

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FARKLI METALOFİTALOSİYANİN ÜRÜNLERİNİN MEME KANSERİ
ÜZERİNE ETKİSİ

Hazırlayan
Hayrani Eren BOSTANCI

Danışman
Prof. Dr. Behzat ÇİMEN
Prof. Dr. Yusuf TUTAR

Doktora Tezi

Mart 2021
KAYSERİ

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**FARKLI METALOFTHALOSİYANİN ÜRÜNLERİNİN MEME KANSERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Hayrani Eren BOSTANCI**

**Danışman
Prof. Dr. Behzat ÇİMEN
Prof. Dr. Yusuf Tutar**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından TDK-2019-9191 kodlu proje ile desteklenmiştir**

**Mart 2021
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı : Hayrani Eren BOSTANCI

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Farklı metalofthalosiyenin ürünlerinin meme kanseri üzerine etkisi” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Hayrani Eren BOSTANCI

Danışman

Prof.Dr. Behzat ÇİMEN

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr. Behzat ÇİMEN

Prof. Dr. Behzat ÇİMEN danışmanlığında Hayrani Eren BOSTANCI tarafından hazırlanan “Farklı Metalofthalosiyanin Ürünlerinin Meme Kanseri Üzerine Etkisi” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

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

JÜRİ :

Danışman	:Prof. Dr. Behzat ÇİMEN	
Üye	:Prof. Dr. Sevtap BAKIR	
Üye	:Doç. Dr. Ahmet CUMAOĞLU	
Üye	:Doç. Dr. Şengül Dilem DOĞAN	
Üye	:Dr. Öğr. Üyesi Ceylan HEPOKUR	

ONAY :

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve Sayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın yönlendirilmesinde, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar insani ilişkilerde de sonsuz desteğiyle gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Behzat ÇİMEN'e, bilgi birikimi ve doğru yönlendirmeleri ile bende yeni ufuklar açan sayın hocam Prof. Dr. Yusuf TUTAR'a, gerek uygulama ve teorik bilgide bana kattığı bütün bilgi ve beceriler ile gerek sağladığı altyapı ile gerek yaptığı ahlak ve içten tavırlarıyla beni her daim motive eden çok kıymetli hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Ceylan HEPOKUR'a, sağladığı altyapı ve bilgi birikimi ile tezimin rahat ilerlemesini sağlayan sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ERGÜL'e, çalışmalarım süresince birçok fedakarlık göstererek beni destekleyen ve her anımda yanımda olan eşim ve oğluma, yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için aileme en derin duygularla teşekkür ederim. Bununla birlikte TDK-2019-9191 Proje kodu ile bu tezi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Hayrani Eren BOSTANCI

KAYSERİ, Mart 2021

FARKLI METALOFTALOSİYANİN ÜRÜNLERİNİN MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Hayrani Eren BOSTANCI

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Mart 2021

Danışman: Prof. Dr. Behzat ÇİMEN-Prof. Dr. Yusuf TUTAR

ÖZET

Kanser günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biridir. Kanser, anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile başlar ve tedavi edilmez ise ölüme neden olabilir. Multidisipliner bir çalışma gerektiren kanser tedavileri; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, fotodinamik terapi (PDT) gibi farklı seçenekleri içermektedir.

Kemoterapi ve radyoterapi sonucu oluşan istenmeyen yan etkiler farklı kanser tedavi yöntemlerinin araştırılıp geliştirilmesini sağlamıştır. Fotodinamik terapi bu yöntemlerden biri olarak ortaya çıkmıştır. Yaklaşık 30 sene önce FDA (US Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış olmasına rağmen bu yöntem günümüzde hala etkili bir şekilde kullanılamamaktadır. Fotodinamik terapi, geliştirilen moleküler yapının vücuda verilerek dağılmasını ve kanserli bölgede birikmesini öngörmektedir. Kanserli bölgede birikimin sağlanmasının ardından yüksek dalga boylarında seçilen bölgeye ışınla yapılarak geliştirilen molekül uyarılır ve reaktif ürünler ortaya çıkar. Bu reaktif ürünler de kanserli hücrelerin ölümünü sağlayarak hastanın kanserden kurtulmasını sağlar.

Bu çalışmada sentezlenen Zn, Cu, Co, Ga, Mn ve In bağlı metalo-ftalosiyanın bileşiklerinin farklı meme kanseri hücre hatları (kanseri hücre hatları MCF-7, MDA-MB-231 ile sağlıklı hücre hattı MCF-10A) üzerinde sitotoksikite çalışmaları yapılmıştır. Yapılan XTT ölçümleri sonucunda 3 hücre hattı için IC_{50} değerleri bulunmuştur. Bulunan IC_{50} değerlerine göre Ga ve Zn bağlı ftalosiyanın yapılarının MCF7 hücre hattı üzerinde en verimli sonuca götürdüğü gösterilmiştir. Yapılan LDH-ELISA çalışmasında uygulama sonrası hücre bazında oluşan LDH düzeyleri ölçülmüş ve hücrelerin apoptoza yöneldiği görülmüştür. Ayrıca flow sitometri ile yapılan cell-cycle ve dead cell kitleri ile bu uygulama sonucu kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelere oranla daha çok apoptoza gittiği görülmüştür. Bu araştırma sonucunda bulunan sonuçlar ile Ga-Pc ve Zn-Pc ftalosiyanın yapılarının toksik etkileri incelenmiş ve diğer yapılara kıyasla meme kanseri için en uygun metalo-ftalosiyanın yapılarının olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Ftalosiyanın, Metaloftalosiyanın, Fotodinamik Terapi, Meme kanseri

EFFECTS OF DIFFERENT METALLOPHTHALOCYANINE PRODUCTS ON BREAST CANCER

Hayrani Eren BOSTANCI

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Biochemistry

PhD Thesis, March 2021

Supervisors: Prof. Dr. Behzat ÇİMEN-Prof. Dr. Yusuf TUTAR

ABSTRACT

Cancer is one of the most important health problems of today. Cancer begins with the uncontrolled proliferation of abnormal cells and can lead to death if left untreated. Cancer treatments that require a multidisciplinary study; It includes different options such as surgery, radiotherapy, chemotherapy, photodynamic therapy (PDT).

Undesirable side effects caused by chemotherapy and radiotherapy have led to the research and development of different cancer treatment methods. Photodynamic therapy has emerged as one of these methods. Although it was approved by the FDA (US Food and Drug Administration) about 30 years ago, this method is still not used effectively today. Photodynamic therapy predicts that the developed molecular structure is distributed to the body and accumulates in the cancerous area. After the accumulation in the cancerous area is achieved, the developed molecule is stimulated by irradiating the selected area at high wavelengths and reactive products are produced. These reactive products also enable the patient to get rid of cancer by causing the death of cancerous cells.

In this study, cytotoxicity studies of synthesized Zn, Cu, Co, Ga, Mn and In bound metallo-phthalocyanine compounds were performed on different breast cancer cell lines (cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and healthy cell line MCF-10A). As a result of the XTT measurements, IC50 values were found for 3 cell lines. According to the IC50 values found, Ga and Zn bound phthalocyanine structures have been shown to lead the most efficient result on the MCF7 cell line. In the LDH-ELISA study, LDH levels formed on the cell basis after the application were measured and it was observed that the cells were directed towards apoptosis. In addition, it was observed that cancer cells undergo more apoptosis than healthy cells as a result of this application with cell-cycle and dead cell kits performed by flow cytometry. As a result of this research, the toxic effects of Ga-Pc and Zn-Pc phthalocyanine structures were examined and it was concluded that metallo-phthalocyanine structures were the most suitable for breast cancer compared to other structures.

Keywords: Phthalocyanine, Metallophthalocyanine, Photodynamic Therapy, Breast cancer

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xiiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Ftalosiyanin'in Tarihsel Keşfi	3
2.2 Ftalosiyaninlerin Yapısı.....	4
2.3 Ftalosiyaninlerin Kimyasal Özellikleri	5
2.3.1 Elektrovaleant Metaloftalosiyaninler:	5
2.3.2 Kovalent Metaloftalosiyaninler:.....	6
2.4 Fiziksel Özellikleri	7
2.5 Ftalosiyaninlerin Kullanım Alanları.....	8
2.5.1 Boyar Madde ve Pigment	8
2.5.2 Baskı Mürekkebi Uygulamaları	8
2.5.3 Reaksiyon Katalizleme	9
2.5.4 Elektrofotografi	9
2.5.5 Nükleer Kimyada Uygulamaları	9
2.5.6 Diğer Alanlar.....	10
2.5.7 Çalışmada kullanılan ftalosiyaninler	10
2.6 Fotodinamik Terapinin Tarihsel Gelişimi	10
2.7 Fotodinamik Terapi.....	13
2.7.1 Fotodinamik Terapide Işık	17
2.7.2 Dalgaboyu ($\lambda_{\max}$)	17
2.7.3 Işık Kaynakları	19

2.8 Fotodinamik Terapide Aksiyon Mekanizmaları	20
2.9 Doğrudan Hücre Ölümü	21
2.9.1 Apoptoz.....	21
2.9.2 Nekroz.....	23
2.9.3 Otofaji	25
2.10 Vasküler Etki	27
2.11 İmmünolojik Etki	29
2.12 Fotodinamik Terapi Sonrası Sitokrom C Salınımı.....	29
2.13 Fotoduyarlı Yapılar	30
2.14 Kanser	31
2.14.1 Kanser Nedir?.....	31
2.15 Karsinogenezin aşamaları.....	32
2.15.1 Doğal Seçilim.....	32
2.15.2 Tümörün Meydana Gelmesi ve İlerlemesi.....	33
2.15.3 Tümörün gelişmesi ve metastaz	33
2.16 Meme Kanseri	34
2.17 Serbest Radikaller	35
2.17.1 Singlet Oksijen	35
2.18 Serbest radikallerin etkileri.....	37
2.18.1 Genel etkileri	37
2.18.2 Membran lipidlerine etkileri (Lipid Peroksidasyonu)	37
2.18.3 Proteinlere Etkileri.....	38
2.18.4 Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkisi	38
2.18.5 Karbonhidratlara Etkisi.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1 Kullanılan cihazlar	39
3.2 Kullanılan kimyasallar	40
3.3 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi.....	41
3.3.1 Sentezlenen Organik Bileşiklerin Anti-Kanser Etkilerinin Araştırılması İçin Yapılacak <i>in-vitro</i> Çalışmalar	41
3.3.2 Hücre Kültürü.....	41
3.3.3 Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması.....	41
3.3.4 Hücrelerin Açılması, Çoğaltılması ve Pasajlanması.....	42
3.3.5 Hücrelerin Sayılması / Canlılığının Tespit Edilmesi.....	43
3.3.6 Hücre Sayımı.....	43

3.4 Metaloftalosiyeninlerin sentezi	45
3.4.1 3-(4-(3-oxobutyl)phenoxy)phthalonitrile sentezi	45
3.4.2 Ftalosiyenin sentezinin genel prosedürü	45
3.4.3 Floresans kuantum verimleri	46
3.5 Sitotoksosite Testleri	46
3.5.1 Ftalosiyenin bileşiklerinin hücre hatlarındaki IC ₅₀ dozunun belirlenmesi	46
3.6 Antiproliferatif Özelliklerinin İncelenmesi	47
3.6.1 Flow sitometri (Anneksin V)	47
3.6.2 Hücre Döngüsü ve Apoptozun Flow Sitometrik Olarak Belirlenmesi	47
3.6.3 Hücre Döngüsü Analizi Reaktiflerin Hazırlanması	48
3.6.4 Anneksin V Analizi Reaktiflerin Hazırlanması Anneksin V	49
3.7 LDH aktivite tayini	50
3.8 İstatistiksel Analizler	51
4. BULGULAR	52
4.1 Sentez ve spektroskopik karakterizasyon	52
4.1.1 Agregasyon çalışmaları	53
4.1.2 Floresans Özellikleri	54
4.1.3 Ftalosiyeninlerdeki pH değişiminin UV vis ve Floresans spektrumları üzerindeki etkisi	54
4.2 IC ₅₀ dozunun belirlenmesi	55
4.2 LDH aktivite sonuçları	57
4.3 Flow Sitometri Sonuçları	57
4.3.1 Annexin V	58
4.3.2 Hücre döngüsü	61
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	65
6. KAYNAKLAR	71
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

