura’ ticari adı ile piyasaya sunulan ve eklem iltihaplarının tedavisinde kullanılan ‘Auranofin’ olarak bilinen bileşiğin FDA tarafından kullanımının onaylanmasından sonra altın ihtiva eden bileşiklere olan ilgiyi hızla artırmıştır (Şekil 2.12) Daha sonra bu bileşik ve türevleri üzerine yapılan çalışmalar altın bileşiklerinin anti kanser tedavisinde de kullanılabileceğini göstermiştir (Fuhrmann ve ark., 2015) Altın bazlı bileşikler ile yapılan birçok biyolojik aktivite çalışmaları bu bileşiklerin iyi birer anti kanser ajanı olarak davrandığını göstermiştir (Nobili ve ark., 2009)

Altın nano partiküller, fotodinamik terapide sistemler arası geçişleri kolaylaştırdıkları için sıklıkla kullanılmaktadırlar. Yapılan çalışmada altın dendrimerlerin sitotoksik etki gösterdikleri belirlenmiştir. Filipovska ve arkadaşları bis(difosfin) altın(I) katyonlarının meme kanserinde apoptosizi başlattığını göstermişlerdir (Rackham ve ark., 2007). Bununla birlikte altın bağlı organik bileşiklerde, altının triplet hal geçişlerini promote ettiği bilinmektedir (Şekil 2.14) (Jaworski ve ark., 2014).



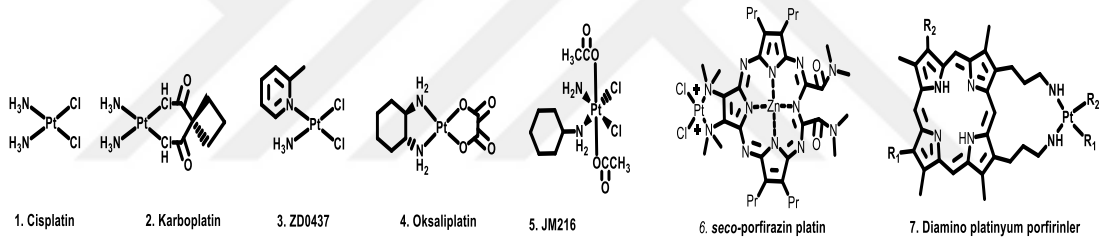
Şekil 2.14. Terapötik altın kompleksi (ChemDraw, 2023)

Fotosensitizörün, triplet kuantum verimi ve ömrü (lifetime) singlet oksijen üretimi ile direkt olarak ilgilidir (Guldi ve ark., 2000). Yapılan çalışmalar bazı ağır metallerin varlığının sistemler arası geçişleri artırdığı göstermiştir. Genellikle diamanyetik karaktere sahip metal merkezleri kullanılarak yapılan çalışmalarda sistemler arası geçişleri attığı ve triplet ömrünün uzadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte paramagnetik yapıya sahip metallerin tam tersi şekilde etki ettiği gözlenmiştir. Bu veriler göz önünde bulundurularak, karanlık toksisitesi düşük, diamagnetik karaktere sahip olan altın komplekslerinin çalışma kapsamına alınmıştır (Ball ve ark., 1998; Guldi ve ark., 2000). Bir molekülün fotodinamik terapide kullanılabilmesi için moleküllerin molar absorbtivitelevlerinin yüksek olması istenir çünkü bu durum sistemler arası geçişlerin singlet oksijen üretimini artırabilir. Organo altın komplekslerinin triplet kuantum veriminin yüksek olduğu bilinmektedir. Ayrıca altın ihtiva eden azadipirometan komplekslerin molar absorbtivitelevlerinin de yüksek olduğu önceki literatür çalışmalarında belirlenmiştir (Chen ve ark., 2020; Gao ve ark., 2012). Bu nedenle altın içeren yeni azadipirometan komplekslerinin daha az doku hasarına sebep olan ve daha yüksek verimle singlet oksijen üretebilen sensitizör olarak kullanılabilme potansiyelleri mevcuttur (Gao ve ark., 2012a).

2.10.2 Platin Kompleksleri

Günümüzdeki kanser tedavilerinin birçoğunda hala etkin olarak sisplatin kullanılmaktadır. Sisplatin bilinen yan etkilerine rağmen, birçok kanserin tedavisinde kullanılan %90 başarı oranına sahip inorganik bir bileşiktir. Platin esaslı bu moleküller, büyük bir başarı ile kanserli hücreyi yok etmelerine rağmen bu bileşiklerin iki büyük dezavantajı bulunmaktadır. Bunlardan birincisi platine dayanıklı tümörlerde etkisiz olmaları ve ikincisi ise nefrotoksisiteye sebep olmasıdır. Karboplatin ve cisplatin FDA

tarafından onaylanmış ve klinik çalışmalarda halen kullanılmakta olan ilaçlardır (Şekil 2.15) (Josefsen & Boyle, 2008; Zhang ve ark., 2003). Yapılan çalışmalar ZD0437, oksaliptatin ve JM216 gibi moleküllerin de iyi birer anti kanser ajanı olarak kullanılma potansiyeli olduğunu göstermiştir. Ancak birçok platin bazlı ilaç, esas olarak doza bağlı yan etkiler veya sisplatine direnç nedeniyle, sisplatine bir alternatif bulma girişiminde klinik deneylerle taranmıştır. Bu ilaçların sisplatine göre üstün avantajlarının olmaması, çalışmanın askıya alınmasına yol açmıştır. Klinik çalışmalarda durdurulan platin ilaçları arasında sebriplatin, spiroplatin, sikloplatin, miboplatin, SPI-077, aroplatin, BBR3464, TRK-710, iproplatin, zeniplatin, enloplatin, ormaplatin JM 11 ve NSC 170898 bulunmaktadır (Ndagi ve ark., 2017c). Her ne kadar doza bağlı yan etkileri olsa da mevcut FDA tarafından onaylanmış platin içerikli kanser ilaçların başarısı da göz ardı edilmemelidir. Bu noktada mevcut yan etkileri nasıl minimum seviyeye indirenebilir ve kullanılan mevcut ilaçlara nasıl alternatif sağlanabilir sorusuna bu çalışma kapsamında da cevap aranmıştır.



Şekil 2.15. Terapötik platin kompleksleri (ChemDraw, 2023).

Ayrıca platin bazlı fotosensitizörlerin son dönmlerde gösterdiği başarı, bu bileşiklerin fotodinamik terapide kullanımının birçok avantajının olduğunu da göstermiştir. Platin esaslı fotosensitizörlerde ağır-metal etkisinin sebep olduğu spin-orbit etkileşimlerinin sistemler arası geçişler sayesinde etkin singlet oluşumunu artırdığı bilinmektedir (Doherty ve ark., 2016) Benzer etkilerin yeni azadipirometan ligandlarında da gözlenmesi beklenmektedir.

2.11. Biyouyumlu Malzemelerin Kullanım Alanları

Metal koordinasyonlu bileşiklerinin kanser hücrelerine karşı sitotoksik potansiyeli geniş çapta kabul görmektedir, ancak bunların sıklıkla düşük suda çözünürlükleri ve biyolojik

ortamdaki metal iyonlarının potansiyel olumsuz etkileşimleri, hedef bölgelere etkili taşıma ve dağıtım sağlamak için uygun platformlara dahil edilmelerini gerektirir.

Polimer nanopartiküller, biyomedikal alanda hastalıkların tanı ve tedavisinde araçlar olarak yaygın bir şekilde uygulanmaktadır (Uthaman ve ark., 2015). Bir dağıtım taşıyıcısı olarak, polimer nanopartiküller birden fazla ilacı adsorbe edebilir veya bunlarla yüklenebilir ve ilaçların salımını daha etkili bir şekilde kontrol edebilir. Ek olarak, polimer nanopartiküller ilaçları yüzeylerinde kapsülleyebilir. Bu polimer bazlı nanoparçacıkların hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere sahip molekülleri hedefleme ve ayrıca hücrelere girme yeteneği, hedeflenen ilaçların daha güvenli ve verimli bir şekilde verilmesine ve gen terapisine yardımcı olabilir (De Jong & Borm, 2008). Polimer nanopartiküller, özellikle hidrofilik yüzeylere sahip olanlar, çok küçük spesifik olmayan protein adsorbsiyon özelliklerinden dolayı taşıyıcı olarak kullanılırlar. Ayrıca komplike hastalıkların teşhis ve tedavisinde de kullanılabilirler.

Kitosan, doğada bol miktarda bulunan doğal olarak oluşan bir polimerdir. İyi fizikokimyasal özellikleri ve benzersiz biyolojik özellikleri nedeniyle kitosan; tıp, gıda, kimya, kozmetik, su arıtma, metal ekstraksiyonu ve geri kazanımı, biyokimya ve biyomedikal mühendisliği endüstrileri dahil olmak üzere birçok endüstride uygulama alanı bulmaktadır. Bununla birlikte, kitosan sulu çözeltilerde çözünmez, bu canlı sistemlerde yaygın olarak uygulanmasını sınırlayan önemli bir dezavantajdır (Ngo ve ark., 2015). Bununla birlikte kitosan, modifiye kitosana özel özellikler kazandıran aşı modifikasyonuna izin veren bazı fonksiyonel gruplara sahiptir. Bu tür modifikasyonlar, çözünürlüğünü iyileştirmek ve sonuç olarak uygulamalarını genişletmek için kitosan'ı kimyasal olarak değiştirmek için kullanılabilir. Bu kimyasal modifikasyonlar, sürekli salım özelliklerine sahip ve toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen birçok türde kitosan türevi üretir (Chua ve ark., 2012). Ayrıca kitosan nanoparçacıkları, antitümör aktiviteye ulaşmak için vücudun bağışıklık fonksiyonunu geliştirebilir (Zhao ve ark., 2018). İyi biyoyumlulukları ve biyobozunurlukları ve kolay değiştirilmeleri nedeniyle, kitosan nanoparçacıkları ilaç taşıyıcıları olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2011).

2.12. Biyouyumlu Malzemeler ile İlaç Tasarımında Seçilen Hedefler

İdeal bir biyouyumlu malzeme bazlı ilaç dağıtım sisteminin tam olarak neyden yapıldığını tanımlamadan önce, vücudun dışsal parçacıklı maddeyi nasıl ele aldığını anlamak gerekir. Biyouyumlu malzemeler insan vücuduna doğrudan enjeksiyon, inhalasyon ve oral alım olmak üzere üç ana yoldan girebilir. Bir kez sistemik dolaşıma girdiklerinde, partikül-protein etkileşimi, çeşitli organlara dağılmadan önce gerçekleşen ilk fenomendir (Prado-Gotor & Grueso, 2011; Rizvi & Saleh, 2018). Kan kılcal damarlarından emilim, lenfatik sistemin partikülleri daha fazla dağıtmasını ve ortadan kaldırmasını sağlar. Bu sistemin, ikisi ilaç dağıtımıyla ilgili olan üç ana işlevi vardır. Birincisi, sıvı geri kazanımı, sıvıların lenfatik sistem tarafından kan kılcal damarlarından filtre edilmesini içerir. İkincisi bağışıklığı kapsar ve bu konuyla en alakalı olanı olabilir. Sistem fazla sıvıyı geri alırken, dokulardan yabancı hücreleri ve kimyasalları da alır. Sıvılar kana geri süzülürken, lenf düğümleri geçen herhangi bir yabancı maddeyi algılar (Park ve ark., 2016). Bir şey yabancı olarak tanınırsa, makrofajlar onu yutar ve vücuttan temizler (Alexis ve ark., 2008). Biyo uyumlu partiküllerin sentezinde 3 ana etken çok önemlidir.

2.12.1. Şekli ve Boyutu

Vücuttaki hücrenin onları nasıl "gördüğünü" etkiler ve böylece dağılımlarını, toksisitelerini ve hedefleme yeteneklerini belirler. En önemlisi, nanopartiküller, daha önce tedavisi zor olan hastalıklar için sürekli ilaç verilmesini sağlayarak kan beyin bariyerini (BBB) geçebildiği bilinmektedir (Steffens ve ark., 2011). Parçacık boyutu küçüldükçe yüzey alanının hacme oranı büyümektedir. Bu da nano boyuttaki parçacıkların ulaşılması zor olan bölgelere kolaylıkla erişebilir olmasını sağlamaktadır.

Bu, ilacın daha büyük bir moleküle kıyasla partikülün yüzeyine daha yakın olduğu anlamına gelir. Yüzeyde veya yüzeye yakın olmak, daha hızlı ilaç salınımına yol açmaktadır (Buzea ve ark., 2007) Geniş bir yüzey alanı/hacim oranına sahip nanoparçacık sistemleri oluşturmak daha faydalı olacaktır. Ancak bununla birlikte, toksisite her zaman izlenmelidir. Çünkü nanoparçacığın boyutu biyolojik kaderi belirlemektedir. Vasküler ve lenf sistemlerinin yabancı madde ve kimyasalların filtrelenmesinden ve temizlenmesinden sorumlu olduğunu unutmamız gerekir. Bu, ideal nanoparçacık sistemine dönüştürülmesi gereken başka bir faktördür. 200 nm veya daha büyük

partiküllerin lenfatik sistemi aktive etme eğiliminde olduğu ve dolaşımdan daha hızlı atıldığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Prokop & Davidson, 2008).

2.12.2. Yüzey Özellikleri

İlk olarak, nanosistemlerin temizlenmesi ele alınmalıdır. Nanopartiküller lenfatik sistem tarafından tanınabildiklerinden, vücudun yabancı maddelere karşı doğal bağışıklık tepkisine tabidirler. Bir nanoparçacık ne kadar hidrofobikse, kan bileşenlerinin daha yüksek bağlanması nedeniyle temizlenmesi o kadar olasıdır (Kou ve ark., 2013). Hidrofobik nanopartiküller kolayca temizlendiğinden, yüzeylerini hidrofilik hale getirmenin veya mevcut hidrofilik özellikteki bileşiklerin seçilmesi nano boyuttaki bu parçacıkların dolaşımdaki sürelerini artıracaklarını varsaymak doğru bir karar olacaktır.

2.12.3. İlaç Yükleme ve Bırakma

Gelişmiş ilaç yükleme ve salım mikro ve nanosistemleri, çekici özgülükleri, biyobozunurlukları, biyouyumlulukları ve düşük toksisiteleri nedeniyle geniş çapta araştırılmıştır. İyi biyouyumluluk/stabilite, immünojenik olmama, geniş yüzey alanı, yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve düşük ilaç sızıntısı avantajlarıyla farmasötiklerin hedeflenen dağıtımı için uygulanabilmektedir (Iravani & Varma, 2022).

2.13. Kitosan

Kitosan çok çeşitli potansiyel uygulamalar için uygun, spesifik işlevleri yerine getirmek üzere kolayca değiştirilebilen (tipik olarak pozitif yüzey yüklerine sahip olan) kimyasal fonksiyonel gruplara sahip biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu bir polimerdir. Kitosan bazlı nanopartiküller, dermatolojik ve gastrointestinal hastalıkların, akciğer hastalıklarının ve beyne ilaç verilmesi ve oküler enfeksiyonların tedavisi dahil olmak üzere farklı uygulama yollarını izleyerek çeşitli ilaç dağıtım uygulamalarında araştırılmıştır (Song ve ark., 2001). Hidrofobik uzun asil zincirlerinin aşılmasıyla elde edilen amfifilik kitosan türevlerine dayalı polimerik misel nanoparçacıkları, yakın zamanda suda normal kümelenme yoluyla hazırlanmıştı (Koopaei ve ark., 2014). Ayrıca, kitosan (CS) ve polikaprolakton (PCL) bazlı normallikten oluşan amfifilik miseller üretilmiş ve onun intestinal farmakokinetik profilini geliştirmek için paklitaksel (PTX) taşıyıcıları olarak kullanılmıştır (Steffens ve ark., 2011). Deneysel sonuçlar, kitosan

nanoparçacıklarının kimyasal modifikasyonunun, hedeflemelerini ve biyoyararlanımlarını iyileştirebileceğini göstermiştir. Son gelişmeler, tümör hedefleme görüntüleme ve terapi (teranostik) uygulamaları ve hedeflenen ilaç dağıtım sistemlerinin inşası için kitosan nanoparçacıklarının kullanımını vurgulamaktadır (Steffens ve ark., 2011). Morfinin kitosan bazlı bir nazal formülasyonu (Rylomine™) şu anda ABD'de faz 3 klinik denemelerinde ve İngiltere ve AB'de ise faz 2 klinik denemelerinde bulunmaktadır. Daha iyi etkinlik ve güvenlik ile farklı ilaç özelliklerine çok yönlü yenilikçi ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi her zaman yüksek talep olmuştur. Doğal kitin biyokütlesinden türetilen bir aminopolisakarit olan kitosan, ortaya çıkan farmasötik eksipiyanlardan ve ilaç taşıyıcı maddelerden biri olarak büyük ilgi görmüştür.

2.13.1. Kanser Tedavisinde Kitosan Çalışmalarına Genel Bakış

Nanotıp, ilaç yüklü parçacıkların ayırt edici fizikokimyasal özelliklerinden dolayı kanserlerin yönetimi ve tedavisi için büyük ilgi görmüştür. Kitosanın katyonik doğası, ilaç salımı, transfeksiyon ve kontrollü salım için bu tür parçacıkların geliştirilmesi için çekicidir. Parçacık özellikleri, polimerin veya parçacığın kendisinin modifikasyonu ile iyileştirilebilir. Kitosan partiküllerinin fizikokimyasal özellikleri, pasif ve aktif hedefli ilaç iletimi, hücresel alım ve tümör büyümesinin inhibisyonu (TGI) üzerindeki etkilerini vurgulamaya olanak tanıyan 126 yeni çalışmada analiz edilmiştir. 2012'den 2019'a kadar, 40 in vivo çalışmadan sadece 4'ünde kitosan parçacıkları kullanılarak tümör boyutunda bir azalma rapor edilirken, diğer tüm çalışmalar kontrollere göre tümör büyümesinin engellendiğini bildirdi. Hücresel alım mekanizmalarını bildiren 12 çalışma dahil olmak üzere, hücresel alım için toplam 23 çalışma analiz edilmiştir. Kitosan parçacıklarının fizikokimyasal özelliklerini kontrol ederek hedeflenen teslimat, endositoz ve ekzositoz ile ilgili süreçleri anlamak ve kullanmak, güvenli ve verimli nanotıbbın geliştirilmesi için önemlidir. Kitosan partikülleri hakkında mevcut literatüre dayalı olarak kombinasyon terapilerinde, kitosan nanotıbbın çok önemli bir rol oynayabileceği sonucuna varılabilir. Ayrıca kitosan partiküllerinin fizikokimyasal özelliklerini kontrol ederek ekzositoz ile güvenli ve verimli ilaç taşıma sistemleri geliştirilebilir (Mushtaq ve ark., 2021).

2.13.2. Kitosan Temelli Hidrojellerin Özellikleri ve Farmasötik Uygulamaları

Hidrojel yapı iskeleleri, doğal hücresel ortamı taklit eden üç boyutlu yapılarda hücresel yapışma ve hücresel yeniden modelleme için uygun bir ortam sağlamak üzere yarı

sentetik veya sentetik hücre dışı matris olarak hizmet eder. Bunun yanı sıra kitosan temelli hidrojel, küçük moleküllü ilaçları, proteinleri, büyüme faktörlerini ve hücre büyümesi ile farklılaşması için gerekli diğer bileşenleri taşıma kapasitesine sahiptir. İlaç verme bağlamında, hidrojel ilaçları sınırlandırmak, etki alanındaki ilaç konsantrasyonunu artırmak ve sonuç olarak hedef dışı yan etkileri azaltmak için kullanılmaktadır. Hidrojel araştırmalarında birçok çeşitli doğal ve sentetik polimerler çalışılmıştır. Kitosan, hidrojel yapıları için oldukça ilgi gören doğal bir katyonik kopolimerdir. Bu polimer, biyolojik cihazlar için yaygın olarak ihtiyaç duyulan iki biyolojik özellik olan biyouyumluluk ve biyobozunurluk ile sonuçlanan insan enzimleri yoluyla bozunma kabiliyetine sahip hidrofilik bir yapıya sahiptir. Kitosan bazlı hidrojel, doku onarım başarıları elde etmek için potansiyel taşıyan mühendislik yapı iskeleleridir. Ayrıca, terapötik bileşenlerin kontrollü salımı için dağıtım sistemleri olarak uygulanmıştır. Kitosan gibi hidrojel kafeslerde kullanılan birçok polimer, mukoadesif özelliklerini zıt yükler arasındaki etkileşimler yoluyla gösterir. Bu spesifik özellik, spesifik ilaç verme amacı için doku bağlama yeteneği sayabilir (F. Song ve ark., 2021).

2.14. Çalışmanın Hipotezi

Fotodinamik terapi, yeni ve umut verici bir antitümör stratejisi olarak kabul edilmektedir. Ayrıca malign hücrelere karşı seçici bir sitotoksik aktivite uygulayabilen, klinik olarak onaylanmış, minimal düzeyde invaziv bir terapötik prosedürdür olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada 219Z081 nolu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında sentezlenen, fotodinamik terapiye uygun, foto duyarlaştırıcı olan bodipy temelli altın ve platin içeren yeni nesil malzemeler ve bu malzemelerin biyo uyumlu halleri kullanılmıştır. Bu yöntem yeni nesil metal komplekslerin toksisitesini azaltarak, ilaç aktivitesini arttırması beklenmiştir. Bunun yanı sıra, metal komplekslerin varlığının FDT uygulanması ile birlikte aktif hale gelerek hedef kanser hücrelerini apoptoza götürmesi hedeflenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu çalışma kapsamında kullanılan kimyasal bileşikler 219Z081 nolu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Kimya Bölümü, Anorganik Kimya laboratuvarında sentezlendi. Deneysel aşamalarda kullanılan makine ve teçhizatlara dair bilgiler tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan makine ve teçhizat listesi.

Makine/Teçhizat	Model/Markası
Güvenlik kabini	ESCO, Class II, Type A2
Otomatik Hücre Sayım Cihazı	Countess™ 3, Invitrogen, ThermoFisher Scientific
Pro Pipet Kontrolörü	accu-jet ^R pro, BRAND
Santrifüj	mikro 200 R Hettich Zentrifugen
Vorteks	Velp scientifica
Mini Santrifüj-Vorteks	Combi-Spin, BIOSAN
Su Ceketli Nemlendirilmiş CO ₂ İnkübatörü	NuAire, NU-4850
Isıtıcı ve Manyetik Karıştırıcı	VELP Scientifica
Mikroplaka Çalkalayıcı İnkübatör	PST-60HL, BOECO
Işık Mikroskobu	Leica DM IL LED
Floresans Mikroskobu	Leica DFC295 S 40/0.45
Hassas Terazı	Denver Instrument
ELİSA Plaka Okuyucu	Thermo Scientific, Multiskan go
Akış Sitometresi	The Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer, ThermoFisher Scientific
Buz Makinesi	Scotsman, AF 80
Mikropipet Seti	Isolab
-20°C Derin Dondurucu	Vestel
-80°C Dondurucu	New Brunswick Scientific
Otoklav	HMC HIRAYAMA

Deneysel aşamalarda kullanılan kimyasal ve sarf malzemelere dair bilgiler tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	Marka
Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM)	Sigma Life Science
RPMI-1640 Medium	Sigma Life Science
RPMI-1640 Medium (Non Fenol Red)	Capricorn Scientific
L-Glutamin solusyonu	Sigma Life Science
Pensilin-streptomisin	Biological Industries
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biological Industries
Phosphate Buffered Saline (Tuzlu fosfat tamponu)	Capricorn scientific
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Serva
Tripsin EDTA Solition A	Biological Industries
MTT (metiltiazoldifenil-tetrazolyum bromid) boyası	Serva
Kristal Viole	Biobasic
Tyrpan Blue Boyası	İnvitrogen,ThermoFisher Scientific
Kitosan Deasetillenmiş kitin Poli(D-glukozamin)	Aldrich Chemistry
Sodyum tripolyfosfat	Thermo Scientific
Etanol	İsolab
Methanol	Honeywell
Asetik Asit	İsolab
Water for Cell Culture	Thermo Scientific
Antibakteritel-Antifungal Çözelti Zefiran	Dermosept
Pastör Pipeti	İsolab
15 ml Santrifüj Tüpleri	Nest Scientific
50 ml Santrifüj Tüpleri	Nest Scientific
10 ml Steril Serolojik Pipet	Nest Scientific
25 ml Steril Serolojik Pipet	Nest Scientific
Steril filtre ucu (0,45 µm)	Sartorius
Pastör Pipeti	Isolab

Tablo 3.2(devam). Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

6-Kuyulu Hücre Kültür Kabı	Nest Scientific
96-Kuyulu Hücre Kültür Kabı	Nest Scientific
2 ml Kriyovial Tüp	Nest Scientific
T75 Kültür Flaskı	Nest Scientific
T25 Kültürü Flaskı	Nest Scientific
Ependorf tüp	Isolab
Steril Enjektör	Beybi
Pudrasız Nitril Eldiven	Beybi

Deneyisel aşamalarda kullanılan kitlelere dair bilgiler tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan kitler

Kullanılan Kitler	Marka
eBioscience Annexin V Apoptoz Tespit Kiti PE İnvitrogen	Thermofisher, USA
Sitotoksosite Tespit Kiti ⁺ (LDH ^{PLUS})	Roche, Sigma Aldrich

3.2 Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü ve Kimyasal Bileşiklerin Dozlarının Hazırlanması

Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Hücre kültürü işlemlerinin tümü steril kabin içerisinde gerçekleştirildi. Steril kabinde kullanılacak malzemeler, kontaminasyon riskini en aza indirmek için ısıya dayanıklı ve ısıyla bozulma riski taşımayan tüm malzemeler otoklavlandı. Ayrıca steril kabinde kullanılacak her malzeme öncesinde %70’lik EtOH ile steril hale getirildi. Meydana gelebilecek kontaminasyon riski en aza indirgenmesi için hücre kültürünün yapıldığı laboratuvar ortamı düzenli aralıklarla ile hem UV’lendi hem de üç günde bir laboratuvar zemini %10’luk çamaşır suyu ile temizlendi. Deney aşamalarında tek kullanımlık olarak kullanılan malzemeler otoklavlanarak laboratuvar ortamından uzaklaştırıldı.

Bu çalışmada kullanılan; meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008), kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatları Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kanser Araştırma Laboratuvarı stoklarından, temin edildi. Meme kanseri (MCF-7) ve yumurtalık kanseri (OV2008) hücre hatları için %10 FBS, %1 penicillin streptomycin, %1 L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri, İnsan kolorektal

kanseri hücre hattı (HT29) için %10 FBS, %1 pencilin streptomycin, %1 L-glutamin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kullanıldı. Hazırlanan besiyerleri kullanım süreci boyunca +4 °C'de muhafaza edildi.

-80 °C den alınan kriyoviallerdeki hücre hatları, 50 ml'lik falkon tüplerinde 10 ml besiyeri içerisinde çözündürüldü. Hücre dondurma solüsyonunu ortadan kaldırmak için 2500 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj işlemi sonrası falkon tüpüne yapışan peletten besiyeri-dondurma solüsyonu karışımı pastör pipeti kullanılarak dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Pelette ki hücreler 15 ml besiyeri içerisinde pipetaj yapılarak homojen olacak şekilde dağıtıldı. Besiyeri içerisindeki hücreler otomatik pipet yardımı ile 75 cm²'lik flaska eklendi. Flasklar etiketlendi ve ardından hücreler ışık mikroskopunda incelendikten sonra %5 CO₂ ve %80-90'lık nem doygunluğuna sahip inkübatöre alındı. 3 günlük inkübasyon süresinden sonra flask yüzeyini %70-80 dolduran hücreler deneysel işlemler için kullanıldı. İlk olarak besiyeri uzaklaştırıldı ve 5-10 ml, 1 X fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkama yapıldı. 3-5 ml tripsin eklendikten sonra tripsinin hücrelerinin yüzeyle olan bağlantılarının kopması için 1-2 dakika inkübatörde bekletildi. Inkübasyon süreci tamamlandıktan sonra flask içerisine tripsini inaktif hale getirmek için 7-10 ml besiyeri eklendi. Flask içerisinde pipetaj yapıldıktan sonra etiketlenmiş 50 cm²'lik falkon tüpüne alındı ve 2500 rpm'de 2-3 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet 10 ml'lik besiyeri ile çözündürüldü. Hücre sayımı için 10 ul hücre besiyeri içeren falkondan ve 10 ul tripan blue çözeltisinden alınıp bir ependorf içinde karıştırıldı. Daha sonra otomatik hücre sayım cihazında (Countess) total hücre miktarı hesaplandı. Deney için gerekli hücre miktarı hesaplandıktan sonra arda kalan hücreler tekrar 75 cm² flaska hücre ekimi yapıldı.

Flask içerisindeki hücre yoğunluğu ile ölü hücre miktarları belirli aralıklarla kontrol edildi. Gerekli koşullarda besiyeri değiştirildi ya da pasaj yapılarak hücre yoğunluğu kontrol altında tutuldu. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra MTT, LDH testi ve koloni oluşum testi işlemleri için kullanıldı. Hücrelerle ilgili deneysel işlemler sonlandıktan sonra hücreler 150 cm³ alana sahip flasklarda büyütüldü. Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hücreler 1,8 mL'lik kriyoviyallerde, FBS ve DMSO karışımı (9:1) ile donduruldu. Kriyoviyaller, hücrelerin ortama adapte olması için önce -20°C'de 15-20 dk bekletildikten sonra -80°C'ye alındı.

Kimyasal Bileşiklerin Dozlarının Hazırlanması

Bu tez çalışmasında, 219Z081 nolu Tübitak 1001 projesi kapsamında sentezlenen aza-bodipy temelli platin ve altın içeren yeni nesil bileşikler kullanıldı. Birleşiklerin moleküler ağırlıkları tablo 3.1’de gösterildi. Bu yeni nesil bileşiklerden stok çözeltilerinin hepsi 12500 μM olacak şekilde tablo 3.2’de belirtilen miktarlar hesaplandı ve ardından 0.5 ml DMSO içerisinde çözdürüldü. Daha sonra hazırlanacak ilaç dilüsyonları için 1:5 oranında DMSO:PBS karışımı hazırlandı. Başta hazırlanan 0.5 ml’lik stoklardan dilüsyonlar 2.5 μM , 1 μM , 0.5 μM , 0.2 μM , 0.1 μM ve 0.05 μM olacak şekilde tablo 3.3’de gösterildiği gibi hazırlandı. Hazırlanan stoklar ve dilüsyonlar oda sıcaklığında (25 °C) saklandı.

Tablo 3.4. Kimyasal bileşiklerin moleküler ağırlıkları

Kimyasal bileşiklerin isimleri	Ligand	Au	Pt
L1	862.9900 g/mol	1491.2267 g/mol	1390.1610 g/mol
L2	1391.6260 g/mol	2019.8627 g/mol	1918.7970 g/mol
L3	1246.4719 g/mol	1874.7085 g/mol	1773.6429 g/mol
L4	798.9940 g/mol	1427.2307 g/mol	1326.1650 g/mol
L5	967.3180 g/mol	1595.5547 g/mol	1494.4890 g/mol

Tablo 3.5. Kimyasal bileşiklerin stok çözeltilerin hazırlanması

Stok Çözeltilerinin Hazırlanması		
L1 (5,3995 mg/ 0.5 ml DMSO)	L1-Au (9,32 mg/ 0.5 ml DMSO)	L1-Pt (11,1878 mg/ 0.5 ml DMSO)
L2 (8,6975 mg/ 0.5 ml DMSO)	L2-Au (12,6225 mg/ 0.5 ml DMSO)	L2-Pt (11,9925 mg/ 0.5 ml DMSO)
L3 (7,325 mg/ 0.5 ml DMSO)	L3-Au (11,7175 mg/ 0.5 ml DMSO)	L3-Pt (11,085 mg/ 0.5 ml DMSO)
L4 (4,995 mg/ 0.5 ml DMSO)	L4-Au (8,92 mg/ 0.5 ml DMSO)	L4-Pt (8,2895mg/ 0.5 ml DMSO)
L5 (6,045 mg/ 0.5 ml DMSO)	L5-Au (9,9725 mg/ 0.5 ml DMSO)	L5-Pt (9,34 mg/ 0.5 ml DMSO)

Tablo 3.6. Kimyasal bileşiklerin dozlarının hazırlanması

Stok Çözeltilerden Dilüsyon Hazırlama	Birleşiklerin Dozları (µM)	Eklenen Hacim (uL)	Bileşiklerin 96 kuyulu Plakadaki Son Konsantrasyonları (200 uL Besiyeri)
480 uL dmsö:pbs (1:5) + 20 uL (12500 µM stoktan alındı)	500	1	2.5 µM
492 uL dmsö:pbs (1:5) + 8 uL (12500 µM stoktan alındı)	200	1	1 µM
496 uL dmsö:pbs (1:5) + 4 uL stok (12500 µM stoktan alındı)	100	1	0.5 µM
498,4 uL dmsö:pbs (1:5) + 1,6 uL (12500 µM stoktan alındı)	40	1	0.2 µM
240 uL dmsö:pbs (1:5) + 60 uL (100 µM dilüsyondan alındı)	20	1	0.1 Mm
225 uL dmsö:pbs (1:5) + 75 uL (40 µM dilüsyondan alındı)	10	1	0.05 µM

3.2.2 Kimyasal Bileşiklerin Kitosen ile Kaplanması

Kitosen ile ligand etkileşimi kısmı için 0,01 gr kitosen tartıldı ve üzerine %1'lik 10 ml asetik asit (AC) çözeltisi eklenerek kitosen hidrojeli hazırlandı. Ardından çöktürme işlemi için gerekli olan tripolifosfat (TPP)'dan 0,1 gr tartıldı ve 100 ml çift distile edilmiş su (ddH₂O) içerisinde çözdürüldü. Kimyasal bileşiklerin stokları, kimyasal bileşiklerin dozlarının hazırlanması başlıklı kısımda bahsedildiği gibi 0.5 ml DMSO içerisinde 12500 µM olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan ilaç stokları üzerine aynı hacimde kitosen hidrojelinin eklendi ve 3-5 dakika vorteksenerek ilaç ile kitosen hidrojelinin homojen olarak karışması sağlandı. Öncesinde hazırlanan TPP çözeltisinden, kitosen ile ilaç stok karışımına çökme gözlemlenene dek kontrollü şekilde yavaşça eklendi. Çökme gözlemlendikten sonra mini santrifüj makinesinde 2500 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Bu kimyasal bileşiklerde fotoduyarlastırıcı olarak kullanılan AZA-BODİPY adlı boyar maddenin kimyasal bileşikte herhangi bir çözülme göstermesinden dolayı ortamı mavi-yeşil renge boyadığını biliyoruz bu nedenle santrifüj işleminden sonra supernatant kısmındaki sıvı rengi saydam olup olmadığı herhangi bir kimyasal bileşiğin ortamda çözünüp çözünmediği kontrol edildi. Herhangi bir çözünme göstermeyen bileşikler santrifüj işleminden sonra saydam süpernatant kısmını oluşturan TPP uzaklaştırıldı. Ependorf dibinde kalan pellet kısmındaki kimyasal bileşik ile entegre olmuş kitosen üzerine 0.5 ml'lik DMSO eklendi ve böylelikle kimyasal bileşikte herhangi bir kayıp yaşamadan başlangıçtaki ilaç konsantrasyonu normal halini aynı şekilde korumuş oldu. Burada kitosenin konsantrasyonu her kimyasal ajanda aynı miktarda olduğundan göz ardı edildi. Kimyasal bileşiklerin konsantrasyonu daha önce bahsedildiği gibi (bkz. tablo 3.2 ve tablo 3.3) 2.5 µM, 1 µM, 0.5 µM, 0.1 µM, 0.05 µM olacak şekilde hazırlandı.

3.2.3. Hücre Ekimi ve MTT Uygulaması

İnkübasyonda yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler laminar kabin içerisinde eski besiyerinden uzaklaştırıldı. Ardından 5-10 ml 1^xPBS ile ortam yıkandı. PBS ortamdan uzaklaştırıldı ve 3-5 ml tripsin eklendikten sonra 1-2 dk inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrası 7-10 ml taze besiyeri eklendi ve flask içerisinde pipetaj yapıldıktan sonra hücreler 50 ml'lik falkon tüplerine alındı. Hücre içeren falkon tüpü 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Elde edilen pelletten süpernatant pastör pipeti ile uzaklaştırıldı ve pellet 10 ml taze besiyeri ile çözdürüldü. Daha sonra 10 µL hücre içeren besiyerinden ve

10 uL Tripan Blue boyasından alındı ve bir epondorf içerisinde karıştırıldı. Ardından otomatik hücre sayım cihazında (Countess) hücre sayımı yapıldı. Bir kuyucukta 7500 hücre olarak şekilde hesap yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu plaklara 200 µl besiyeri-hücre karışımı eklendi. Hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Kalan hücreler tekrar kullanılmak üzere flasklara ekildi. 24 saat sonra kimyasal bileşikler belirlenen konsantrasyonlarda ve tekrarlarında eklendi ardından 48 saat inkübasyonda tutuldu.