PDT	: Fotodinamik Terapi
Pc	: Ftalosiyenin
ZnPc	: Çinko bağlı metaloftalosiyenin
CuPc	: Bakır bağlı metaloftalosiyenin
CoPc	: Kobalt bağlı metaloftalosiyenin
InPc	: İndiyum bağlı metaloftalosiyenin
MnPc	: Mangan bağlı metaloftalosiyenin
PF	: Photofrin
PS	: Fotoduyarlı yapı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Metalli ve metalsiz ftalosiyanınların kimyasal yapıları	3
Şekil 2-2 a) Porfirin, b) Porfirazin, c) Tetrabenzoporfirin, d) Ftalosiyanın	4
Şekil 2-3 Ftalosiyanınların en düşük enerjideki rezonans yapısı	7
Şekil 2-4 Ftalosiyanın molekülünün geometrik yapısının şematik gösterimi: a) Kare düzlemsel, dört koordinasyonlu, b) Kare tabanlı piramit, beş koordinasyonlu, c) Tetragonal, altı koordinasyonlu	8
Şekil 2-5 Fotodinamik terapinin tarihsel gelişimi	12
Şekil 2-6 Fotodinamik terapinin muamelesi	13
Şekil 2-7 Fotoduyarlı yapıların uyarılması ve Tip I / Tip II reaksiyonları	14
Şekil 2-8 Işık kaynağının dokuya etki etmesi ve dağılması	15
Şekil 2-9 PDT’de kullanılan bazı fotoduyarlı yapıların absorpsiyon spektrumları	18
Şekil 2-10 Fotodinamik terapinin aksiyon mekanizmaları	20
Şekil 2-11 Apoptoz olayının dışsal (ekstrinsik) ve içsel (intrinsik) yolları	22
Şekil 2-12 Meme kanseri oluşum bölgeleri	35
Şekil 2-13 Singlet oksijen reaksiyonları	36
Şekil 3-1 Olympus R1 hücre sayım cihazı	44
Şekil 3-2 Olympus R1 hücre sayımı için slayt	44
Şekil 4-1 Hücrelerin belirlenen IC ₅₀ değerleri	56
Şekil 4-2 Çalışılan kit sonucu elde edilen standart eğri grafiği	57
Şekil 4-3 MCF-10a kontrol hücrelerinin ölüm hücre tablosu	58
Şekil 4-4 MCF-10a hücrelerinin Zn-PC ile etkileşime girmesi sonucu oluşan ölüm hücre tablosu	58
Şekil 4-5 MCF-10a hücrelerinin Ga-PC ile etkileşime girmesi sonucu oluşan ölüm hücre tablosu	59
Şekil 4-6 MCF-7 kontrol hücrelerinin ölüm hücre tablosu	59
Şekil 4-7 MCF-7 hücrelerinin Zn-PC ile etkileşime girmesi sonucu oluşan ölüm hücre tablosu.	60
Şekil 4-8 MCF-7 hücrelerinin Ga-PC ile etkileşime girmesi sonucu oluşan ölüm hücre tablosu	60
Şekil 4-9 MCF-7 hücrelerinin Zn-PC ile etkileşime girmeden önce oluşan hücre döngü grafiği	61

Şekil 4-10 MCF-7 hücrelerinin Zn-PC ile etkileşime girmesi sonucu oluşan hücre döngü grafiği.....	62
Şekil 4-11 MCF-7 hücrelerinin Ga-PC ile etkileşime girmeden önce oluşan hücre döngü grafiği.....	62
Şekil 4-12 MCF-7 hücrelerinin Ga-PC ile etkileşime girmesi sonucu oluşan hücre döngü grafiği.....	62
Şekil 4-13 Çinko bağlı ftalosiyanın verilerek ışına yapılan ve verilmeden bulunan MCF-7 hücre hattındaki döngülerin karşılaştırılması.....	63
Şekil 4-14 Galyum bağlı ftalosiyanın verilerek ışına yapılan ve verilmeden bulunan MCF-7 hücre hattındaki döngülerin karşılaştırılması.....	63



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 Fotodinamik Terapi ile oluşabilecek hücre ölüm mekanizmaları.....	17
Tablo 2.2 Günümüzde kullanılan foto duyarlı yapılar.....	18
Tablo 2.1 Doğrudan hücre ölüm şekillerinin ayırt edici karakteristik özellikleri	28
Tablo 3.1 Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler	40
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, yapıları ve üretici firmalar	42
Tablo 4.1 THF'de yeni sentezlenmiş metalofthalosiyaninlerin spektral parametreleri ve fotofiziksel özellikleri (ΦF).	56
Tablo 4.2 Hücre hatlarının yeni sentez yapıları içerisindeki IC_{50} değerleri	68
Tablo 4.3 MCF7 hücre hattı üzerinde 5 tekrarlı çalışılan LDH enzim değerleri	69

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biridir. Kanser, anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile başlar ve tedavi edilmez ise ölüme neden olabilir. Multidisipliner bir çalışma gerektiren kanser tedavileri; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, fotodinamik terapi (PDT) gibi farklı seçenekleri içermektedir (Agostinis *ve ark.*, 2011).

Kemoterapi ve radyoterapi sonucu oluşan istenmeyen yan etkiler farklı kanser tedavi yöntemlerinin araştırılıp geliştirilmesini sağlamıştır. Fotodinamik terapi bu yöntemlerden biri olarak ortaya çıkmıştır. Yaklaşık 30 sene önce FDA (US Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış olmasına rağmen günümüzde hala etkili bir şekilde kullanılamamaktadır (Agostinis *ve ark.*, 2011). Fotodinamik terapi, geliştirilen moleküler yapının vücuda verilerek dağılmasını ve kanserli bölgede birikmesini öngörmektedir. Kanserli bölgede birikimin sağlanmasının ardından yüksek dalga boylarında seçilen bölgeye ışın yapılarak geliştirilen molekül uyarılır ve reaktif ürünler ortaya çıkar. Bu reaktif ürünler de kanserli hücrelerin ölümünü sağlayarak hastanın kanserden kurtulmasını sağlar (Li *ve ark.*, 2013).

Kanser türleri arasında meme kanseri, akciğer kanserinden sonra dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kanser türüdür. Her sekiz kadından birinin hayatının belirli bir döneminde meme kanserine yakalanabileceği bildirilmektedir. Erkeklerde de görülmekle beraber kadınlarda görülme durumu erkeklere göre 100 kat daha fazladır. Bu yüzden araştırmacılar yeni terapötik ajan geliştirmek için çalışmaları bu alana kaydırmıştır (Basanagouda *ve ark.*, 2014). Bu çalışmada yeni sentezlenen farklı metalofthalosiyaninlerin meme kanseri üzerinde toksisitesinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Fotodinamik terapide yaygın olarak kullanılmakta olan photofrin, uygulama sonrası hastalarda ışığa hassaslık yarattığı için hastalar 4-6 hafta arası güneşe çıkamamaktadır.

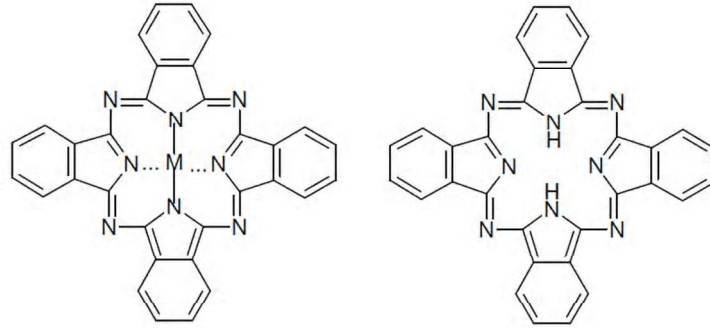
Bu yüzden deride daha az toksik etki yaratan ve daha uzun dalga boylarında absorpsiyon yapan fotoduyarlı yapıların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Yano ve ark., 2011).

Bu çalışmada sentezlenen Zn, Cu, Co, Ga, Mn ve In metalo-ftalosiyenin bileşiklerinin sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır. Bugüne kadar birçok farklı metal atomu içeren farklı metalo-ftalosiyeninler sentezlenmiş ancak literatür bilgileri incelendiğinde bu komplekslerin meme kanser hücre hattına uygulanarak etkileri ya araştırılmamış yada geliştirilmeye açık bırakılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin meme kanseri hücre hatları ile (MCF-7, MDA-MB-231) sağlıklı hücre hattı (MCF-10A) üzerine uygulanarak sitotoksisite testleri yapılmıştır. Karanlık ortamda 24 saat süren inkübasyonun ardından yüksek dalga boyunda ışınım yapılarak kanserli hücrelerin ölüm yolları (apoptoz, nekroz vs..) araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda bulunan sonuçlar ile bütün ftalosiyenin yapılarının toksik etkileri birbiriyle karşılaştırılmış ve meme kanseri için en uygun metalo-ftalosiyenin yapısının bulunması amaçlanmıştır. Bunun sonucu olarakta fotodinamik terapi ile meme kanseri tedavi sürecinde kullanılmak üzere yeni terapötik ajan aday(ı)larının sunulması planlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Ftalosiyanın'ın Tarihsel Keşfi

Ftalosiyanimler bir tetraisoindol türevidir ve sentetik olarak elde edilen en önemli boyar madde gruplarından. Son dönemde uygulamalı çalışmalar ve temel bilimde fazlasıyla üzerinde durulmakta ve çalışılmaktadırlar. İlk olarak 1907 yılında asetikanhidrit ve ftalimid'in o-siyanobenzamid sentezi sırasında, Tcherniac ve Braun isimli araştırmacılar tarafından yan ürün oluşması sonucu yanlışlıkla bulunmuştur (Şekil 2-1) (Wöhrle, 1993).



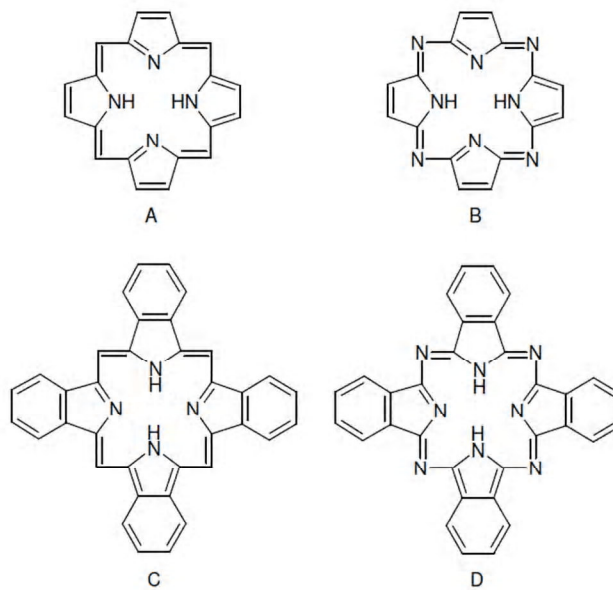
Şekil 2-1 Metalli ve metalsız ftalosiyanimlerin kimyasal yapıları (Wöhrle, 1993)

Von Der Weid ve De Diesbach ise 1907 yılında yaptıkları deneyde dibromobenzen ve o-dibromoksilen'in bakır siyanür ile ısıtıldığında koyu mavi bir bileşik oluştuğunu gözlemlemişlerdir (Braun ve Tcherniac, 1907). Drescher ve Dunsworth tarafından kanıtlanan başka bir olayda ise 1928 yılında bir boya tesisinde emaye kaplı bir reaktörde amonyak ve ftalik anhidrit'in reaksiyonu sonucu ftalimid sentezi sırasında reaktörde bir sızıntı olduğu gözlemlenmiş ve bu sızıntının mavi-yeşil renkli bir metoftalosiyanim olduğu gösterilmiştir. Yapılan araştırma ve çalışmalar sonucunda ftalosiyanim bileşiklerine ilk patent Dandridge, Drescher ve Thomas tarafından 1929 yılında alınmıştır(Allen ve Allen, 1971).

2.2 Ftalosiyaninlerin Yapısı

Ftalosiyaninler, porfirin türevleri ile yakın olan analogları tetrabenzoporfirinler ve porfirazinlerle birlikte birçok kimyasal mekanizmada yer alırlar. Makrosiklik sentetik bir yapısı olan ftalosiyaninler doğada bulunan porfirin halkasının analogu niteliğindedir.

Yapısal olarak 4 pirolün metil karbonlarının π -konjugasyonu ile oluşan porfirinler ftalosiyaninlere benzemektedirler. Ftalosiyanin molekülü farklı olarak 4 isoindolin grubunun azot yapıları ile bağ yapması sonucu oluşur. Mezo pozisyonundaki 4 azot atomu ve 4 benzo ünitesi, porfirin ve ftalosiyanin arasındaki temel farklılığı göstermektedir. Ftalosiyaninde bulunan aza köprüleri porfirinde metin grupları ile yer değiştirmiştir. Ftalosiyaninlerin bir diğer adlandırma şekli 4 isoindol biriminin kondenzasyon ürünü olan tetra-benzo-tetra-aza-porfirin'dir (**Şekil 2-2**) (Wöhrle, 1993).



Şekil 2-2 a) Porfirin, b) Porfirazin, c) Tetrabenzoporfirin, d) Ftalosiyanin (Wöhrle, 1993)

Ftalosiyaninler yapılarında bulunan azonitrojenler ile oksidasyon ve ısıya karşı porfirinlere kıyasla çok daha dayanıklıdırlar. Bununla birlikte π -konjugasyonu sebebiyle halkaları arasındaki agregasyon fazladır, bu da ftalosiyanin yapılarının su ve organik çözücülerde çözünürlüğünü azaltmaktadır (Wöhrle, 1993).

Ftalosiyanin molekülleri çok çeşitli uygulama alanlarında incelenmiştir. Son yıllarda antimikrobiyal direncin hızla artması nedeniyle tıbbi uygulamalarda kullanılabilecek yeni bileşiklerin sentezlenmesi önemlidir. Bu alanda gelecek vaat eden moleküllerden biri, ftalosiyaninler gibi N4-makrosiklik komplekslerdir. Bu nedenle, ftalosiyanin moleküllerinin üstün özellikleri ve tıbbi uygulamalara duyulan ihtiyaç birlikte düşünüldüğünde, bunların sentezi ve potansiyelinin araştırılması önemlidir(Allen ve Allen, 1971).

Yeşil bitki yapraklarının pigmenti olan klorofil ve kanda bulunan hem yapıları moleküler olarak ftalosiyanine benzerlik göstermektedirler. Ftalosiyaninler içinde barındırabildiği farklı metal iyonları ve değişken yapılarla gaz sensörü, katalizör, fotodinamik terapi gibi birçok alanda işlevsel kullanılabilmektedirler (Reiter, 2014).

2.3 Ftalosiyaninlerin Kimyasal Özellikleri

Ftalosiyaninler dört isoindol çekirdeği içermekte olup aromatik dikarboksilli asitlerden oluşmaktadır ve bu asitlerin nitril, amid, imid türevleri ile oluşturulan oldukça gergin bir yapıya sahiptir. Ftalosiyanin sentezi için karboksil grupları doymamış aromatik gruba direk bağlanmalıdır, aksi taktirde sentezlenemezler. Bununla birlikte karboksil gruplarını taşıyan karbon atomlarının çifte bağ yapmış olması ftalosiyanin sentezi için bir başka şarttır. Ftalosiyaninlerin merkezini oluşturan isoindol kısmındaki hidrojen atomları metal iyonları ile rahatlıkla yer değiştirerek metaloftalosiyanin oluşumunu sağlamaktadırlar(Denes, 1998).

Merkez atomuna bağlı olarak ftalosiyaninlerin kimyasal özellikleri değişkenlik gösterir. Metal içeren ftalosiyaninlerin kararlılıkları merkez bölümündeki oyuk ile metal iyonunun o oyuga ne kadar uyumlu olduğuna bağlıdır. Ftalosiyanin molekülünün iç çapı metal atomunun çapı ile örtüşmezse stabil olmayan bir yapı oluşur ve metal atomu kolayca molekülden ayrılabilir(Denes, 1998). İki çeşit metal bağlı ftalosiyanin türü bulunmaktadır. Bunlar;

2.3.1 Elektrovalent Metaloftalosiyaninler: Organik çözücülerde çözünmeyen, toprak alkali ve alkali metallerini içeren yapılardır. Metali ftalosiyaninden ayırmak için su,

alkollü su ve anorganik asitler kullanılabilir(Gök ve ark., 2018).

Alkali-Metal ftalosiyanimlere; dipotasyum ftalosiyanim (PcK_2), disodyum ftalosiyanim (PcNa_2), dilyum ftalosiyanim (PcLi_2) örnek verilebilir.

Toprak Alkali-Metal ftalosiyanimlere ise; kalsiyum ftalosiyanim (PcCa) ve baryum ftalosiyanim (PcBa) örnek verilebilir(Denes, 1998).

2.3.2 Kovalent Metaloftalosiyanimler: Daha kararlı yapıda olan bu ftalosiyanim türü uygun koşullarda yüksek sıcaklık altında ($450-550^\circ\text{C}$) süblimleşerek bozunmaz hale gelirler.

Nitrik asit dışında hiçbir asit yapısında değişikliğe sebep olamaz. Metal ve ftalosiyanim arasında oluşan kuvvetli bağ ve oluşturdukları molekülün yalancı aromatik karakter taşıması bu stabiliteye sebep olmaktadır.

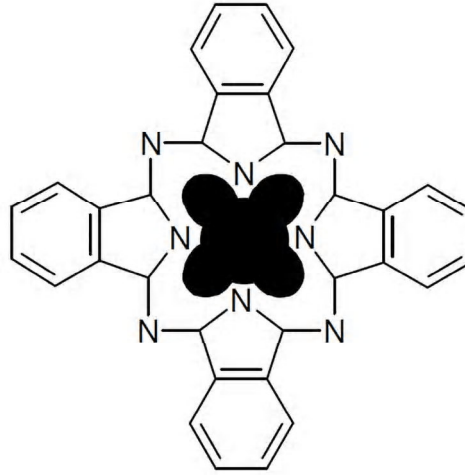
İki (+2) değerlikli metallerin iyonları ftalosiyanim ile karşılanırken, üç ve yüksek değerlikli metal iyonlarının ftalosiyanim kompleksleri ortamdaki uygun anyonlar tarafından doldurulur(Demir ve ark., 2019).

Ftalosiyanimler genellikle suda çözünmeyen yapılardır. Elektrovalent metaloftalosiyanimler organik çözücülerde çözünmezler, fakat kovalent metaloftalosiyanimler kinolin gibi organik çözücülerde çözünebilirler. Bununla birlikte bazı ek grupların ftalosiyanimlere eklenmesi ile bu yapıların organik çözücüdeki çözünürlükleri artırılabilir (Denes, 1998).

Hidrojen peroksit ve perklorik asit gibi kuvvetli oksitleyiciler ftalosiyanimle etkileşime girdiğinde yükseltgenme ürünü olarak ftalimidi oluştururlar. Bünyesinde metal bulunduran ftalosiyanimler ise oksidasyon reaksiyonlarında katalizör olarak görev yapar. Benzaldehid ftalosiyanim varlığında yükseltgenerek benzoik aside dönüşebilir. Sülfat artıklarının yükseltgenerek sülfata dönüştürülmesinde Kobalt bağlı ftalosiyanimler katalizleyici olarak rol üstlenirler.

Ftalosiyanimler yapılarında bulundurdıkları benzen halkaları ile elektrofilik substitüsyon reaksiyonları gerçekleştirebilmektedirler. Molekül üzerindeki dört benzen halkasında aynı oranda substitüsyona uygun vaziyettedir. Ftalosiyanimler π -elektronları bakımından oldukça zengindir ve aromatik yapıdadır. Makrosiklik halkalarına

bağlanacak bir metal ve iki proton iyonu yapının nötrale olmasını sağlar (Şekil 2-3) (Denes, 1998).



Şekil 2-3 Ftalosiyaninlerin en düşük enerjideki rezonans yapısı (Denes, 1998)

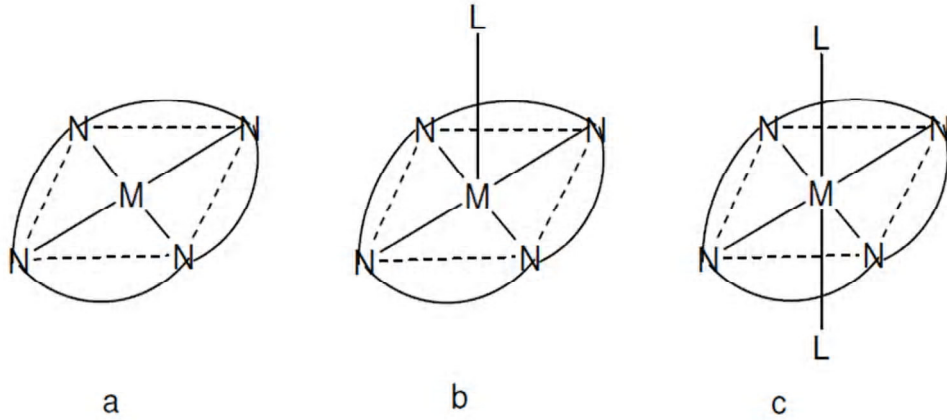
2.4 Fiziksel Özellikleri

İsomorfik kristal bir yapıda bulunan ftalosiyaninler α ve β yapıları olmak üzere iki tip yapıdan oluşmaktadırlar. Bu yapılar arasında termodinamik kararlılık ve çözünürlük gibi yapısal farklar bulunmaktadır. β yapısı en sık karşılaşılan yapı olmakla birlikte α yapısına göre çok daha karardır. X ışını difraksiyon yöntemi ile bu yapılar ayrıştırılabilirler (Andriianova ve ark., 2020).

Kararlı yapıda olan β formu organik çözücüler yardımıyla sentezlenirken, α formu polar çözücüler yardımı ile sentezlenir. α formu aromatik yapıdaki organik çözücülerle etkileşirse veya yüksek sıcaklıklarda ısıtılırsa β formu elde edilir (Ou ve ark., 2021).

Yarı iletken özellik gösteren ftalosiyaninler kuvvetli vakum ve 550°C 'nin üzerinde süblimleşirler. Birçok ftalosiyanin yapısının erime noktası bulunmamaktadır. Merkezinde simetrik ve kristal bir yapıya sahip olan ftalosiyaninler bu özellikleri ile şekil değiştirmeksizin hidrojen atomlarını Co veya Ga, In, Zn, Cu vb.. metal atomlarını merkezine bağlayabilir. Bu yapıların merkez bölgeye bağlanması ile beş yada altı

koordinasyonlu piramidal yapılar oluşur (**Şekil 2-4**) (Andriianova ve ark., 2020).



Şekil 2-4 Ftalosiyanın molekülünün geometrik yapısının şematik gösterimi: a) Kare düzlemsel, dört koordinasyonlu, b) Kare tabanlı piramit, beş koordinasyonlu, c) Tetragonal, altı koordinasyonlu (Denes, 1998)

2.5 Ftalosiyanın Kullanım Alanları

2.5.1 Boyar Madde ve Pigment

Kısıtlı renk tonu aralıklarına ve yalnızca mavi ile yeşil renkleri arasındaki spektruma hitap etmesine rağmen ftalosiyaninler uzun vadeli dayanma güçleri ve yoğun renk tonlarından birçok alanda boyar madde olarak kullanılmaktadırlar(Lv ve ark., 2020).

Dolma kalem mürekkeplerinde, tekstil boyamalarında, metal ve plastik yüzeylerin boyanmasında mavi ve yeşil tonlardaki boyar maddeler arasında ftalosiyaninler en çok tercih edilen yapılardır ve yılda binlerce ton üretilmektedirler(Lv ve ark., 2020).

2.5.2 Baskı Mürekkebi Uygulamaları

Bakır bağlı ftalosiyanin yapıları bugün karton mürekkepleri, etiket baskıları ve poster boyalarında kullanılır. Hem kristalize ve floküle olmayan hafif klorlanmış α -tipi, hem de daha yeşil olan, ancak, kristalize ve floküle olmayan β -tipi, kristalizasyona yol açan çözücülerle pigmentin temas halde olabileceği çözücü tipi mürekkeplerde kullanılır. β -bakır ftalosiyaninin bazı türleri floküle olabilir, dolayısıyla, kullanılan sistemdeki

flokülasyonun derecesinin tespit edilmesi gerekir(Allen ve Allen, 1971).

Ftalosiyenin yeşili de, tüm baskı mürekkeplerinde kullanılmaktadır. Boya, kristalize olmayan bir boyadır ancak, bazı sistemlerde floküle olabilir. Floküle olamayan tipler de geliştirilmiştir.

Deterjan, sabun, asidik ve bazik tüm temizleyicilere karşı yüksek direnç gösteren ftalosiyeninler parafin ve çözücülerde çözünmezler, ayrıca ışığa da dayanıklıdır(Allen ve Allen, 1971).

2.5.3 Reaksiyon Katalizleme

Metalli ftalosiyeninler suyun yararlı bir yakıt olan hidrojene indirgenmesinde foto hissediciler olarak önerilmektedirler(Filipan-Litvić ve ark., 2008).