48 saatlik inkübasyon sonunda laminar kabinde 96'lık plaklarda bulunan eski besiyerleri çoklu mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı. Sonrasında 96 kuyucuklu plaka çoklu mikropipet yardımıyla hücrelere zarar vermeden 1X PBS ile yıkandı. 10 mg MTT tozu tartıldı ve ardından 2 ml 1X PBS içerisinde çözündürülerek stok MTT solüsyonu hazırlandı. Stok MTT solüsyonundan 1,1 ml alındı ve üzerine FBS ve fenol kırmızısı içermeyen renksiz medyadan 9,9 ml eklendi. Hazırlanan bu MTT solüsyonu her kuyu başına 100 ul olacak şekilde eklendi. MTT solüsyonu eklendikten hemen sonra 4 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

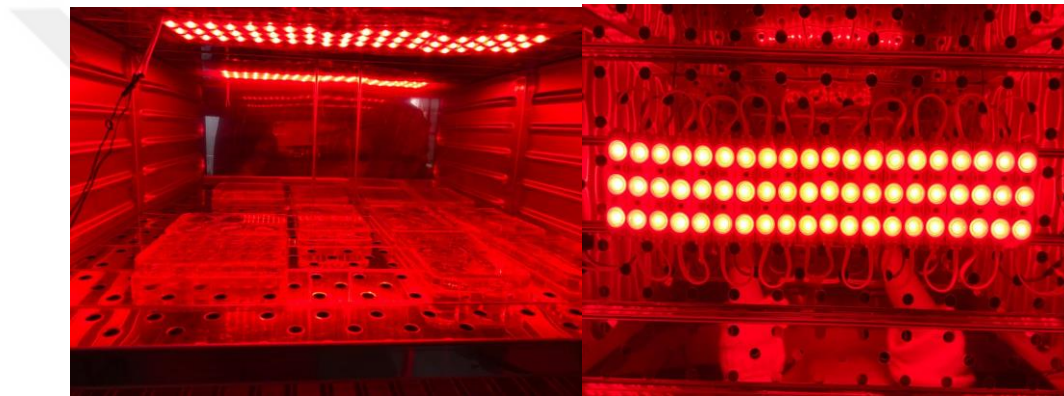
İnkübasyon süresi dolduktan sonra oluşan mor rengin çözülmesi için kuyucuklardan 100 µl MTT solüsyonu dikkatli şekilde uzaklaştırıldı ve yerine 100 µl DMSO eklendi. DMSO ilavesinden sonra 30 dakika karanlık ortamda mikrolaka inkübatör çalkalayıcısında (PST-60HL, BOECO) inkübe edildi. Ardından 540 nm ve 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Multiskan GO mikrolake reader; Thermo Scientific) absorbans değerleri ölçüldü. Absorbans verilerinin analizi için kontrol grubu hücrelerinin ortalaması %100 alınarak hücre canlılığı verileri önce excelde hesaplandı ardından gerekli grafiklerin eldesi için GraphPad Prism 8.0.1 programında analizleri yapıldı.

3.2.4 Fotodinamik Terapi Uygulaması

Fotodinamik terapi, kanser hücrelerini öldürmek için ışığa duyarlılaştırıcı veya ışığa duyarlı hale getiren ajan adı verilen ışıkla etkinleştirilen bir ilaç ile kullanıldığı bilinmektedir. Işık, bir lazerden veya LED'ler gibi başka bir kaynaktan gelebilmektedir. Bu çalışmada FDT ile kanser hücrelerini öldürmek için ışığa duyarlı hale getiren ajan olarak BODİPY kullanıldı. AZA-BODİPY bu çalışmada kullanılan metal (Altın ve Platin) içeren kimyasal bileşiklerin temel iskeleti olarak kullanıldı. FDT uygulaması için

gerekli ışık kaynağı olarak LED kırmızı ışık kullanıldı. LED kırmızı ışık seçilmesinin en etkin sebebi FDT ile kullanılan kimyasal ajanların yeşil-mavi renkte olmasıydı. Ayrıca kırmızı LED ışığın dalga boyu 630-700 nm ve penetrasyon derinliği 2-3 mm olduğundan FDT uygulamasında tercih edildi.

MTT, LDH, Kristal violet ile boyama ve akış sitometrisi testleri için kullanılan hücre hatlarına kimyasal ajanların ilavesinin hemen ardından 30 dakika boyunca LED kırmızı ışık altında inkübasyona bırakıldı. FDT uygulaması ardından hücreler %5 CO₂ ve %80-90'lık nem doygunluğuna sahip inkübatörde deney aşamalarına kadar gerekli olan inkübasyon süreçlerini tamamladı.



Şekil 3 1. Kanserli hücre hatlarına kimyasal bileşiklerin ilavesi sonrası fotodinamik terapi uygulaması

3.2.5. LDH Testi

MTT deneyi ile FDT sonrası kanser hücrelerinde IC₅₀ değeri veren potansiyel antikanser aktivite gösteren kimyasal birleşikler seçilerek, 96 kuyulu plakaya uygun yoğunlukta ekilen (7500 hücre/200 uL) MCF-7, OV2008 ve HT-29 kanserli hücre hatlarında LDH enzim aktivitesi testi yapıldı. Hücre kültürü, ekimi, sayımı, inkübasyon süreçleri MTT deneyi süreçleri ile aynı şekilde gerçekleştirildi. Hücrelerin ekiminden 24 saat sonra kimyasal bileşikler ile muamele edildi. FDT uygulaması yapılacak hücre hattı grupları seçilerek 30 dakika kırmızı LED ışıkta bekletildi. Daha sonra hücreler 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinin sonunda 96 kuyulu plakadan besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından kuyucuklara 50 uL renksiz besiyeri eklendi. Daha sonra lizis

kontrol kuyularına LDH^{PLUS} kitinden (Roche), lizis solüsyonundan 5 uL eklendikten sonra 15 dakika 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

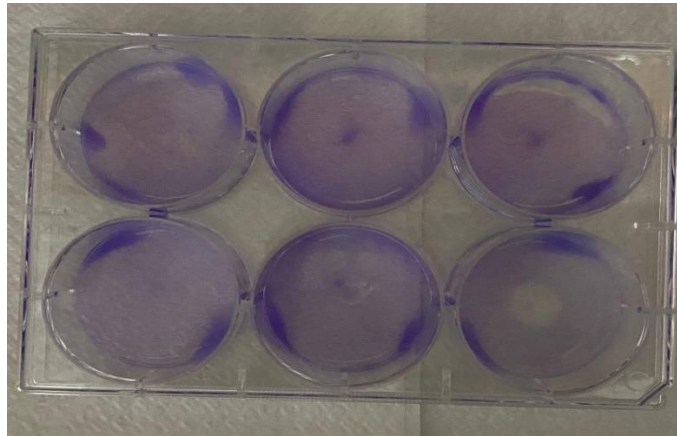
İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra 96 kuyucuklu plakadaki tekrar kuyusuna göre, LDH^{PLUS} kiti içerisinde bulunan katalist ve boya solüsyonu belirli oranda (1:46) hesaplanıp 50 ml’lik falkon tüpünde reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı ışıktan etkileneneceğinden dolayı falkonun etrafı alüminyum folyo ile kapatıldı. Reaksiyon karışımı 100 ul olacak şekilde kuyulara eklendikten sonra ve 10 dakika 25 °C’de mikroparka inkübatör çalkalayıcısında (PST-60HL, BOECO) inkübe edildi. İnkübasyon süresi dolduktan sonra LDH^{PLUS} kitinden çıkan LDH enzimi aktivitesini sabitlemek için durdurma solüsyonundan kuyulara 50 ul eklenerek mikroparka inkübatör çalkalayıcısında (PST-60HL, BOECO) 10 sn bekletilerek solüsyonun homojen şekilde dağılması sağlandı. Ardından 492 nm ve arka plan okuması olarak 690 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Multiskan GO mikroparka reader; Thermo Scientific) ölçümleri alındı. Hesaplamalar 492 nm dalga boyu okumasındaki değerlerden, 690 nm arka plan okumasındaki değerler excel’de birbirinden çıkartıldı. Kontrol grubuna kıyasla deney gruplarındaki % LDH miktarı değişimleri önce excelde hesaplandı ardından gerekli grafiklerin eldesi için GraphPad Prism 8.0.1 programında analizleri yapıldı.



Şekil 3.2. LDH enzim sızıntısı testinin 48. saatteki renk değişim görüntüsü

3.2.6. Kristal Viyole ile Hücrelerin Boyanması

Kimyasal ajanların ilavesinin ardından fotodinamik terapi (FDT) uygulanan hücrelerdeki morfolojik farklılıkları belirlemek için kristal viyole ile hücrelere boyama işlemi yapıldı. Bu test, meme kanseri hücre hattı (MCF-7), yumurtalık kanseri hücre hattında (OV2008) ve kolorektal kanseri hücre hatlarında (HT-29) yapıldı. Bu hücre hatları için MTT testi sonuçlarına göre, FDT uygulamasından sonra hücre hatlarında etkinliği belirlenmiş kimyasal ajanlar ve uygun konsantrasyonları seçildi. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler pasaj işlemine tabi tutuldu ve hücreler hemositometre yardımı ile sayıldı. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara her kuyucuk başına 10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Ekimi yapılan hücreler 24 saat inkübasyon süresinden sonra kimyasal bileşikler eklendi ve hemen ardından FDT için 30 dakika boyunca kırmızı LED ışık altında bekletildi. FDT sürecini tamamlayan hücreler %5 CO₂ ve %80-90'lık nem doygunluğuna sahip inkübatöre alındı ve 48 saat inkübasyonda tutuldu. İnkübasyon sürecini tamamlayan hücreler önce besiyerinden uzaklaştırılıp ardından 1 ml 1X PBS ile yıkandı. Ardından hücrelere, metanol ve asetik asit (3:1 oranında) karışımından 1 ml eklenerek inkübatörde 5 dakika fikse edildi. Daha sonra fiksatif karışım aspire edilerek kristal viole boyası (300 uL) ile 15 dakika oda sıcaklığında (25 ° C) hücreler bekletildi. Boya birkaç defa steril distile su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Hücrelerin mikroskop görüntüleri Leica DFC295 S 40/0.45 ile çekilmiş olup, Leica Application Suite v+ yazılımı kullanılarak hazırlandı.



Şekil 3.3. Kanserli hücre hatlarının kristal viyole ile boyanması

3.2.7 Annexin V bağlama deneyi

Tümör hücrelerinin apoptozu, Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I kullanılarak değerlendirildi. Bu tahlil için çalışmamızda FDT ile birlikte kullanılan kimyasalların en yaygın ve etkin sitotoksik etki gösterdiği HT-29 (kolorektal kanser) hücre hattı seçildi. HT-29 hücre hattında MTT testinde FDT uygulaması sonucunda en etkin çalışan L1 serisi ile L2 serisinin altın ve platinli bileşikleri uygun konsantrasyonlarıyla seçildi. Annexin V bağlama tahlili için inkübasyonda yeterli yoğunluğa ulaşmış kolorektal kanser hücre hattı (HT-29) bkz. hücrelerin kültüre edilmesi alt başlıkta anlatıldığı gibi pasaj işlemleri gerçekleştirildi. Ardından hücreler sayılarak tahlil için gerekli olan hücre miktarı tayin edildi. Hücreler 6 kuyulu kültür plakalarına her kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde ekimleri yapıldı ve ardından 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından eski besiyeri değiştirilerek 1 ml taze besiyeri eklendi ve ardından MTT testi ile FDT uygulaması sonucunda HT-29 hücre hattında etkinliği belirlenen bileşiklerin uygun konsantrasyonları kuyucuktaki hücrelere işlendi. Kimyasal ajanların ilavesinin hemen ardından FDT uygulaması için 30 dakika boyunca LED kırmızı ışık altında inkübasyona bırakıldı. FDT uygulaması tamamlandıktan sonra hücreler 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecini tamamlandıktan sonra plaka kuyucuklarında bulunan hücrelerin besiyeri 15 ml falkon tüpüne alındı. Hücreler daha sonra 5 uL Annexin V-PE ve 5 uL 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) içeren 15 mL'lik falkon tüplerine aktarıldı. Numuneler hafifçe karıştırıldı ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Her bir tüpe 400 uL Annexin V bağlayıcı tampon eklenmesinin ardından numuneler analiz edildi ve akış sitometrisi ile miktar tayini yapıldı (Cacan ve ark., 2015). Elde edilen veriler FlowJo yazılımı kullanılarak analiz edildi. Canlı hücreler hem annexin V-PE hem de 7-AAD için negatifti; erken apoptotik hücreler annexin V-PE için pozitif ve 7-AAD için negatifti, geç apoptotik ve ölü hücreler hem annexin V-PE hem de 7-AAD etiketlemesi için pozitif olarak kabul edildi.

3.2.8. İstatiksel Analiz ve Veri Görselleştirme

Deneyler üç tekrarlı çalışıldı ve elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edildi. İstatiksel analiz ve veri görselleştirme için GraphPad Prism 8.0.1 yazılımı kullanıldı. MTT testinde ilaç uygulanan deney grubu, %100 hücre canlılığı olarak kabul edilen kontrol grubuna karşı kıyaslandırılarak arasındaki değişimler belirlendi. Laktat dehidrojenaz (LDH) enzim aktivitesi testinde, kanser hücresinden salgılanan standart LDH enzim miktarını ifade eden kontrol grubu %100 LDH salınım miktarı olarak alındı. Kontrol grubuna kıyasla ilaç eklenen deney grupları arasındaki LDH salınım profillerindeki değişimler yüzde (%) olacak şekilde hesaplanarak grafikleştirildi. MTT testi ile LDH enzim aktivitesi testi sonucundaki verilerin istatistiksel anlamlılığı Student's T-test metodu kullanılarak P değerleri belirlendi. MTT testinde ayrıca ilaçların karanlık ortam sitotoksitesitesi ile fotodinamik terapi (FDT) sonucunda gösterdikleri sitotoksitesiteleri aynı grafik içerisinde gösterilerek istatistiksel anlamlılıkları two-way ANOVA (ya da mixed model) ve Tukey's multiple comparisons test ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Annexin V tahlili için yapılan akış sitometri verileri flowJo yazılımı (TreeStar, sürüm 9.6) kullanılarak analiz edildi. Çalışmada kullanılan şematik şekillerin bazıları Biorender ve ChemDraw yazılımı kullanılarak yapıldı. Hücrelerin kimyasal ajanların ilavesi sonrası FDT uygulaması ile geçirdikleri morfolojik farklılıkların temsili mikroskop görüntüleri Leica DFC295 S 40/0.45 ile çekilmiş olup, Leica Application Suite v+ yazılımı kullanılarak hazırlandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Hücre Canlılık Testleri (MTT)

Başlangıç ligandlarına göre L1, L2, L3, L4 ve L5 şeklinde adlandırılan bu 5 seriye bağlanan altın (Au) ve platin (Pt) içeren yeni nesil bileşiklerin hem normal halleri hem de biyouyumlu hale getirmek için kitosanle kaplanmış hallerinin, karanlık sitotoksik etkisi ile fotodinamik terapi sonrası sitotoksik etkisinin, meme kanseri (MCF-7), kolorektal kanseri (HT-29) ve yumurtalık kanseri (OV2008) olmak üzere üç farklı hücre hattında MTT yöntemi kullanılarak çeşitli dozlara karşılık yüzde hücre canlılıkları hesaplandı. Bu yeni nesil bileşiklerin 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.2 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M ve 2.5 μ M konsantrasyonları kullanıldı. İnkübatörde belirli yoğunluğa ulaşan hücreler sayıldı ve MTT deneyi için gerekli miktar hesaplandı. Hücreler 1 kuyucuk için 7500 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekimleri yapıldı. Ardından 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra belirtilen konsantrasyonlarda kimyasal bileşikler eklendi. FDT uygulaması yapılacak kanserli hücre hatları 30 dakika kırmızı led ışık altında bekletildi ve hücreler ardından 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecini tamamlamış hücrelere daha önce uygulanmış MTT deneyi protokolü uygulandı (Cacan ve ark., 2017; Berkel & Cacan 2021; Kucuk ve ark., 2021) Ardından spektrometrede ölçümleri yapıldı.

Kimyasal bileşiklerin üç hücre hattındaki uygulamalarının ardından yüzde hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT testinin analizleri sonucunda belirlendi. Bu kimyasal bileşiklerin karanlık ortam analizlerinin verdiği istatistiksel verilere göre; L3 serisinden L3-Au'nun kolorektal kanseri (HT-29) ve yumurtalık (OV2008) kanseri üzerinde 0.5 μ M'da, L4 serisinden L4-Au'nun meme kanseri (MCF-7) ve yumurtalık kanseri (OV2008) üzerinde 2.5 μ M'da, L2 serisinden L2-Au'nun kolorektal kanserinde (HT-29) ve yumurtalık kanserinde (OV2008) 1 μ M'da iken meme kanserinde (MCF-7) 2.5 μ M'da ve L1 serisinden L1-Pt'nin kolorektal kanseri (HT-29) üzerinde 2.5 μ M'da hücre canlılığını % 50 oranında düşürdüğü belirlendi. Yine istatistiksel verilerin analizi sonucunda, L5 serisi ile birlikte diğer kimyasal bileşiklerin kitosan ile kaplanmış hallerinin karanlık ortamda belirgin bir şekilde sitotoksik etki göstermediği belirlendi (Tablo 4.1). Yine bu kimyasal bileşiklerin normal ve kitosanlı hallerinin kolorektal kanseri (HT-29), yumurtalık kanseri (OV2008) ve meme kanseri (MCF-7) hücre hatlarında fotodinamik terapi sonrası MTT analizleri sonucunda hücre canlılığını üzerinde % 50 düşüş sağladığı belirlenen kimyasallar ve etkin dozları tablo 4.2 'de belirtildi.

Tablo 4.1. Kimyasal bileşiklerin normal ve kitosanli hallerinin fotodinamik terapi uygulamadan gösterdikleri IC50 değerleri (N=Normal, K=Kitosanli)

Kimyasal İsimleri		HT-29		MCF-7		OV2008	
		N	K	N	K	N	K
		Ort (μM) ± SD	Ort (μM) ± SD	Ort (μM) ± SD	Ort (μM) ± SD	Ort (μM) ± SD	Ort (μM) ± SD
L1 Serisi	Ligand	-	-	-	-	-	-
	Au	-	-	-	-	-	-
	Pt	2.140 ± 0.009	-	-	-	-	-
L2 Serisi	Ligand	-	-	-	-	-	-
	Au	0.795 ± 0.028	-	1.200 ± 0.243	-	0.690 ± 0.074	-
	Pt	-	-	-	-	-	-
L3 Serisi	Ligand	-	-	-	-	-	-
	Au	0.316 ± 0.035	-	-	-	0.274 ± 0.017	-
	Pt	-	-	-	-	-	-
L4 Serisi	Ligand	-	-	-	-	-	-
	Au	-	-	1.592 ± 0.393	-	1.693 ± 0.069	-
	Pt	-	-	-	-	-	-
L5 Serisi	Ligand	-	-	-	-	-	-
	Au	-	-	-	-	-	-
	Pt	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.2. Kimyasal bileşiklerin normal ve kitosanlı hallerinin fotodinamik terapi uygulaması sonrası gösterdikleri IC50 değerleri (N=Normal, K=Kitosenli)

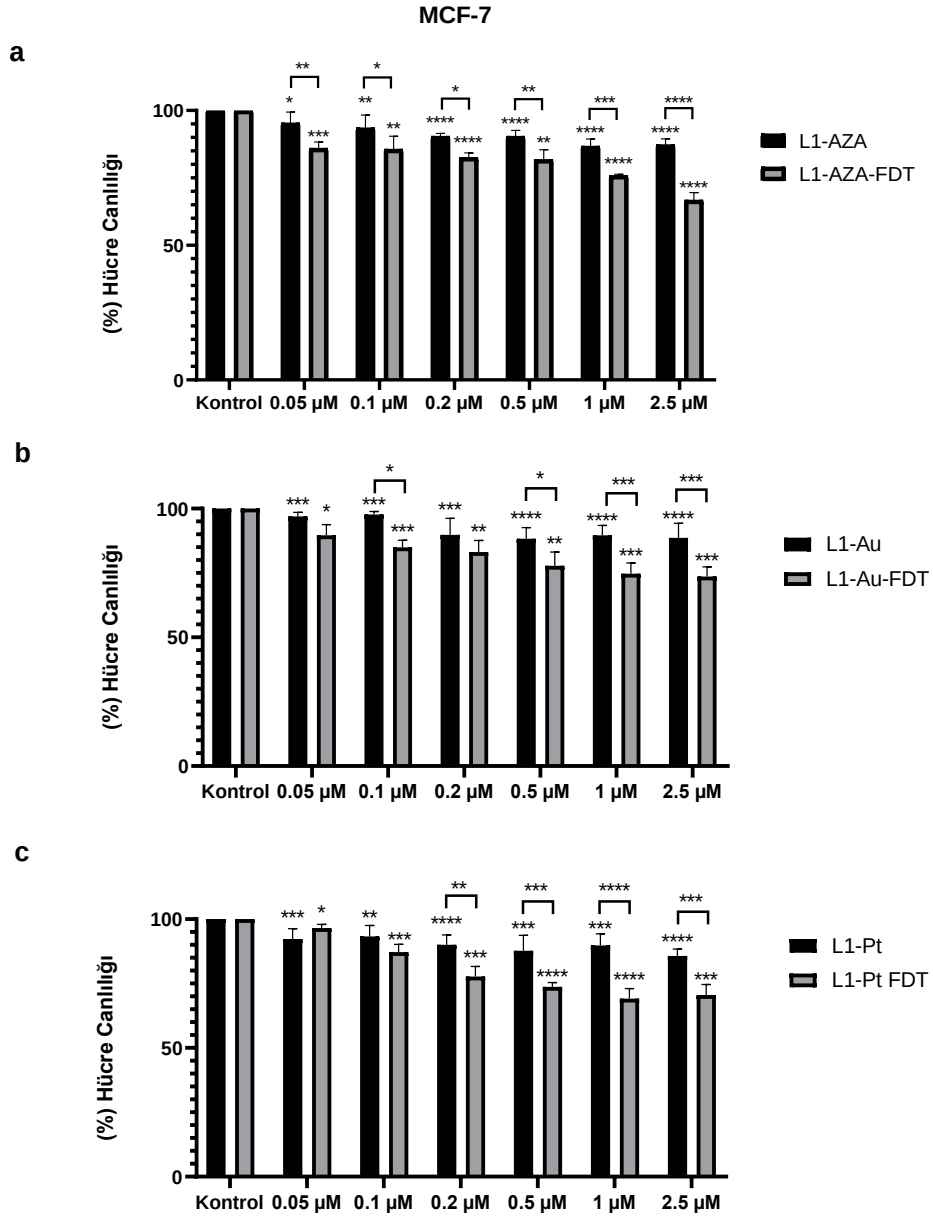
		HT-29		MCF-7		OV2008	
Kimyasal İsimleri		N	K	N	K	N	K
		Ort (μ M) $\pm$ SD	Ort (μ M) $\pm$ SD	Ort (μ M) $\pm$ SD	Ort (μ M) $\pm$ SD	Ort (μ M) $\pm$ SD	Ort (μ M) $\pm$ SD
	Ligand	-	-	-	-	-	-
L1 Serisi	Au	0.891 $\pm$ 0.098	-	-	-	-	-
		1.213 $\pm$ 0.335	-	-	-	-	-
L2 Serisi	Pt	0.795 $\pm$ 0.028	2.054 $\pm$ 0.009	-	-	0.546 $\pm$ 0.436	-
		0.122 $\pm$ 0.004	2.255 $\pm$ 0.001	0.244 $\pm$ 0.014	-	0.063 $\pm$ 0.003	2.352 $\pm$ 0.003
L3 Serisi	Au	0.371 $\pm$ 0.006	1.337 $\pm$ 0.457	0.349 $\pm$ 0.053	-	0.191 $\pm$ 0.005	-
		-	-	-	-	-	-
L4 Serisi	Pt	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-
L5 Serisi	Au	0.968 $\pm$ 0.064	-	1.338 $\pm$ 0.888	-	0.541 $\pm$ 0.101	2.137 $\pm$ 0.031
		0.334 $\pm$ 0.081	0.447 $\pm$ 0.197	-	-	-	-
L6 Serisi	Pt	-	-	-	-	-	-
		1.831 $\pm$ 0.128	-	-	-	0.409 $\pm$ 0.077	-

4.1.1. L1 serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) normal ve kitosanlı hallerinin fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

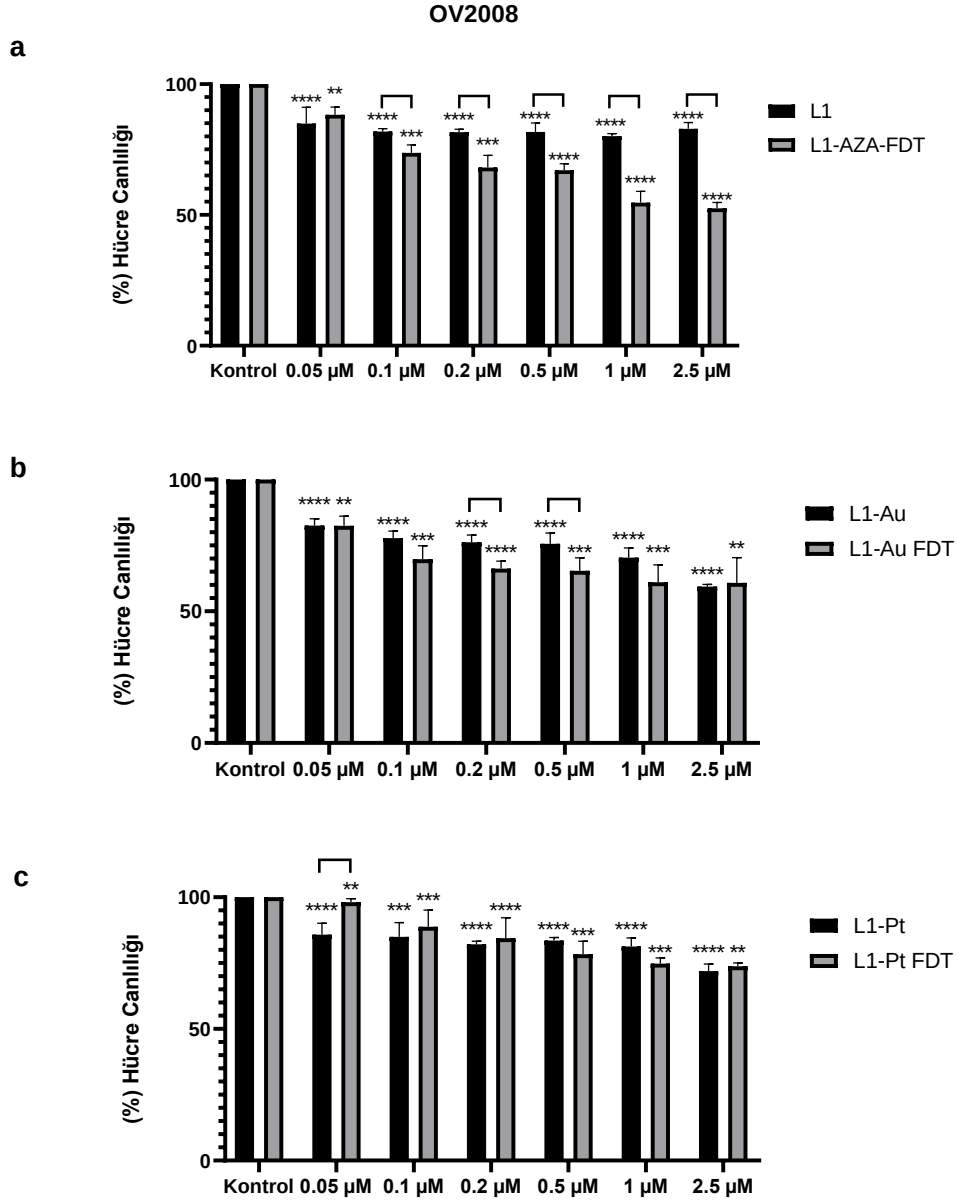
L1 serisi, altın (Au) ve platin (Pt)'in fotodinamik terapi (FDT) uygulamadan önce ve uyguladıktan sonra meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi yapıldı. L1 bileşiğinin MCF-7 hücre hattında 2.5 μM 'lık konsantrasyonda FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %87 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %67 olarak belirlendi (Şekil 4.1a). L1 bileşiğinin OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'lık konsantrasyonunda FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %83 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulanması sonrası bu oran %53 olarak belirlendi (Şekil 4.2a). Yine L1 bileşiğinin HT-29 hücre hattında 2.5 μM 'lık konsantrasyonda FDT uygulamadan hücre canlılığı oranı %90 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası hücre canlılığı oranı %67 olarak belirlendi (Şekil 4.3c).

L1-Au bileşiği, MCF-7 hücre hattında 2.5 μM 'da FDT uygulamadan hücre canlılığı oranı %88 iken bu oran aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonra %73 olarak belirlendi (Şekil 4.1b). L1-Au bileşiği, OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan ve uyguladıktan sonra her iki durum da hücre canlılığı oranı %60 olarak belirlenerek her iki koşulda hücre üzerindeki sitotoksitesinde bir farklılık oluşturmadığı saptandı (Şekil 4.2b). Yine L1-Au bileşiğinin HT-29 hücre hattındaki 2.5 μM 'lık konsantrasyonda FDT uygulamadan hücre canlılığı oranı %55 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %30 olarak belirlendi (Şekil 4.3b).

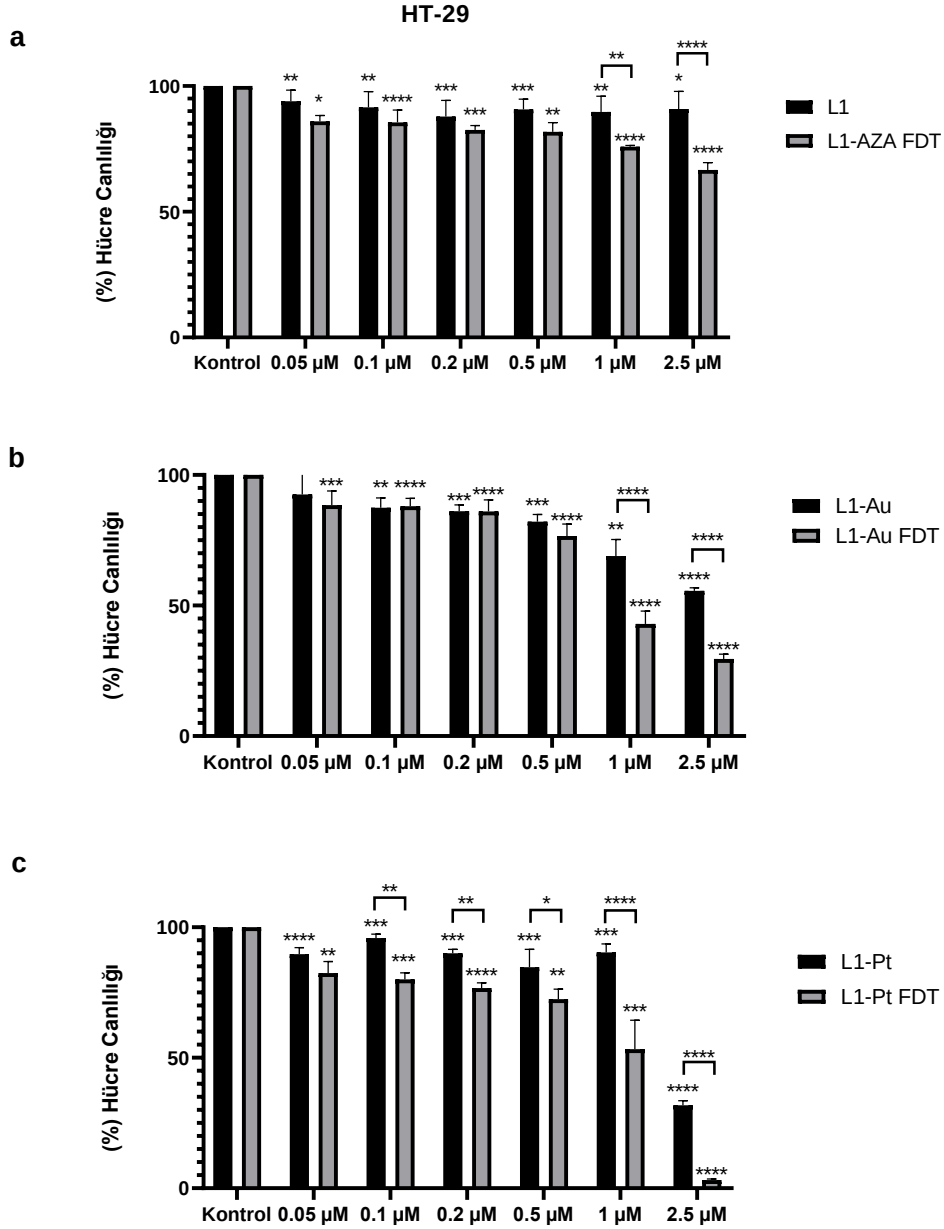
L1-Pt bileşiği, MCF-7 hücre hattında hücre canlılığı oranı %86 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %71 olarak belirlendi (Şekil 4.1c). L1-Pt bileşiğinin OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'lık konsantrasyonda FDT uygulanmadan ve uygulaması sonrası hücre canlılığı oranı %70-75 olarak belirlenerek FDT sonrası bileşiğin sitotoksitesinde bir artış olmadığı belirlendi (Şekil 4.2c). Yine L1-Pt bileşiğinin HT-29 hücre hattında ise 2.5 μM 'lık konsantrasyonda FDT uygulamadan yüksek sitotoksite göstererek hücre canlılığı oranını %32'ye kadar düşürür iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %3 olarak belirlendi (Şekil 4.3c).



Şekil 4.1. MCF-7 meme kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L1, L1-Au ve L1-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uygulandıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 meme kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıkta bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L1 ve L1 FDT, b) L1-Au ve L1-Au FDT ile c) L1-Pt ve L1-Pt FDT'nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri.



Şekil 4.2. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L1, L1-Au ve L1-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L1 ve L1 FDT, b) L1-Au ve L1-Au FDT ile c) L1-Pt ve L1-Pt FDT'nin OV2008 hücre hattı üzerindeki etkileri.



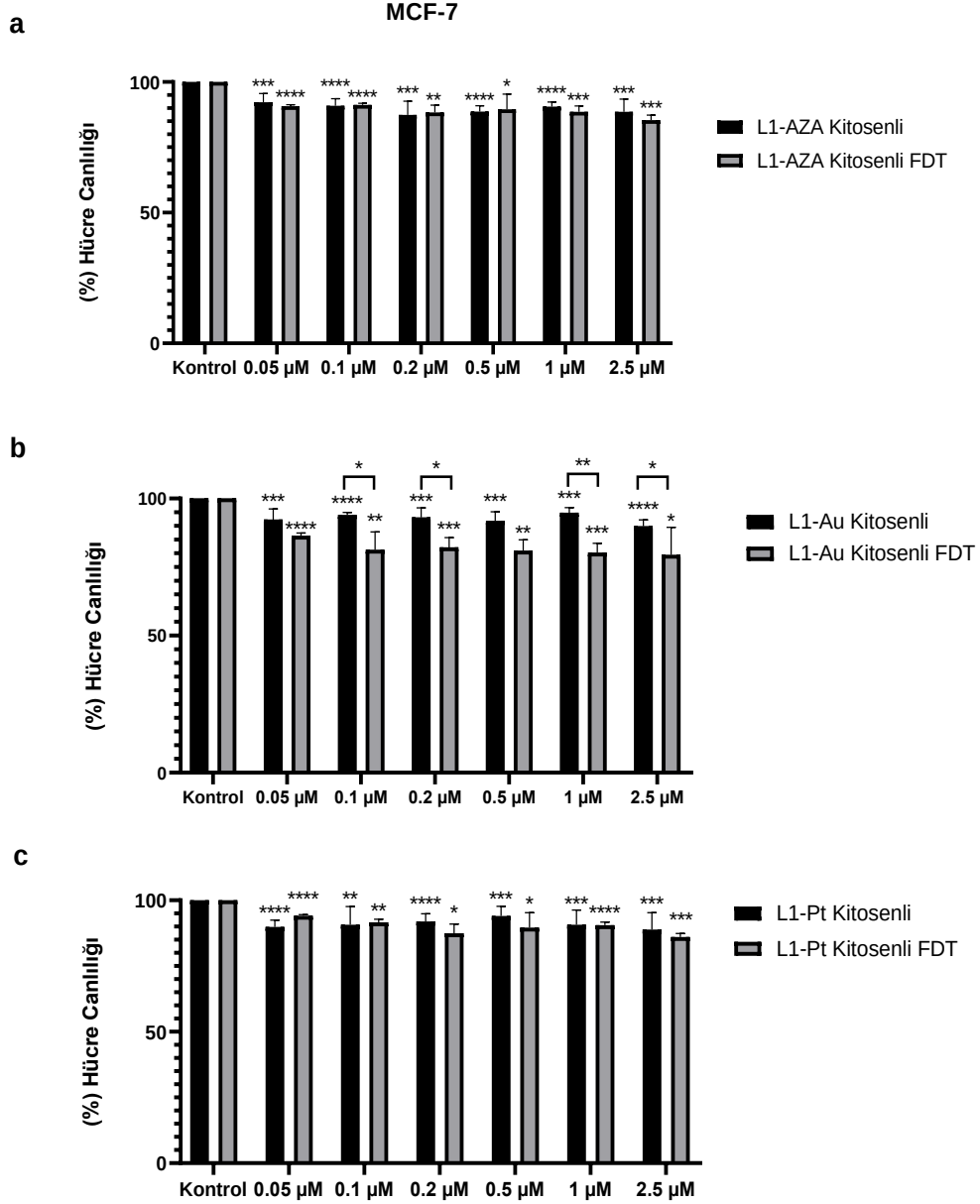
Şekil 4.3. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L1, L1-Au ve L1-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 kolorektal kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L1 ve L1 FDT, b) L1-Au ve L1-Au FDT ile c) L1-Pt ve L1-Pt FDT'nin HT-29 hücre hattı üzerindeki etkileri.