Ftalosiyeninler oksidasyon reaksiyonları için güçlü katalizörlerdir. Metaller ile kompleks hale getirildiğinde oksijen reaktifliğini artırıcı özellik kazandığı görülmüştür. Kristal yapıda bulunan Fe ve Co bağlanmış ftalosiyeninler ham petrolde bulunan tiyollerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadırlar. Merox yöntemi olarak bilinen bu ayrıştırma işlemi metalli ftalosiyeninler ile iyileştirilerek kullanılmaktadır(Filipan-Litvić ve ark., 2008).

2.5.4 Elektrofotografi

Elektrofotografi, ışığı ve elektriği bir kopya üretmek için kullanan önemli bir teknolojidir. Ftalosiyeninler hem fotokondaktörde kopya oluşum sürecinde, hem de substrat görünen kopya üretiminde görev yapan oldukça önemli kimyasal maddelerdir(Davidenko ve ark., 2020).

2.5.5 Nükleer Kimyada Uygulamaları

Ftalosiyeninler iyonlaşma radyasyonuna karşı mükemmel kararlılık gösterdiklerinden nükleer kimyada çok sayıda kullanıma sahiptirler, metal bağlı ftalosiyeninlerin nötronlarla yayılması ile zenginleşmiş radyonükleotidler üretilir. Elde edilen radyonükleotidler artık ftalosiyenin ile şelat oluşturmaz ve filtrasyonla reaksiyona girmemiş olan metaloftalosiyeninler ayrılır. Zenginleştirilmiş radyonükleotidler sulu

ortamda bulunur(Xiao ve ark., 2021).

Bu tekniği kullanarak çok sayıda farklı nükleotidler üretmek mümkündür, fakat bu tekniğin daha başarılı olması için metaloftalosiyanın'ın sülfürik asit içinde metal iyonunu kaybetmemesi gerekir(Xiao ve ark., 2021).

2.5.6 Diğer Alanlar

Günümüzde metalli ya da metalsiz ftalosiyanınlar kullanılarak görünür ışığı tutup kızılötesi (IR) ışınları geçiren optik filtreler yapılmaktadır. Bununla birlikte ftalosiyanınların, havada bulunan istenmeyen kokuları uzaklaştırıcı filtrelerde, korozyon önleyicilerde, yüksek sıcaklıkta çalışan katı yağlayıcılarda, fotovoltaiik hücrelerde yük ayırmada, sıvı kristal göstergelerde, non-lineer optik malzemelerde, foto iletken olarak kırmızıya duyarlı yeni fotokopi uygulamalarında ve lazer boyalarında kullanımları bilinmektedir(Olgac ve ark., 2017).

2.5.7 Çalışmada kullanılan ftalosiyanınlar

Burada yeni ftalonitril türevi olarak 3- (4- (3-oksobutil) fenoksi) ftalonitril sentezlendi. Periferik olmayan metaloftalosiyanın türevleri Çinko, Bakır, Kobalt, Manganez, Galyum ve İndiyum ile hazırlandı. Elde edilen yeni bileşikler, ortak spektroskopik olarak karakterize edildi. Yeni tip periferik olmayan metaloftalosiyanın türevlerinin pH indüklü J-tipi agregasyon davranışları araştırıldı. Bileşik çinko, kobalt ve bakır asidik pH değerlerinde J-tipi agregasyon gösterdi.

2.6 Fotodinamik Terapinin Tarihsel Gelişimi

Işık tedavileri 3.000 yılı aşkın bir süredir tedavi olarak kullanılmaktadır (Daniell ve Hill, 1991). Özellikle, Hint, antik Mısır ve Çin uygarlıklarında çeşitli hastalıkların (vitiligo, sedef hastalığı, raşitizm, cilt kanseri vb..) tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmıştır (Dolmans ve ark., 2003). Kanda bulunan, ham bir porfirin özü olan hematoporfirin (HP), floresan özelliğine sahiptir ve floresan yaklaşık 100 yıl önce tümör tespiti için kullanılmıştır (O'Connor ve ark., 2009; Wen ve ark., 2017). Işık enerjisini emen ve oksijen varlığında sitotoksik singlet oksijen (1O_2) ve diğer reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu sağlayan porfirinlerin ışığa duyarlı özelliği

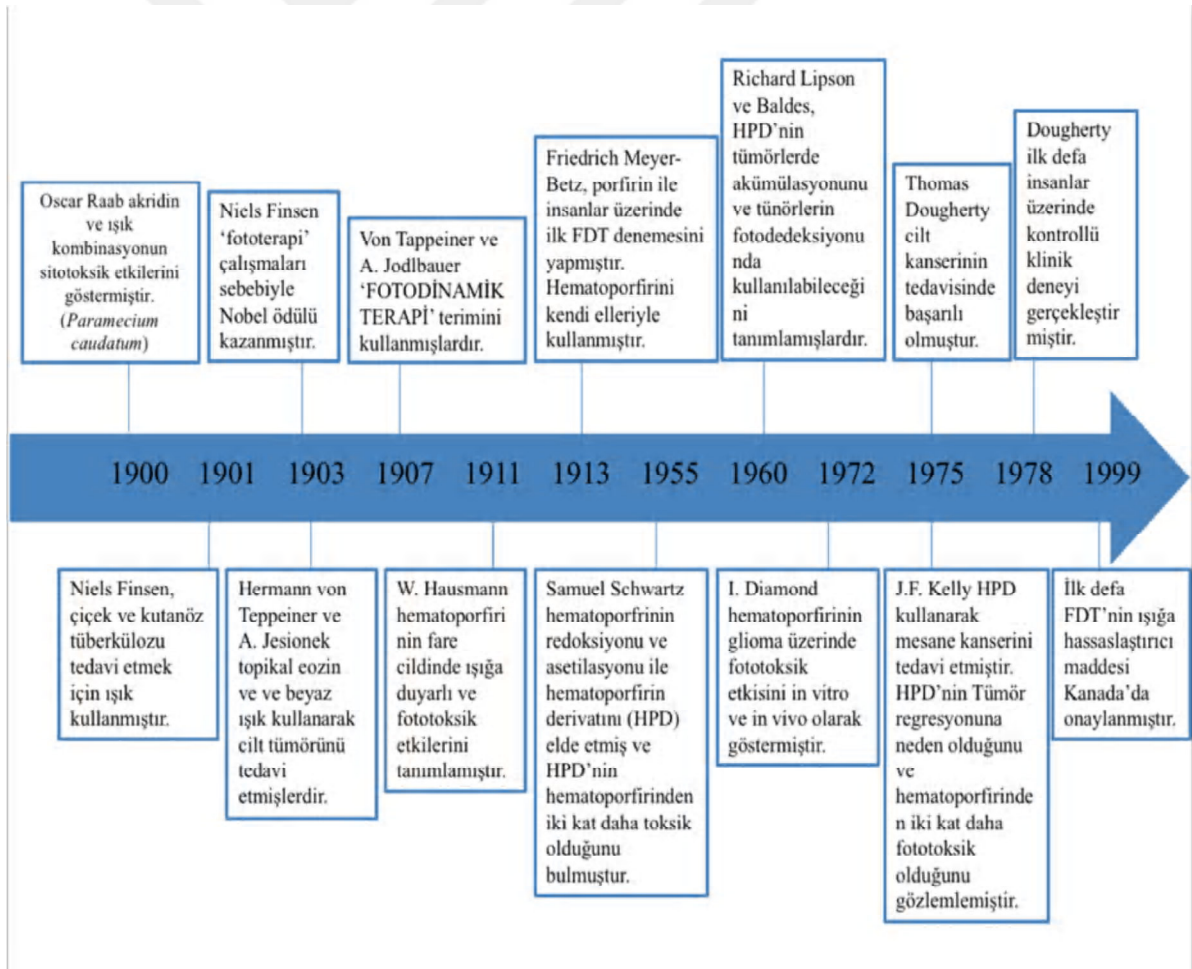
1900'lerde tanındı ve kapsamlı bir şekilde çalışıldı (Brown ve ark., 2004). Fotodinamik tedavi (PDT), toksik olmayan bir ilacın veya boyanın seçici olarak alınması prensibine dayanır. Foto duyarlı yapı (photosensitizer) olarak adlandırılan bu yapı özellikle tümör hücrelerine ve/veya malign dokulara lokalize olur, daha sonra lezyon, uygun ve spesifik dalga boyundaki düşük enerjili ışıkla uyarılır ve dokuya nüfuz eden ışıkla oksijen varlığında aktive edilir. Aktifleşen yapılar tekli oksijen ve diğer reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesini ve böylece tümör hücre ölümü veya doku bozulmasını gerçekleştirir.

PDT yirminci yüzyılın başından beri kullanılmaktadır. Eozin gibi boyları ışıkla birlikte kullanarak kutanöz bozukluklarını, özellikle cilt kanserini tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, endikasyonların aralığı son zamanlarda önemli ölçüde genişlemiştir. Beyin, mesane, endobronşiyal, meme, akciğer, özofagus ve mide kanserleri gibi birçok alanda çalışılması yapılmaktadır (Piotrowski ve ark., 2004).

1900'de, belirli dalga boylarının infusoria ve protozoa gibi tek hücreli canlılar için ölümcül olabileceği gerçeği keşfedildi(Saidi ve ark., 1998). Bu dönemden sonra birçok araştırmacı çiçek hastalığı, tüberküloz, kanser ve diğer hastalıkların tedavisi için farklı dalga boylarında ışık kullanmaya çalıştı (Daniell ve Hill, 1991). 1903 yılında Eozin kimyasalının Hermann von Tappeiner ile A. Jensioneck tarafından cilt kanserinde kullanılabileceği keşfedildi(Castano ve ark., 2004). Porfrin, Friedrich Meyer-Bertz tarafından 1913 başlarında kullanıldı ve günümüzde porfrin PDT'de en çok kullanılan kimyasallardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır(Dolmans ve ark., 2003). Hematoporfirin 1955 yılında Samuel Schwartz tarafından geliştirildi ve Lipson ile Baldes bu maddenin tümör dokuda ışıma ile lokalize olduğunu bildirdi. 1960'larda, **Şekil 2-5**'de gösterildiği gibi, modern fotodinamik tedavi (PDT), bir hematoporfirin türevinin enjeksiyonu ile kanser tanı ve tedavi edici etkilerinin keşfi ile başlatıldı(Baldes, 1960). 1993 yılında Kanada'da porfimer sodyum'un (Photofrin) ilk klinik onayından ve 1995 yılında ilk ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onayından sonra, PDT, kanserler için geçerli olan en siteye özgü ilaç haline gelmiştir ve çeşitli kanserlerin tedavisi için klinik olarak onaylanmıştır. Özofagus kanseri, akciğer kanseri, endobronşiyal kanser, baş ve boyun kanseri, meme kanseri, mide kanseri, safra yolları kanseri ve papiller mesane kanseri gibi kanser türlerinin tedavisinde kullanılmıştır(Li ve ark., 2017). Başka bir fototerapötik ajan olan aminolevulinik asit (Levulan), 1999

yılında aktinik keratoz tedavisi için klinik olarak onaylandı, ve klor bazlı temoporfin (Foscan) 2001 yılında baş ve boyun kanserinin palyatif tedavisi için onaylandı(Hwang ve ark., 2018). Ek olarak, aterosklerotik plaklar, romatoid artrit, arteriyel restenozun profilaksisi ve yaşa bağlı masküler dejenerasyon (AMD) PDT ile tedavi edilmiştir(Li ve ark., 2018).

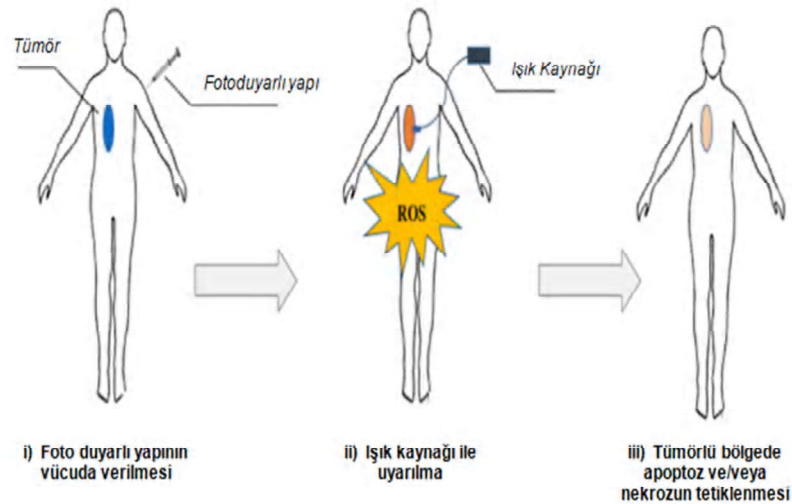
2000 yılında FDA, koroidal neovaskülarizasyonda (CNV) PDT' nin etkileyici terapötik etkileri nedeniyle yaşlılarda körlüğün ana nedeni olan AMD için bir çare olarak onayladı. Işığa duyarlı bir terapötik yöntem olan PDT, minimal invazivlik, uzun süreli mortalitenin azalması ve topikal ışınlama ile doku seçiciliği gibi bir takım avantajlar sunar(Kim ve ark.. Bu topikal ışık kaynaklı ilaç, geleneksel kemoterapi ve radyoterapiden daha iyi mekansal seçicilik sağlamaktadır.