4.1.2. L1 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) farklı konsantrasyonlarda fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

L1 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platin (Pt)'in fotodinamik terapi (FDT) uygulamadan önce ve uygulandıktan sonra meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi yapıldı. L1 kitosanlı bileşiğinin, MCF-7 hücre hattında en yüksek konsantrasyon olan 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan ve uygulandıktan sonra hücre üzerinde oldukça düşük sitotoksikite göstererek her iki durum da hücre canlılığı oranı %88 olarak belirlendi (Şekil 4.4a). L1 kitosanlı bileşiğinin OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %83 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulanması sonrası bu oran %72 olarak belirlendi (Şekil 4.5a). Yine L1 kitosanlı bileşiğinin, HT-29 hücre hattında 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %89 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %52 olarak belirlendi (Şekil 4.6a).

L1-Au kitosanlı bileşiğinin, MCF-7 hücre hattında 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %90 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %79 olarak belirlendi (Şekil 4.4b). L1-Au serisi kitosanlı bileşiğin, OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'da hücre canlılığı oranı %78 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %70 olarak belirlendi (Şekil 4.5b). Yine L1-Au kitosanlı bileşiğinin, HT-29 hücre hattında FDT uygulanmadan ve uygulandıktan sonra hücre üzerinde gösterdiği düşük sitotoksikite aynı olup hücre canlılığı oranı %75 olarak belirlendi (Şekil 4.6b).

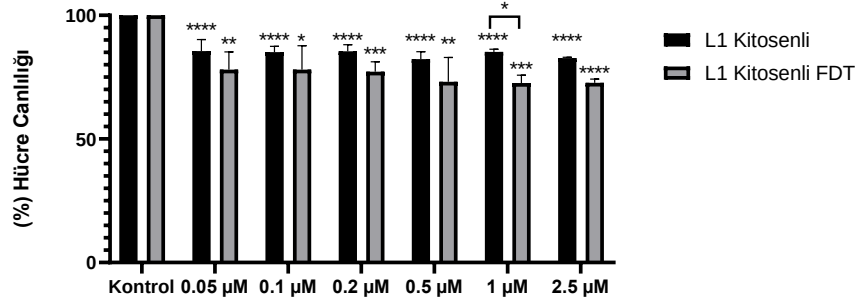
L1-Pt kitosanlı bileşiğinin, MCF-7 hücre hattında 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan ve uygulandıktan sonra hücre canlılığı oranı %85 olarak saptanarak her iki durum da da benzer ve düşük sitotoksikite gösterdikleri belirlendi (Şekil 4.4c). L1-Pt kitosanlı bileşiğinin, OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %82 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %72 olarak belirlendi (Şekil 4.5c). Yine L1-Pt kitosanlı bileşiğinin, HT-29 hücre hattında 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %92 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası hücre canlılığı oranı %52 olarak belirlendi (Şekil 4.6c).



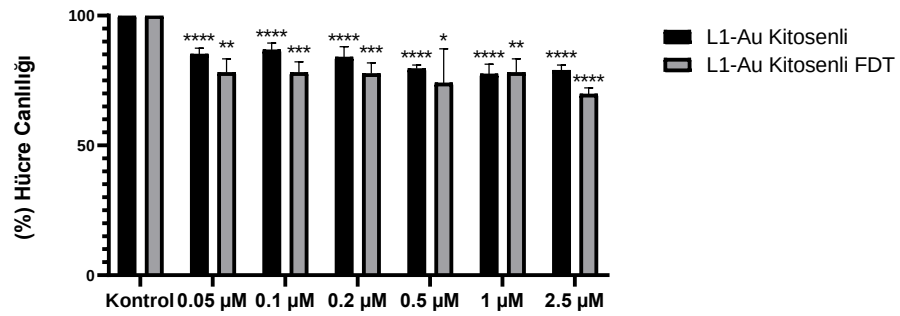
Şekil 4.4. Şekil 4.4. MCF-7 meme kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L1 kitosanlı, L1-Au kitosanlı ve L1-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücre sel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 meme kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L1 ve L1 FDT, b) L1-Au ve L1-Au FDT ile c) L1-Pt ve L1-Pt FDT'nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri.

OV2008

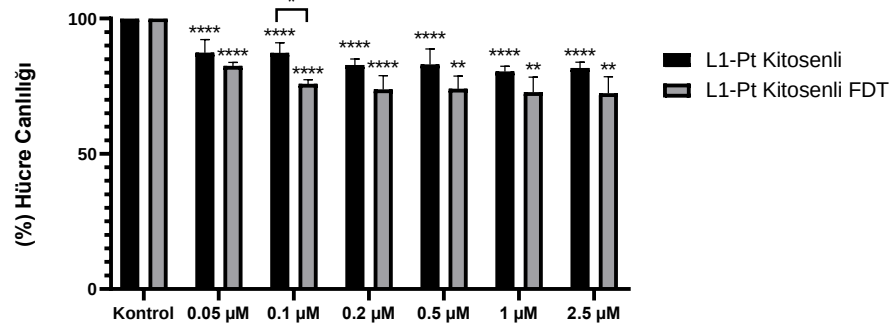
a



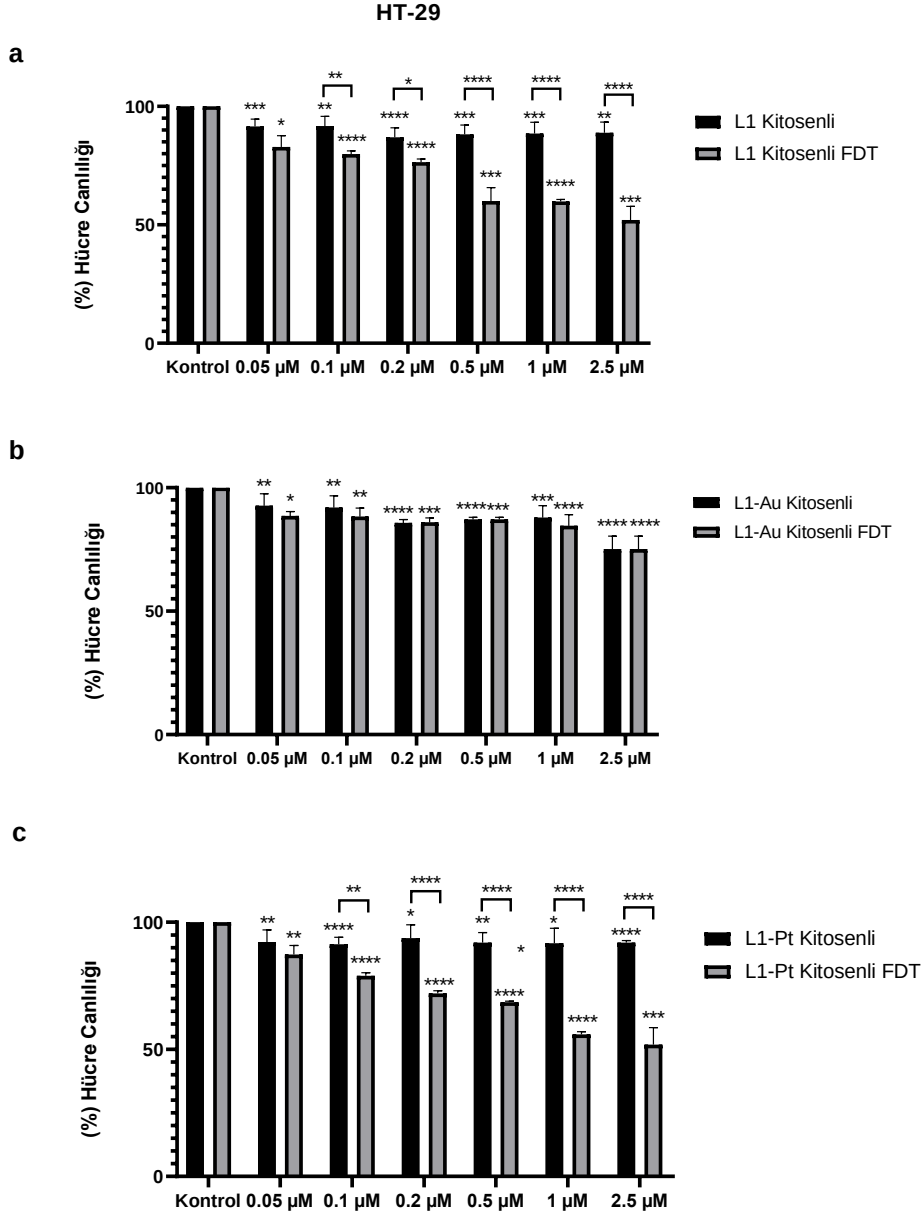
b



c



Şekil 4.5. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L1 kitosanlı, L1-Au kitosanlı ve L1-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L1 ve L1 FDT, b) L1-Au ve L1-Au FDT ile c) L1-Pt ve L1-Pt FDT'nin OV2008 hücre hattı üzerindeki etkileri.



Şekil 4.6. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında MTT yöntemi ile L1 kitosanlı, L1-Au kitosanlı ve L1-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 kolorektal kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nm ve 570 nm'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L1 ve L1 FDT, b) L1-Au ve L1-Au FDT ile c) L3-Pt ve L3-Pt FDT'nin HT-29 hücre hattı üzerindeki etkileri.

4.1.3. L2 serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

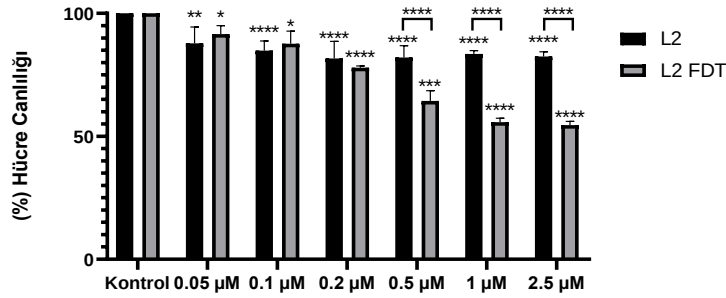
L2 serisi, altın (Au) ve platin (Pt)'in fotodinamik terapi (FDT) uygulamadan önce ve uyguladıktan sonra meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi yapıldı. L2 bileşiğinin, MCF-7 hücre hattında 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı % 82 iken FDT uygulandıktan sonra hücre canlılığı oranı %55'e düştüğü belirlendi (Şekil 4.7a). L2 bileşiğinin 2.5 μM 'da OV2008 hücre hattında ise FDT uygulamadan önce hücre canlılığı oranı %73 iken FDT uyguladıktan sonra hücre canlılığı oranı %33'e düşmüş olduğu belirlendi (Şekil 4.8a). Yine aynı bileşiğin 2.5 μM 'lık konsantrasyonu, HT-29 hücre hattında FDT uygulamadan hücre canlılığı %85 iken FDT uygulaması sonrası bu oranı %27'ye düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.9a).

L3-Au bileşiği, MCF-7 hücre hattında FDT uygulanmadan önce 1 μM 'lık konsantrasyonda hücre canlılığı oranını %51'e düşürürken FDT uygulanması sonrası 0.5 μM 'da hücre canlılığı oranını %49'a düşürdüğü belirlendi. Ayrıca L3-Au bileşiği MCF-7 hücre hattında 2.5 μM 'da yüksek sitotoksosite göstererek hücre canlılığını %3'e kadar düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.7b). L3-Au bileşiği, OV2008 hücre hattında ise 0.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranını %68'e düşürürken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %4'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.8b). Yine aynı bileşiğin HT-29 hücre hattında FDT uygulamadan 0.5 μM 'lık konsantrasyonda hücre canlılığı oranı %67 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %6'ya kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.9b).

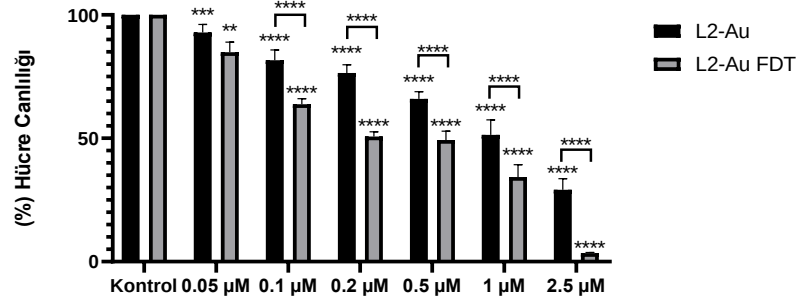
L3-Pt bileşiği, MCF-7 hücre hattında 2.5 μM 'da FDT uygulamadan hücre canlılığı oranı %87 iken FDT uygulaması sonrası bu oran %47'ye kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.7c). L3-Pt birleşigi OV2008 hücre hattında ise FDT uygulamadan 0.5 μM 'lık konsantrasyonda hücre canlılığı oranı %84 iken FDT sonrası bu oran %45'e düştüğü belirlendi (Şekil 4.8c). Yine aynı birleşigin HT-29 hücre hattında 1 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %81 iken FDT uygulaması sonrası bu oran %40'a düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.9c).

a

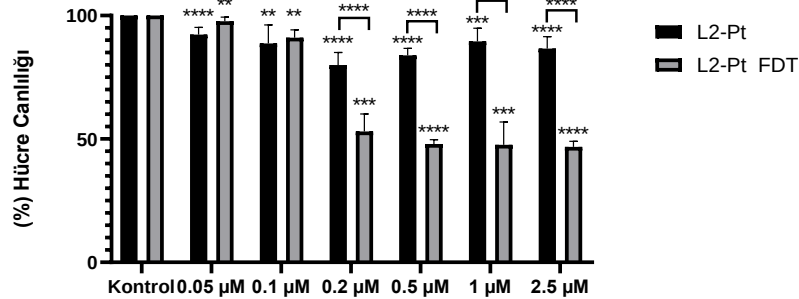
MCF-7



b

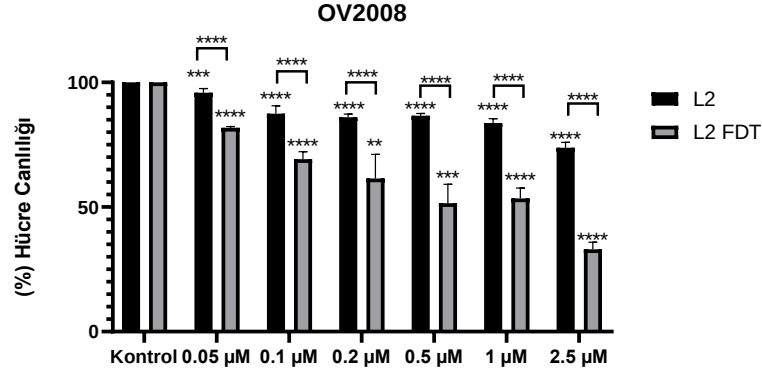


c

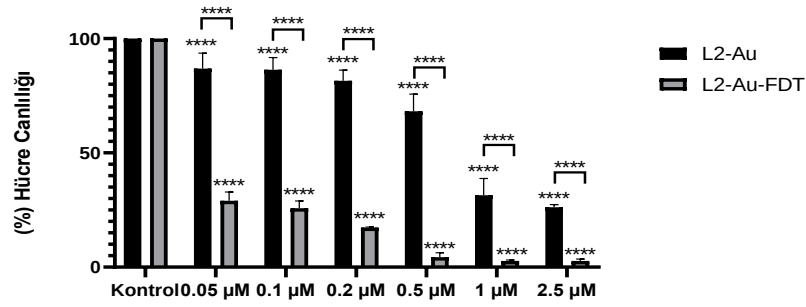


Şekil 4.7. MCF-7 meme kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L2, L2-Au ve L2-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uygulandıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 yumurtalık kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıkta bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değeri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değeri göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değeri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L2 ve L2 FDT, b) L2-Au ve L2-Au FDT ile c) L2-Pt ve L2-Pt FDT'nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri.

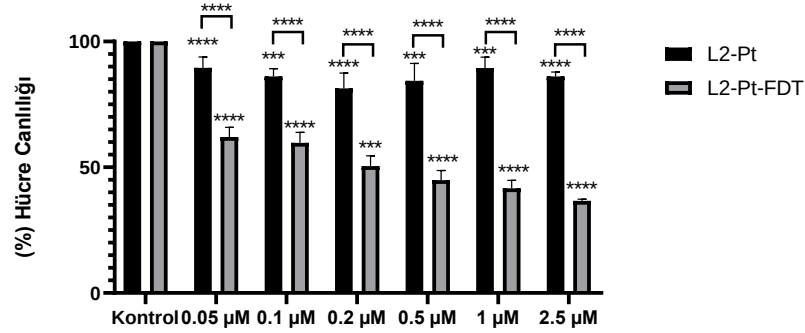
a



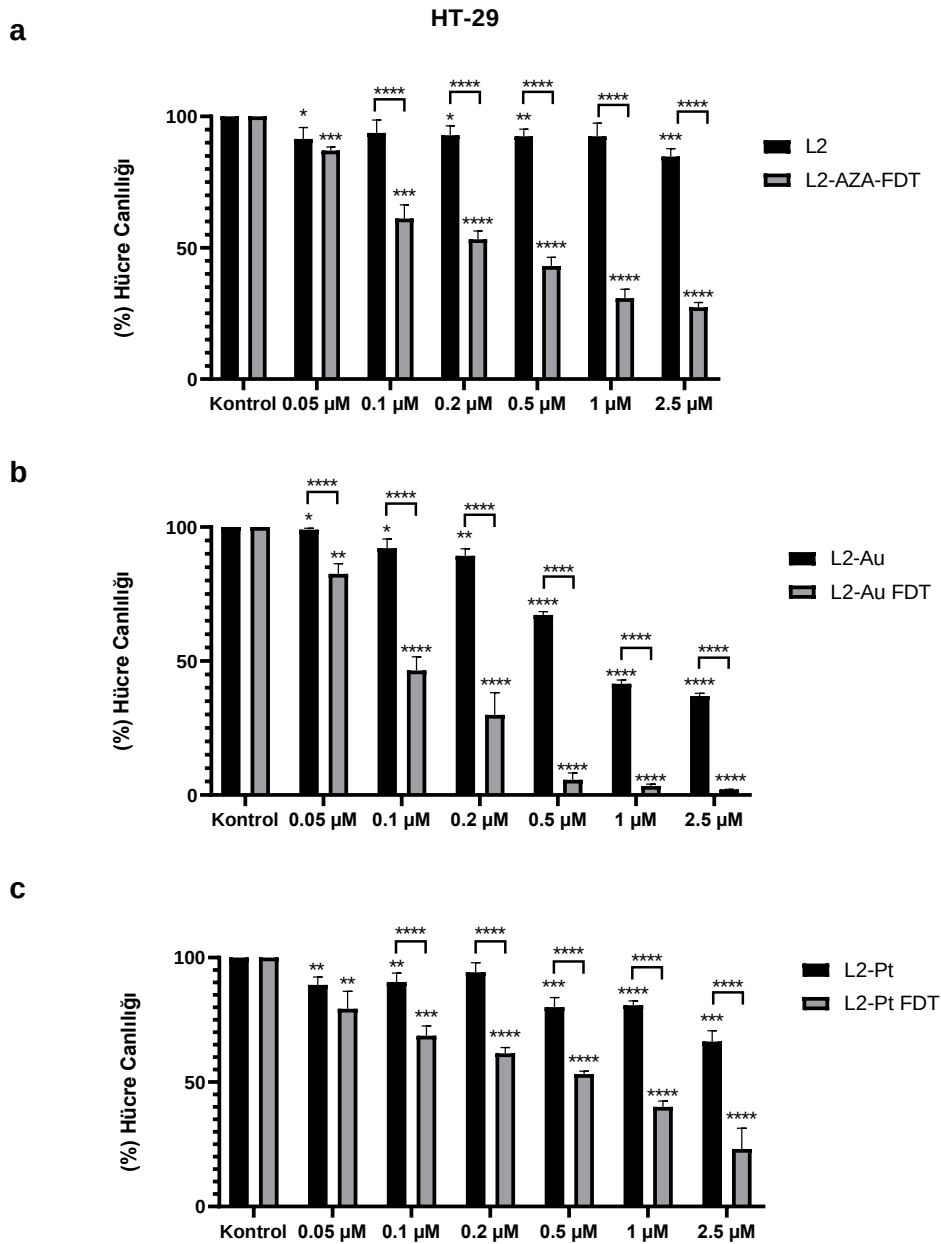
b



c



Şekil 4.8. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L2, L2-Au ve L2-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıkta bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L2 ve L2 FDT, b) L2-Au ve L2-Au FDT ile c) L2-Pt ve L2-Pt FDT'nin OV2008 hücre hattı üzerindeki etkileri.



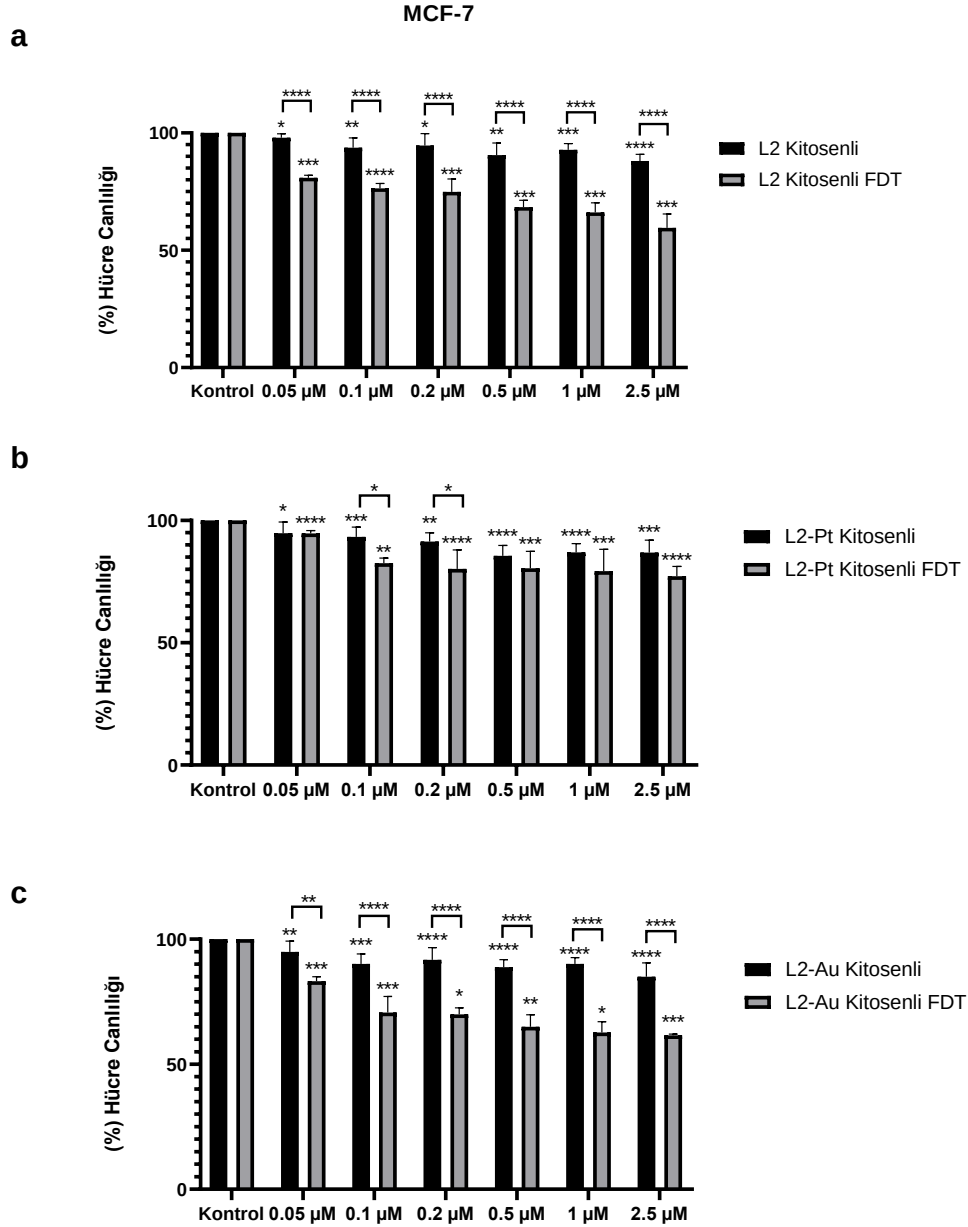
Şekil 4.9. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L2, L2-Au ve L2-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 kolorektal kanseri hücre hatları 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.2 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L2 ve L2 FDT, b) L2-Au ve L2-Au FDT ile c) L2-Pt ve L2-Pt FDT'nin HT-29 hücre hattı üzerindeki etkileri.

4.1.4. L2 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) farklı konsantrasyonlarda fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

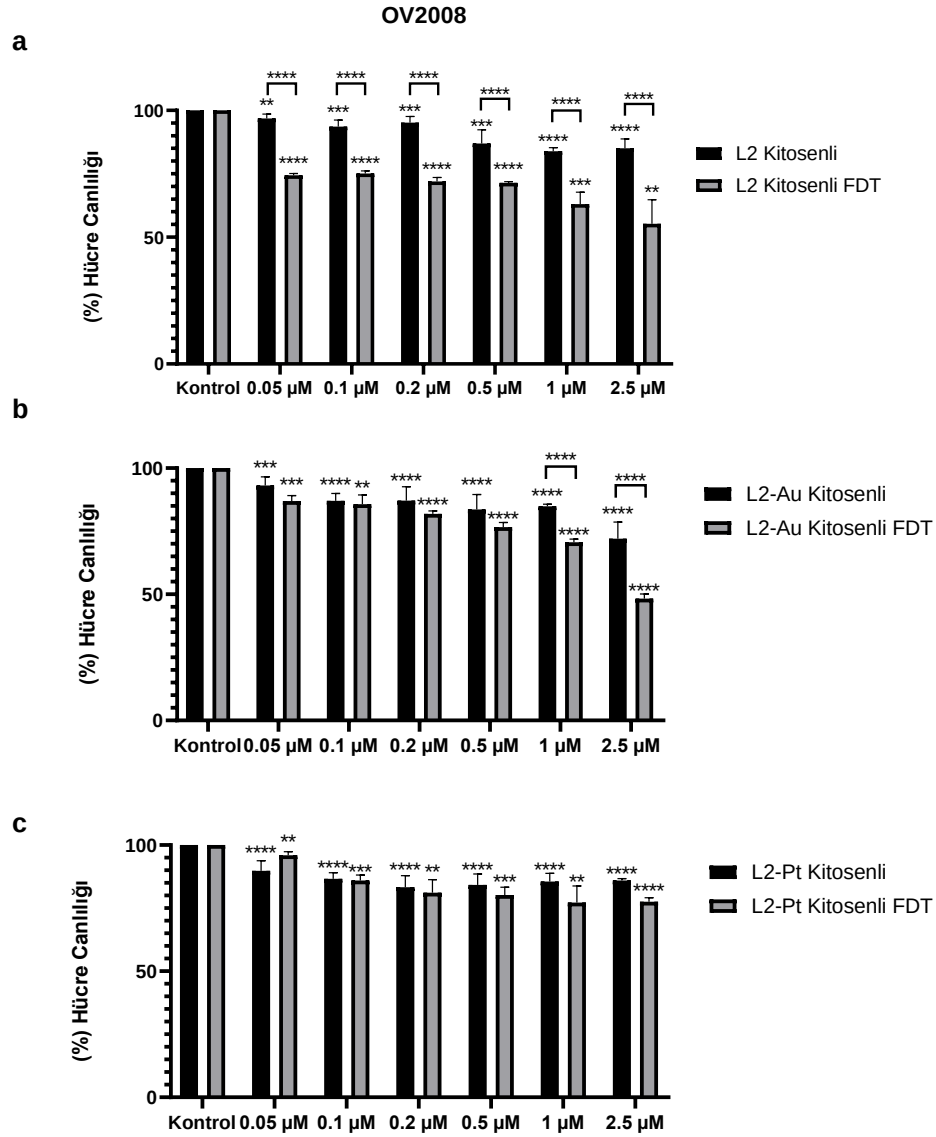
L2 kitosanlı bileşiğinin MCF-7 hücre hattında, 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %88'de iken FDT uygulaması sonrası aynı konsantrasyonda bu oran %60'a kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.10a). L2 kitosanlı bileşiğinin OV2008 hücre hattında 2.5 μM 'lık konsantrasyonda ise FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %86 iken FDT uygulaması sonrası ile bu oranı %55'e kadar düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.11a). Yine aynı birleşimin HT-29 hücre hattında ise 2.5 μM 'lık konsantrasyonda FDT uygulamadan hücre canlılığı oranı %78 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %48'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.12a).

L2-Au kitosanlı bileşiğin, MCF-7 hücre hattında FDT uygulanmadan 2.5 μM 'lık konsantrasyonda hücre canlılığı oranı %87 iken bu oran aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası %77'ye düştüğü belirlendi (Şekil 4.10b). L2-Au kitosanlı bileşiğin, OV2008 hücre hattında ise FDT uygulanmadan 2.5 μM 'da hücre canlılığı oranı %72 iken FDT uygulaması sonrası aynı konsantrasyondaki hücre canlılığı oranı %48 olarak belirlendi (Şekil 4.11b). Yine aynı birleşimin HT-29 hücre hattında FDT uygulanmadan 2.5 μM 'lık konsantrasyonu ile muamelesi sonucunda hücre canlılığı oranı %72 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %48'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.12b).

L2-Pt kitosanlı bileşiğin, MCF-7 hücre hattında FDT uygulanmadan 2.5 μM 'lık konsantrasyonda hücre canlılığı %85 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %61'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.10c). L2-Pt kitosanlı bileşiğin, OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %86 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulanması sonrası bu oran %78'e düştüğü belirlendi (Şekil 4.11c). Aynı bileşik HT-29 hücre hattında 2.5 μM 'lık konsantrasyonda FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %72 iken aynı konsantrasyonda FDT sonrası bu oran %48'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.12c).



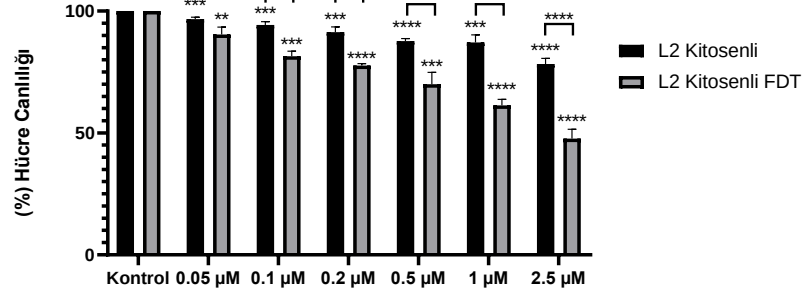
Şekil 4.10. MCF-7 meme kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L2 kitosanlı, L2-Au kitosanlı ve L2-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 meme kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L2 ve L2 FDT, b) L2-Au ve L2-Au FDT ile c) L2-Pt ve L2-Pt FDT'nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri.



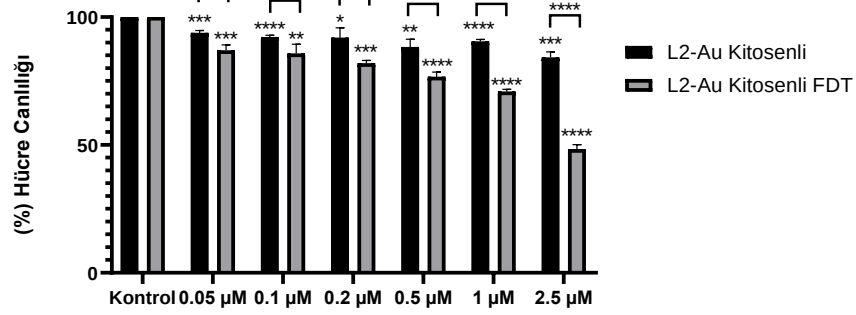
Şekil 4.11. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L2 kitosanlı, L2-Au kitosanlı ve L2-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L2 ve L2 FDT, b) L2-Au ve L2-Au FDT, c) L2-Pt ile L2-Pt FDT'nin OV2008 hücre hattı üzerindeki etkileri.

HT-29

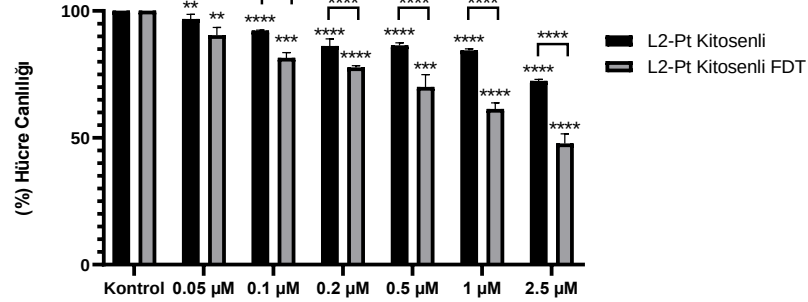
a



b



c



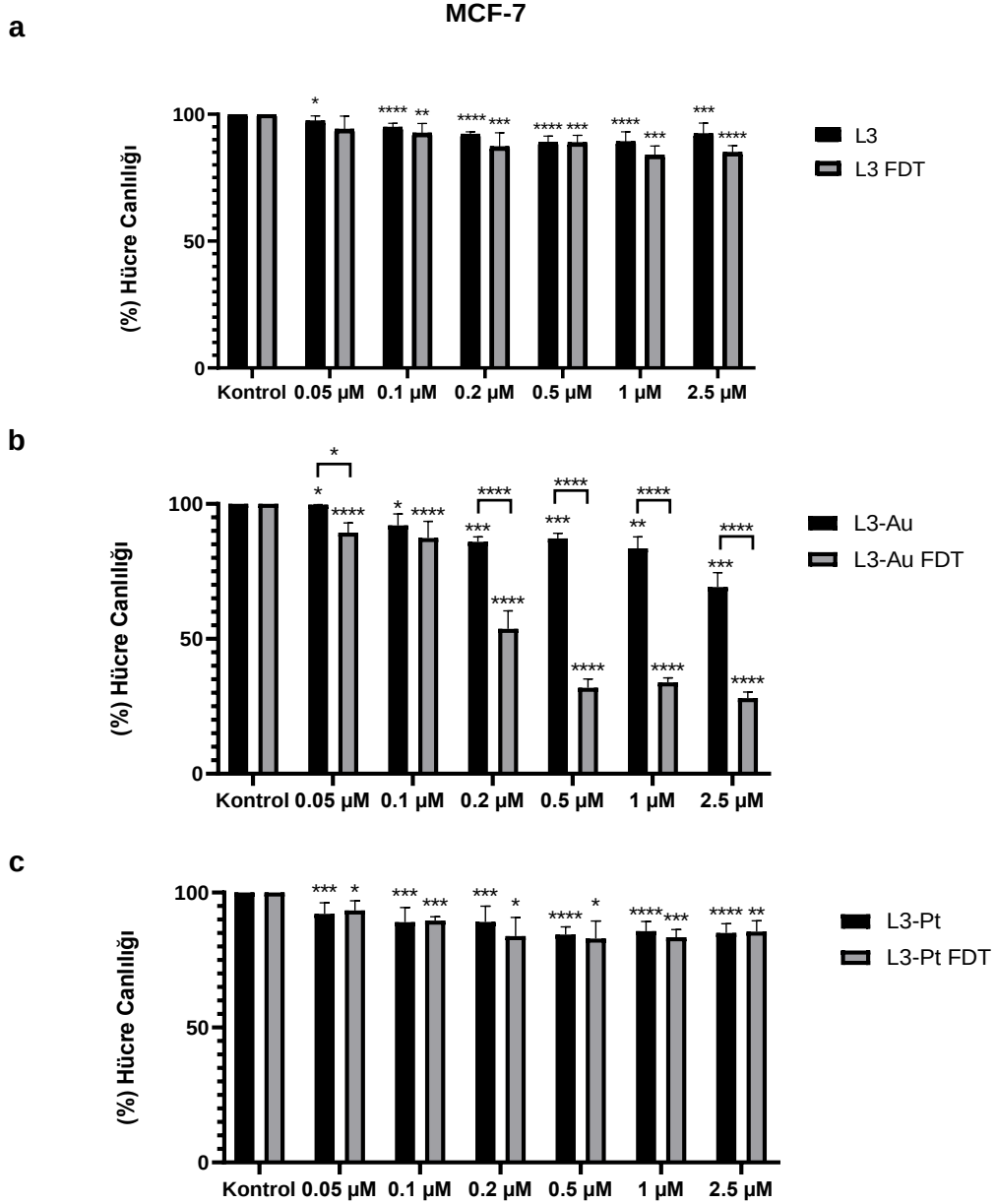
Şekil 4.12. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L2 kitosanlı, L2-Au kitosanlı ve L2-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 kolorektal kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L2 ve L2 FDT, b) L2-Au ve L2-Au FDT, c) L2-Pt ile L2-Pt FDT'nin HT-29 hücre hattı üzerindeki etkileri.