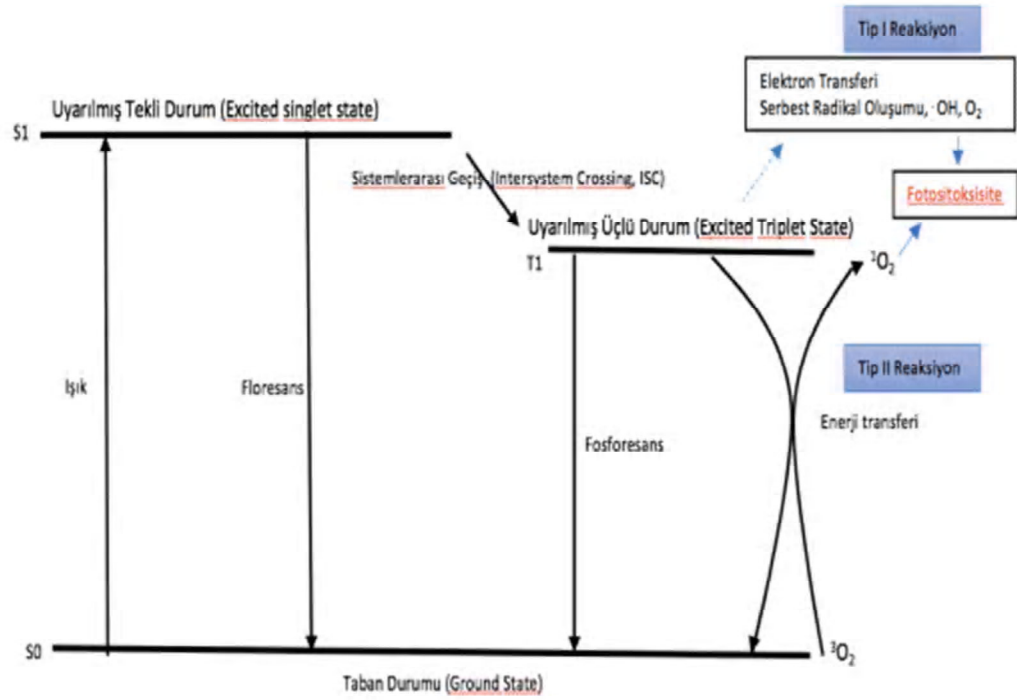
Şekil 2-5 Fotodinamik terapinin tarihsel gelişimi (Osiecka ve ark., 2009)

2.7 Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapi günümüzde birkaç farklı ülkede uygulanmakta ve en önemli alternatif kanser tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Birincil kanser tedavi yöntemleri olan kemoterapi ve radyasyon terapileriyle kıyaslandığında hedefe yönelik eğilimi ve düşük yan etkilerinden dolayı tercih sebebidir (Mansoori ve ark., 2019). Fotodinamik tedavi 3 elemente ihtiyaç duyar. Bunlar, ışık, fotoduyarlı yapı (photosensitizer) ve moleküler oksijendir. Işığın emilimiyle birlikte foto duyarlı yapılar singlet durumdan triplet haline yükseltgenirler. Yükseltgenen bu yapılar iki türlü reaksiyon gerçekleştirebilir. Bunlardan ilki hücre membranı veya bir molekül gibi bir substratla direk olarak reaksiyona girmesi ve bir hidrojen atomunu bu yapılara geçirerek radikal oluşumuyla gerçekleşir. Bu radikaller daha sonra ortamdaki oksijenle etkileşerek reaktif oksijenli ürünlerin oluşumunu sağlar (tip 1 reaksiyon). İkinci olarak, triplet haldeki substratlar direk olarak enerjilerini oksijene aktararak yüksek derecede reaktif oksijen ürünlerini (ROS) oluştururlar (tip 2 reaksiyon). Oluşan bu reaksiyonlar eş zamanlı olarak gerçekleşir ve bu reaksiyonların birbirine oranı foto duyarlı yapının çeşidine, substrat/oksijen konsantrasyonuna ve foto duyarlı yapının substrata olan affinitesine bağlıdır (Shao ve ark., 2013).

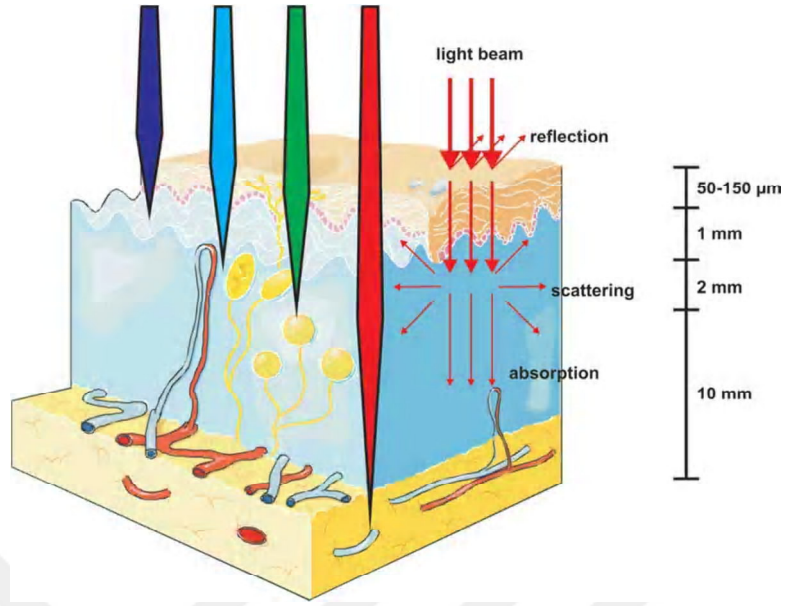


Şekil 2-6 Fotodinamik terapinin muamelesi (Shao ve ark., 2013)



Şekil 2-7 Fotoduyarlı yapıların uyarılması ve Tip I / Tip II reaksiyonları (Allison ve ark., 2004)

Işık, fotodinamik tedavide temel bileşenlerden biridir, bu yüzden kaynak seçimi çok önemlidir. Canlı bir dokuya gönderilen ışık dalga boyuna göre ya absorbe edilir ya da saçılır. Vücut tarafından absorbe edilen ışık canlı organizma ile temas ettiği andan itibaren lipid, hemoglobin, aminoasit gibi yapıların kromoforları ile absorbe olur. Buda ışığın dokuda penetre edeceği mesafenin kısılması anlamına gelir. Her yapının kromoforu belirli dalga boyunda ki ışığı absorbe edebilmektedir. Bu yüzden ışık kaynağı seçiminde ve dalga boyunun ayarlanmasında dokunun özellikleri göz ardı edilmemelidir (Mfouo-Tynga ve Abrahamse, 2015).



Şekil 2-8 Işık kaynağının dokuya etki etmesi ve dağılması (Mfouo-Tynga ve ark., 2018)

Işık kaynağının seçiliminde iki önemli noktaya dikkat edilmelidir. Birincisi ışığın ulaşması gereken derinliktir, penetrasyon derinliğine bağlı olacak şekilde ışık kaynağı seçimi yapılmalıdır. Kırmızı ışık (600-700 nm) daha derin nüfuz ederken, mavi ışık (400 nm) dokuda nispeten düşük penetrasyona sahiptir. Canlı dokunun "optik penceresi" olarak da bilinen terapötik pencere 600-1300 nm arasındır. Bu sebeple dokuda maksimum derinliklere ulaşmak için, mümkün olan en uzun dalga boyunda absorban yapan fotoduyarlı madde seçilmelidir. İkinci olarak seçilen ışık kaynağının sahip olduğu dalgaboyu, seçilen fotoduyarlı maddenin absorpsiyon spektrumuna karşılık gelmesidir. En ideal dalgaboyu, maksimum derinlikte en yüksek oranda O_2 meydana gelen dalga boyudur(Mfouo-Tynga ve ark., 2018).

Literatür bilgilerine bakıldığında fotodinamik tedavi sonucunda oluşan hücre ölümleri birçok farklı yolla oluşabilmektedir (Baines, 2010; Hanahan ve Weinberg, 2011; Jain ve ark., 2013; Giorgi, Bonora, Sorrentino, ve ark., 2015; Wen ve ark., 2017; Hwang ve ark., 2018). Aşağıdaki tabloda FDT sonrası başlıca oluşan ölüm yolları ve ölüm şeklinin oluşumunda rol oynayan yapılar listelenmiştir .

Tablo 2.1 Fotodinamik Terapi ile oluşabilecek hücre ölüm mekanizmaları (Mroz, Yaroslavsky, Gitika B Kharkwal, *ve ark.*, 2011)

	Organel	Yöntemler
Direk hücre hasarı	Mitokondri: Sitokrom c salınımı BCL-2 hasarı	Apoptoz
	Sitoplazma: NFkB hasarı	
	Endoplazmik retikulum: Beclin 1 mTOR aktivasyonu	Otofaji
	Hücre Membran disintegrasyonu	Nekroz
Vasküler hasar	Bölgesel Oksijen ve Besin yetersizliği	Apoptoz
		Nekroz
		Otofaji
İmmün sistemin aktivasyonu	Sitotoksik T hücreleri	Granzim tabanlı apoptoz

Günümüzde birçok fotoduyarlı yapı farklı ülkelerde etkin bir şekilde kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Levulan, vertiporfin, foscan, Pc-4 ve photofrin bunlara verilebilecek örneklerdendir (Ormond ve Freeman, 2013).

Tablo 2.2 Günümüzde kullanılan foto duyarlı yapılar (Mroz *ve ark.*, 2011)

Platform	İlaç	İçerik	Üretici	Web site
Porfrin	Photofrin	HpD	Axcan Pharma, Inc.	www.axcan.com
Porfrin	Levulan	ALA	DUSA Pharmaceuticals, Inc.	www.dusapharma.com
Porfrin	Metvix	M-ALA	PhotoCure ASA	www.photocure.com
Porfrin	Visudyne	Vertiporfin	Novartis Pharmaceuticals	www.visudyne.com
Teksafrin	Antrin	Lutexaphyrin	Pharmacylics	www.pharmacylics.com
Klorin	Foscan	Temoporfin	Biolitec Pharma Ltd.	www.bioletcpharma.com
Klorin	LS11	Talaporfin	Light Science	www.lightscience.com
Boya	Photosens	Phthalocyanine	General Physics Institute	www.gpi.ru

Photofrin günümüzde en çok kullanılan foto duyarlı yapıdır. Kanada, İngiltere, Hollanda ve Japonya gibi ülkelerde akciğer, özofagus, mesane ve rahim ağzı kanserlerinde klinik olarak uygulanmıştır. İntravenöz enjeksiyonla 2-5 mg/kg ilaç konsantrasyonu ile verilen ilaçtan 24-48 saat sonra 630 nm dalga boyunda ışınla tedavi gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, PDT sonrası deride gerçekleşen uzun süreli (4-12 hafta) ışığa duyarlılık ve 630 nm'de düşük absorptans gerçekleştirilmesi photofrinin dezavantajlarından biridir. Bu sorunlardan dolayı yeni ve geliştirilmeye açık foto duyarlı yapılar oluşturulmaya çalışılmaktadır. Bu yeni geliştirilen foto duyarlı yapıların uzun vadeli foto duyarlı olmaması ve yüksek dalga boylarında absorptans yapması istenmektedir. Ayrıca istenilen dokuya ne kadar etki ettiği de önemlidir. Yeni geliştirilen foto duyarlı yapılar klinik kullanım için onaylanmadan önce belirli parametreleri yerine getirmesi gereklidir (Mroz, Yaroslavsky, Gitika B Kharkwal, *ve ark.*, 2011). Bu parametreler;

- Optimum doz (PS için)
- Foto duyarlı yapının verilmesi ve lazer uygulanması arasındaki optimum süre
- Optimum ışık dozu
- Foto duyarlı yapının belirlenen kanser üzerindeki fotodinamik etkisi
- Foto duyarlı yapının sağlıklı hücre hattındaki sitotoksik etkileri
- Eksitasyon için gereken optimum dalga boyu gibi belirlemeleri içermektedir (Mroz *ve ark.*, 2011).