4.1.5. L3 serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) farklı konsantrasyonlarda fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

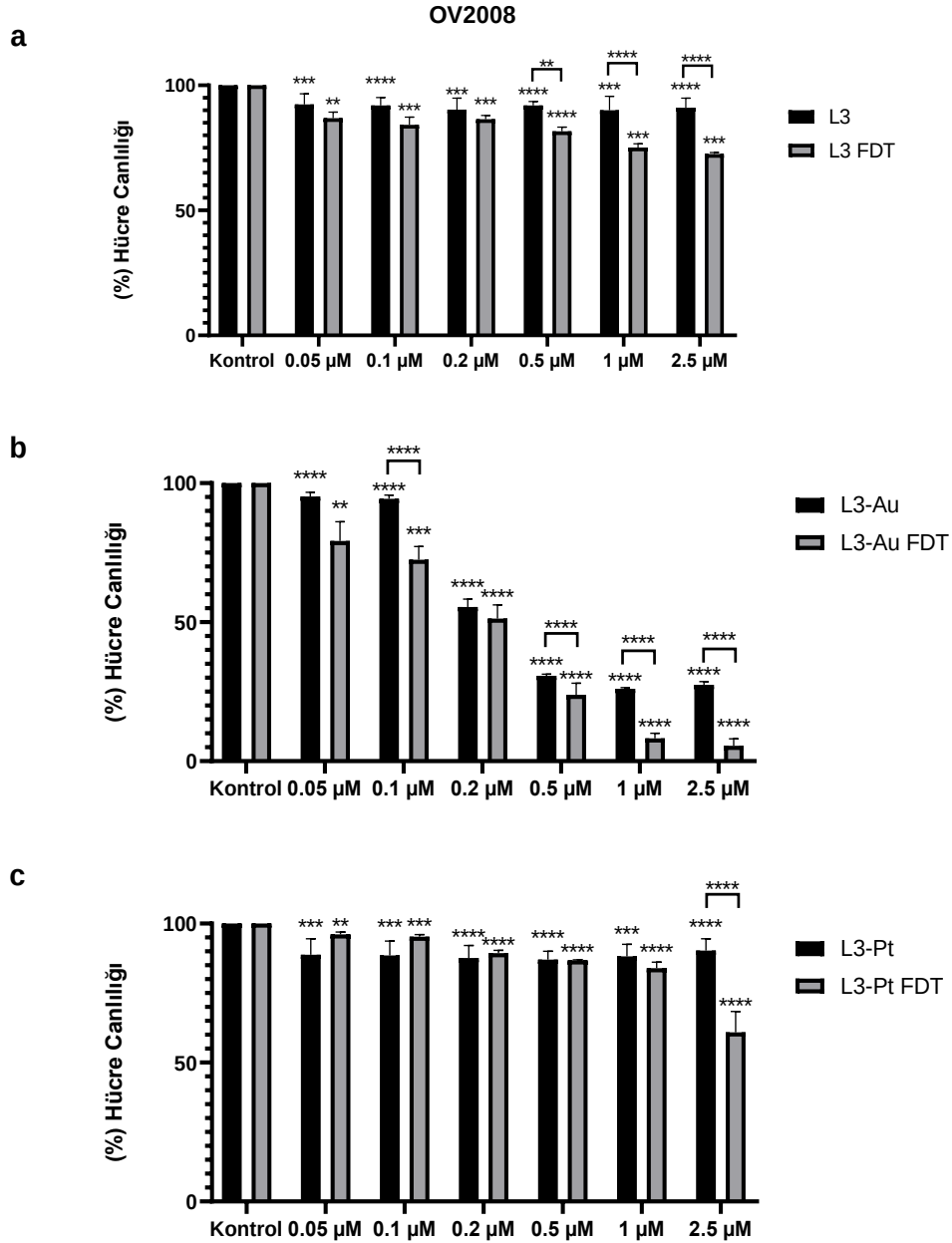
L3 serisi, altın (Au) ve platin (Pt)'in fotodinamik terapi (FDT) uygulamadan önce ve uygulandıktan sonra meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi yapıldı. L3 bileşiğinin, MCF-7 hücre hattında en yüksek konsantrasyon olan 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %92 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %85 olarak belirlendi (Şekil 4.13a). L3 bileşiği, OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %91 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %73 olarak belirlendi (Şekil 4.14a). Yine L3 bileşiği, HT-29 hücre hattında 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %77 iken bu oran aynı konsantrasyonda FDT uygulanması sonrası %59 olarak belirlendi (Şekil 4.15a).

L3-Au bileşiği, MCF-7 hücre hattında 0.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %87 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulandıktan sonra bu oran %32 olarak belirlendi (Şekil 4.13b). L3-Au bileşiği, OV2008 hücre hattında 0.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %55 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %50 olarak belirlendi (Şekil 4.14b). L3-Au bileşiği, HT-29 hücre hattında 1 μM 'da FDT uygulanmadan ve uygulandıktan sonra hücre canlılığı oranı %45-50 olduğu saptanarak her iki durum da da hücre üzerindeki sitotoksitesinin benzer olduğu belirlendi (Şekil 4.15b).

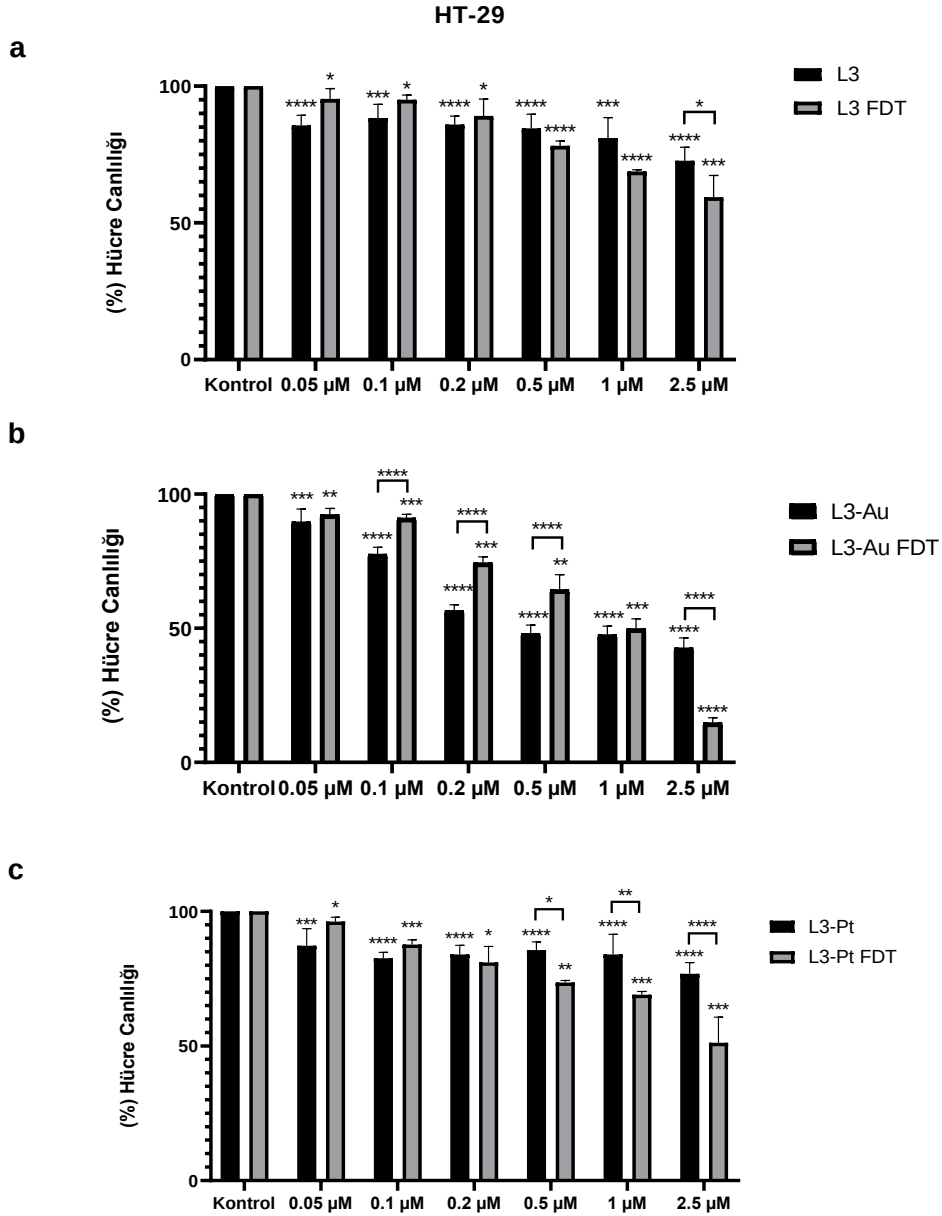
L3-Pt bileşiği, MCF-7 hücre hattında en yüksek konsantrasyon olan 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan ve uygulandıktan sonra benzer sitotoksite göstererek hücre canlılığı oranı %85 olarak belirlendi (Şekil 4.13c). L3-Pt bileşiği, OV2008 hücre hattında 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %90 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulanması sonrası bu oran %61'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.14c). L3-Pt bileşiği, HT-29 hücre hattında ise 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %76 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası hücre canlılığı oranı %51'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.15c).



Şekil 4.13. MCF-7 meme kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L3, L3-Au ve L3-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uygulandıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 meme kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alındı. Arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L3 ve L3 FDT, b) L3-Au ve L3-Au FDT ile c) L3-Pt ve L3-Pt FDT'nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri.



Şekil 4.14. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L3, L3-Au ve L3-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L3 ve L3 FDT, b) L3-Au ve L3-Au FDT ile c) L3-Pt ve L3-Pt FDT'nin OV2008 hücre hattı üzerindeki etkileri.



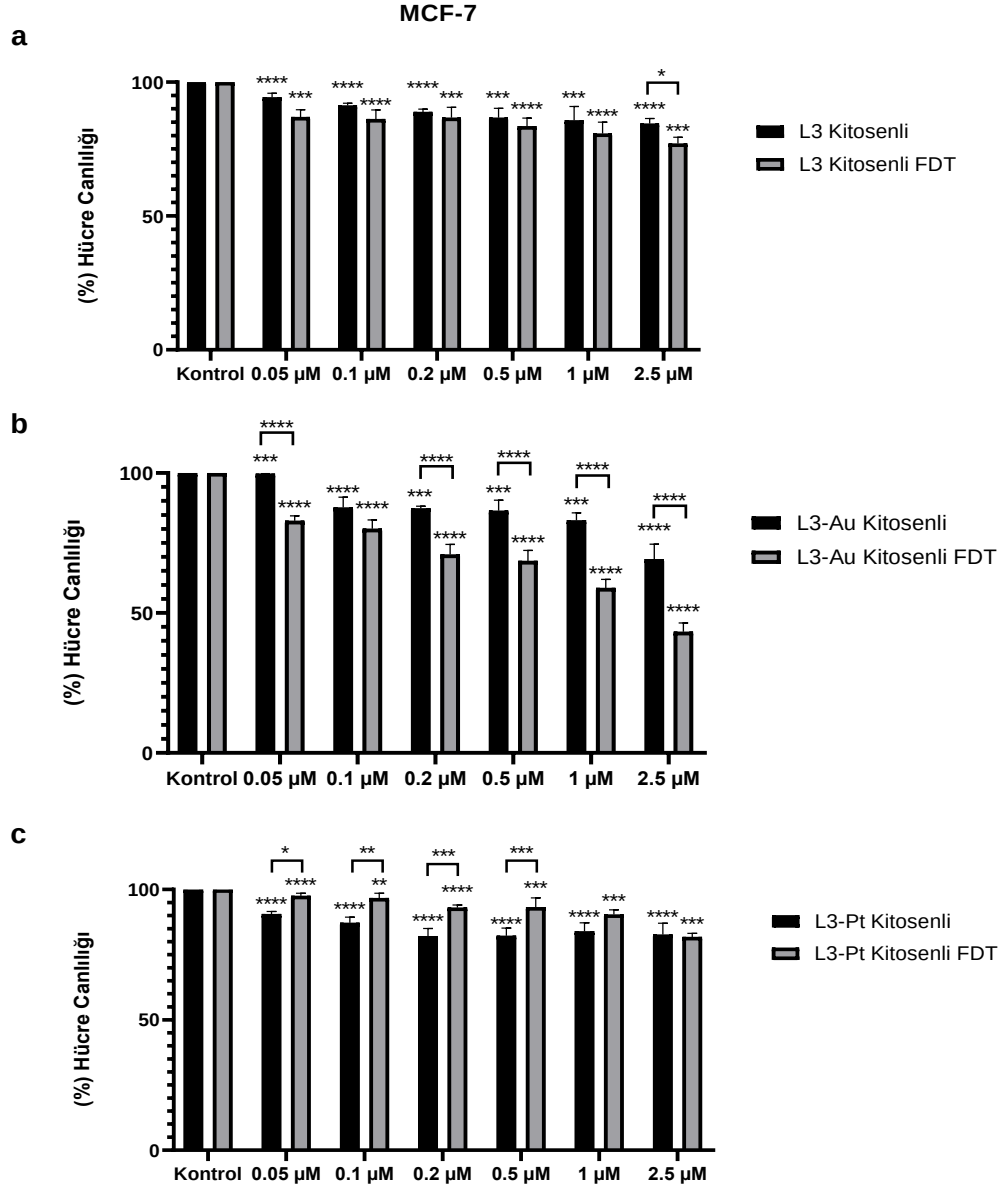
Şekil 4.15. HT-29 kolorektal kanser hücre hattında, MTT yöntemi ile L3, L3-Au ve L3-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 kolorektal kanser hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L3 ve L3 FDT, b) L3-Au ve L3-Au FDT ile c) L3-Pt ve L3-Pt FDT'nin HT-29 hücre hattı üzerindeki etkileri.

4.1.6. L3 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) farklı konsantrasyonlarda fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

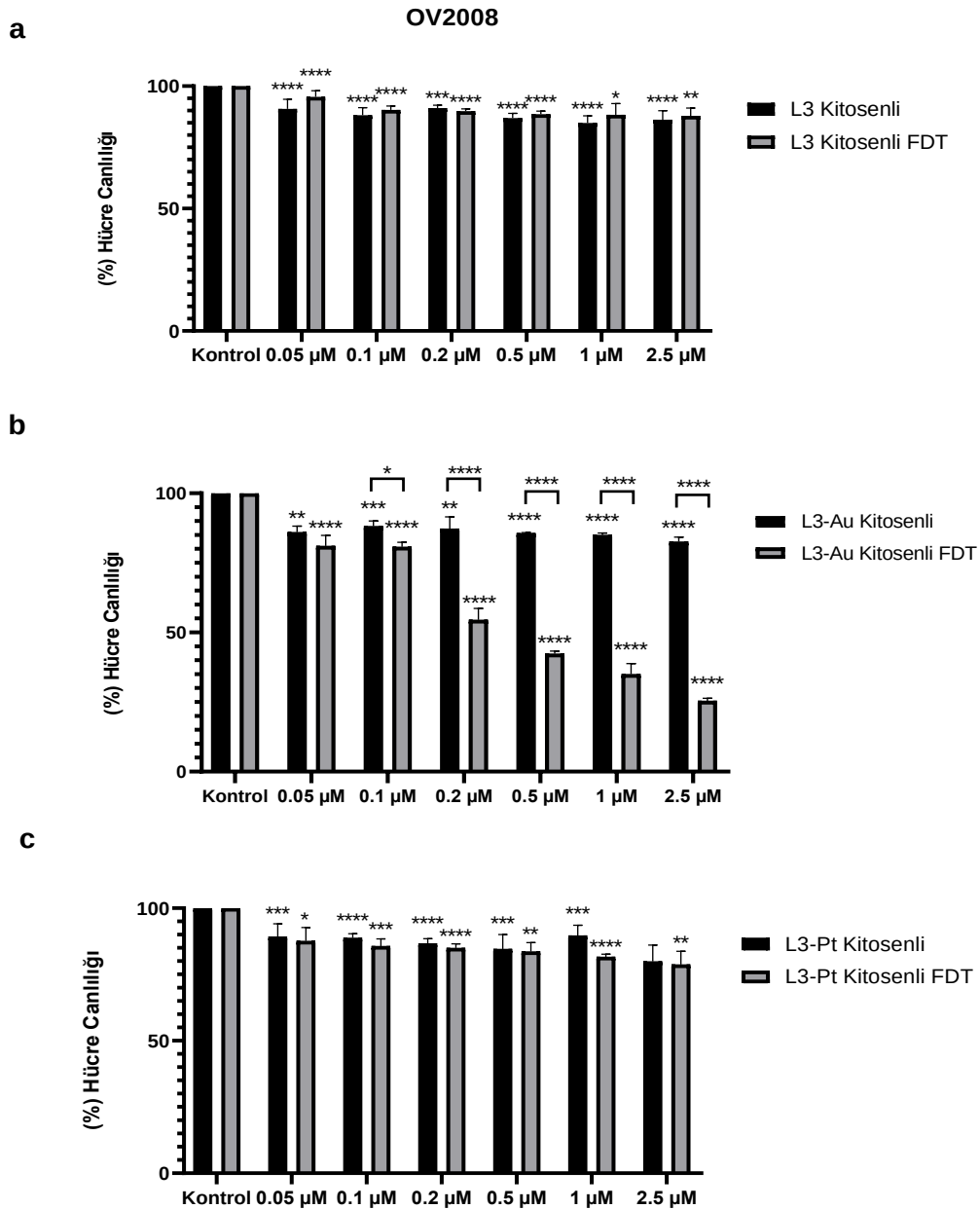
L3 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platin (Pt)'nin fotodinamik terapi (FDT) uygulamadan önce ve uyguladıktan sonra meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi yapıldı. MTT testi sonucunda başlangıç ligandı olan L3 Kitosanlı bileşiğinin FDT uygulanmadan ve FDT uygulandıktan sonraki her iki durumda da artan konsantrasyonlarına rağmen beklenildiği üzere bu üç hücre hattında da sitotoksik etki göstermediği belirlendi (Şekil 4.16a, Şekil 4.17a ve Şekil 4.18a).

L3-Au kitosanlı bileşik ile MCF-7 hücre hattında FDT uygulanmadan en yüksek konsantrasyon olan 2.5 μM 'da hücre canlılığı oranı %70 olarak saptanırken, FDT uygulaması sonrası bu oran %50 eşinin altına düşürmüştüğü belirlendi (Şekil 4.16b). L3-Au kitosanlı bileşik, OV2008 hücre hattında ise FDT uygulanmadan tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığı oranını %85 civarında tutarken, FDT sonrası bu durum 0.5 μM 'lık konsantrasyonda %50 eşinin altına düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.17b). Yine L3-Au kitosanlı bileşiğin HT-29 hücre hattında, FDT uygulanmadan en yüksek konsantrasyon olan 2.5 μM 'da yüzde hücre canlılığı oranı %80 iken FDT uygulaması sonrası 1 μM 'lık konsantrasyonda hücre canlılığı oranını %50'ye kadar düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.18b).

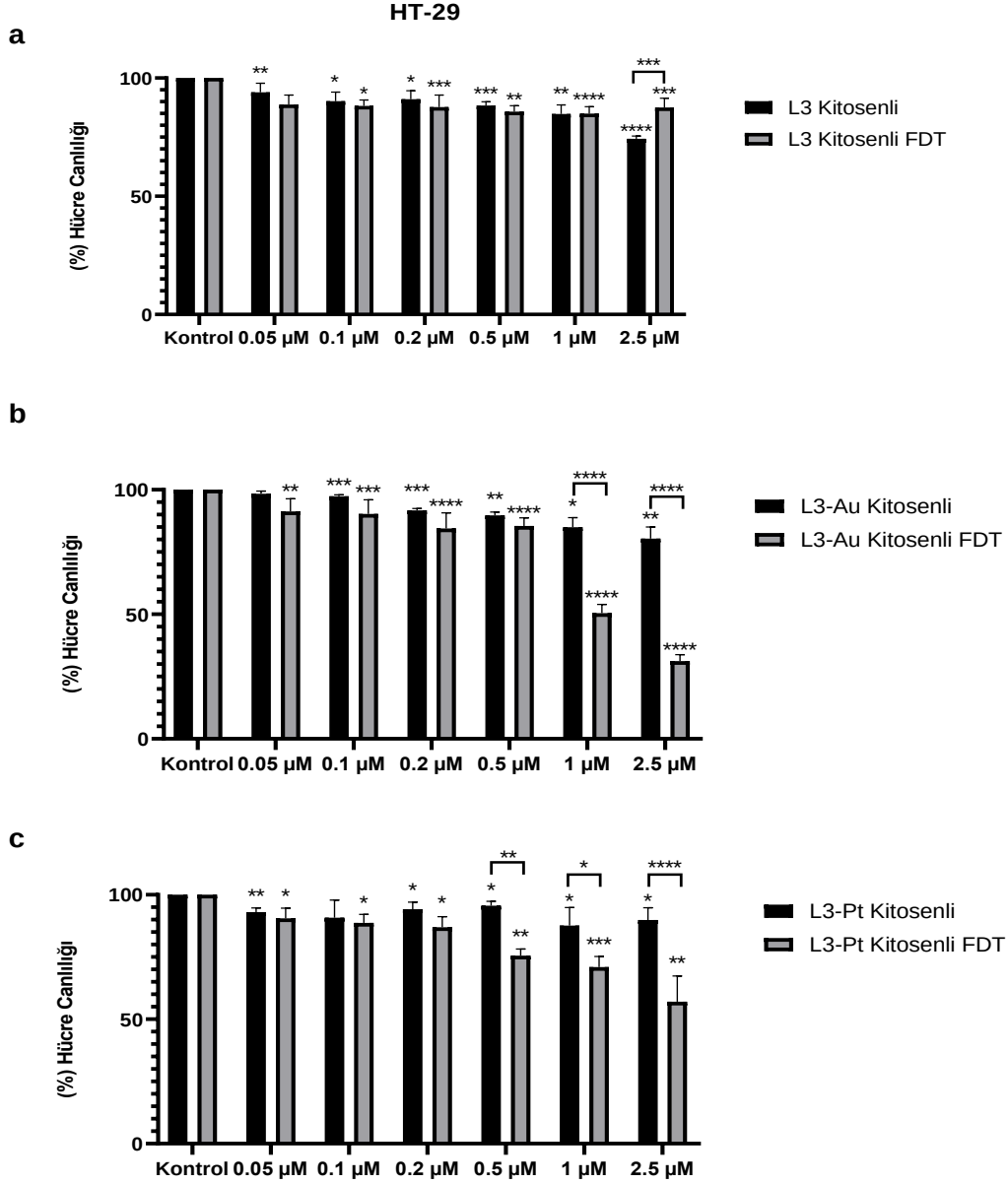
L3-Pt kitosanlı bileşik (2.5 μM) ile muamele edilen MCF-7 ve OV2008'de FDT uygulaması öncesi ve sonrası yüzde hücre canlılık oranında bir farklılık göstermeden her iki durum da da hücre canlılık oranı %80'de kaldığı belirlendi (Şekil 4.16c ve Şekil 4.17c). L3-Pt kitosanlı bileşik ile muamele edilen HT-29 hücre hattında ise FDT sonrası hücre canlılık oranını %57'ye kadar düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.18c).



Şekil 4.16. MCF-7 meme kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L3 kitosanlı, L3-Au kitosanlı ve L3-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 kolorektal kanser hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi(****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L3Kitosanlı ve L3 Kitosanlı FDT, b) L3-Au Kitosanlı ve L3-Au Kitosanlı FDT ile c) L3-Pt Kitosanlı ve L3-Pt Kitosanlı FDT'nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri.



Şekil 4.17. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L3 kitosanlı, L3-Au kitosanlı ve L3-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 yumurtalık kanser hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L3 ve L3 FDT, b) L3-Au ve L3-Au FDT ile c) L3-Pt ve L3-Pt FDT'nin OV2008 hücre hattı üzerindeki etkileri.



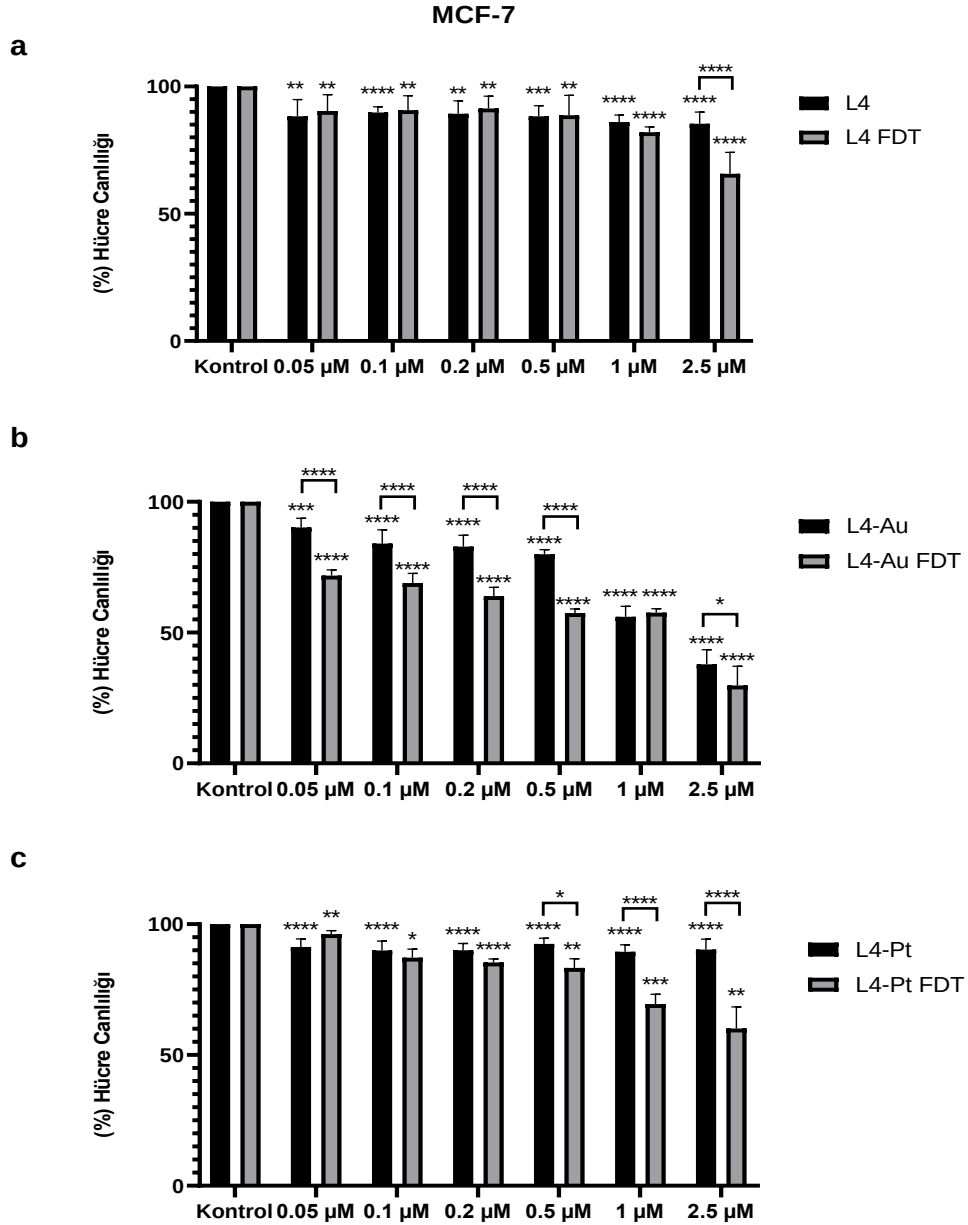
Şekil 4.18. HT-29 kolorektal kanser hücre hattında, MTT yöntemi ile L3 kitosanlı, L3-Au Kitosanlı ve L3-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 kolorektal kanser hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi(****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L3 ve L3 FDT, b) L3-Au ve L3-Au FDT ile c) L3-Pt ve L3-Pt FDT'nin HT-29 hücre hattı üzerindeki etkileri.

4.1.7. L4 serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

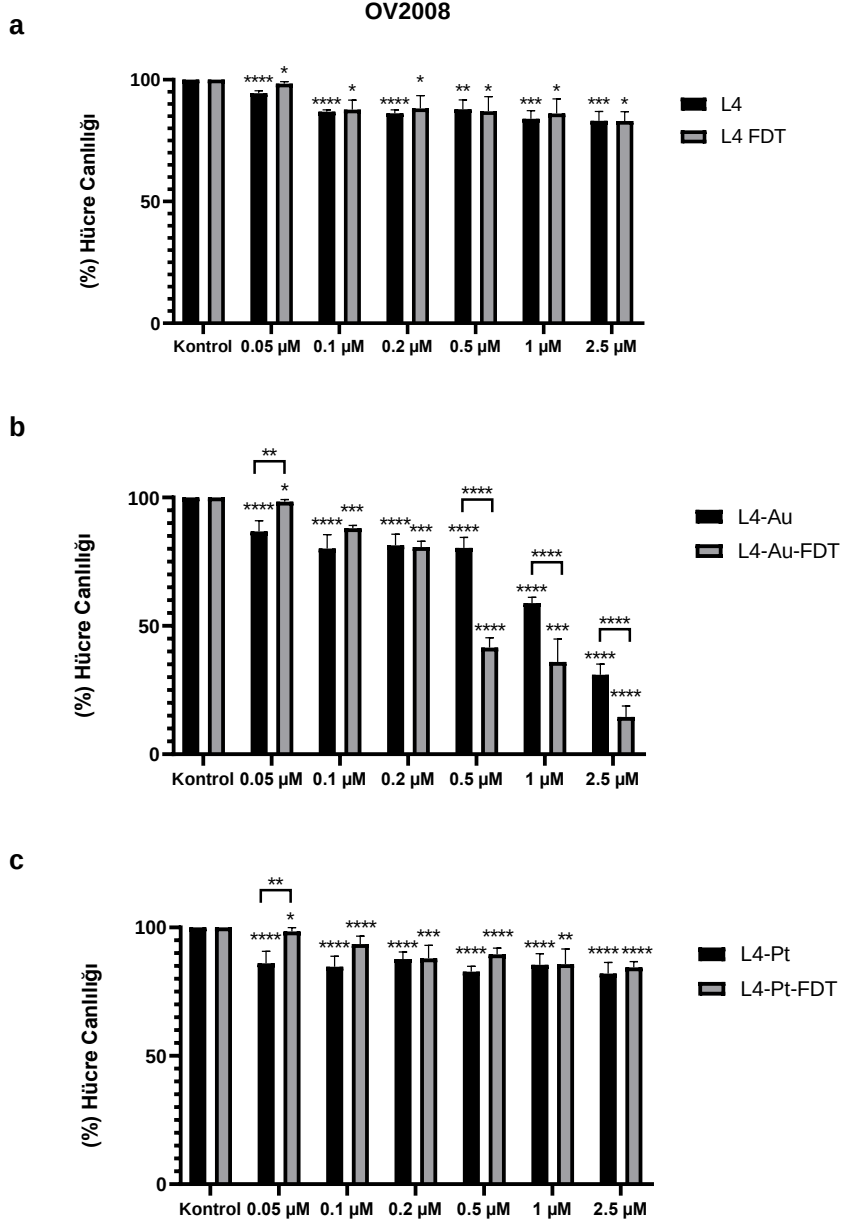
L4 serisi, altın (Au) ve platin (Pt)'in fotodinamik terapi (FDT) uygulamadan önce ve uyguladıktan sonra meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi yapıldı. MTT testi sonucunda başlangıç ligandı olan L4'nın, MCF-7 hücre hattında 2.5 μM 'lık konsantrasyonda FDT uygulamadan hücre canlılığı oranı %85 iken FDT sonrası bu oran %66 olarak belirlendi (Şekil 4.19a). L4 bileşiğinin OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan ve uygulandıktan sonra hücre canlılığı oranı %83 olarak belirlendi (Şekil 4.20a). Yine L4 serisi HT-29 hücre hattında ise 2.5 μM 'lık konsantrasyonda FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %68 iken bu oran FDT uygulaması ardından %62 olarak belirlendi (Şekil 4.21a).

L4-Au bileşiği, MCF-7 hücre hattında FDT uygulamadan en yüksek konsantrasyon olan 2.5 μM 'da hücre canlılığı oranı % 38'lerde iken FDT uygulaması sonrası bu oran %30'a kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.20b). L4-Au bileşiği, OV2008 hücre hattında ise FDT uygulamadan 2.5 μM 'da hücre canlılık oranı % 31 iken FDT uygulaması sonrası 0.5 μM 'lık konsantrasyonda hücre canlılığı oranını % 40'larda olduğu belirlendi (Şekil 4.20b). Yine L4-Au bileşiği, HT-29 hücre hattında 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %76 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulandıktan sonra hücre canlılığı oranı %68 olarak belirlendi (Şekil 4.21b).

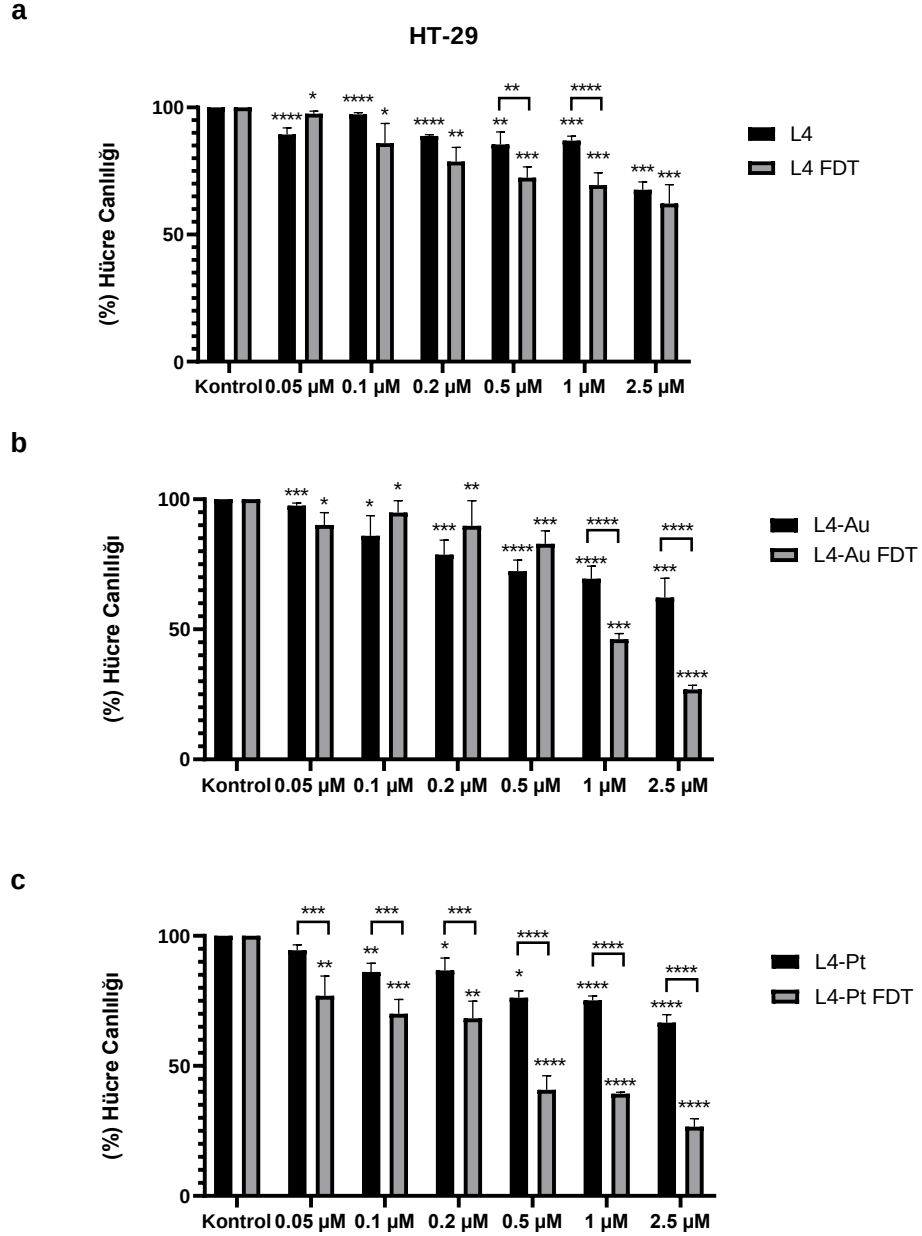
L4-Pt bileşiği, MCF-7 hücre hattında FDT uygulanmadan önce artan konsantrasyonlara rağmen hücre canlılığı oranı %90'lardayken, FDT sonrası hücre canlılığı oranı % 60'larda olduğu belirlendi (Şekil 4.19c). L4-Pt bileşiği, OV2008 hücre hattında ise FDT uygulanmadan ve uyguladıktan sonra bu her iki durum içinde en yüksek konsantrasyon olan 2.5 μM 'da hücre canlılığı oranı % 80-85'lerde olduğu belirlendi (Şekil 4.20c). Yine L4-Pt bileşiği, HT-29 hücre hattında FDT uygulamadan en yüksek olan 2.5 μM 'da hücre canlılığı oranı % 67 iken FDT uygulaması sonrası 0.5 μM 'da hücre canlılığı oranı % 40'a kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.21c).



Şekil 4.19. MCF-7 meme kanser hücre hattında, MTT yöntemi ile L4, L4-Au ve L4-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uygulandıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 meme kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değeri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değeri göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değeri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L4 ve L4 FDT, b) L4-Au ve L4-Au FDT ile c) L4-Pt ve L4-Pt FDT'nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri.



Şekil 4.20. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L4, L4-Au ve L4-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM’da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okµM a değeri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değeri göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değeri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. A) L4 ve L4 FDT, b) L4-Au ve L4-Au FDT ile c) L4-Pt ve L4-Pt FDT’nin OV2008 hücre hattı üzerindeki etkileri.



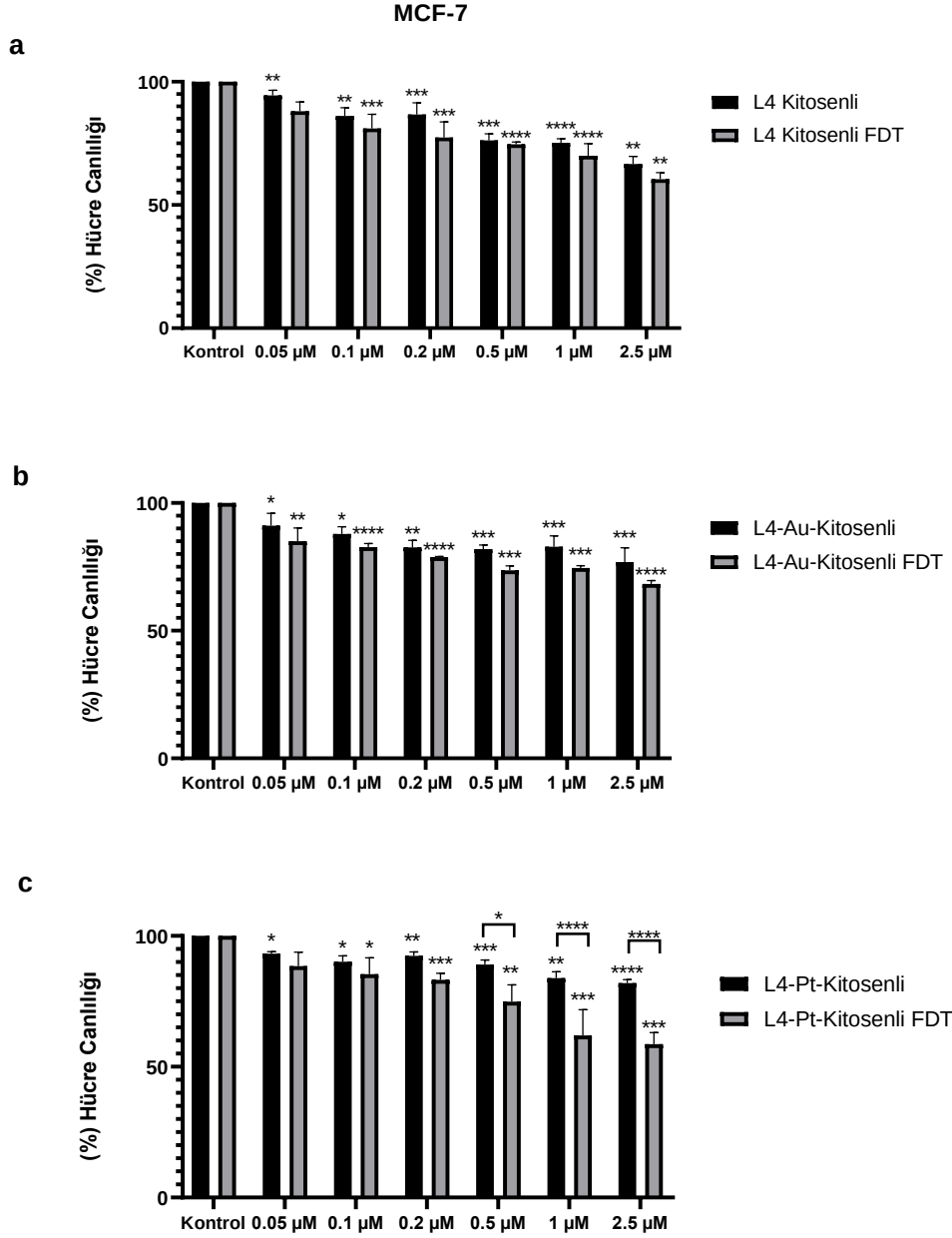
Şekil 4.21. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L4 kitosanlı, L4-Au kitosanlı ve L4-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 kolorektal kanseri hücre hatları 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.2 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıkta bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM’da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. A) L4 ve L4 FDT, b) L4-Au ve L4-Au FDT ile c) L4-Pt ve L4-Pt FDT’nin HT-29 hücre hattı üzerindeki etkileri.

4.1.8. L4 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) farklı konsantrasyonlarda fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

L4 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platin (Pt)'in fotodinamik terapi (FDT) uygulamadan önce ve uyguladıktan sonra meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi yapıldı. L4 kitosanlı bileşiğin 2.5 μM 'lık konsantrasyonda FDT uygulamadan hücre canlılığı oranı %67 iken FDT sonrası bu oran %60 olarak belirlendi (Şekil 4.22a). L4 kitosanlı bileşiğin OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'da konsantrasyonda hücre canlılığı oranı %84 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası hücre canlılığı oranı %58 olarak belirlendi (Şekil 4.23a). Yine L4 kitosanlı bileşiğin 2.5 μM 'da HT-29 hücre hattında hücre canlılığı oranı %67 iken FDT uygulaması sonrası bu oran %60 olarak belirlendi (Şekil 4.24a).

L4-Au kitosanlı bileşiği, MCF-7 hücre hattında en yüksek konsantrasyon olan 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %77 iken FDT uygulaması sonrası bu oran %68'lere kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.22b). L4-Au kitosanlı bileşiği OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %77 iken FDT sonrası bu oran %46'ya kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.23b). Aynı bileşik HT-29 hücre hattında ise FDT uygulanmadan hücre canlılığı %77 iken FDT sonrası hücre canlılık oranı %68'e kadar düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.24b).

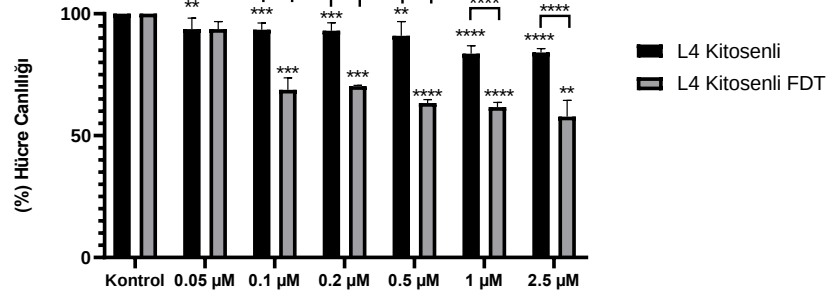
L4-Pt kitosanlı bileşiği, MCF-7 hücre hattında 2.5 μM 'da FDT uygulamadan hücre canlılığı oranı %82'lerde iken FDT uygulaması sonrası hücre canlılığı oranı %52'lere kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.22 c). L4-Pt kitosanlı bileşiği, OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'lık konsantrasyonda FDT uygulamadan hücre canlılığı oranı %91 iken FDT uygulaması sonrası bu oran %58'lere kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.23c). Yine L4-Pt bileşiği 2.5 μM 'lık konsantrasyonda HT-29 hücre hattında FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %82 iken FDT uygulandıktan sonra bu oran %31'e düştüğü belirlendi (Şekil 4.24c).



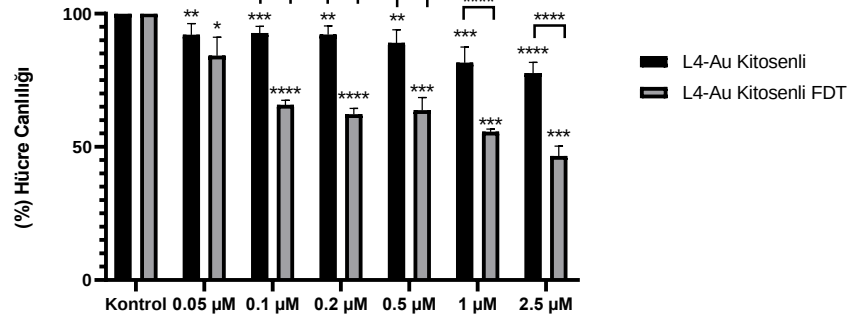
Şekil 4.22. MCF-7 meme kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L4 kitosanlı, L4-Au kitosanlı ve L4-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 meme kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıkta bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM’da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değeri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değeri göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değeri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. A) L4 ve L4 FDT, b) L4-Au ve L4-Au FDT ile c) L4-Pt ve L4-Pt FDT’nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri.

OV2008

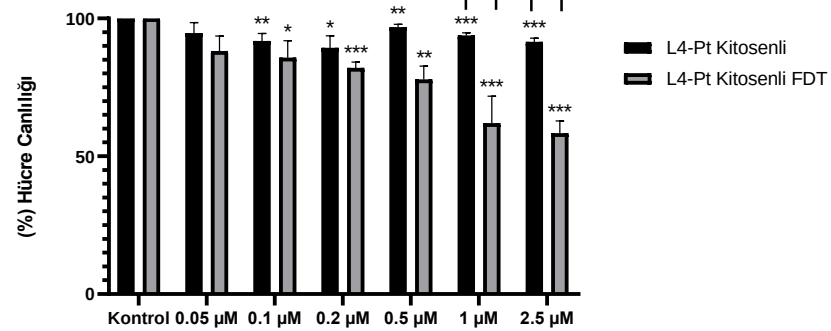
a



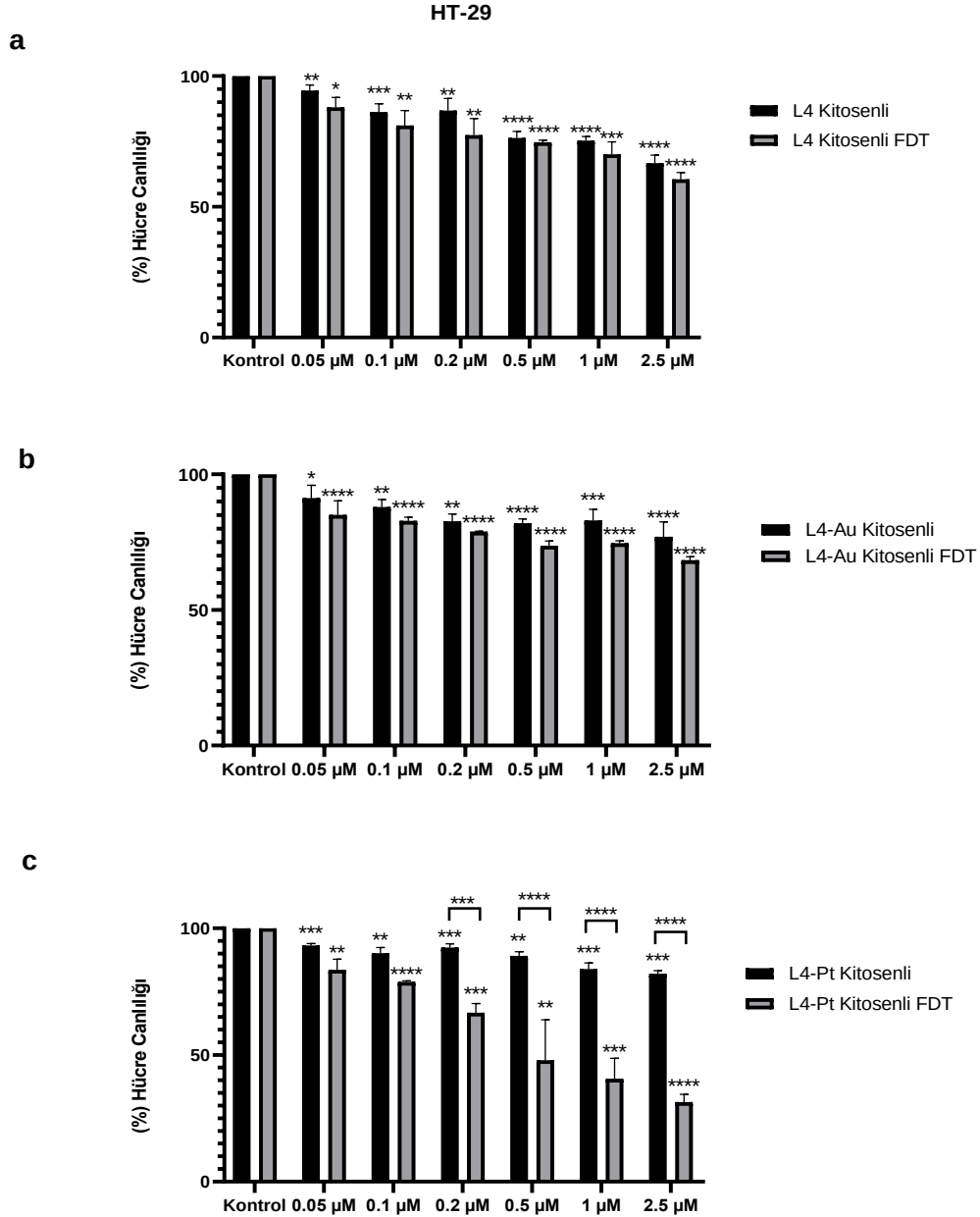
b



c



Şekil 4.23. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L4, L4-Au ve L4-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L4 ve L4 FDT, b) L4-Au ve L4-Au FDT ile c) L4-Pt ve L4-Pt FDT'nin OV2008 hücre hattı üzerindeki etkileri.



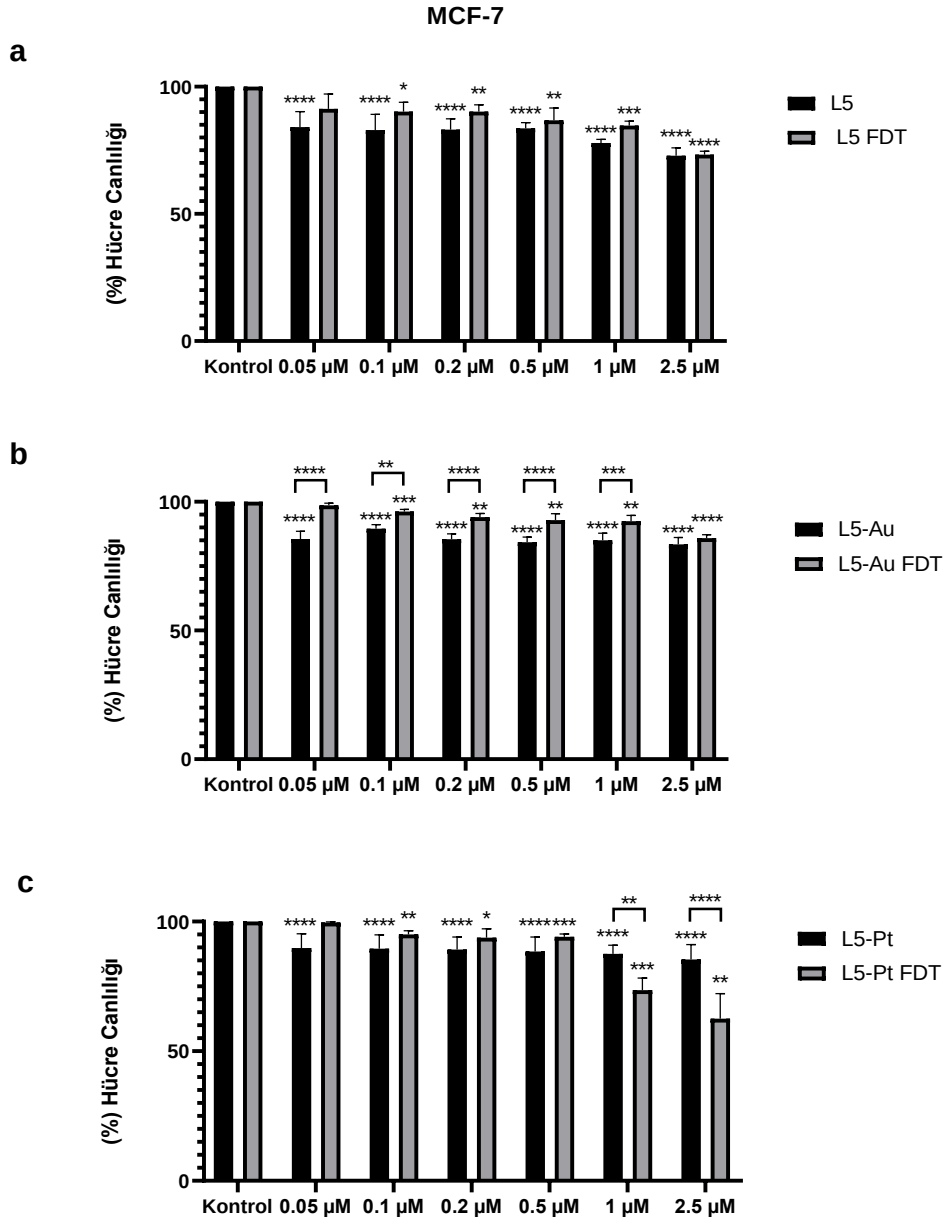
Şekil 4.24. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L4 kitosanlı, L4-Au kitosanlı ve L4-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 kolorektal kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L4 ve L4 FDT, b) L4-Au ve L4-Au FDT ile c) L4-Pt ve L4-Pt FDT'nin HT-29 hücre hattı üzerindeki etkileri.

4.1.9. L5 serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) normal ve kitosanlı hallerinin fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

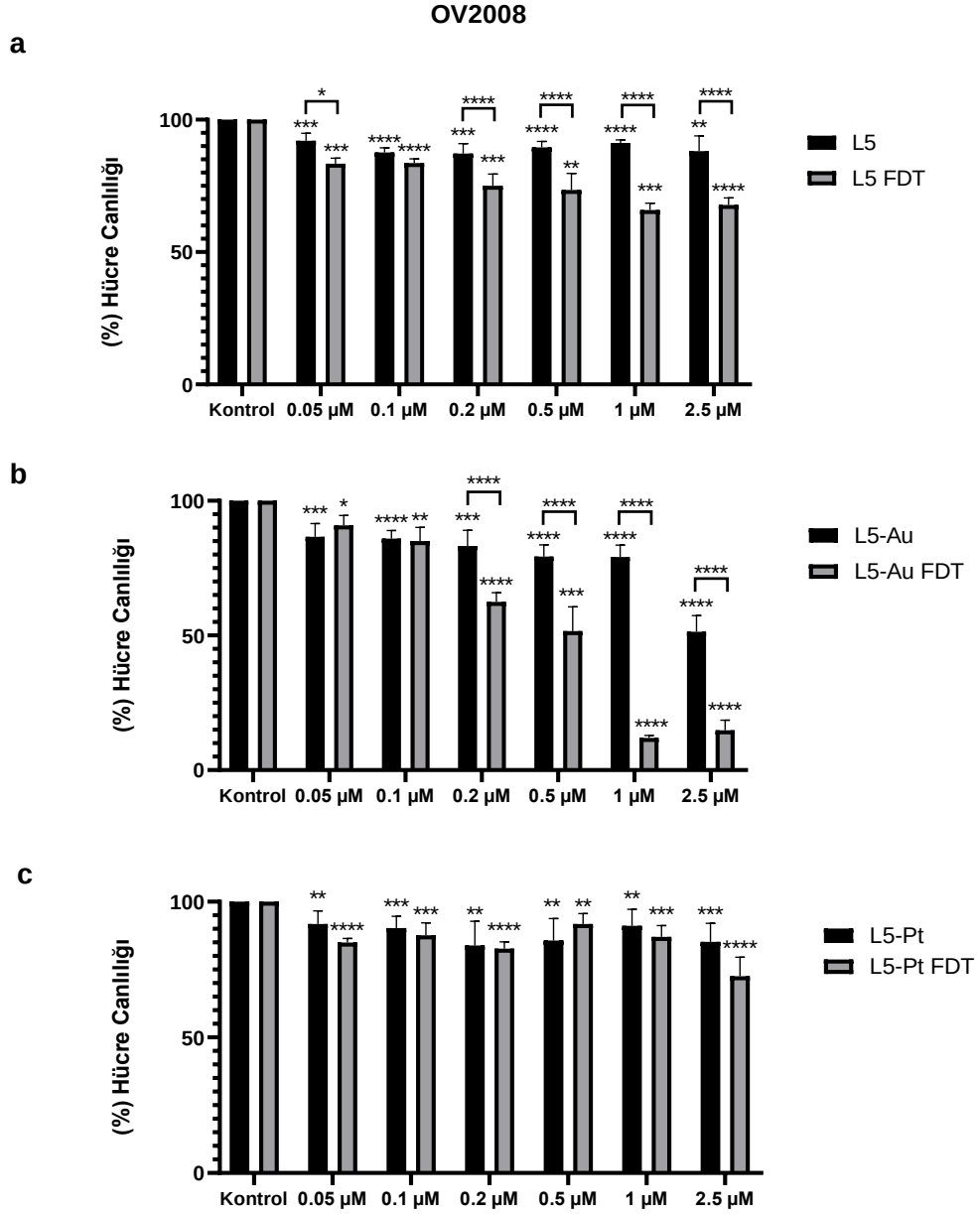
L5 bileşiğinin MCF-7 hücre hattında en yüksek konsantrasyon olan 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan ve uygulandıktan sonra hücrelerde benzer sitotoksikite göstererek hücre canlılık oranını %73'e kadar düşüre bildiği belirlendi (Şekil 4.25a). L5 bileşiği, OV2008 hücre hattında ise FDT uygulanmadan 2.5 μM 'lık konsantrasyonda hücre canlılık oranı %88 iken FDT uygulaması sonrası aynı konsantrasyonda bu oran %68'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.26a). Yine L5 bileşiğinin HT-29 hücre hattında FDT uygulanmadan 2.5 μM 'lık konsantrasyonun da hücre canlılığı oranı %86 iken FDT uygulanması sonrası bu oran %62'ye kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.27a).

L5-Au bileşiğinin, MCF-7 hücre hattında en yüksek konsantrasyon olan 2.5 μM 'lık konsantrasyonda FDT uygulanmadan ve uygulandıktan sonra her iki durumda da benzer ve düşük sitotoksikite göstererek hücre canlılığını %80-85 oranına kadar düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.25b). L5-Au bileşiğinin, OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'da FDT uygulamadan hücre canlılığı oranı %51 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulanması sonrası hücre canlılığı oranı %15'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.26b). Yine L5-Au bileşiği, HT-29 hücre hattında FDT uygulanmadan 2.5 μM 'lık konsantrasyonda hücre canlılığı oranı %88 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulanması sonrası hücre canlılığı oranı %24 olarak belirlendi (Şekil 4.27b).

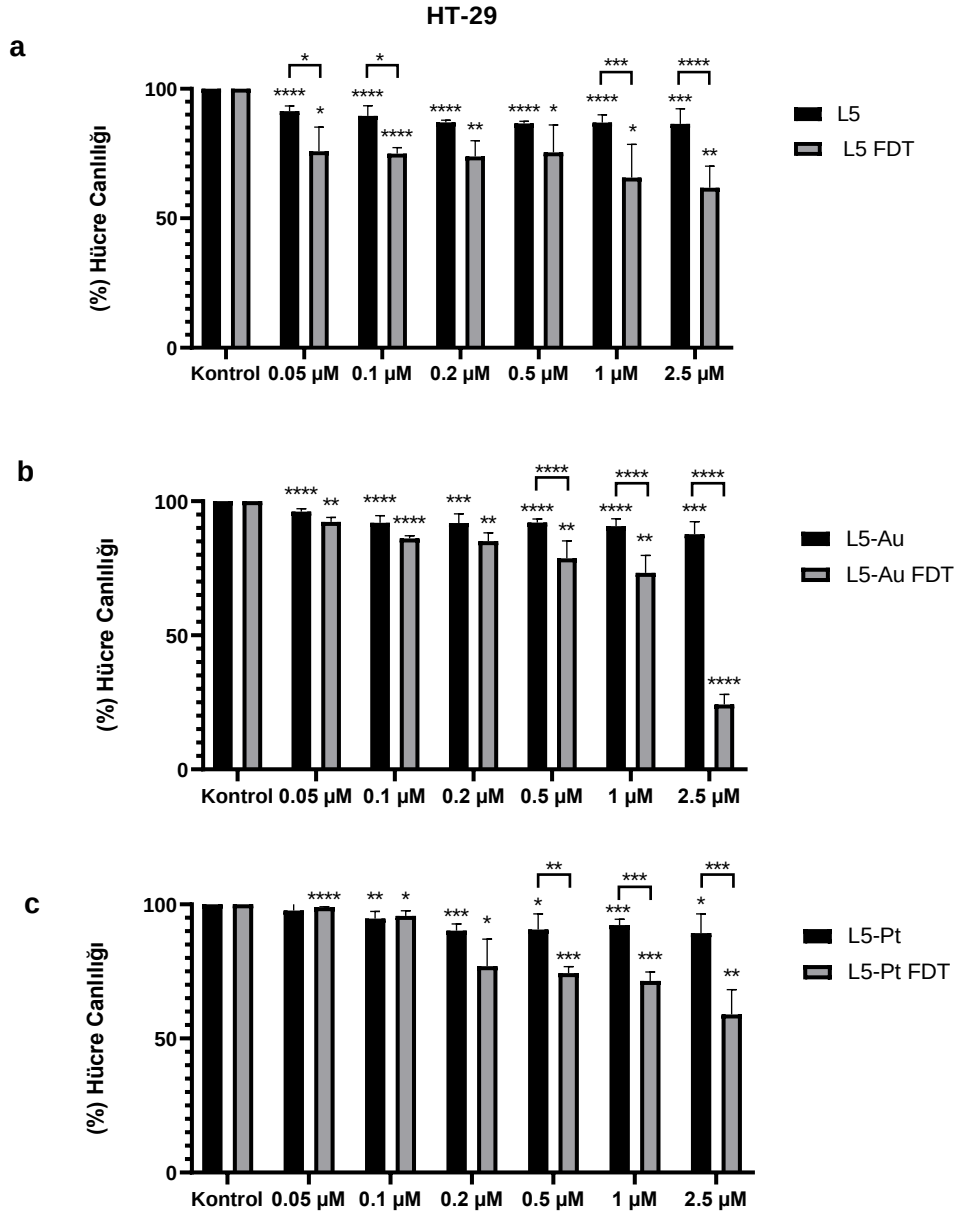
L5-Pt bileşiğinin, MCF-7 hücre hattında en yüksek konsantrasyon olan 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %85 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası hücre canlılığı oranını %63'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.25c). L5-Pt bileşiğinin, OV2008 hücre hattında ise 2.5 μM 'da hücre canlılığı oranı %85 iken aynı konsantrasyonda FDT sonrası hücre canlılığı oranı %73'e düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.26c). Yine L5-Pt bileşiğinin HT-29 hücre hattında 2.5 μM 'da FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %89 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulanması sonrası hücre canlılığı oranı %59'a düştüğü belirlendi (Şekil 4.27c).



Şekil 4.25. MCF-7 meme kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L5, L5-Au ve L5-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 meme kanseri hücre hatları 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.2 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıkta bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L5 ve L5 FDT, b) L5-Au ve L5-Au FDT ile c) L5-Pt ve L5-Pt FDT'nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri.



Şekil 4.26. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L5, L5-Au ve L5-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıkta bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms0 (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L5 ve L5 FDT, b) L5-Au ve L5-Au FDT ile c) L5-Pt ve L5-Pt FDT'nin OV2008 hücre hattı üzerindeki etkileri.



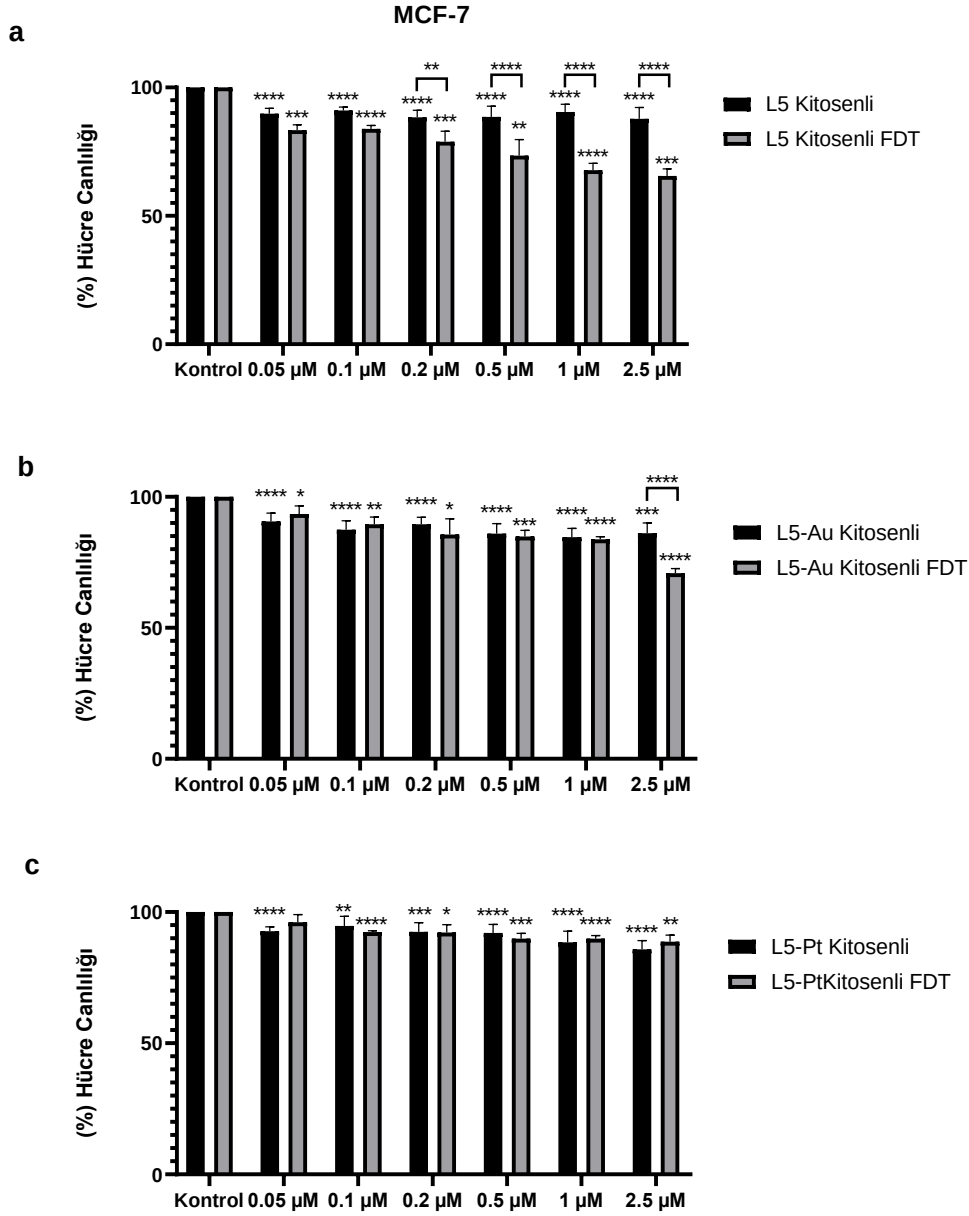
Şekil 4.27. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L5, L5-Au ve L5-Pt bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücrel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 kolorektal kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L5 ve L5 FDT, b) L5-Au ve L5-Au FDT ile c) L5-Pt ve L5-Pt FDT'nin HT-29 hücre hattı üzerindeki etkileri.

4.1.10. L5 kitosanlı serisi, altın (Au) ve platinin (Pt) farklı konsantrasyonlarda fotodinamik terapi uygulaması öncesi ve sonrası meme kanseri (MCF-7), yumurtalık kanseri (OV2008) ve kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi

L5 kitosanlı bileşiği, MCF-7 hücre hattında FDT uygulanmadan 2.5 μ M 'da hücre canlılığı oranı %88 iken bu oran aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası %66'ya kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.28a). L5 kitosanlı bileşiği, OV2008 hücre hattında ise FDT uygulanmadan 2.5 μ M 'lık konsantrasyonda hücre canlılığı oranı %92 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu oran %82'ye kadar düştüğü belirlendi (şekil 4.29a). Yine aynı bileşikte aynı konsantrasyon ile muamele edilen HT-29 hücre hattında ise FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %92 iken bu oran FDT uygulaması sonrası %60'a kadar düştüğü belirlendi (şekil 4.30a).

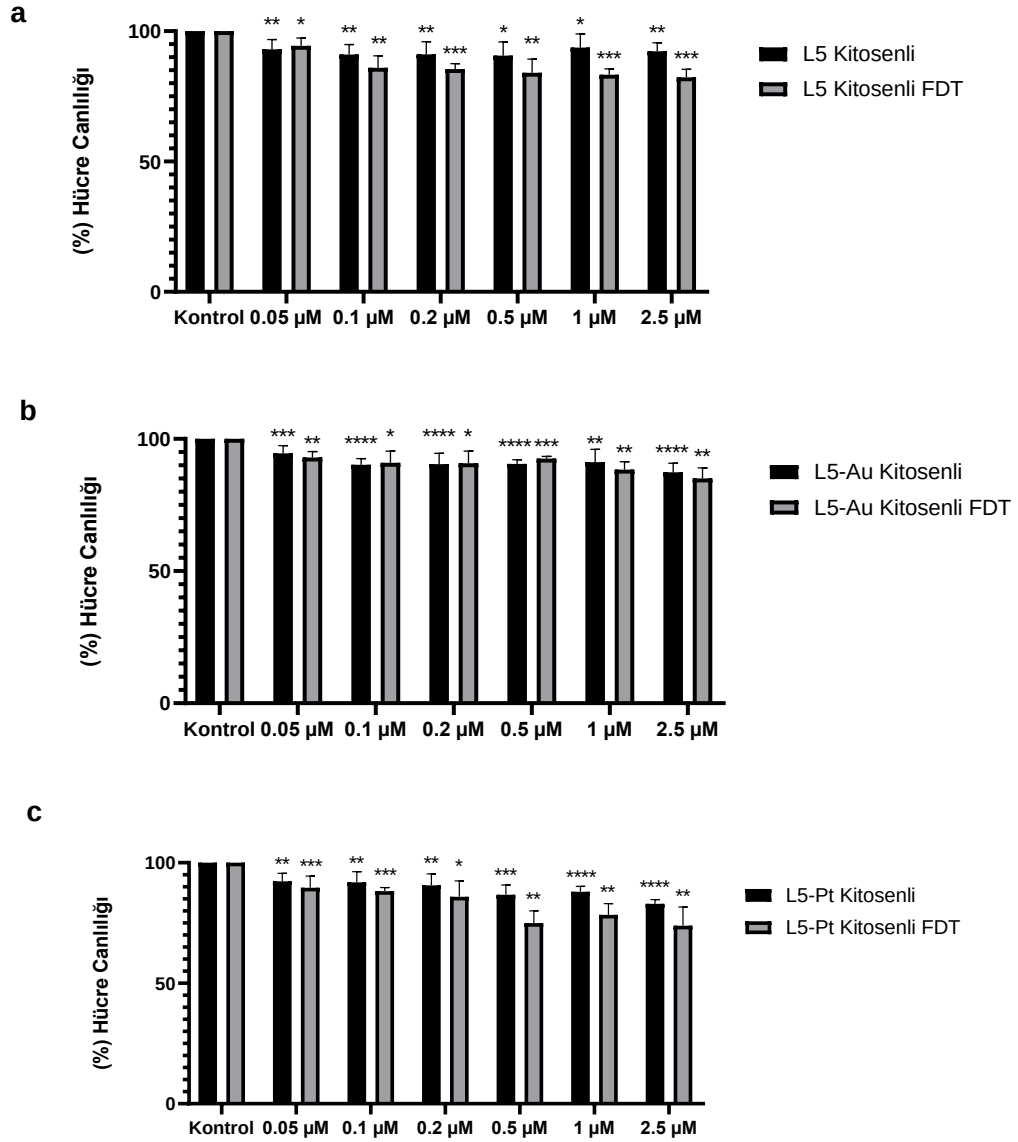
L5-Au kitosanlı bileşiği, MCF-7 hücre hattında FDT uygulanmadan 2.5 μ M 'lık konsantrasyonda hücre canlılığı oranı %86 iken hücre canlılığı oranı aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası %71'e kadar düştüğü belirlendi (Şekil 4.28b). L5-Au kitosanlı bileşiği, OV2008 hücre hattında ise FDT uygulanmadan 2.5 μ M 'lık konsantrasyonda hücre canlılığı oranı %87 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası hücre canlılığı oranı %85 olarak belirlendi (Şekil 4.29b). Yine aynı bileşik aynı konsantrasyonda HT-29 hücre hattında FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %75 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası bu hücre canlılığı oranı %68 olarak belirlendi (Şekil 4.30b).