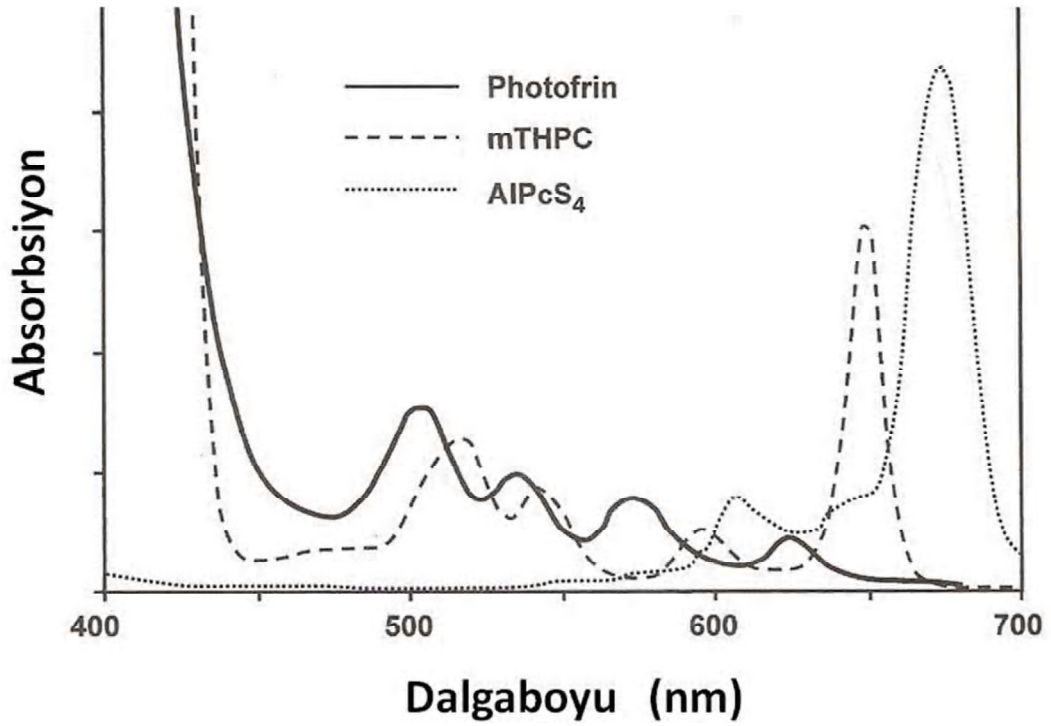
2.7.1 Fotodinamik Terapide Işık

PDT'de kırmızı ya da kızılötesi denilen, gözle görünmeyen, uzun dalga boyundaki ışık kullanılır. Fotobiyolojik reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ışığın fotoduyarlı yapı tarafından absorbe edilmesi, başka bir deyişle kullanılan ışığın dalga boyunun fotoduyarlı yapının absorpsiyon spektrumu ile uygunluk göstermesi gereklidir.

2.7.2 Dalgaboyu (λ_{max})

PDT'de ışık kaynağı, kullanılan fotoduyarlı yapının *in vivo*'daki aktivasyon spektrumuna uygunluk gösteren dalga boyundaki ışığı sağlamalıdır. Pek çok

fotoduyarlı yapı geniş bir dalga boyu aralığında aktive olabilir ancak fotoduyarlı yapının maksimum absorpsiyonunu veren dalga boyu ile aktive edilmesi, radikal oksijen gibi toksik foto ürünlerin daha yüksek miktarda üretilmesine olanak tanır(Longo ve ark., 2009).



Şekil 2-9 PDT’de kullanılan bazı fotoduyarlı yapıların absorpsiyon spektrumları (Longo ve ark., 2009)

Kullanılan ışığın dalga boyu ile ışığın doku içinde ulaşabildiği derinlik (penetrasyon) ilişkilidir ancak dalga boyuyla birlikte, ışığın hücreler ve diğer mikroyapılar tarafından kırılması ve bazı moleküller tarafından (özellikle hemoglobin, melanin ve su) absorbe edilmesi de penetrasyonu etkiler. 630 nm civarında ışığın etkili olabildiği derinlik (penetrasyon) 2-3 mm iken, 600 nm üzerindeki dalga boyları söz konusu olduğunda hemoglobinin absorpsiyonu düştüğünden, ışığın dokuya penetrasyonu 5-6 mm’ye ulaşır. 800 nm’nin üzerinde ise, ışık fotonlarının enerjisi dalga boyuyla ters ilişkili olduğundan, radikal oksijen oluşumuna yetecek foton enerjisi ortaya çıkmaz. Bu nedenle derinde yer alan, geniş çaplı kanser dokularında çalışırken fotoduyarlı yapının maksimum absorpsiyon değeri ile uygunluk göstermese de uzun dalga boyunda ışık uygulandığında daha iyi sonuçlar elde edildiği görülmüştür(Juarranz ve ark., 2008).

Fotoduyarlı yapının etkili absorpsiyon spektrumu solüsyon içindeki absorpsiyon spektrumu ile aynı olmak zorunda değildir. Fotoduyarlı yapının biyomoleküllere bağlanması ile ilişkili olarak, en üst düzey absorpsiyonu veren dalga boyu değerinde (absorption peak) birkaç nm'lik sapma olasıdır. Eğer lazer gibi tek bir dalga boyunda ışık veren ya da dalga boyu aralığının dar olduğu ışık kaynakları kullanılıyorsa, kullanılan ışığın dalga boyu ile in vivo aktivasyon doruğunun (peak) birbiriyle uyumlu olması şarttır. Bu anlamda ışığı geniş bir dalga boyu aralığında veren (broad-band sources) LED ve filtreli lambaların kullanımı avantajlıdır(Souto *ve ark.*, 2013).

2.7.3 Işık Kaynakları

PDT'de kullanılan ışık kaynaklarını lazerler, ışık yayan diodlar (Light Emitting Diodes-LEDs) ve filtreli lambalar olmak üzere üç sınıfta incelemek mümkündür (Woźniak *ve ark.*, 2020).

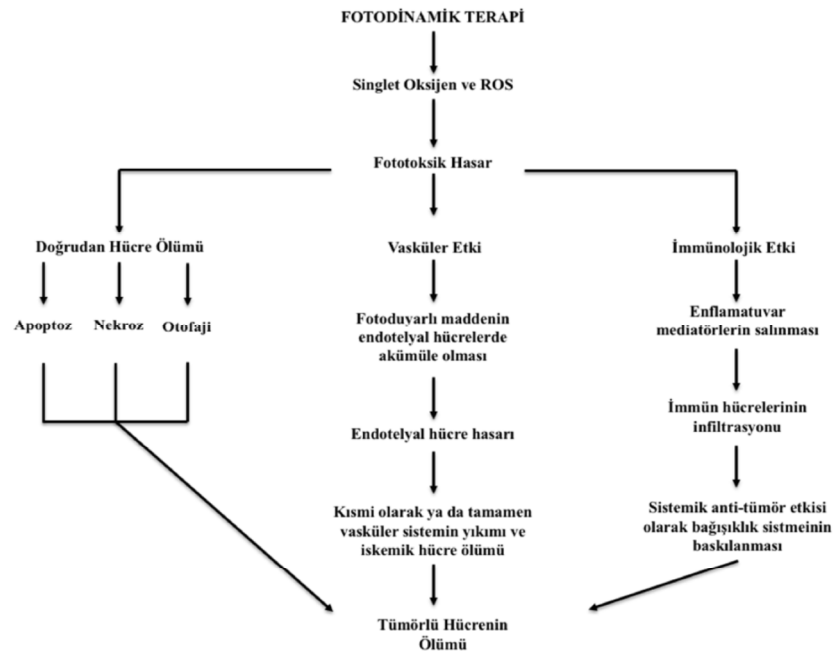
Lazerler (Laser-Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), ışık ışınlarını odaklanmayı kolaylaştıran az bir sapma ile tek bir renkte (monochromaticity) ve senkronize ışık dalgaları (coherent light waves) halinde verirler. Sabit bir dalga boyunda ve doğrusal ışık veren lazerler, ışığın odaklanmasını sağladığından fiber temelli uygulamalar için avantajlıdır(Yan *ve ark.*, 2020).

Kullanılan PS'nin absorpsiyon bandına uygun dalga boyundaki ışığı bir filtre vasıtasıyla veren lamba sistemleri ise özellikle endoskopik olmayan PDT uygulamalarında tercih edilir. Lazer sistemlerine göre daha ucuzdurlar ve kullanımları daha kolaydır(Yan *ve ark.*, 2020).

Geniş bir dalga boyu aralığında (broad-band) kullanılabilen LED'ler (Light emitting diodes) yarı iletkenlerdir. Yüksek ışık gücüne sahip olmasalar da ucuz ve küçüktürler. Lazer ışık kaynaklarında ışık, düşük bir sapma ile ve odaklanarak ilerlediğinden (coherence) doğrudan retinada konsantre olabilir ve gözde kalıcı hasarlar bırakabilir. Lazer olmayan ışık kaynakları (lamba sistemleri ve LED'ler) kullanırken böyle bir risk söz konusu değildir(Woźniak *ve ark.*, 2020).

2.8 Fotodinamik Terapide Aksiyon Mekanizmaları

Fotodinamik terapinin tümör doku üzerinde çeşitli antitümör mekanizmaları ile etkili olabileceği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Kessel ve Reiners, 2007). Bu mekanizmalar hücresel, vasküler ve immünolojik etki mekanizmaları olarak üçe ayrılır. Birinci mekanizmada fotoduyarlı maddenin tümör hücreleri içerisinde lokalize olması ve aktivasyonu ile doğrudan hücre ölümü gerçekleştirilmektedir. İkinci mekanizmada tümör doku vaskülatürü hasara uğratarak, oksijen ve temel besin maddelerinin tedarik edilmesi engellenir ve vasküler etki ile hücre ölümü gerçekleştirilmektedir. Üçüncü mekanizmada immün sistem uyarılarak, enflamatuvar ve immün cevap oluşturularak hücre ölümü gerçekleştirilmektedir. Fotodinamik terapi uygulamalarında üç ana aksiyon mekanizması birlikte veya ayrı ayrı etkili olabilmektedir. Bu mekanizmalar **Şekil 2.10**'de açıklanmıştır.



Şekil 2-10 Fotodinamik terapinin aksiyon mekanizmaları (Mfouo-Tynga ve Abrahamse, 2015)

2.9 Doğrudan Hücre Ölümü

Doğrudan hücre ölüm mekanizması, hücrelerin hayati fonksiyonlarını yerine getiremediği zamanlarda homeostaziyi korumak için meydana getirdikleri sürecin sonucudur(Engelberg-Kulka *ve ark.*, 2006). Hücre ölümünün gerçekleşmesiyle hasarlı, zarar görmüş hücreler uzaklaştırılarak organizmanın korunması sağlanmaktadır(Yuan ve Kroemer, 2010).Fotodinamik terapi uygulaması sonrası meydana gelecek hücresel tepkinin çeşidi birçok faktöre bağlıdır. Meydana gelecek tepkiyi belirleyen en önemli faktör fotoduyarlı maddenin hücre içerisinde akümüle olduğu lokalizasyondur(Kessel ve Reiners, 2007). Biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak fotoduyarlı maddeler genellikle mitokondri, plazma membranı, lizozom, golgi aparatı, endoplazmik retikulum gibi hücre içi organellerde lokalize olurlar(Juarranz *ve ark.*, 2008b). Hücre iskeleti ve hücreyi bir arada tutan diğer bileşenler de fotoduyarlı maddelerin hedefleri olarak tanımlanmıştır.

Fotodinamik reaksiyon farklı komponentleri etkilese de hücrede meydana gelebilecek üç ana ölüm mekanizması vardır(Castano *ve ark.*, 2004). Doğrudan hücre ölüm mekanizmaları apoptoz, nekroz ve otofajidir(Foote, 1991). Hücrelerin ölüm mekanizmaları, morfoloji, enzimatik aktivite, fonksiyonel ve immünolojik cevaplara bağlı olarak programlı ya da programsız olarak belirlenir(Oliveira *ve ark.*, 2011).