L5-Pt kitosanlı bileşiği, MCF-7 hücre hattında 2.5 μ M 'lık konsantrasyonda FDT uygulanmadan ve uygulandıktan sonra hücre canlılığı %85-90 oranında olduğu ve her iki durumda da benzer olduğu saptandı (Şekil 4.28c). L5-Pt kitosanlı bileşiğin OV2008 hücre hattında ise 2.5 μ M 'lık konsantrasyonda FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %83 iken bu oran aynı konsantrasyonda FDT uygulanmasının ardından hücre canlılığı oranı %74 olarak belirlendi (Şekil 4.29c). Yine aynı bileşik aynı konsantrasyonda HT-29 hücre hattında FDT uygulanmadan hücre canlılığı oranı %89 iken aynı konsantrasyonda FDT uygulaması sonrası hücre canlılığı oranı %55 olarak belirlendi (Şekil 4.30c).

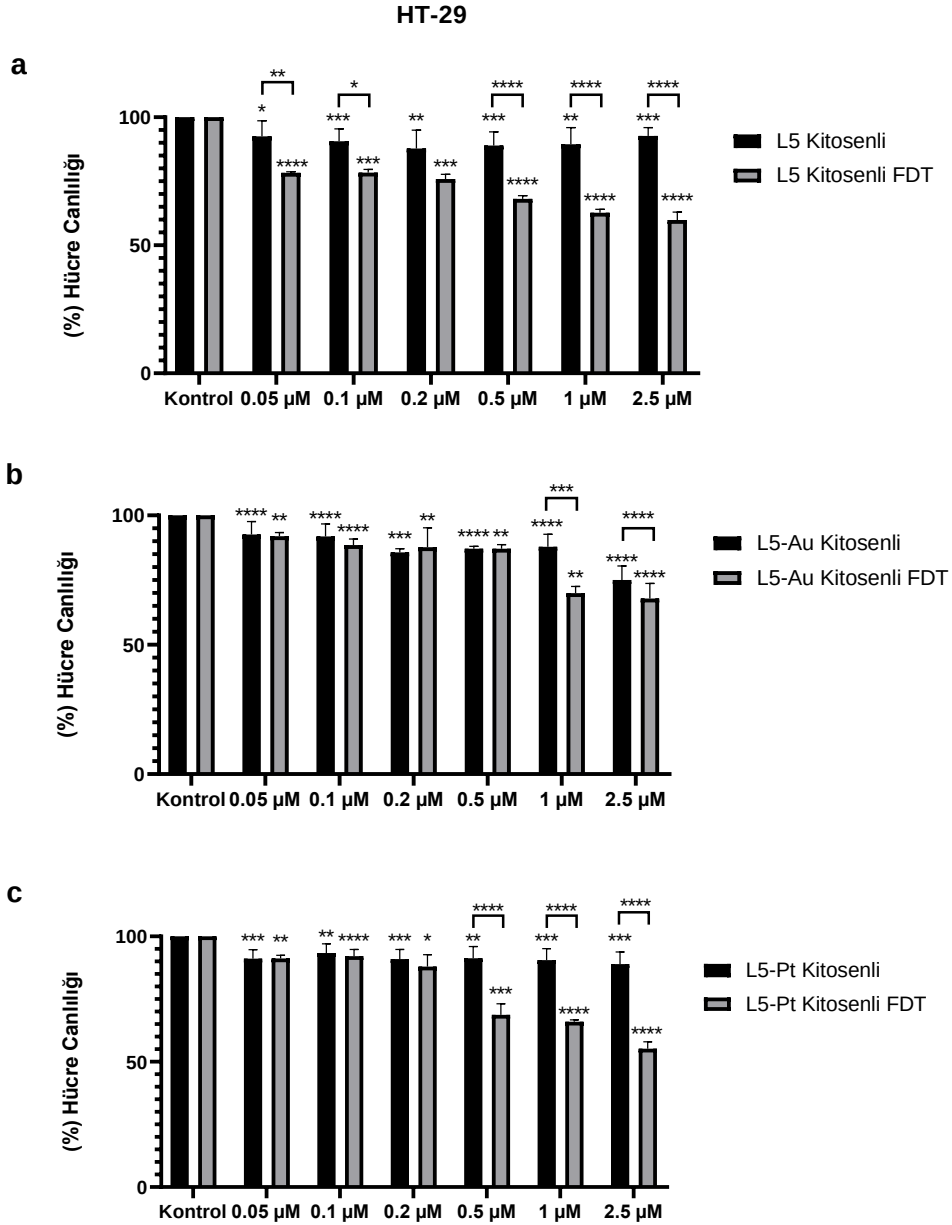


Şekil 4.28. MCF-7 meme kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L5 kitosanlı, L5-Au kitosanlı ve L5-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. MCF-7 meme kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L5 ve L5 FDT, b) L5-Au ve L5-Au FDT ile c) L5-Pt ve L5-Pt FDT'nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki etkileri.

OV2008



Şekil 4.29. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L5 kitosanlı, L5-Au kitosanlı ve L5-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L5 ve L5 FDT, b) L5-Au ve L5-Au FDT ile c) L5-Pt ve L5-Pt FDT'nin OV2008 hücre hattı üzerindeki etkileri.



Şekil 4.30. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında, MTT yöntemi ile L5 kitosanlı, L5-Au kitosanlı ve L5-Pt kitosanlı bileşiklerine fotodinamik terapi uygulamadan (siyah) ve fotodinamik terapi uyguladıktan sonraki (gri) hücresel sitotoksitesinin belirlenmesi. HT-29 kolorektal kanseri hücre hatları 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM konsantrasyonları ile muamele edildi. FDT uygulanan grup için (gri) hücreler 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları 540 nM ve 570 nM'da ölçümleri alınarak arkapalan ve çözücü pbs:dms (5:1) okuma değerleri çıkartıldıktan sonra hesaplandı. Bar çubukları canlılık oranlarını, hata çubukları ise SD değerlerini göstermektedir. İstatistiksel analiz GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile FDT uygulanmayan (siyah) ve FDT uygulanan (gri) gruplar arasında ise two-way ANOVA ile P değerleri belirlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Deneyler üç kez tekrarlanmıştır. a) L5 ve L5 FDT, b) L5-Au ve L5-Au FDT ile c) L5-Pt ve L5-Pt FDT kimyasal bileşiklerinin HT-29 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri.

4.2. LDH Salınımı Kullanılarak Plazma Zarı Bütünlüğünün Ölçülmesi

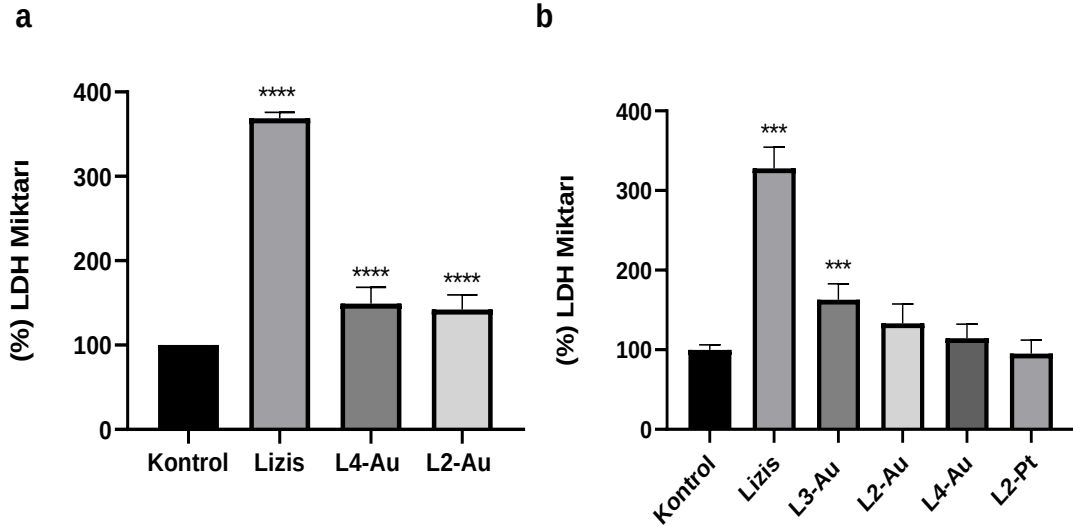
LDH Sitotoksosite Testi, hücresel sitotoksositeyi belirlemek için basit ve güvenilir bir yöntem sağlayan kolorimetrik bir testtir. Laktat dehidrojenaz (LDH), birçok farklı hücre tipinde bulunan ve plazma zarının hasar görmesi üzerine hücre kültürü ortamına salınan sitozolik bir enzimdir. Bu çalışma kapsamında kullanılan yeni nesil kimyasal bileşiklerin hücre büyümesi inhibisyonu ve hücre ölümü üzerindeki etkilerinin analiz edilmesi için laktat dehidrojenaz (LDH) enzim aktivitesi testi yapılmıştır. Daha önce MTT deneyi ile kanser hücrelerinde aşırı sitotoksosite oluşturmada potansiyel antikanser aktivite gösteren kimyasal birleşiklerden (bkz. tablo 4.1 ve tablo 4.2) uygun konsantrasyonlar seçildi. 96 kuyulu plakaya, 1 kuyuda 7500 hücre olacak şekilde MCF-7, OV2008 ve HT-29 kanserli hücre hatlarının ekimi yapılarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecini tamamlayan hücre hatlarına kimyasal bileşikler uygun konsantrasyonlarda eklendi ve hemen ardından fotodinamik terapi uygulaması için 30 dakika boyunca kırmızı led ışık altında bekletildi. 48 saatlik inkübasyonun ardından LDH enzim aktivitesi testi yapıldı.

4.2.1 FDT kullanılan bazı kimyasal ajanların FDT uygulamadan ve uygulandıktan sonra MCF-7 hücre hattındaki laktat dehidrojenaz enzim sızıntısının ölçümü

Meme kanseri (MCF-7) hücre hatlarında MTT testi sonucuna göre; FDT uygulanmadan L4-Au (1 μ M), L2-Au (1 μ M) ve FDT uygulandıktan sonra L3-Au (0.2 μ M), L4-Au (1 μ M), L2-Pt (0.2 μ M), L2-Au (1 μ M) bileşikleri ile muamele edilerek MCF-7 hücre hattının hücre zarı hasarını belirlemek amacıyla LDH testi yapıldı.

FDT uygulamadan, L4-Au ve L2-Au kimyasal bileşikleri ile muamele edilen MCF-7 hücre hattı, normalde ortamda bulunan LDH miktarını ifade eden kontrol grubuna kıyasla ortamdaki LDH oranları anlamlı olacak şekilde daha yüksek çıktığı belirlendi (Şekil 4.31a)

FDT uygulandıktan sonra, L3-Au, L4-Au, L2-Pt ve L2-Au kimyasal bileşikleri ile muamele edilen MCF-7 hücre hattı, kontrol grubuna kıyasla kendi ortamlarındaki LDH enzim sızıntısı oranı hepsinde daha fazla çıkmasına rağmen sadece L3-Au bileşiği anlamlı bir sonuç verdi (Şekil 4.31b).



Şekil 4.31. MCF-7 meme kanseri hücre hattında MTT testi sonucuna göre FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra IC50 değeri verdiği belirlenen kimyasal bileşikler ile muamele edilen MCF-7 hücre hatlarının, FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonraki durumlarının LDH enzim sızıntısı üzerine etkileri. a) FDT uygulanmadan hücrelerdeki LDH enzim sızıntısı miktarı, b) FDT uygulaması sonrası hücrelerde ki LDH enzim sızıntısı miktarı.

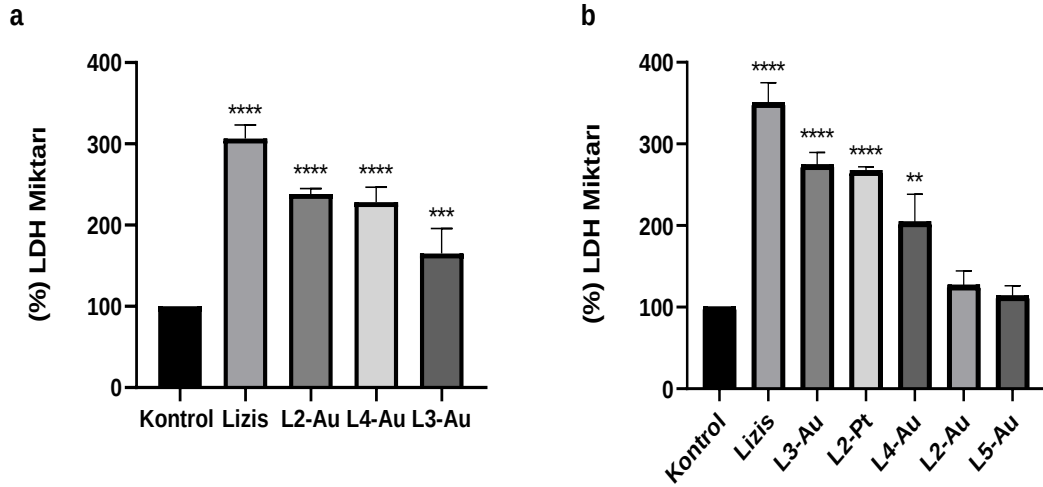
4.2.2 FDT kullanılan bazı kimyasal ajanların FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra OV2008 hücre hattındaki laktat dehidrogenaz enzim sızıntısının ölçümü

Yumurtalık kanseri (OV2008) hücre hatlarında MTT testi sonucuna göre; FDT uygulanmadan L3-Au (0.2 μ M), L4-Au (1 μ M), L2-Au (0.5 μ M) ve FDT uygulandıktan sonra L3-Au (0.2 μ M), L4-Au (0.5 μ M), L2-Pt (0.1 μ M), L2-Au (0.5 μ M), L5-Au (0.5 μ M) bileşikleri ile muamele edilerek OV2008 hücre hattının hücre zarı hasarını belirlemek amacıyla LDH testi yapıldı.

FDT uygulamadan, L3-Au, L4-Au ve L2-Au kimyasal bileşikleri ile muamele edilen OV2008 hücre hattı, normalde ortamda bulunan LDH miktarını ifade eden kontrol grubuna kıyasla ortamdaki LDH oranları anlamlı olacak şekilde daha yüksek çıktığı belirlendi (Şekil 4.32a)

FDT uygulandıktan sonra, L3-Au, L4-Au, L2-Pt, L2-Au, L5-Au, L2 kimyasal bileşikleri ile muamele edilen OV2008 hücre hattı, kontrol grubuna kıyasla kendi ortamlarındaki

LDH enzim sızıntısı oranı hepsinde daha fazla çıkmasına rağmen sadece L3-Au, L2-Pt, L2-Au ve L4-Au bileşiği anlamlı bir sonuç verdi (Şekil 4.32b).



Şekil 4.32. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında MTT testi sonucuna göre FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra IC50 değeri verdiği belirlenen kimyasal bileşikler ile muamele edilen OV2008 hücre hatlarının, FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra ki durumlarının LDH enzim sızıntısı üzerine etkileri. a) FDT uygulanmadan hücrelerde ki LDH enzim sızıntısı miktarı b) FDT uygulaması sonucu hücrelerde ki LDH enzim sızıntısı miktarı.

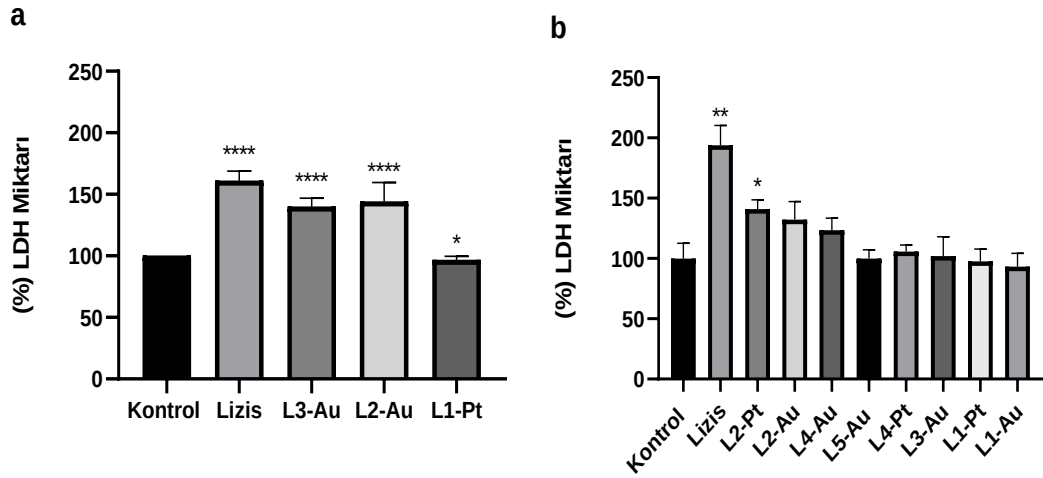
4.2.3 FDT kullanılan bazı kimyasal ajanların FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra HT-29 hücre hattındaki laktat dehidrogenaz enzim sızıntısının ölçümü

Kolorektal kanseri (HT-29) hücre hatlarında MTT testi sonucuna göre; FDT uygulanmadan L4-Au (0.2 μ M), L2-Au (0.5 μ M), L1-Pt (1 μ M) ve FDT uygulandıktan sonra L2-Au (0.1 μ M), L2-Pt (0.2 μ M), L1-Au (1 μ M), L1-Pt (1 μ M), L4-Au (0.5 μ M), L4-Pt (0.2 μ M), L3-Au (1 μ M), L5-Au (1 μ M) bileşikler ile muamele edilerek MCF-7 hücre hattının hücre zarı hasarını belirlemek amacıyla LDH testi yapıldı.

FDT uygulamadan, L4-Au, L2-Au, L1-Pt kimyasal bileşikler ile muamele edilen HT-29 hücre hattı, normalde ortamda bulunan LDH miktarını ifade eden kontrol grubuna kıyasla ortamdaki LDH oranları anlamlı olacak şekilde daha yüksek çıktığı belirlendi (Şekil 4.33a)

FDT uygulandıktan sonra, L4-Au, L4-Pt, L2-Pt, L2-Au, L1-Au, L1-Pt, L3-Au, L5-Au kimyasal bileşikler ile muamele edilen HT-29 hücre hattı, kontrol grubuna kıyasla kendi

ortamlarındaki LDH enzim sızıntısı oranı hepsinde daha fazla çıkmasına rağmen sadece L2-Pt bileşiği anlamlı bir sonuç verdi (Şekil 4.33b).

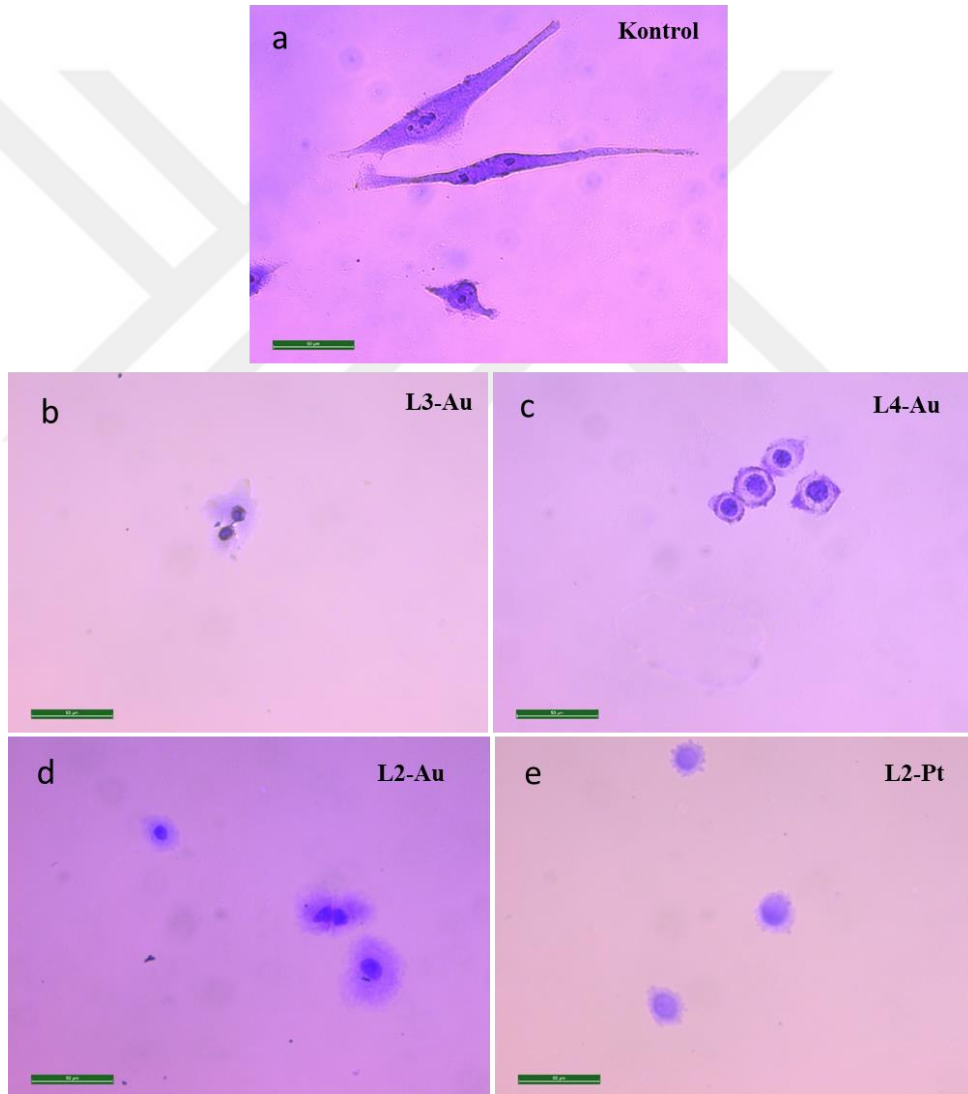


Şekil 4.33. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında MTT testi sonucuna göre FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonra IC50 değeri verdiği belirlenen kimyasal bileşikler ile muamele edilen HT-29 hücre hatlarının, FDT uygulamadan ve uyguladıktan sonraki durumlarının LDH enzim sızıntısı üzerine etkileri. a) FDT uygulanmadan hücrelerdeki LDH enzim sızıntısı miktarı b) FDT uygulaması sonucu hücrelerdeki LDH enzim sızıntısı miktarı.

4.3. Kimyasal Ajanların İlavesinin Ardından Fotodinamik Terapi (FDT) Uygulanan Kanser Hücrelerindeki Morfolojik Farklılıklar

Kimyasal ajanların ilavesinin ardından fotodinamik terapi (FDT) uygulanan hücrelerdeki morfolojik farklılıkları belirlemek için kristal viyole ile kanserli hücre hatlarına boyama işlemi yapıldı. Boyama işlemi, meme kanseri hücre hattı (MCF-7), yumurtalık kanseri hücre hattında (OV2008) ve kolorektal kanseri hücre hatlarında (HT-29) yapıldı. Bu deney için MTT testi sonuçlarına göre, FDT uygulamasından sonra bu hücre hatlarında etkinliği belirlenmiş kimyasal ajanlar seçildi. Kimyasal ajanlar ve konsantrasyonları belirlendikten sonra deney için gerekli yoğunluğa ulaşan hücreler 6 kuyucuklu plakalara her kuyucuk başına 10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat sonunda kimyasal ajanlar eklendi ve hemen ardından FDT uygulaması için 30 dakika kırmızı led ışıktaki bekletildi. Ardından 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecini tamamlayan hücreler kristal viyole ile boyandı.

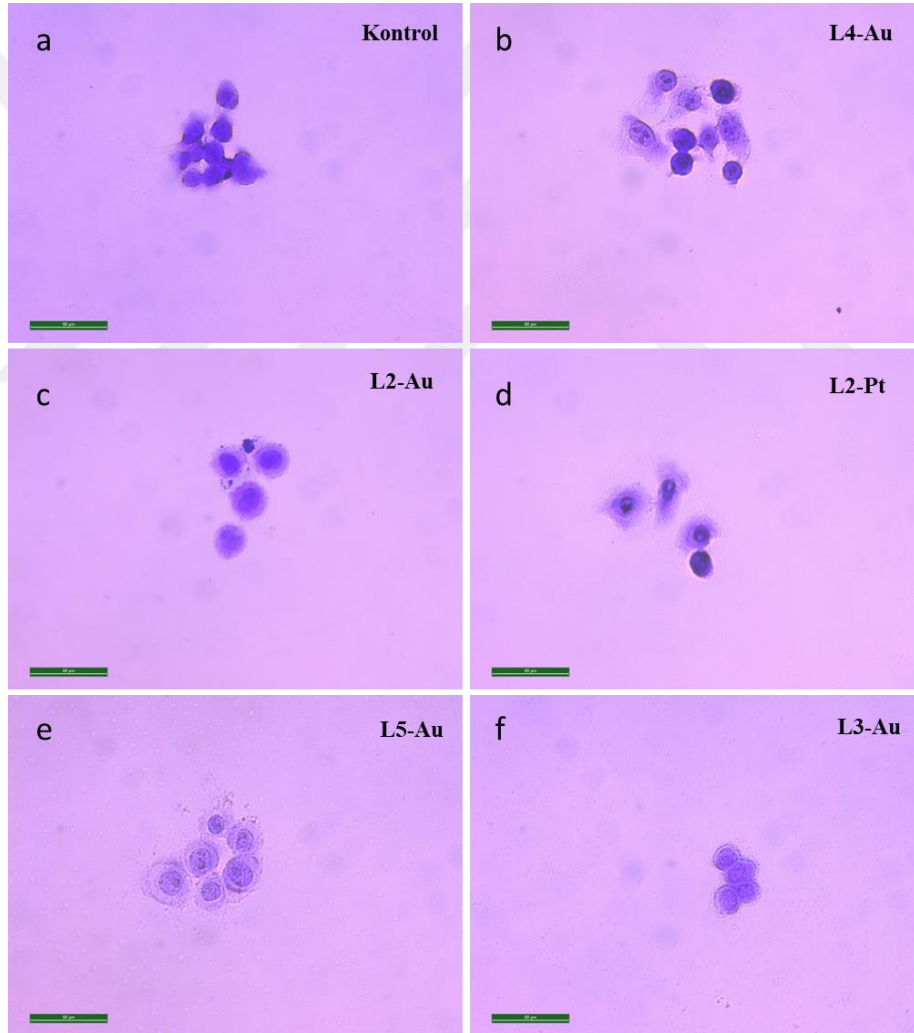
MCF-7 meme kanseri hücre hattının L3-Au (0.2 μ M), L4-Au (1 μ M), L2-Pt (0.2 μ M), L2-Au (1 μ M) bileşikleriyle muamelesi ve FDT uygulaması sonrası 48. saat sonundaki mikroskopik görüntüleri incelendi. MCF-7 meme kanseri hücre hattında kristal viyole ile boyanması sonucunda bahsedilen bu kimyasal bileşikler ve uygun konsantrasyonları ile muamelesi sonrası 48. saat görüntüleri kontrol grubundaki hücre morfolojisine göre değişmiş olduğu saptandı. MCF-7 hücre hattı hücreleri orijinal şeklini kaybetmiş, yuvarlaklaşmış, büzülmüş ve ortamda yüzdüğü belirlendi (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. MCF-7 meme kanseri hücre hattında kimyasal ajan ilavesi ile FDT uygulaması sonrası meme kanseri hücre hatlarındaki morfolojik farklılıkların mikroskop görüntüleri. a) Kontrol grubu MCF-7 hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü, b) L3-Au (0.2 μ M) bileşiği ile muamele sonrası MCF-7 hücre hattının mikroskopik görüntüsü, c) L4-Au (1 μ M) bileşiği ile muamele sonrası MCF-7 hücre hattının mikroskopik görüntüsü,

d) L2-Au (1 μ M) bileşigi ile muamele sonrası MCF-7 hücre hattının mikroskopik görüntüsü, e) L2-Pt (0.2 μ M) bileşigi ile MCF-7 hücre hattının mikroskop görüntüsü (40x'lik objektif 50 μ m ölçek).

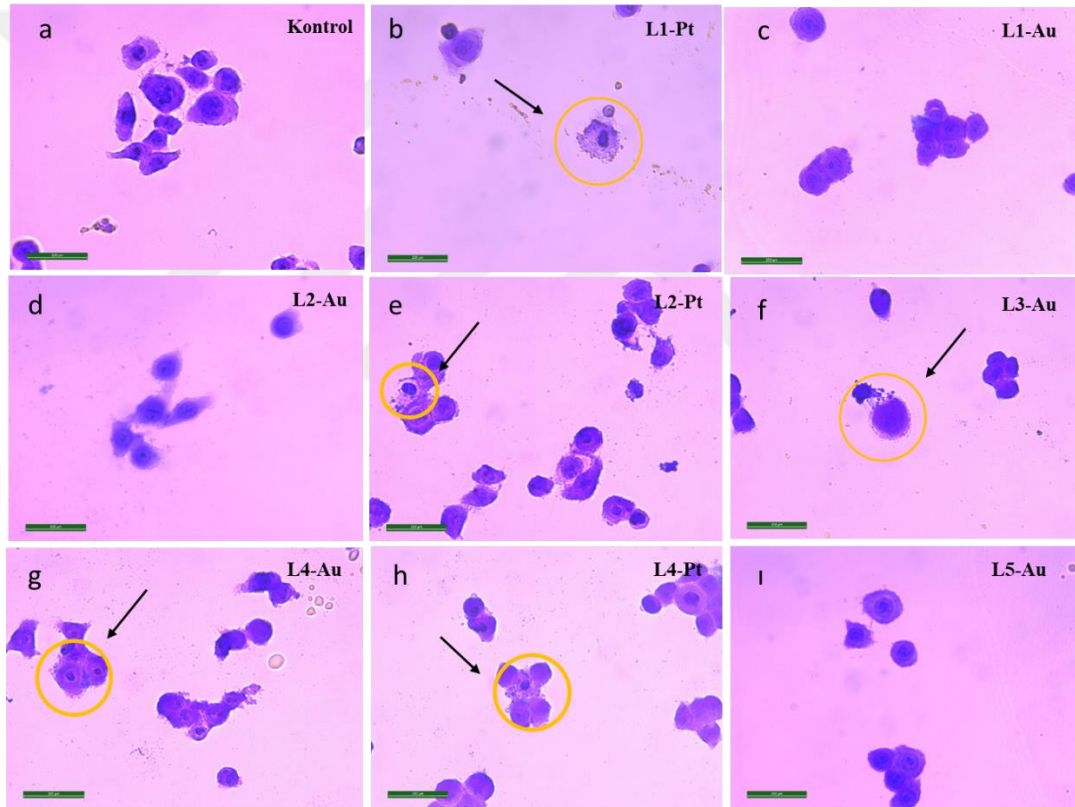
OV2008 yumurtalık kanseri hücre hatları L4-Au (0.5 μ M), L2-Pt (0.1 μ M), L2-Au (0.5 μ M), L5-Au (0.5 μ M) ve L3-Au (0.2 μ M) bileşikleriyle muamelesi ve FDT uygulaması sonrası 48. saat sonundaki mikroskopik görüntüleri incelendi. Yumurtalık kanseri hücre hattında yapılan kristal viyole boyaması sonucunda bahsedilen bu kimyasal bileşikler ve uygun konsantrasyonları ile muamelesi sonrası 48. saat görüntüleri kontrol grubunda ki hücre morfolojisine göre değişmiş olduğu saptandı. OV2008 yumurtalık hücre hattı hücreleri orijinal şeklini kaybetmiş, büzülmüş, hücre zarı çizgisi kaybolmuş ve ortamda yüzdüğü belirlendi (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında kimyasal ajan ilavesi ile FDT uygulaması sonrası yumurtalık kanseri hücre hatlarındaki morfolojik farklılıkların mikroskop görüntüleri. a) Kontrol, b) L4-Au (0.5 μ M) bileşigi ile OV2008 hücre hattının mikroskop görüntüsü, c) L2-Au (0.5 μ M) bileşigi ile muamele sonrası OV2008 hücre hattının mikroskop görüntüsü, d) L2-Pt (0.1 μ M) bileşigi ile muamele sonrası OV2008

hücre hattının mikroskop görüntüsü, e) L5-Au (0.5 μ M) bileşiği ile muamele sonrası OV2008 hücre hattının mikroskop görüntüsü, f) L3-Au (0.2 μ M) bileşiği muamele sonrası OV2008 hücre hattının mikroskop görüntüsü (40x'lik objektif 50 μ m ölçek).

HT-29 kolorektal kanseri hücre hatları L1-Au (1 μ M), L1-Pt (1 μ M), L2-Au (0.1 μ M), L2-Pt (0.2 μ M), L3-Au (1 μ M), L4-Au (0.5 μ M), L4-Pt (0.2 μ M), ve L5-Au (1 μ M) bileşikleriyle muamelesi ve FDT uygulaması sonrası 48. saat sonundaki mikroskopik görüntüleri incelendi. HT-29 hücre hattı hücrelerinin bu kimyasal bileşikler ile 48 saat süreyle maruz bırakılması bu kanser hücrelerinde yuvarlaklaşma, büzülme, zar taşması ve bitişik hücrelerle temasın kaybolması gibi tipik apoptotik özellikler ortaya çıkardı. (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında kimyasal ajan ilavesi ile FDT uygulaması sonrası kolorektal kanseri hücre hatlarındaki morfolojik farklılıkların mikroskop görüntüleri. a) Kontrol, b) L1-Pt (1 μ M) bileşiği ile HT-29 hücre hattının mikroskop görüntüsü, c) L1-Au (1 μ M) bileşiği ile HT-29 hücre hattının mikroskop görüntüsü, d) L2-Au (0.1 μ M) bileşiği ile muamele sonrası HT-29 hücre hattının mikroskop görüntüsü, e) L2-Pt (0.2 μ M) bileşiği ile muamele sonrası HT-29 hücre hattının mikroskop görüntüsü, f) L3-Au (1 μ M) bileşiği ile muamele sonrası HT-29 hücre hattının mikroskop görüntüsü, g) L4-Au (0.5 μ M) bileşiği muamele sonrası edilmiş HT-29 hücre hattının mikroskop görüntüsü, h) L4-Pt (0.2 μ M) bileşiği ile muamele sonrası

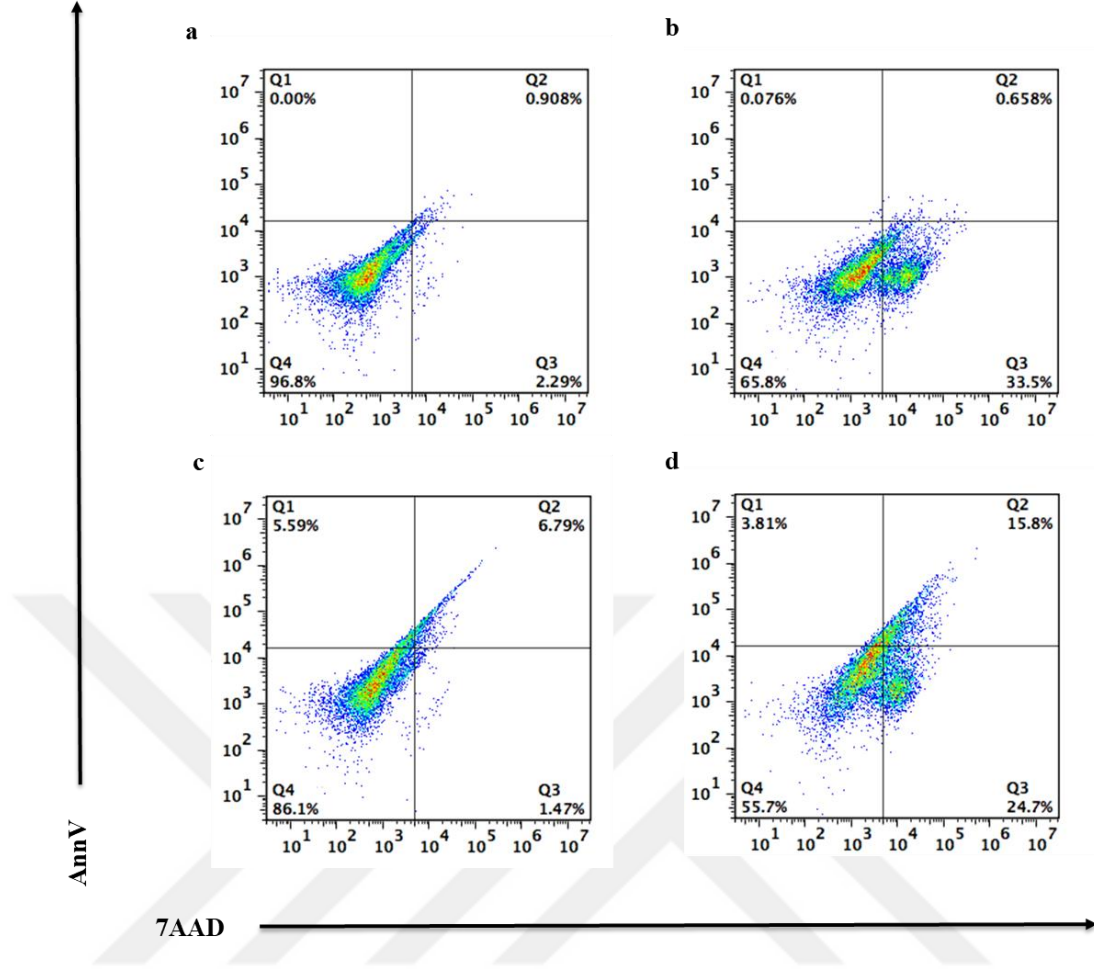
HT-29 hücre hattının mikroskop görüntüsü, 1) L5-Au (1 μ M) bileşiği muamele sonrası edilmiş HT-29 hücre hattının mikroskop görüntüsü (40x'lik objektif 50 μ m ölçek).

4.4. Akış sitometrisi ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

HT-29 kolorektal kanseri hücre hattına L1 serisi ile L2 serisi bileşiklerinin ilavesinin hemen ardından 30 dakika FDT uygulaması yapıldı. Daha sonra 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hücrenin ölüm şeklinin, Annexin V konjugatları ve 7-AAD (7-amino-aktinomisin D) birlikte kullanılarak erken apoptozdan, geç apoptoz ve nekrozdan ayırımını yapmak için akış sitometrisinde analizleri yapıldı.

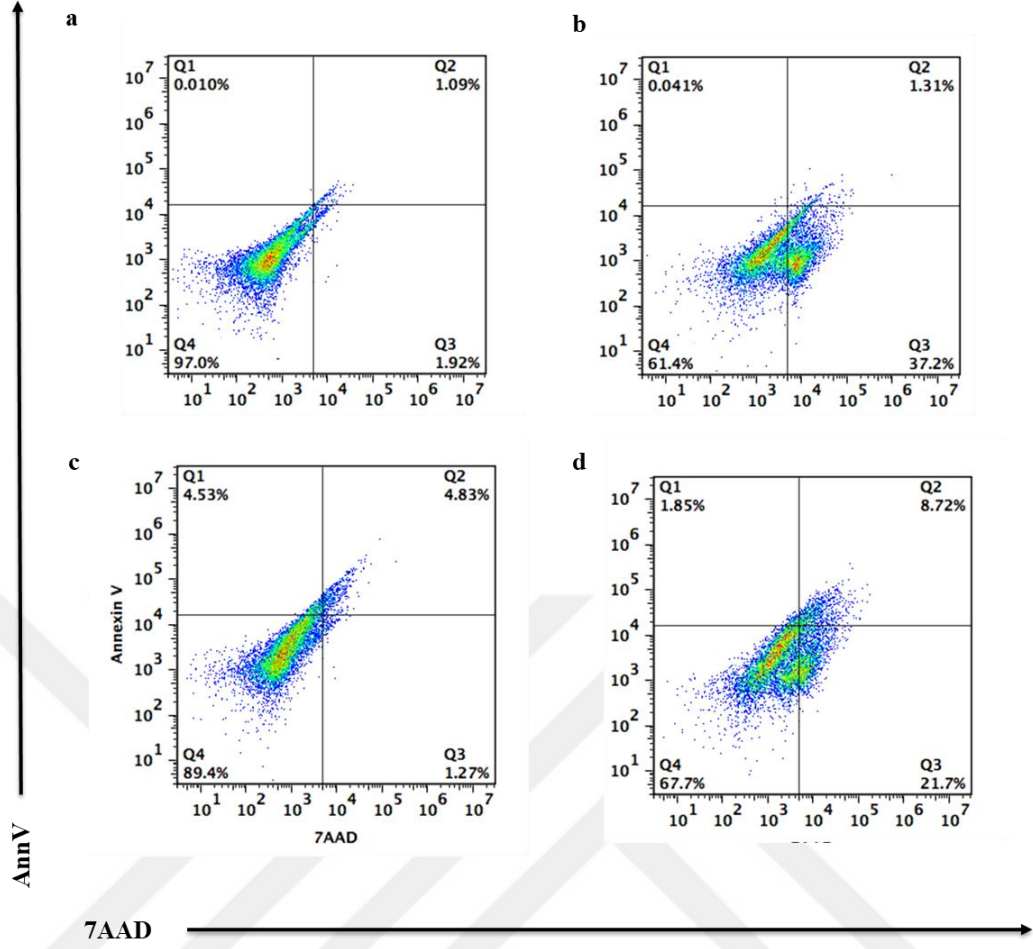
HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında, L1-Au bileşiğinin 1 μ M'lık ve L1-Pt bileşiğinin 1 μ M'lık konsantrasyonları uygulanırken, L2-Au bileşiğinin 0.1 μ M'lık ve L2-Pt bileşiğinin ise 1 μ M'lık konsantrasyonları uygulandı.

48 saatlik tedavi bulgularımıza göre kontrol grubunda hücre canlılığı oranı %96.8 iken ölü hücre oranı %2.29 olarak belirlendi (Şekil 4.37a). L1-Au bileşiği ile muamele edilmiş ve 7-AAD ile işlenmiş deney grubu hücrelerinde canlı hücre sayısı %65.8 iken ölü hücre sayısı %33.5 yükseldiği belirlendi (Şekil 4.37b). L1-Au bileşiği ile muamele edilmiş ve AnnV ile işlenmiş deney grubu hücrelerinde %5.59 erken apoptoz ve %6.79 apoptoz olduğu gözlemlendi (Şekil 4.37c). L1-Au bileşiğiyle muamele edilmiş ardından AnnV ve 7-AAD ile işlenmiş deney grubu hücrelerinde %3.81 erken apoptoz, %15.8 apoptoz olduğu gözlemlendi (Şekil 37d).



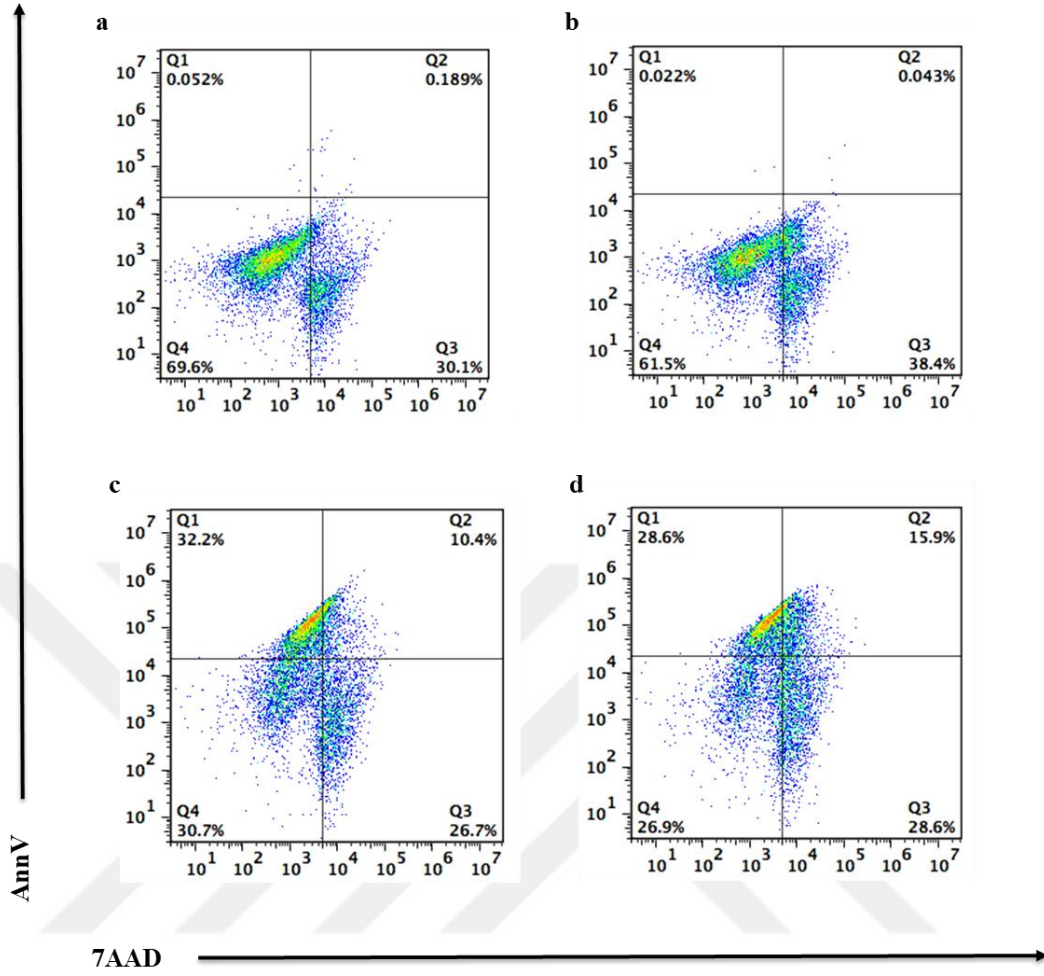
Şekil 4.37. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında L1-Au bileşiği ilavesi ile FDT uygulaması sonrası bu hücre hattındaki Annexin V bağlanması ile apoptoz ve nekrozun kantitasyonunun akış sitometrisi ile ölçümü. a) L1-Au ile muamele edilmiş, AnnV ve 7-AAD ile muamele edilmemiş kontrol grubu hücreleri, b) L1-Au bileşiği ile muamele edilmiş ve 7-AAD ile işlenmiş deney grubu, c) L1-Au bileşiği ile muamele edilmiş ve AnnV işlenmiş deney grubu, d) L1-Au bileşiğiyle muamele edilmiş AnnV ile 7-AAD işlenmiş deney grubu.

48 saatlik tedavi bulgularımıza göre kontrol grubunda hücre canlılığı oranı %97.0 iken ölü hücre oranı %1.92 olarak belirlendi (Şekil 4.48a). L1-Pt bileşiği ile muamele edilmiş ve 7-AAD ile işlenmiş deney grubu hücrelerinde canlı hücre sayısı %61.4 iken ölü hücre sayısı %37.2 yükseldiği belirlendi (Şekil 4.48b). L1-Pt bileşiği ile muamele edilmiş ve AnnV ile işlenmiş deney grubu hücrelerinde %4.53 erken apoptoz ve %4.83 apoptoz olduğu gözlemlendi (Şekil 4.38c). L1-Pt bileşiğiyle muamele edilmiş ardından AnnV ve 7-AAD ile işlenmiş deney grubu hücrelerinde %1.85 erken apoptoz, %8.72 apoptoz olduğu gözlemlendi (Şekil 38d).



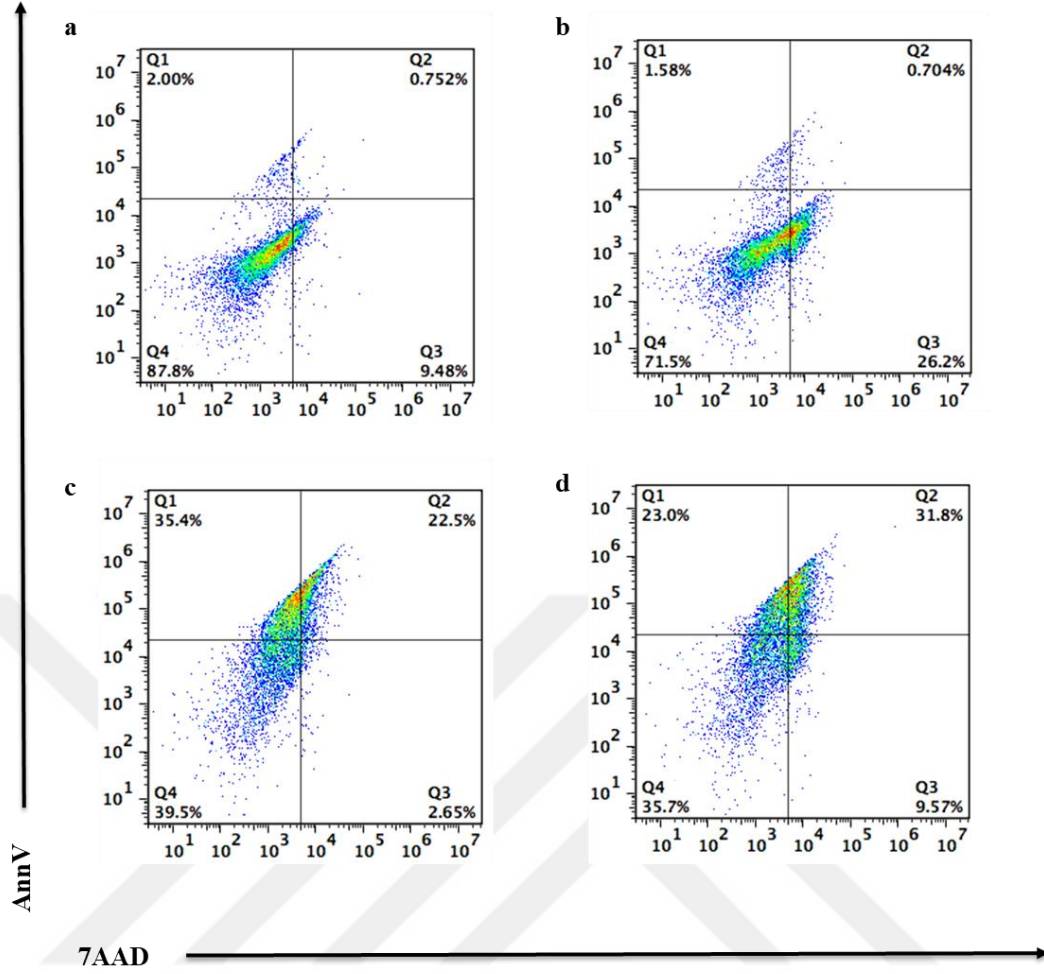
Şekil 4.38. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında L1-Pt bileşiği ilavesi ile FDT uygulaması sonrası bu hücre hattındaki Annexin V bağlanması ile apoptoz ve nekrozun kantitasyonunun akış sitometrisi ile ölçümü. a) L1-Pt ile muamele edilmiş, AnnV ve 7-AAD ile muamele edilmemiş kontrol grubu hücreleri, b) L1-Pt bileşiği ile muamele edilmiş ve 7-AAD ile işlenmiş deney grubu, c) L1-Pt bileşiği ile muamele edilmiş ve AnnV işlenmiş deney grubu, d) L1-Pt bileşiğiyle muamele edilmiş AnnV ile 7-AAD işlenmiş deney grubu.

48 saatlik tedavi bulgularımıza göre AnnV ve 7-AAD ile işlenmemiş kontrol grubunda hücre canlılığı oranı %69.6 iken ölü hücre oranı %30.1 olarak belirlendi (Şekil 4.39a). L2-Au bileşiği ile muamele edilmiş ve 7-AAD ile işlenmiş deney grubu hücrelerinde canlı hücre sayısı %61.5 iken ölü hücre sayısı %38.4 yükseldiği belirlendi (Şekil 4.39b). L2-Au bileşiği ile muamele edilmiş ve AnnV ile işlenmiş deney grubu hücrelerinde %30.7 canlı hücre sayısı, %32.2 erken apoptoz ve %10.4 apoptoz olduğu gözlemlendi (Şekil 4.39c). L2-Au bileşiğiyle muamele edilmiş ardından AnnV ve 7-AAD ile işlenmiş deney grubu hücrelerinde %28.6 erken apoptoz, %15.9 apoptoz olduğu gözlemlendi (Şekil 39d).



Şekil 4.39. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında L2-Au bileşiği ilavesi ile FDT uygulaması sonrası bu hücre hattındaki Annexin V bağlanması ile apoptoz ve nekrozun kantitasyonunun akış sitometrisi ile ölçümü. a) Kontrol grubu hücreleri, b) L2-Au bileşiği ile muamele edilmiş ve 7-AAD ile işlenmiş deney grubu, c) L2-Au bileşiği ile muamele edilmiş ve AnnV işlenmiş deney grubu, d) L2-Au bileşiğiyle muamele edilmiş AnnV ile 7-AAD işlenmiş deney grubu.

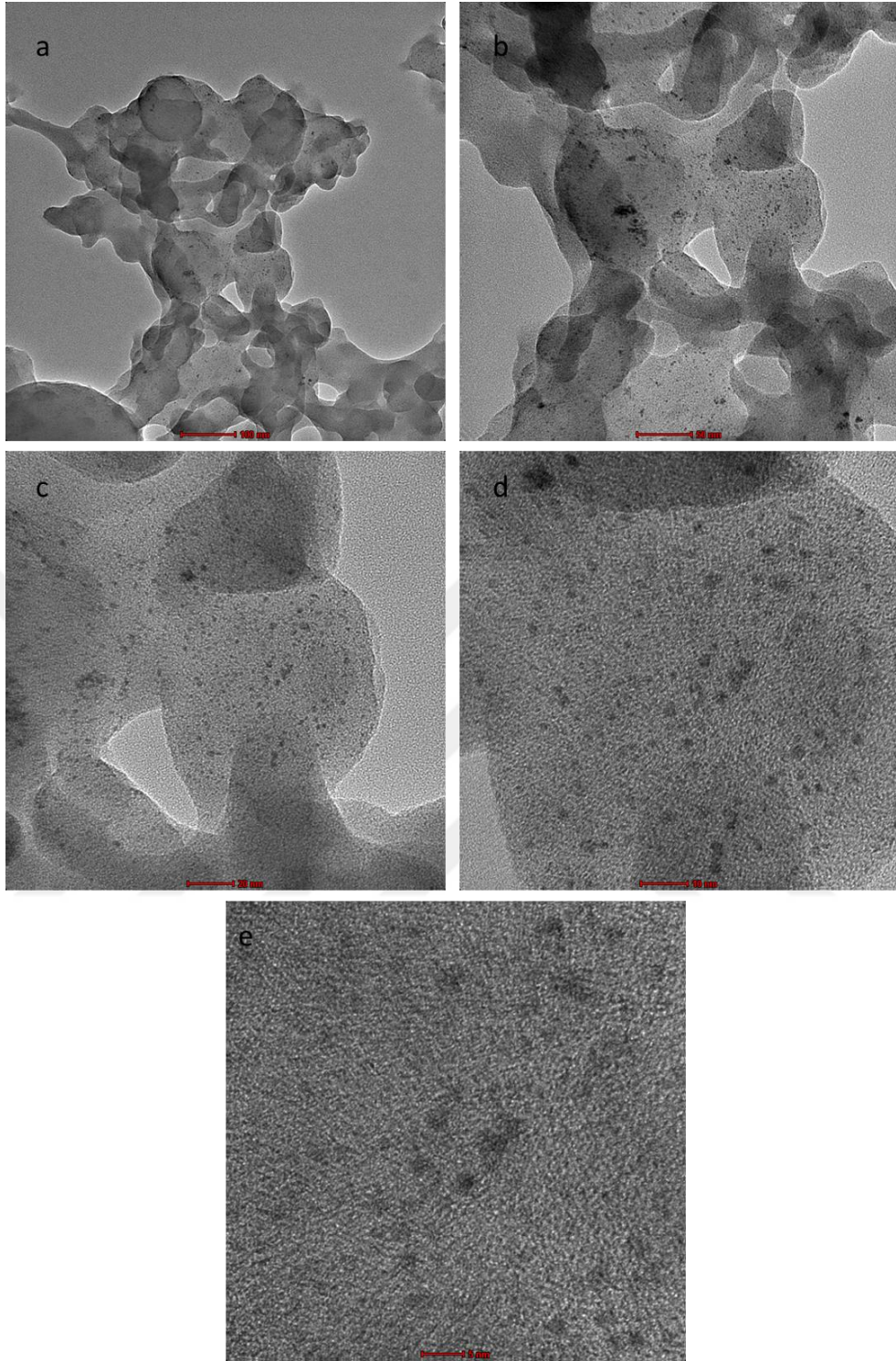
48 saatlik tedavi bulgularımıza göre kontrol grubunda hücre canlılığı oranı %87.8 iken ölü hücre oranı %9.48 olarak belirlendi (Şekil 4.40a). L2-Pt bileşiği ile muamele edilmiş ve 7-AAD ile işlenmiş deney grubu hücrelerinde canlı hücre sayısı %71.5 iken ölü hücre sayısı %26.2 yükseldiği belirlendi (Şekil 4.40b). L2-Pt bileşiği ile muamele edilmiş ve AnnV ile işlenmiş deney grubu hücrelerinde %39.5 canlı hücre sayısı, %35.4 erken apoptoz ve %22.5 apoptoz olduğu gözlemlendi (Şekil 4.40c). L2-Pt bileşiğiyle muamele edilmiş ardından AnnV ve 7-AAD ile işlenmiş deney grubu hücrelerinde %23.0 erken apoptoz, %31.8 apoptoz olduğu gözlemlendi (Şekil 4.40d).



Şekil 4.40. HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında L2-Pt bileşiği ilavesi ile FDT uygulaması sonrası bu hücre hattındaki Annexin V bağlanması ile apoptoz ve nekrozun kantitasyonunun akış sitometrisi ile ölçümü. a) L2-Pt ile muamele edilmiş, AnnV ve 7-AAD ile muamele edilmemiş kontrol grubu hücreleri, b) L2-Pt bileşiği ile muamele edilmiş ve 7-AAD ile işlenmiş deney grubu, c) L2-Pt bileşiği ile muamele edilmiş ve AnnV işlenmiş deney grubu, d) L2-Pt bileşiğiyle muamele edilmiş AnnV ile 7-AAD işlenmiş deney grubu.

4.5. FDT ile Kullanılan Kimyasal Bileşiklerin Kitosen ile Kaplanmasının Temsili TEM Görüntüleri

Kanserli hücrelerde fotofiziksel özellikleri belirlenen yeni bileşiklerin anti-kanser aktivitelerinin biyo uyumlu moleküller ile entegre ederek yan etkilerini en aza indirmek, mevcut ilaç aktivitesini ise arttırmak amacıyla kitosen ile kapsülasyon işlemi yapıldı. L2-Pt bileşiği üzerinde yapılan kitosen kaplaması işleminin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü alındı. Görüntüde kimyasal bileşiğin kitosen ile entegrasyonu işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. L2 serisinden platinli bileşiğinin kitosan ile kaplanması sonucunda taramalı elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri. L2-Pt kitosanlı bileşiğinin a) 100 nm, b) 50 nm, c) 20 nm, d) 10 nm ve e) 5 nm’de ki ölçeklerde taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.

4.6. Verilerin Tartışılması

Kanser, küresel sağlık üzerinde en yüksek etkiye sahip hastalık olarak dünya çapında bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Tüm son teknolojik gelişmelere rağmen, nüks ve metastaz hala ana ölüm nedenidir. Kanser yapısı ve evresine bağlı olarak cerrahi müdahaleden sonra en çok tercih edilen tedavi yöntemleri arasında kemoterapi ve radyoterapi yer almaktadır. Fakat bu tedavi yöntemleri, hedefe spesifik olmadıkları zaman tümöral hücrelerle birlikte sağlıklı hücreleri de hedef alabilmektedir (Cacan & Ozmen, 2020). Fotodinamik terapi (FDT), diğer tedavi seçeneklerinden ödün vermediği ve kemoterapi ve radyoterapi ile karşılaştırıldığında uzun vadeli morbiditeyi azalttığı için, malign hastalıkların kontrolünde umut verici bir alternatif tedavi olarak görülmektedir (Mishchenko ve ark., 2022). Bu tez çalışmasında da fotodinamik terapide kullanılabilecek AZA-BODPY temelli altın ve platin içeren yeni nesil bileşikler ile bu bileşiklerin biyoyumlu halleri kullanılmıştır.

Çalışmada ilk olarak, meme kanseri hücre hattı MCF-7, yumurtalık kanseri hücre hattı OV2008 ve kolorektal kanseri hücre hattı HT-29'da fotodinamik terapiye (FDT) uygun fotoduyarlastırıcı olan AZA-BODİPY temelli altın ve platin içeren yeni nesil bileşiklerin bu hücre hatlarındaki gösterdikleri sitotoksik aktiviteleri MTT sitotoksitesite canlılık testi ile belirlendi. MTT sonuçlarına göre IC50 değeri veren yeni nesil bileşiklerin bu değere en yakın konsantrasyonları seçilerek diğer deneysel işlemler için kullanıldı. Altın ve platin içeren bu kimyasal bileşiklerin ağır metal sitotoksitesitesini sınırlandırmak için kitosen ile kaplanması sonucu elde ettiğimiz biyoyumlu hallerinin MTT sonuçlarından elde ettiğimiz verilere göre beklenildiği gibi metal bileşiklerinin sitotoksitesitesini sınırladığı belirlendi. Diğer deneysel işlemler için üç hücre hattında da kullanılmak için belirlenen etkin konsantrasyonlar ise aşağıda verildi.

MCF-7 meme kanseri hücre hattında FDT uygulamadan IC50 değerine en yakın karanlık sitotoksitesite gösteren bileşikler ve konsantrasyonları sırasıyla; L4-Au (1 uM) ve L2-Au (1 uM) olarak belirlendi. MCF-7 meme kanseri hücre hattında FDT uygulaması sonrası IC50 değerine en yakın sitotoksitesite gösteren bileşikler ve konsantrasyonları ise sırasıyla; L3-Au (0.2 µM), L4-Au (1 µM), L2-Pt (0.2 µM) ve L2-Au (1 µM) olarak belirlendi.

OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında FDT uygulanmadan IC50 değerine en yakın karanlık sitotoksiste karanlık sitotoksiste gösteren bileşikler ve konsantrasyonları sırasıyla; L3-Au (0.2 μ M), L4-Au (1 μ M) ve L2-Au (0.5 μ M) olarak belirlendi. OV2008 yumurtalık kanseri hücre hattında FDT uygulaması sonrası IC50 değerine en yakın sitotoksiste gösteren bileşikler ve konsantrasyonları ise sırasıyla; L3-Au (0.2 μ M), L4-Au (0.5 μ M), L2-Pt (0.1 μ M) ve L2-Au (0.5 μ M) olarak belirlendi.

HT-29 kolorektal kanseri hücre hattında FDT uygulanmadan IC50 değerine en yakın karanlık sitotoksiste karanlık sitotoksiste gösteren bileşikler ve konsantrasyonları sırasıyla; L4-Au (0.2 μ M), L2-Au (0.5 μ M) ve L1-Pt (1 μ M) olarak belirlendi. Kolorektal kanseri hücre hattında FDT uygulaması sonrası IC50 değerine en yakın sitotoksiste gösteren bileşikler ve konsantrasyonları ise sırasıyla; L2-Au (0.1 μ M), L2-Pt (0.2 μ M), L1-Au (1 μ M), L1-Pt (1 μ M), L3-Au (1 μ M), L5-Au (1 μ M) ve L4-Au (0.5 μ M) olarak belirlendi.

Daha önce literatürde çalışılmış, fotodinamik terapi için geliştirilen kimerik peptit tasarımı eksozomların (ChiP-Exo) plazma zarı ve çekirdek hedefli çalışarak plazma zarı yapısını bozmak ve hücre ölümüne neden olmak için ROS'u tetiklediği bildirilmiştir (Cheng ve ark., 2019). Yine başka bir çalışmada, FDT uygulaması üzerine plazma zarı geçirgenliğini aktif olarak artıran foto duyarlaştırıcıların (FD) tasarımlarının mevcut olduğu görülmüştür (Jia ve ark., 2017). Ayrıca bazı foto duyarlaştırıcıların (FD) hücre ve organel zarlarında daha yüksek derecede birikme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir (Agostinis ve ark., 2011). Hücre zarını oluşturan lipidlerin üzerindeki ışığa duyarlı oksidasyonların membranların dışarı sızmasına neden olduğu mekanizmada yakın zamanda tanımlanmıştır (Bacellar ve ark., 2018). Bu çalışma kapsamında FDT kullanıma uygun olan yeni nesil kimyasal bileşiklerin FDT uygulanmadan ve uygulandıktan sonra hücre zarı bütünlüğü üzerindeki etkilerinin analiz edilmesi için laktat dehidrogenaz (LDH) enzim aktivitesi testi yapılmıştır. LDH enzim aktivitesi testi meme kanseri MCF-7, yumurtalık kanseri OV2008 ve kolorektal kanseri HT-29 hücre hatlarında MTT sonuçlarına göre belirlenen yukarıda açıklanan konsantrasyonlarla muamelesi sonrası yapıldı. LDH enzim aktivitesi sonucuna göre bu üç hücre hattında da kimyasalların ilavesinin ardından FDT uygulanmadan ve uygulandıktan sonra her iki durumda da LDH enzim sızıntısı oranı kontrol grubuna göre yüksek çıktığı belirlendi. MCF-7, OV2008 ve HT-29 hücre hatlarına kimyasalların ilavesi ardından FDT

uygulanan hücre hatlarındaki LDH enzim sızıntısı, FDT uygulanmayan hücre hatlarına göre biraz daha fazla olduğu görüldü. Ancak FDT uygulanmayan hücre hatlarında LDH enzim sızıntı değerlerinin analizleri anlamlı bir değer verirken, FDT uygulanan bu üç hücre hattında LDH analizleri sonuçlarının çoğu anlamlı bir değer vermediği belirlendi.

FDT'nin doku yıkımının mekanizmasında foto duyarlaştırıcının (FD), uyarımı ile birlikte üretilen reaktif kimyasal türlerle zarar verme eylemi yoluyla hücreleri doğrudan öldürme yeteneği kazandırdığı bilinmektedir (Agostinis ve ark., 2011). FDT'nin doğrudan fototoksik etkisi, zarlar ve organeller gibi belirli hedeflere geri dönüşü olmayan ışık hasarını içermektedir (Josefsen & Boyle, 2012). Hücre içi ve hücre dışı mikroçevrenin bozulmaları çok yoğun olduğunda, hücreler plazma zarının tamamen parçalanmasının ardından ölebilir (nekroz morfolojisi) veya spesifik hücre ölüm mekanizmalarını ortaya çıkarabilir (Galluzzi ve ark., 2018). Propidyum iyodür veya kristal viyole gibi normalde geçirgen olmayan boyaların alımı, nekroz veya hücre parçalanması söz konusu olduğunda güvenilir bir hayatta kalma indeksi olabilmektedir (Kessel & Reiners, 2020). Bu çalışmada da hedef kanser hücrelerine kimyasal ajanların ilavesi sonrası uygulanan FDT'nin hücreleri ölüme götürürken morfolojik değişimlerini gözlemleyebilmek adına kristal viole ile boyama işlemi yapıldı. MCF-7, OV2008, HT-29 hücre hatları ile bu hücre hatlarına uygulanan kimyasalların konsantrasyonları daha önce açıklandığı şekilde uygulandı. Bulgularımıza göre hedef kanser hücrelerinin büzüldüğü, hücre zarı çizgilerini kaybederek orijinal şekillerine göre farklılaştığı ve birçoğunun ortamda yüzdüğü belirlendi. Bu morfolojik değişimlerin birçoğu apoptotik hücre ölüm özellikleri taşısa da hücrelerin spesifik hücre ölüm mekanizmalarını ortaya çıkarmak için bizlere yeterli sonuç verememektedir.

Fotodinamik terapide kullanılan fotoduyarlaştırıcıların türü ve FDT uygulanan hücre hattının çeşidi gibi değişkenlik gösteren faktörler FDT uygulamasının hücre üzerindeki sitotoksik etkisiyle beraber hücre ölüm yollarında çeşitlilik gösterebilmektedir. Aynı fotoduyarlaştırıcı için Campos ve çalışma grubu fare embriyonik fibroblastlarında (NIH/3T3) apoptozu FDT tarafından tetiklenen ana hücre ölümü türü olarak tanımlasa da (Campos ve ark., 2020), Dos Santos ve çalışma grubu meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) daha çok otofajik bir ölüm yolu olduğunu bildirmişlerdir (dos Santos ve ark., 2017). Bu tür sonuçlar FDT'nin fotoduyarlaştırıcının çeşidine, hedef kanser hücresinin türüne ve fotoduyarlaştırıcılara bağlanan modifiye edilmiş farklı grupların özelliklerine bağlı

olarak, apoptozun yanı sıra diğer klasik olmayan hücre ölümü yollarının da hücre canlılığının azalmasından sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Bu aşamada hücrelerin ölüm yollarını belirlemek amacıyla apoptoz tahlili yapıldı. Bu tahlil için çalışmamızda FDT ile birlikte kullanılan kimyasalların en yaygın ve etkin sitotoksik etki gösterdiği HT-29 (kolorektal kanser) hücre hattı seçildi. HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin apoptozu, Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I kullanılarak değerlendirildi. HT-29 kolorektal kanseri hücre hatları L1-Au (1 μ M), L1-Pt (1 μ M), L2-Au (0.1 μ M) ve L2-Pt (0.2 μ M) kimyasal bileşikleriyle muamele edildi. L1-Au bileşiğiyle muamele edilmiş deney grubu hücrelerinde %3.81 erken apoptoz, %15.8 apoptoz olduğu gözlemlenirken, L1-Pt bileşiğiyle muamele edilmiş deney grubu hücrelerinde %1.85 erken apoptoz, %8.72 apoptoz olduğu gözlemlendi. L2-Au bileşiğinin muamele edilmiş deney grubu hücrelerinde ise %28.6 erken apoptoz, %15.9 apoptoz olduğu gözlemlenirken, L2-Pt bileşiğiyle muamele edilmiş deney grubu hücrelerinde %23.0 erken apoptoz, %31.8 apoptoz olduğu gözlemlendi. Bu çalışma kapsamında elde ettiğimiz sonuçlara göre FDT ile kullandığımız bu yeni nesil metal bileşiklerinin kolorektal kanseri hücrelerinde (HT-29) nekrotik ve apoptotik süreci başlattığı belirlenmiştir. Yine farklı bir çalışmada fotodinamik terapi sonrası, Annexin V/ 7AA bağlanması tahlili ile apoptoz/nekroz hücre ölümünü saptamak için prostat tümör hücrelerinde akış sitometrisi işlemi yapılmış ve sonuç olarak FDT'nin bu tümör hücrelerinde nekroptozu tetiklediği bildirilmiştir (Gomes ve ark., 2023). Başka bir çalışmada ksenotransplante subkutanöz bir tümöre (adeno-karsinom, G-3) sahip dişi çıplak farelerde, tıpta da çok iyi bilinen metilen mavisi (MB +)'nin lokal enjeksiyonu ile FDT uygulamasından 3 hafta sonrasına kadar tümörün sabit bir hacminde kaldığını bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2019). Diğer bir çalışmada ise altın nanokongugatlarının (Au-NPs) ile FDT uygulamasının çoklu model antikanser tedavisi için çok işlevli bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceğini ileri sürmüştür (Sonia ve ark., 2022). Tüm bu çalışmalar ışığında da elde ettiğimiz sonuçlar hali hazırda literatürde mevcut çalışmalar ile benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Fotodinamik terapi (PDT), yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD), sedef hastalığı ve bazı kanserler dahil olmak üzere bir dizi hastalık ve bozukluğun tedavisinde kullanılan bir tedavi yöntemidir (Kharkwal ve ark., 2011). Ameliyat veya radyoterapiden farklı olarak, hücre dışı matris FDT'den etkilenmez; bu nedenle dokuya zarar vermez ve FDT nadiren yaralara neden olur. Bu, hafif uygulama kolaylığı ile birleştiğinde, FDT'yi insanlarda kanserler ve kanser öncesi durumlar için popüler bir tedavi haline getirmiştir. Dahası, Işığa duyarlılaştırıcı boyalar flüoresan olduğundan ve seçici olarak tümör dokularında birikebildiklerinden, tümörü normal dokulardan ayırt etmek için ek bir olarak sunabilirler (Ye ve ark., 2018). FDT, seçici olarak lokalize ışığa duyarlı bir ilaç (foto duyarlılaştırıcı olarak bilinir) ve uygun bir dalga boyundaki ışığın bir kombinasyonunu kullanır. İlacın ışıkla aktive olan formu, reaktif oksijen türleri (ROS) ve radikalleri üretmek için moleküler oksijen ile reaksiyona girer ve biyolojik bir ortamda bu toksik türler, hücrede biyokimyasal bozulmaya neden olan hücresel bileşenlerle etkileşime girebilir. Hücrenin homeostazı önemli ölçüde değiştirilirse, hücre ölümü süreci başlar. Klinik FDT için yasal onay alan ilk ışığa duyarlılaştırıcı Photofrin'dir. Photofrin özellikle uzun süreli hasta fotosensitivitesi olmak üzere bir dizi ilgili dezavantaja sahiptir. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için ikinci ve üçüncü nesil ışığa duyarlılaştırıcılar geliştirilmiş ve araştırılmıştır (Agostinis ve ark., 2011).

Metal bazlı ilaçların yüksek sitotoksik veriminin yanında getirdiği birtakım dezavantajların farkında olduğumuzdan bu noktada da biyoyumlu malzemelerden yardım aldık. Günümüze kadar, ilaç yüklü parçacıkların ayırt edici fizikokimyasal özelliklerinden dolayı kanser tedavi yönetimi ve tedavisi için yapılan araştırmalarda büyük bir ilgi görmüştür (Zhao ve ark., 2018b). Bu çalışma kapsamında ise yakın zamanda; toksik olmama (Huang ve ark., 2004; Aiping ve ark., 2006; Chien ve ark., 2016), biyoyumluluktaki biyobozunurluk (Okamoto ve ark., 2003) ve antikanser aktivitesi gibi bir çok olumlu özellikleri sebebiyle ilgi çeken 'kitosen' polimeri kullanılmıştır (Galed ve ark., 2005). Kitosen, bir dağıtım taşıyıcısı olarak büyük bir potansiyele sahiptir ve diğer polimerlerle karşılaştırılmaz. Kitosanın suda çözünmesi son derece zordur, ancak asidik çözeltide çözünabilmektedir. Suda çözünmezliği, tıbbi uygulamalarda kullanımı için önemli bir sınırlamadır. Ancak modifiye kitosan, modifiye edilmemiş kitosandan daha üstün kimyasal özelliklere sahiptir. Örneğin, Kitosan

türevlerinden üretilen nanoparçacıklar, stabilite ve biyouyumlulukları nedeniyle ilaçları dağıtmak için kullanılabilir. Ayrıca kitosan bazlı nanopartiküllerin ilaç salımı, aşı salımı, antimikrobiyal uygulamaları, kallus ve doku rejenerasyonu uygulamaları da sunulmaktadır (Josefsen & Boyle, 2008).