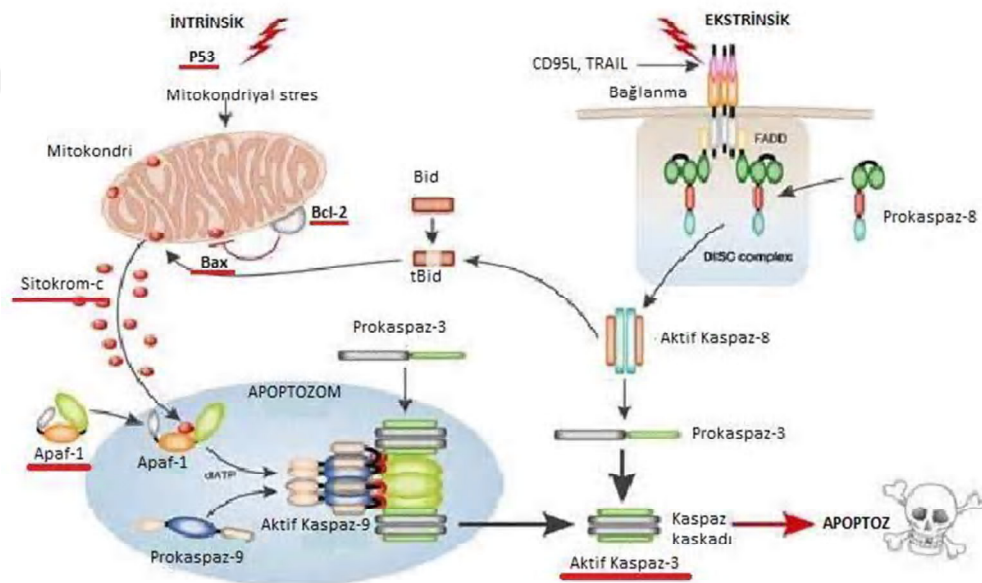
2.9.1 Apoptoz

Hücresinin kontrollü ölüm mekanizmasıdır(Oleinick *ve ark.*, 2002). Fotodinamik aksiyon sonrasında, çoğunlukla mitokondride ve endoplazmik retikulumda lokalize olan fotoduyarlı maddeler hücreyi apoptoza sürüklemektedir. Apoptozu etkileyen hücresel faktörler; sitokininler, hücrede bulunan kalsiyum oranındaki yükselme, tümör nekroz faktörü ve sitotoksik antikanser ilaçlarıdır(Kroemer *ve ark.*, 2009). Apoptozu düzenleyen 3 başlıca gen bulunmaktadır. Bunlar; bcl-2, bax ve p53 genleridir. Bcl-2 geni protipik antiapoptoz genidir. Tek etkisinin apoptoz üzerine olmadığı bilinmekle beraber aşırı salınımı sonucu hücre ölümünün azalması sonucu lenfoma gelişimine sebep olmaktadır. Bax geni ise bcl-2 geninin aksine hücre ölümünü artırmaktadır. Bu iki genin birbirlerine göre oluşan düzeyleri hücre yaşamını düzenlemektedir. P53 geni apoptoza neden olan gen olarak bilinmektedir. DNA hasarı onarılamadığında hücre apoptozu uyarılmakta ve p53 geni, bax geninin kopyalanmasını artırmaktadır. Kanser

tedavilerinde kullanılmakta olan kemoterapötik bileşiklerin etkinlikleri tümör hücrelerinde apoptozu uyarma yeteneklerine bağlıdır. Tümör hücrelerinde p53 geni mutasyona uğramış ise apoptozu tetikleyen kemoterapötik bileşiklerin etkisi oldukça düşebilmektedir.

Apoptoz sürecini başlatan 3 faktör bilinmektedir. Bunlar; DNA hasarına karşı genlerin cevabı, hücre membranında bulunan hücre ölüm reseptörlerinin uyarılması ve hücreye proteolitik enzimin girişiyle apoptozun uyarılmasıdır.

Fotodinamik terapi uygulamalarında fotoduyarlı maddelerin nükleusta lokalize oldukları tespit edilmediğinden direk olarak DNA hasarına yol açmadığı, bu nedenle mutajenik bir etki oluşturmadığı bilinmektedir. Bcl-2 gen ailesinin proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotik Proteaz Aktivasyon Faktörü-1), apoptoz sürecinde etkili ve karakteristik morfolojik değişimlere neden olan üç ana etmendir(Erental ve ark., 2012).



Şekil 2-11 Apoptoz olayının dışsal (ekstrinsik) ve içsel (intrinsik) yolları (Engelberg-Kulka ve ark., 2006)

Apoptoz sonucu görülen karakteristik morfolojik değişimler, çekirdek zarının kırılması, mitokondriyal hasar, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonları ve apoptotik cisimlerin şekillenmesidir(Mfouo-Tynga ve Abrahamse, 2015). Bcl-2/Bax gen ailesine

ait proteinler apoptozun regülasyonunda önemli rol oynarlar. Apoptotik sinyalin alınması ile Bax proteinleri (proapoptotik proteinler), mitokondri membranının iyon permeabilitesini azaltır ve bu nedenle membran içindeki sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktörler sitoplazmaya geçerler. Apoptoz indükleyici faktörler nükleusta meydana gelecek apoptotik reaksiyonu başlatırlar. Sitokrom c, sitoplazma içerisinde bulunan Apaf 1 proteinine bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder. Oluşan bu kompleks apoptozom olarak adlandırılır. Aktive olan prokaspaz 9, aktif kaspaz 9'a dönüşür ve efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktif hale getirir. Aktif kaspaz 3, deoksiribonükleaz enzimlerinin serbestliğini sağlar ve kromatin yoğunlaşması gibi apoptozun morfolojik belirtilerini ortaya çıkartarak hücrenin planlı ölümünü sağlar(Mroz, Yaroslavsky, Gitika B. Kharkwal, *ve ark.*, 2011; Nikolettou *ve ark.*, 2013). Endoplazmik retikulumda biriken fotoduyarlı maddelerin membran permeabilitesini değiştirmesiyle kalsiyum iyonlarının endoplazmik retikulumdan mitokondriye transfer olması da hücreyi apoptoza sürükleyen nedenler arasındadır. Kalsiyum iyonlarının yoğunluğu mitokondrial membranda morfolojik değişime neden olmaktadır ve bu durum hücreyi apoptoza sürükler(Ouyang *ve ark.*, 2012; Giorgi, Bonora, Missiroli, *ve ark.*, 2015; Giorgi, Bonora, Sorrentino, *ve ark.*, 2015).

2.9.2 Nekroz

Rastgele meydana gelen ve gen bazında kontrol edilemeyen düzensiz hücre ölüm sürecidir. Programlı hücre ölümüne neden olan sinyal yollarının olmaması ve enflamatuvar bir yanıt oluşturulmasıyla karakterize edilen bir ölüm şeklidir(Lamkanfi *ve ark.*, 2007). Nekroz süresince hücrede mitokondriyal reaktif oksijen ürünlerin üretimi yoğunlaşır, apoptotik olmayan proteazlar aktive olur, kalsiyum kanalları açılır ve ATP üretim seviyesi düşer. Nekrotik hücre ölümüne neden olan en önemli faktör hipoksidir. Ağır metaller, enfeksiyon, toksik maddeler veya tramva gibi dış uyarılara karşı da nekroz gelişebilmektedir. Ökaryotik hücrelerde kaspaz aktivitesinin meydana gelmediği durumlarda, sinyal iletimi ve katabolik aktiviteler toll benzeri reseptör aracılığı ile nekroz mekanizmasını düzenler.

Yedi tip nekroz vardır ve her birinde birbirini takip eden aşamalar aynıdır. Bunlar; plasma membranın geçirgenliğinin bozulması, endoplazmik retikulum boyunca

kalsiyum iyonlarının hareketi, organel ve plazma membranının şişmesi, kalsiyuma bağlı kalpin aktivasyonu, lizozomal parçalanma, hücreyel yapıların degradasyonu, eflamasyon ve/veya iltihaplanmanın meydana gelmesidir(Lemasters, 2005; Cho *ve ark.*, 2011). Nekrotik hücreyel ölüm aşamalarının ilk basamağı, dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılara bağlı olarak hücrenin iyon dengesinin bozulmasıdır. Nekrozun başlangıcının kontrolü, reseptör etkileşimli proteinlerin (RIP1 ve RIP3) aktivitesi tarafından olur. RIP1 ve RIP3 serin-treonin yapılı kinazlardır. Kaspazların etkili olmadığı nekrozda RIP1 ve RIP3 hücreyel ölüm reseptörü olarak sinyalleme işleminde görev almaktadır. RIP1 ve RIP3 mitokondri aktivasyonunu sağlar ve nekrozu indükler. Nekrotik uyarıcılar kalpain aktivasyonuna neden olmaktadır. Kalpain, kalsiyum ile aktive olan bir kaspaz proteazdır ve lizozom enzimlerinin salınımına katkıda bulunur. Bcl-2 ailesinden proteinler, mitokondrinin iç ve dış zarındaki porları aktive etmektedir. Mitokondriyal porlar, ROS ve kalsiyum iyonunun fazla üretilmesi halinde açılan kanallardır. Bcl-2 ailesinden Nix proteini endoplazmik retikulumdan kalsiyum iyonlarının salınmasına neden olur ve salınan mitokondri matriksine geçerek porların açılmasına neden olur. RIP proteinleri de aşırı ROS üretimine neden olduğu için mitokondriyal porlar açık kalır. Mitokondri de bu durumda oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretemeyecek duruma gelir ve hücre içi ATP eksikliği başlar. Ayrıca, DNA tamirini gerçekleştiren enzimler de NAD (Nikotinamid adenin dinükleotit) molekülünü parçalayarak ATP eksikliğine yol açar. Hücre içi ATP eksikliği, iyon pompasının yetersiz kalmasına neden olur. Bu durum hücre içine sıvı alımını artırır. Organeller şişer, plazma membranının bütünlüğü bozulur ve osmatik basıncın bozulmasından dolayı hücre patlar. Hücre içeriğinin, hücreler arası boşluğa salınması enflamasyon ve/veya iltihaplanmaya neden olur. Hücreler arası boşlukta meydana gelen yangı nedeniyle makrofaj ve nötrofiller nekrotik dokuya geçerek, o lokasyonu fagosite eder(Wood *ve ark.*, 1997; Christofferson *ve ark.*, 2012; Galluzzi *ve ark.*, 2012; Ke *ve ark.*, 2016).

Nekroz ile hücre ölümü, plazma membranında biriken fotoduyarlı maddelerde sık görülmektedir. Lipozomal alimunyum kloro ftalosiyaninin in vitro ve in vivo olarak fotodinamik etkinliği Ehrlich tümörlerinde araştırılmıştır ve bu fotoduyarlı maddenin %90 oranında nekroz ve kısmi olarak da vasküler etki ile tümörü yok ettiği kaydedilmiştir(Longo *ve ark.*, 2009; Baines, 2010; Conrad *ve ark.*, 2016).

2.9.3 Otofaji

Bir vakuol içine alınan hücre içi makro moleküllerin lizozomal olarak parçalanmasıdır. Otofaji, anabolik ve katabolik hücre içi fonksiyonların dengelenmesini sağlayan ve hasarlı hücre içi yapıların geri dönüşümünü sağlayan bir hücre ölüm şeklidir. Sitoplazmanın bir kısmı ya da ilgili organeller endoplasmik retikulumun ekstrasellüler membranı ile sarılır. Primer lizozomlar, bu yapıyla birleşerek sekonder lizozomu (otofajik vakuol=otozom=otofagozom) oluşturur.

Otozomlar çift membranlı yapılardır. Otozom hidrolitik enzimlerle parçalanarak, nükleusta yoğunlaşmaya neden olur. Otofajik hücre ölümünde apoptotik hücre ölümünden farklı olarak, karakteristik nükleus yoğunlaşması çok daha uzun sürede gerçekleşir. Fakat DNA kırıkları ve apoptotik cisimcikler gözlenmez(Tsujimoto ve Shimizu, 2005; Yu *ve ark.*, 2006; Gozuacik ve Kimchi, 2007; Mizushima ve Klionsky, 2007; Xie ve Klionsky, 2007; Di *ve ark.*, 2013; Jain *ve ark.*, 2013; Michaud *ve ark.*, 2014).

Otofaji, hücre koruyucu bir mekanizmadır ve fotodinamik aksiyon olarak gelişen hücre ölüm mekanizmalarındandır. Apoptotik ölüm mekanizması bozulduğunda, hücrenin otofajiye yönlendiği gözlenmiştir. Bu durum FDT uygulamalarında fotoduyarlı maddenin dozuna ve uygulanan ışık yoğunluğuna bağlı olarak gelişmektedir.

Otofaji, düşük doz FDT uygulamalarında koruyucu bir mekanizma olarak işlev görürken, yüksek doz uygulamalarda hücreyi ölüme sürükler. Fotoduyarlı maddenin mitokondriyal ve/veya endoplasmik retikulumda biriktiği durumlarda otofajik hücre ölümü gerçekleşebilmektedir(Xue *ve ark.*, 2010; Separovic *ve ark.*, 2011; Garg *ve ark.*, 2015).