Bu çalışma kapsamında da, 219Z081 nolu Tübitak 1001 projesi kapsamında sentezlenen, fotodinamik terapiye uygun, foto duyarlaştırıcı olan aza-bodipy temelli altın ve platin içeren yeni nesil malzemeler ve bu malzemelerin biyouyumlu hallerinin antikanser aktiviteleri ile incelenmiştir. Bu çalışma dört bölümden oluşan bir deney planı ile tasarlandı. Bu dört bölüm; MTT testi, LDH enzim miktarı ölçümü, kristal viyole ile hücre morfolojilerini görüntüleme ve apoptoz tahlilinden oluşmaktadır. Tüm bu yapılan deneysel işlemlerin sonuçlarından, FDT ile kimyasal bileşiklerin "hücre ölümü" üzerindeki rolüne ilişkin bir tahmin elde edilmeye çalışıldı. Mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesinin bir ölçüsü olan MTT tahlili, sitokrom c salınımından kaynaklanan apoptotik ölümle ilişkilendirilebilir, ancak sonuçlar gecikmiş toksisite veya mitokondriyal hasarın onarımından etkilenebildiğinden bizlere spesifik bir hücre ölüm yolu belirlememizde yardımcı olmasa da kimyasal ajanların hedef kanser hücre hatlarındaki doza bağlı sitotoksik etkilerini vererek diğer deneysel tasarımları için kılavuzluk yapmış oldu. FDT ile hücre zarını oluşturan lipidlerin üzerindeki ışığa duyarlı oksidasyonların membranların dışarı sızmasına neden olduğu bilinmektedir. Birçok farklı hücre tipinde bulunan ve plazma zarının hasar görmesi üzerine hücreden ortama salınan sitozolik bir enzimdir. Bu çalışma kapsamında FDT ile kullanılan yeni nesil kimyasal bileşiklerin hücre büyümesi inhibisyonu ve hücre ölümü üzerindeki etkilerinin analiz edilmesi için laktat dehidrojenaz (LDH) enzim aktivitesi testi yapıldı. LDH enzim aktivitesi sonucuna göre hücre hattında da kimyasalların ilavesinin ardından FDT uygulanmadan ve uygulandıktan sonra her iki durumda da LDH enzim sızıntısı oranı kontrol grubuna göre yüksek çıktığı belirlendi. MCF-7, OV2008 ve HT-29 hücre hatlarına kimyasalların ilavesi ardından FDT uygulanan hücre hatlarındaki LDH enzim sızıntısı, FDT uygulanmayan hücre hatlarına göre biraz daha fazla olduğu görüldü. Ancak FDT uygulanmayan hücre hatlarında LDH enzim sızıntı değerlerinin analizleri anlamlı bir değer verirken, FDT uygulanan bu üç hücre hattında LDH analizleri sonuçlarının çoğu anlamlı bir değer vermediği belirlendi. Kristal viyole gibi normalde geçirgen olmayan boyaların alımı, nekroz veya hücre parçalanması söz konusu olduğunda güvenilir bir hayatta kalma indeksi olabilir ancak tek başına spesifik bir hücre yolunu belirlememizde

etkili değildir. Bu aşamada hücrelerin ölüm yollarını belirlemek amacıyla apoptoz tahlili yapıldı. Bu tahlil için çalışmamızda FDT ile birlikte kullanılan kimyasalların en yaygın ve etkin sitotoksik etki gösterdiği HT-29 (kolorektal kanser) hücre hattı seçildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre FDT ile kullandığımız bu yeni nesil metal bileşiklerinin kolorektal kanseri hücrelerinde (HT-29) nekrotik ve apoptotik süreci başlattığı belirlenmiştir. L2-Pt'nin özellikle HT-29 kolorektal kanseri hücre hattı üzerinde büyük ölçüde apoptozu tetiklediği bulunmuştur. Mevcut çalışmanın ilerki aşamalarında bu etkinliği belirlenen bileşiklerin deney hayvanları ile in vivo testlerin yapılması hedeflenmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abbas, Z., Rehman, S., Abbas, Z., & Rehman, S. (2018). An Overview of Cancer Treatment Modalities., InTech, 258s, Londra
<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.76558>
- Abdel-Kader, M. H. (2014). Photodynamic therapy: From theory to application. *Photodynamic Therapy: From Theory to Application*, SPRINGER LINK, 312 s, 3-22., Berlin, Almanya, <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39629-8>
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250-281.
<https://doi.org/10.3322/CAAC.20114>
- Aiping, Z., Tian, C., Lanhua, Y., Hao, W., & Ping, L. (2006). Synthesis and characterization of N-succinyl-chitosan and its self-assembly of nanospheres. *Carbohydrate Polymers*, 66(2), 274-279.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2006.03.014>
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., & Farokhzad, O. C. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 505-515. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- Allen, P. D., & Newland, A. C. (1996). Apoptosis detection by DNA analysis. *Methods in molecular medicine*, 6, 207-213. <https://doi.org/10.1385/0-89603-341-4:207>
- Ames, B. N., Gold, L. S., & Willett, W. C. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5258. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.12.5258>
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 1305-1308.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.281.5381.1305>
- Bacellar, I. O. L., Oliveira, M. C., Dantas, L. S., Costa, E. B., Junqueira, H. C., Martins, W. K., Durantini, A. M., Cosa, G., Di Mascio, P., Wainwright, M., Miotto, R., Cordeiro, R. M., Miyamoto, S., & Baptista, M. S. (2018). Photosensitized Membrane Permeabilization Requires Contact-Dependent Reactions between Photosensitizer and Lipids. *Journal of the American Chemical Society*, 140(30), 9606-9615.
<https://doi.org/10.1021/JACS.8B05014>
- Ball, D. J., Wood, S. R., Vernon, D. I., Griffiths, J., Dubbelman, T. M. A. R., & Brown, S. B. (1998). The characterisation of three substituted zinc phthalocyanines of differing charge for use in photodynamic therapy. A comparative study of their aggregation and photosensitising ability in relation to mTHPC and polyhaematoporphyrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 45(1), 28-35. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00156-0](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00156-0)
- Bao, H., Zhang, Q., Zhu, Z., Xu, H., Ding, F., Wang, M., Du, S., Du, Y., & Yan, Z. (2017). BHX, a novel pyrazoline derivative, inhibits breast cancer cell invasion by reversing the epithelial-mesenchymal transition and down-regulating Wnt/ β -catenin signalling. *Scientific reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-09655-7>
- Baritaki, S., Militello, L., Malaponte, G., Spandidos, D. A., Salcedo, M., & Bonavida, B. (2011). The anti-CD20 mAb LFB-R603 interrupts the dysregulated NF- κ B/Snail/RKIP/PTEN resistance loop in B-NHL cells: role in sensitization to TRAIL apoptosis. *International journal of oncology*, 38(6), 1683-1694.
<https://doi.org/10.3892/IJO.2011.984>

- Bauer, J. H., & Helfand, S. L. (2006). New tricks of an old molecule: lifespan regulation by p53. *Aging Cell*, 5(5), 437. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2006.00228.X>
- Berkel, C., & Cacan, E. (2021). Estrogen- and estrogen receptor (ER)-mediated cisplatin chemoresistance in cancer. *Life sciences*, 286. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.120029>
- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular and Molecular Immunology*, 18(5), 1106. <https://doi.org/10.1038/S41423-020-00630-3>
- BioRender. (2023). <https://www.biorender.com> (20.05.2023).
- 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>
- Bortner, C. D., Oldenburg, N. B. E., & Cidlowski, J. A. (1995a). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 5(1), 21-26. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)88932-1](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)88932-1)
- Bortner, C. D., Oldenburg, N. B. E., & Cidlowski, J. A. (1995b). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 5(1), 21-26. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)88932-1](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)88932-1)
- Bradbury, S. P., Russom, C. L., Ankley, G. T., Wayne Schultz, T., & Walker, J. D. (2003). Overview of data and conceptual approaches for derivation of quantitative structure-activity relationships for ecotoxicological effects of organic chemicals. *Wiley Online Library*, 22(8), 1789-1798. <https://doi.org/10.1897/01-234>
- Brancolini, C., Benedetti, M., & Schneider, C. (1995). Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *The EMBO journal*, 14(21), 5179-5190. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1995.TB00202.X>
- Brenneman, M. K., Alstrum-Acevedo, J. H., Fleming, C. N., Jang, P., Meyer, T. J., & Papanikolas, J. M. (2002). Turning the [Ru(bpy)2dppz]2+ light-switch on and off with temperature. *Journal of the American Chemical Society*, 124(50), 15094-15098. <https://doi.org/10.1021/JA0279139/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JA0279139N00001.GIF>
- Brown, S. B., Bailey, K., & Savill, J. (1997). Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *The Biochemical journal*, 323 (Pt 1)(Pt 1), 233-237. <https://doi.org/10.1042/BJ3230233>
- Brunet, C. L., Gunby, R. H., Benson, R. S. P., Hickman, J. A., Watson, A. J. M., & Brady, G. (1998). Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. *nature.com*. <https://www.nature.com/articles/4400334>
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>
- Cacan, E., & Ozmen, Z. C. (2020). Regulation of Fas in response to bortezomib and epirubicin in colorectal cancer cells. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, 32(4), 193-201. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2020.1740389>
- Cacan, E. Enhancing sensitivity of chemoresistant ovarian cancer cells to TRAIL and FAS mediated apoptosis by radiation. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2017; 74(3): 185-192. Doi: 10.5505/TurkHijyen.2017.12499
- Cacan, E., Spring, A. M., Kumari, A., Greer, S. F., & Garnett-Benson, C. (2015b). Combination Treatment with Sublethal Ionizing Radiation and the Proteasome Inhibitor, Bortezomib, Enhances Death-Receptor Mediated Apoptosis and Anti-Tumor Immune Attack. *International journal of molecular sciences*, 16(12), 30405-30421. <https://doi.org/10.3390/IJMS161226238>

- Campos Chaves Lamarque, G., Cusicanqui Méndez, D. A., Arruda Matos, A., José Dionísio, T., Andrade Moreira Machado, M. A., Magalhães, A. C., Cardoso Oliveira, R., & Cruvinel, T. (2020). Cytotoxic effect and apoptosis pathways activated by methylene blue-mediated photodynamic therapy in fibroblasts. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 29. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2020.101654>
- Cardone, M. H., Salvesen, G. S., Widmann, C., Johnson, G., & Frisch, S. M. (1997). The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell*, 90(2), 315-323. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80339-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80339-6)
- Chan, F. K. M. (2012). Fueling the flames: Mammalian programmed necrosis in inflammatory diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(11). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A008805>
- 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>
- Cheng, H., Fan, J. H., Zhao, L. P., Fan, G. L., Zheng, R. R., Qiu, X. Z., Yu, X. Y., Li, S. Y., & Zhang, X. Z. (2019). Chimeric peptide engineered exosomes for dual-stage light guided plasma membrane and nucleus targeted photodynamic therapy. *Biomaterials*, 211, 14-24. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.05.004>
- Chien, R. C., Yen, M. T., & Mau, J. L. (2016). Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydrate polymers*, 138, 259-264. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.11.061>
- Chua, B. Y., Al Kobaisi, M., Zeng, W., Mainwaring, D., & Jackson, D. C. (2012). Chitosan microparticles and nanoparticles as biocompatible delivery vehicles for peptide and protein-based immunocontraceptive vaccines. *Molecular Pharmaceutics*, 9(1), 81-90. https://doi.org/10.1021/MP200264M/ASSET/IMAGES/MEDIUM/MP-2011-00264M_0002.GIF
- Dai, T., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Prates, R. A., Astrakas, C., St. Denis, T. G., Ribeiro, M. S., Mylonakis, E., Hamblin, M. R., & Tegos, G. P. (2012). Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform. *Frontiers in Microbiology*, 3, 120. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00120>
- Dang, J., He, H., Chen, D., & Yin, L. (2017). Manipulating tumor hypoxia toward enhanced photodynamic therapy (PDT). *Biomaterials science*, 5(8), 1500-1511. <https://doi.org/10.1039/C7BM00392G>
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 116(2), 205-219. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00046-7)
- De Jong, W. H., & Borm, P. J. A. (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International journal of nanomedicine*, 3(2), 133-149. <https://doi.org/10.2147/IJN.S596>
- de Melo Gomes, L. C., de Oliveira Cunha, A. B., Peixoto, L. F. F., Zanon, R. G., Botelho, F. V., Silva, M. J. B., Pinto-Fochi, M. E., Góes, R. M., de Paoli, F., & Ribeiro, D. L. (2023). Photodynamic therapy reduces cell viability, migration and triggers necroptosis in prostate tumor cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1. <https://doi.org/10.1007/S43630-023-00382-9>
- DeRosa, M. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233-234, 351-371. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6)

- Detty, M. R., Gibson, S. L., & Wagner, S. J. (2004). Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of medicinal chemistry*, 47(16), 3897-3915. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15267226/>
- Didenko, V. V., & Hornsby, P. J. (1996). Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *The Journal of cell biology*, 135(5), 1369-1376. <https://doi.org/10.1083/JCB.135.5.1369>
- Doherty, R. E., Sazanovich, I. V., McKenzie, L. K., Stasheuski, A. S., Coyle, R., Baggaley, E., Bottomley, S., Weinstein, J. A., & Bryant, H. E. (2016). Photodynamic killing of cancer cells by a Platinum(II) complex with cyclometallating ligand. *Scientific Reports* (C. 6). <https://doi.org/10.1038/srep22668>
- dos Santos, A. F., Terra, L. F., Wailemann, R. A. M., Oliveira, T. C., de Moraes Gomes, V., Mineiro, M. F., Meotti, F. C., Bruni-Cardoso, A., Baptista, M. S., & Labriola, L. (2017). Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-017-3179-7>
- DR, G., & JC, R. (1998a). Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 118. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.281.5381.1309>
- DR, G., & JC, R. (1998b). Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 118. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.281.5381.1309>
- Draw Chemical Structures, Molecules, and Reactions | ChemSketch | ACD/Labs. (t.y.). Geliş tarihi 15 Haziran 2023, gönderen https://www.acdlabs.com/products/chemsketch/?utm_source=ads&utm_medium=web&utm_campaign=CSGlobal&gclid=EAIaIQobChMIitnnh5jE_wIVFM93Ch15fgyaEAAYASAAEgLYPD_BwE
- Dysart, J. S., & Patterson, M. S. (2005). Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells *in vitro*. *Physics in Medicine & Biology*, 50(11), 2597. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/50/11/011>
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998a). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), 43-50. <https://doi.org/10.1038/34112>
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998b). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), 43-50. <https://doi.org/10.1038/34112>
- Fleming, A., Bourdenx, M., Fujimaki, M., Karabiyik, C., Krause, G. J., Lopez, A., Martín-Segura, A., Puri, C., Scrivo, A., Skidmore, J., Son, S. M., Stamatakou, E., Wrobel, L., Zhu, Y., Cuervo, A. M., & Rubinsztein, D. C. (2022). The Different Autophagy Degradation Pathways and Neurodegeneration. *Neuron*, 110(6), 935. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2022.01.017>
- Fuhrmann, G., Serio, A., Mazo, M., Nair, R., & Stevens, M. M. (2015). Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *Journal of Controlled Release*, 205, 35-44. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2014.11.029>
- Galed, G., Miralles, B., Paños, I., Santiago, A., & Heras, Á. (2005). N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. *Carbohydrate Polymers*, 62(4), 316-320. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2005.03.019>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular

- mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*, 25(3), 486-541. <https://doi.org/10.1038/S41418-017-0012-4>
- Gao, L., Deligonul, N., & Gray, T. G. (2012). Gold(I) complexes of brominated azadipyrromethene ligands. *Inorganic Chemistry*, 51(14), 7682-7688. https://doi.org/10.1021/IC300709N/SUPPL_FILE/IC300709N_SI_003.PDF
- Gasco, M., Shami, S., & Crook, T. (2002). The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 4(2), 70. <https://doi.org/10.1186/BCR426>
- Goodspeed, A., Heiser, L. M., Gray, J. W., & Costello, J. C. (2016). Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics. *Molecular cancer research : MCR*, 14(1), 3-13. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0189>
- Gordon, J. L., Brown, M. A., & Reynolds, M. M. (2018). Cell-Based Methods for Determination of Efficacy for Candidate Therapeutics in the Clinical Management of Cancer. *Diseases*, 6(4), 85. <https://doi.org/10.3390/DISEASES6040085>
- Gorman, A., Killoran, J., O'Shea, C., Kenna, T., Gallagher, W. M., & O'Shea, D. F. (2004). *In vitro* demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 126(34), 10616-10631. https://doi.org/10.1021/JA047649E/SUPPL_FILE/JA047649ESI20040611_122133.PDF
- Guldi, D. M., Mody, T. D., Gerasimchuk, N. N., Magda, D., & Sessler, J. L. (2000). Influence of Large Metal Cations on the Photophysical Properties of Texaphyrin, a Rigid Aromatic Chromophore. *Journal of the American Chemical Society*, 122(34), 8289-8298. <https://doi.org/10.1021/JA001578B>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hengartner, M. O. (2001). Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*, 104(3), 325-328. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00219-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00219-7)
- Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K., & Sasada, M. (1998). Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, 187(4), 587-600. <https://doi.org/10.1084/JEM.187.4.587>
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., & Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 15(13), 1573-1581. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1201324>
- 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>
- Hong, E. J., Choi, D. G., & Shim, M. S. (2016a). Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *İçinde Acta Pharmaceutica Sinica B* (C. 6, Sayı 4, ss. 297-307). <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.01.007>
- Hong, E. J., Choi, D. G., & Shim, M. S. (2016b). Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(4), 297-307. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.01.007>
- Huang, M., Khor, E., & Lim, L. Y. (2004). Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation.

- Pharmaceutical research*, 21(2), 344-353.
<https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016249.52831.A5>
- Iravani, S., & Varma, R. S. (2022). Advanced Drug Delivery Micro- and Nanosystems for Cardiovascular Diseases. *Molecules*, 27(18).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES27185843>
- Jänicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., & Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 273(16), 9357-9360.
<https://doi.org/10.1074/JBC.273.16.9357>
- Jaworski, W., Streszewski, B., Szacilowski, K., & Paclawski, K. (2014). The deposition of gold nanoparticles onto activated carbon. *Archives of Metallurgy and Materials*, 59(3), 899-903. <https://doi.org/10.2478/amm-2014-0152>
- Jensen, M., Engert, A., Weissinger, F., Knauf, W., Kimby, E., Poynton, C., Oliff, I. A., Rummel, M. J., & Österborg, A. (2008). Phase I study of a novel pro-apoptotic drug R-etodolac in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Investigational new drugs*, 26(2), 139-149. <https://doi.org/10.1007/S10637-007-9106-Z>
- Jia, H. R., Jiang, Y. W., Zhu, Y. X., Li, Y. H., Wang, H. Y., Han, X., Yu, Z. W., Gu, N., Liu, P., Chen, Z., & Wu, F. G. (2017). Plasma membrane activatable polymeric nanotheranostics with self-enhanced light-triggered photosensitizer cellular influx for photodynamic cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 255, 231-241. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2017.04.030>
- Jiang, C., Yang, W., Wang, C., Qin, W., Ming, J., Zhang, M., Qian, H., & Jiao, T. (2019). Methylene Blue-Mediated Photodynamic Therapy Induces Macrophage Apoptosis via ROS and Reduces Bone Resorption in Periodontitis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1529520>
- Josefsen, L. B., & Boyle, R. W. (2008). Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-Based Drugs*, 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/276109>
- Josefsen, L. B., & Boyle, R. W. (2012). Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. *Theranostics*, 2(9), 916-966. <https://doi.org/10.7150/THNO.4571>
- Karp, G., & Patton, J. G. (2009a). *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. <https://books.google.com/books?hl=tr&lr=&id=arRGYE0GxRQC&oi=fnd&pg=PR28&ots=jrC8pWYItD&sig=s3Z3PS1TonLi8AmjZGhREIbJxi0>
- Karp, G., & Patton, J. G. (2009b). *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. <https://books.google.com/books?hl=tr&lr=&id=arRGYE0GxRQC&oi=fnd&pg=PR28&ots=jrC8pWYKnj&sig=N3P9dZG1bApyBjsI6XRE0EWWFCA>
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972a). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257. <https://doi.org/10.1038/BJC.1972.33>
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972b). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257. <https://doi.org/10.1038/BJC.1972.33>
- Kessel, D., & Reiners, J. J. (2020). Photodynamic therapy: autophagy and mitophagy, apoptosis and paraptosis. *Autophagy*, 16(11), 2098. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1783823>
- Kharkwal, G. B., Sharma, S. K., Huang, Y. Y., Dai, T., & Hamblin, M. R. (2011). Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers in surgery and medicine*, 43(7), 755-767. <https://doi.org/10.1002/LSM.21080>
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.

- Science* (New York, N.Y.), 275(5303), 1132-1136.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5303.1132>
- Kluck, R. M., Martin, S. J., Hoffman, B. M., Zhou, J. S., Green, D. R., & Newmeyer, D. D. (1997). Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *The EMBO journal*, 16(15), 4639-4649.
<https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.15.4639>
- Koopaei, M. N., Khoshayand, M. R., Mostafavi, S. H., Amini, M., Khorramizadeh, M. R., Tehrani, M. J., Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2014). Docetaxel Loaded PEG-PLGA Nanoparticles: Optimized Drug Loading, In-vitro Cytotoxicity and In-vivo Antitumor Effect. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 13(3), 819.
[/pmc/articles/PMC4177642/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/257642/)
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Koths, K., Kwiatkowski, D. J., & Williams, L. T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* (New York, N.Y.), 278(5336), 294-298.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.278.5336.294>
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., & He, Z. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.001>
- Kroemer, G., Zamzami, N., & Susin, S. A. (1997a). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology today*, 18(1), 44-51. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)80014-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)80014-X)
- Kroemer, G., Zamzami, N., & Susin, S. A. (1997b). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology today*, 18(1), 44-51. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)80014-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)80014-X)
- Kucuk, B., Yilmaz, E., & Cacan, E. (2021). Expression profiles of Natural Killer Group 2D Ligands (NGK2DLs) in colorectal carcinoma and changes in response to chemotherapeutic agents. *Molecular Biology Reports*, 48(5), 3999-4008.
<https://doi.org/10.1007/S11033-021-06404-Y/METRICS>
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*. 1996 Nov 28;384(6607):368-72. doi: 10.1038/384368a0. PMID: 8934524.
- Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N. G., & Jenkins, N. A. (1994). Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme. *Genes & development*, 8(14), 1613-1626.
<https://doi.org/10.1101/GAD.8.14.1613>
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., & Aster, J. (2014). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book*.
https://books.google.com/books?hl=tr&lr=&id=jJlBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=AfVYDY833_&sig=yBY1_bM6drGg_X-Ci_CFoMuRAuE
- LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S., & Korneluk, R. G. (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 27(48), 6252-6275.
<https://doi.org/10.1038/ONC.2008.302>
- Lazebnik, Y. A., Cole, S., Cooke, C. A., Nelson, W. G., & Earnshaw, W. C. (1993). Nuclear events of apoptosis *in vitro* in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *The Journal of cell biology*, 123(1), 7-22.
<https://doi.org/10.1083/JCB.123.1.7>
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), 491-501.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81590-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81590-1)
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997a). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-

- 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80434-1)
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997b). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80434-1)
- Li, S. Y., Zhao, L. P., Zheng, R. R., Fan, G. L., Liu, L. S., Zhou, X., Chen, X. T., Qiu, X. Z., Yu, X. Y., & Cheng, H. (2020). Tumor Microenvironment Adaptable Nanoplatforrm for O₂ Self-Sufficient Chemo/Photodynamic Combination Therapy. *Particle & Particle Systems Characterization*, 37(3). <https://doi.org/10.1002/PPSC.201900496>
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., & Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1), 147-157. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80085-9)
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T., & Wang, X. (1998a). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 8461-8466. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.15.8461>
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T., & Wang, X. (1998b). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15), 8461-8466. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.15.8461/ASSET/F1EEF30D-CA53-45EC-9158-14A3807F4B84/ASSETS/GRAPHIC/PQ1581682004.JPEG>
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89(2), 175-184. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80197-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80197-X)
- Liu, Y., & Zhu, X. (2017). Endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegenerative diseases. *Translational neurodegeneration*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/S40035-017-0092-6>
- Mai, J., Yang, L., Xie, H. J., Li, Y. Y., Wang, X., & Liu, X. X. (2022). Molecular mechanisms of platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer (Review). *Oncology Reports*, 47(4), 1-11. <https://doi.org/10.3892/OR.2022.8293/HTML>
- Martin, S. J., Finucane, D. M., Amarante-Mendes, G. P., O'Brien, G. A., & Green, D. R. (1996). Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *The Journal of biological chemistry*, 271(46), 28753-28756. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.46.28753>
- Martin, S. J., & Green, D. R. (1995a). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, 82(3), 349-352. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90422-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90422-0)
- Martin, S. J., & Green, D. R. (1995b). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*, 82(3), 349-352. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90422-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90422-0)
- McCarthy, N. J., Whyte, M. K. B., Gilbert, C. S., & Evan, G. I. (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *The Journal of cell biology*, 136(1), 215-227. <https://doi.org/10.1083/JCB.136.1.215>
- Mishchenko, T., Balalaeva, I., Gorokhova, A., Vedunova, M., & Krysko, D. V. (2022). Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer? *Cell Death & Disease* 2022 13:5, 13(5), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04851-4>

- Morton, J. P., Timpson, P., Karim, S. A., Ridgway, R. A., Athineos, D., Doyle, B., Jamieson, N. B., Oien, K. A., Lowy, A. M., Brunton, V. G., Frame, M. C., Evans, T. R. J., & Sansom, O. J. (2010). Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 246. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0908428107>
- Mushtaq, A., Li, L., Anitha, A., & Grøndahl, L. (2021). Chitosan Nanomedicine in Cancer Therapy: Targeted Delivery and Cellular Uptake. *Macromolecular Bioscience*, 21(5), 2100005. <https://doi.org/10.1002/MABI.202100005>
- Nardon, C., Boscutti, G., & Fregona, D. (2014). Beyond platinum: Gold complexes as anticancer agents. *Anticancer Research*, 34(1), 487-492.
- Ndagi, U., Mhlongo, N., & Soliman, M. E. (2017a). Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective. *Drug design, development and therapy*, 11, 599-616. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>
- Ndagi, U., Mhlongo, N., & Soliman, M. E. (2017b). Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 599-616.
- Ngo, D. H., Vo, T. S., Ngo, D. N., Kang, K. H., Je, J. Y., Pham, H. N. D., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2015). Biological effects of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocolloids*, 51, 200-216. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2015.05.023>
- Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences*, 22(8), 299-306. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01085-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01085-2)
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., & Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 59(6), 365-378. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2009.01.017>
- Novel Drug Approvals for 2015 | FDA. (2015). <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2015>
- O'Brien, M. A., & Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6), 572-585. <https://doi.org/10.1111/J.1476-4431.2008.00363.X>
- Okamoto, Y., Yano, R., Miyatake, K., Tomohiro, I., Shigemasa, Y., & Minami, S. (2003). Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers*, 53(3), 337-342. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00076-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00076-6)
- Park, H. S., Nam, S. H., Kim, J., Shin, H. S., Suh, Y. D., & Hong, K. S. (2016). Clear-cut observation of clearance of sustainable upconverting nanoparticles from lymphatic system of small living mice. *Scientific Reports*, 6(March), 1-7. <https://doi.org/10.1038/srep27407>
- Photodynamic Therapy to Treat Cancer - National Cancer Institute. (t.y.). <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/photodynamic-therapy>
- Prado-Gotor, R., & Grueso, E. (2011). A kinetic study of the interaction of DNA with gold nanoparticles: mechanistic aspects of the interaction. *Prado-Gotor, Rafael Grueso, Elia*, 13(4), 1479-1489. <https://doi.org/10.1039/C0CP00901F>
- Prokop, A., & Davidson, J. M. (2008). Nanovehicular Intracellular Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(9), 3518-3590. <https://doi.org/10.1002/JPS.21270>
- Rackham, O., Nichols, S. J., Leedman, P. J., Berners-Price, S. J., & Filipovska, A. (2007). A gold(I) phosphine complex selectively induces apoptosis in breast cancer cells:

- Implications for anticancer therapeutics targeted to mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, 74(7), 992-1002. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2007.07.022>
- Ray, S., Mohan, R., Singh, J. K., Samantaray, M. K., Shaikh, M. M., Panda, D., & Ghosh, P. (2007). Anticancer and antimicrobial metallopharmaceutical agents based on palladium, gold, and silver N-heterocyclic carbene complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 129(48), 15042-15053.
- Rizvi, S. A. A., & Saleh, A. M. (2018). Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(1), 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012>
- Rogers, L. (1943). Treatment of Cerebral Contusion. *British medical journal*, 1(4283), 151-154. <https://doi.org/10.1136/BMJ.1.4283.151>
- Rudel, T., & Bokoch, G. M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5318), 1571-1574. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.276.5318.1571>
- Russo, M., & Russo, G. L. (2018). Autophagy inducers in cancer. *Biochemical pharmacology*, 153, 51-61. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2018.02.007>
- Sakahira, H., Enari, M., & Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391(6662), 96-99. <https://doi.org/10.1038/34214>
- Saraste, A., & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528-537. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00384-3/2/45-3-528-FIG2.GIF](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00384-3/2/45-3-528-FIG2.GIF)
- Schneider, P., & Tschopp, J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica acta Helvetiae*, 74(2-3), 281-286. [https://doi.org/10.1016/S0031-6865\(99\)00038-2](https://doi.org/10.1016/S0031-6865(99)00038-2)
- Schwartzman, R. A., & Cidlowski, J. A. (1993). Mechanism of tissue-specific induction of internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. *Endocrinology*, 133(2), 591-599. <https://doi.org/10.1210/endo.133.2.8393769>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21387>
- Simone, C. B., Friedberg, J. S., Glatstein, E., Stevenson, J. P., Stermann, D. H., Hahn, S. M., & Cengel, K. A. (2012). Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic disease*, 4(1), 63-75. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2072-1439.2011.11.05>
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R., & Martin, S. J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of cell biology*, 144(2), 281-292. <https://doi.org/10.1083/JCB.144.2.281>
- Song, F., Kong, Y., Shao, C., Cheng, Y., Lu, J., Tao, Y., Du, J., & Wang, H. (2021). Chitosan-based multifunctional flexible hemostatic bio-hydrogel. *Acta Biomaterialia*, 136, 170-183. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2021.09.056>
- Song, J., Suh, C. H., Park, Y. B., Lee, S. H., Yoo, N. C., Lee, J. D., Kim, K. H., & Lee, S. K. (2001). A phase I/IIa study on intra-articular injection of holmium-166-chitosan complex for the treatment of knee synovitis of rheumatoid arthritis. *European journal of nuclear medicine*, 28(4), 489-497. <https://doi.org/10.1007/S002590000470>
- Sonia, Singh, A., Shivangi, Kukreti, R., Kukreti, S., & Kaushik, M. (2022). Probing multifunctional azure B conjugated gold nanoparticles with serum protein binding properties for trimodal photothermal, photodynamic, and chemo therapy:

- Biophysical and photophysical investigations. *Biomaterials Advances*, 134, 112678. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2022.112678>
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E. S. (1998a). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular cell*, 1(7), 949-957. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80095-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80095-7)
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E. S. (1998b). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular cell*, 1(7), 949-957. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80095-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80095-7)
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., & Alnemri, E. S. (1996). Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: The Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14486-14491. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.25.14486>
- Steffens, L., De Barros Dias, M. C. H., Arantes, P. R., Henn, J. G., Nugent, M., & Moura, D. J. (2011). Nanopolymeric systems to improve brain cancer treatment outcomes. *Advances and Challenges in Pharmaceutical Technology: Materials, Process Development and Drug Delivery Strategies*, 104, 563-601. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820043-8.00001-3>
- 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>
- Tang, P. M. K., Liu, X. Z., Zhang, D. M., Fong, W. P., & Fung, K. P. (2009). Pheophorbide a based photodynamic therapy induces apoptosis via mitochondrial-mediated pathway in human uterine carcinosarcoma. *İçinde Cancer Biology and Therapy (C. 8, Sayı 6, ss. 533-539)*. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.6.7694>
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., Elliston, K. O., Ayala, J. M., Casano, F. J., Chin, J., Ding, G. J. F., Egger, L. A., Gaffney, E. P., Limjoco, G., Palyha, O. C., ... Tocci, M. J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356(6372), 768-774. <https://doi.org/10.1038/356768A0>
- Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998a). Caspases: Enemies Within. *Science*, 281(5381), 1312-1316. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.281.5381.1312>
- Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998b). Caspases: enemies within. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 1312-1316. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.281.5381.1312>
- Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., & Croce, C. M. (1984). Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B Cells with the t(14;18) Chromosome Translocation. *Science*, 226(4678), 1097-1099. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.6093263>
- Urbano, A., McCaffrey, R., & Foss, F. (1998). Isolation and characterization of NUC70, a cytoplasmic, hematopoietic apoptotic endonuclease. *The Journal of biological chemistry*, 273(52), 34820-34827. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.52.34820>
- Uthaman, S., Lee, S. J., Cherukula, K., Cho, C. S., & Park, I. K. (2015). Polysaccharide-Coated Magnetic Nanoparticles for Imaging and Gene Therapy. *BioMed research international*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/959175>
- Vanags, D. M., Isabella Pörn-Ares, M., Coppola, S., Burgess, D. H., & Orrenius, S. (1996). Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 271(49), 31075-31085. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.49.31075>

- Villa-Pulgarín, J. A., Gajate, C., Botet, J., Jimenez, A., Justies, N., Varela-M, R. E., Cuesta-Marbán, Á., Müller, I., Modolell, M., Revuelta, J. L., & Mollinedo, F. (2017). Mitochondria and lipid raft-located FOF1-ATP synthase as major therapeutic targets in the antileishmanial and anticancer activities of ether lipid edelfosine. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005805>
- Wang, J. J., Zeng, Z. W., Xiao, R. Z., Xie, T., Zhou, G. L., Zhan, X. R., & Wang, S. L. (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International journal of nanomedicine*, 6, 765-774. <https://doi.org/10.2147/IJN.S17296>
- Wang, K. K. W., Posmantur, R., Nath, R., McGinnist, K., Whitton, M., Talanian, R. V., Glantz, S. B., & Morrow, J. S. (1998). Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *The Journal of biological chemistry*, 273(35), 22490-22497. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.35.22490>
- Wen, L. P., Fahrni, J. A., Troie, S., Guan, J. L., Orth, K., & Rosen, G. D. (1997). Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 272(41), 26056-26061. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.41.26056>
- Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756), 555-556. <https://doi.org/10.1038/284555A0>
- Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology* 2007 9:10, 9(10), 1102-1109. <https://doi.org/10.1038/ncb1007-1102>
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., & Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5303), 1129-1132. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5303.1129>
- Yano, T., Hatogai, K., Morimoto, H., Yoda, Y., & Kaneko, K. (2014). Photodynamic therapy for esophageal cancer. *Annals of translational medicine*, 2(3). <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2305-5839.2014.03.01>
- Ye, Z., Liang, Y., Ma, Y., Lin, B., Cao, L., Wang, B., Zhang, Z., Yu, H., Li, J., Huang, M., Zhou, K., Zhang, Q., Liu, X., & Zeng, J. (2018). Targeted photodynamic therapy of cancer using a novel gallium (III) tris (ethoxycarbonyl) corrole conjugated-mAb directed against cancer/testis antigens 83. *Cancer Medicine*, 7(7), 3057. <https://doi.org/10.1002/CAM4.1601>
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993). The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75(4), 641-652. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90485-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90485-9)
- Zhang, G. D., Harada, A., Nishiyama, N., Jiang, D. L., Koyama, H., Aida, T., & Kataoka, K. (2003). Polyion complex micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *Journal of Controlled Release*, 93(2), 141-150. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2003.05.002>
- Zhao, D., Yu, S., Sun, B., Gao, S., Guo, S., & Zhao, K. (2018a). Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles. *Polymers*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/POLYM10040462>
- Zhao, D., Yu, S., Sun, B., Gao, S., Guo, S., & Zhao, K. (2018b). Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles. *Polymers*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/POLYM10040462>

Zou, T., Lum, C. T., Lok, C. N., Zhang, J. J., & Che, C. M. (2015). Chemical biology of anticancer gold(III) and gold(I) complexes. *Chemical Society Reviews*, 44(24), 8786-8801. <https://doi.org/10.1039/C5CS00132C>



7. EKLER

7.1. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Kimyasallar

8. ÖZGEÇMİŞ