Genel olarak, PDT uygulamalarında hücre ölüm mekanizması olarak meydana gelecek cevabın belirlenmesi karmaşık bir süreçtir. Fakat genel olarak apoptoz, nekroz ve otofaji yolları gerçekleşmektedir. Apoptoz, nekroz ve otofajinin morfolojik özellikleri, düzenleyici faktörleri, yol açan nedenler, biyokimyasal ve diğer özellikleri **Tablo 2.3**'de verilmiştir.

Tablo 2.3 Doğrudan hücre ölüm şekillerinin ayırt edici karakteristik özellikleri(Mroz ve ark., 2011)

Karakteristik Özellikleri	Hücre Ölüm Mekanizmaları		
	Apoptoz	Nekroz	Otofaji
Morfolojik Özellikler	Hücresel membran sağlamdır, Hücre küçülür, Kromatin yoğunlaşması meydana gelir, Blebler oluşur, Nükleer parçalanma olur, Organeller sağlamdır, Erken evrede fosfatidilserin translokasyonu gözlenir, Apoptotik cisimler.	Hücre membranı bütünlüğünü kaybeder, Hücre şişer, Organel şişer ve parçalanır, Büyük vakuoller oluşur, Organeller parçalanır, Hücre lizisi gerçekleşir, DNA merdiveni oluşmaz, Fosfatidil serin translokasyonu yoktur.	Hücre boyutunun küçülür, Çift membranlı veziküller oluşur, Organellerde bozunum gerçekleşir.
Düzenleyiciler	Ölüm Reseptörleri, Bcl-2 ailesi, Beklin 1, Kaspazlar, Apoptozu inhibe edici proteinler, Adaptör proteinler, Kinazlar, Fosfotazlar, Kalsiyum iyonları, Kalpainler,	Kalsiyum iyonları, İyon kanalları, Metabolik hatalar, Poli(ADP-riboz) (PARB), Kalsiyum iyonlarını düzenleyici proteinler, RIP kinaz, Ölüm Reseptörleri, Keromitler.	Memelilerde rapamisin inhibe edici (mTOR), Fosfoinositid-3 kinaz (PI3 kinaz), Otofaji bağlantılı gen ailesi (ATG ailesi), UPR stres sensörleri, Beklin1, Kinaz,

	BCNII.		Bcl-2 ailesi, IP3 Reseptörü.
Yol Açan Nedenler	ROS ve DNA hasarı, Ölüm reseptör ligantları, Hücre yaşlanması, Büyüme faktörü eksikliği, Organellerde meydana gelen stresler, Anti-Kanser ilaçları, Endoplasmik retikulumdan kalsiyum salınımı.	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Litik viral enfeksiyon, Şiddetli oksidatif stres, Kalsiyum iyonlarının yoğunluğu, Toksik maddeler, Ağır metaller.	Protein agregasyonu ER stresi Gelişimsel program Hipoksi İskemi Hasarlı organeller Proteaz bozukluğu Besin yokluğu
Biyokimyasal ve Diğer Özellikler	Programlıdır, ATP gereklidir. Fizyolojik hücre ölümüdür. DNA kırıkları jel elektroforezde merdiven şeklini alır. Enflamasyon görülmez. Hücreler makrofajlar tarafından fagosite edilerek tek tek ya da kısım kısım ölürler.	ATP gerekmez, İyon dengesi bozulur. Patolojik hücre ölümü gerçekleşir. DNA rastgele parçalanır. Hücreler gruplar şeklinde ölür ve enflamasyon görülür.	Hayatta kalabilir. Fizyolojik hücre ölümü gerçekleşir.

2.10 Vasküler Etki

Yeni kan damarlarının oluşumu ve gelişimi olarak isimlendirilen anjiyogenez, kanser hücrelerine oksijen ve besin kaynağı sağlayarak hücrelerin proliferasyonu ve metastatik

durumlarında anahtar bir rol oynamaktadır(Hanahan ve Weinberg, 2000). Kan damarlarının yeterli gelişim göstermediği tümörlerde oksijen yoğunluğunun düşük olduğu nekrotik bölgelerin varlığı, tümör vaskülatürünün önemini göstermektedir. Tümörlerin mevcut vaskülatürüne hasar veren ve anjiyogenezi inhibe eden anti-anjiyogenik teröpatikler, tümör proliferasyonunu durdurmaya yönelik ve klinik olarak onaylı kanser tedavi yöntemlerindendir(Al-Husein ve ark., 2012). Seçici olarak vasküler hasar oluşturulması ve anti-anjiyogenik etkinin meydana gelmesi fotodinamik tedavi uygulamalarının etkinliğini arttırmaktadır. Örneğin, hematoporfirin türevi (HPD), tümörlerin vasküler yapısında hasara yol açarak kan akışında problemler meydana getirerek terapötik etki oluşturmaktadır(Peng ve ark., 2020). PDT uygulamalarında fotoduyarlı madde uygulaması ile ışık aktivasyonu arasındaki sürenin kısa olmasının hedef vasküler sistemde hasar oluşmasına etki ettiği kaydedilmiştir. Fotoduyarlı madde olarak Verteporfin kullanılarak sıçan kondrosarkomlarına PDT uygulamalarının yapıldığı bir çalışmada, ilaç-ışık uygulamaları arasındaki süre kısaltıldığında vasküler hasarın arttığı kaydedilmiştir (Fingar ve ark., 1999).

Vasküler etki gösteren fotoduyarlı maddeler ile gerçekleştirilen PDT uygulamalarında endotelial ve subendotelial hücreler hasar görmektedir. Endotelial hücreler yuvarlaklaşır ve hücreler arasındaki bağlantıları genişler(Ben-Hur ve ark., 1988). Bu durum endotelial hücrelerin altındaki dokunun açığa çıkmasına neden olur. Hasar gören endotelial hücreler Von Willebrand faktörü gibi pıhtılaşma faktörlerinin, trombositlerin aktive edilmesine neden olur. Aktive olan trombositler subendotelial dokuya geçerler ve trombosit agregasyonuna, trombüs oluşumuna ve damar tıkanmasına neden olurlar. Aktif trombositler ayrıca, PDT sonrası vazokonstriksiyona neden olarak kan akışını daha da azaltmaktadır(Ewenstein ve ark., 1987).Böylece, fotodinamik terapi uygulama esnasında ve uygulama sonrasında hedef dokuda damar daralması, damar geçirgenliği ve lökosit adezyonu gibi tahribatlar meydana gelmektedir. Tedavinin ardından damarlardan makromolekül ve sıvı sızıntıları olmakta ve hedef bölgede doku ödemi görülmektedir (Nelson ve ark., 1987; Fingar ve ark., 1997). Bu durum tümör dokuya kan akışını yavaşlatarak bölgesel hipoksiye neden olmaktadır. Hipoksi ve besin maddelerinin yoksunluğu, tümör hücrelerinin yıkımını tetiklemektedir. Vasküler etki, fotodinamik terapinin anti-tümör etkisinin en önemli bileşenlerindendir (Kurohane ve ark., 2001; Chen ve ark., 2005; Krzykawska-Serda ve ark., 2014).

2.11 İmmünolojik Etki

İmmünolojik etki, fotodinamik terapinin indüklediği üçüncü tümör yıkım mekanizmasıdır ve enflamatik bir yanıtın oluşturulmasına dayanır (Castano ve ark., 2004). Enflamasyon sürecinin temel özelliği, tedavi edilen bölgede enflamatuvar faktörlerin salınmasıdır (Stott ve Korbelik, 2007). Fotodinamik terapiden kaynaklanan oksidatif stres, ısı şok proteinlerinin transkripsiyon faktörlerinin salınmasına ve enflamatuvar sitokinlerinin salınmasını düzenlemektedir (Gollnick ve ark., 2003). Proteinlerin salınması ve hasarla ilişkili moleküler yapıların (DAMP) salınması enflamatuvar yanıtın oluşmasına katkıda bulunur (Matroule ve ark., 2006; Garg ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalar, PDT uygulamalarından sonra ısı şok proteinlerinin ekspresyonuna ve salınımına neden olduğunu göstermektedir (De Vree ve ark., 1996; Reginato, 2014). Isı şok proteinleri, tümör antijenlerine bağlanarak Toll benzeri reseptörleriyle etkileşime girerler (Beg, 2002; Vabulas ve ark., 2002; Castano ve ark., 2006). Bu etkileşimler enflamatuvar ve immün cevap genlerinin ekspresyonunu düzenlemektedir. Isı şok proteinlerinin ve hasarla ilişkili moleküler yapıların kaynağı PDT'nin hücrel etkisine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedirler (Cecic ve Korbelik, 2002; Brackett ve ark., 2011). Sonuç olarak, PDT ile indüklenen tümör dokuda enflamatik bir cevap meydana getirmektedir (Castanov ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2009; Garg ve ark., 2010; Mroz ve ark., 2011).

2.12 Fotodinamik Terapi Sonrası Sitokrom C Salınımı

Apoptotik basamaklarda mitokondrinin üretim ve salınım kısmında kritik önemi vardır. Bu basamaklar içerisinde sitokrom c önemli bir rol oynar. Apoptoz süresince sitokrom c mitokondri aracılığıyla sitozole salınır. Mitokondriden salınan sitokrom c'nin kontrolü BCL-2 protein ailesi tarafından yapılır. Sitozole salınan sitokrom c'ler kaspazlar (öldürücü proteaz ailesi) ile etkileşime girerek Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1), prokaspaz-9 ve ATP gibi kompleks yapıları oluştururlar. Mitokondriyal membran potansiyelinin dağılmasıyla sonuçlanan mitokondriyal membran geçirgenliği geçiş gözeneklerinin açılması, sitokrom c'nin salınımı için ana mekanizma olarak önerilmiştir (Mroz ve ark., 2011). Chiu ve Olenick (Chlu ve Olelnick, 2001) yaptıkları çalışmada ftalosiyanın ile fotodinamik terapi uygulanmış LY-R hücre hatlarında 15

dakika sonunda immüno histokimyasal sonuçlar ile sitokrom c salınımı olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda membran potansiyalindeki düşüşün PDT dozuna ve uygulama süresine bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca bu potansiyel düşüşün sadece yüksek dozda PDT'ye maruz kalan hücrelerde oluştuğu belirtilmiştir.

2.13 Fotoduyarlı Yapılar

Fotoduyarlı yapının fizikokimyasal nitelikleri, PDT'nin etkinliği konusunda belirleyicidir. İdeal bir fotoduyarlı yapı, kimyasal anlamda saf olmalıdır, seçici olarak neoplastik dokuda yoğunlaşmalıdır, kısa süre içinde dokudaki en yüksek konsantrasyonuna ulaşabilmelidir, normal dokudan kısa sürede uzaklaşabilmelidir, optimal doku geçirgenliği sağlayan dalga boyunda aktive olmalıdır, $^1\text{O}_2$ oluşumu için yüksek kuantum verimine sahip olmalıdır ve karanlıkta toksik etki göstermemelidir(Allen ve ark., 2001; Ormond ve Freeman, 2013).

Kanser tedavisinde onaylanan ilk PS, yutak, akciğer, mesane, mide ve servikal kanserlerin tedavisinde kullanılmış olan Photofrin (PF)'dir. HPD'den kısmen saflaştırılarak elde edilmiş olan PF, bir porfirin karışımı olduğundan kimyasal anlamda kısmen karakterize edilebilmektedir, aktif bileşenlerinin belirlenmesi güçtür ve aynı özellikteki tekrarlarının sentezlenmesi konusu şüphelidir. Absorpsiyonun en yüksek olduğu 630 nm için molar absorpsiyon kat sayısının düşük olması, PF'nin yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasını gerektirir. Bununla birlikte, 630 nm'lik dalga boyundaki ışık, doku içinde ancak birkaç mm derinliğe kadar etki edebilir. PF en az 4-6 hafta kadar vücuttan uzaklaşmaz, başka bir deyişle bu zaman içinde fototoksiktir. Seçici olarak tümörde konsantre olma eğilimi de düşük olan PF, bahsedilen nedenlerden dolayı PDT uygulamaları için kullanımı sınırlıdır(Allison ve Sibata, 2010).

PF'in bahsedilen dezavantajları, ikinci nesil fotoduyarlı yapıların sentezlenmesine neden olmuştur. İkinci ve üçüncü nesil fotoduyarlı yapıların hedeflenen dokuya (tümör dokusu vb) karşı seçici olması, yüksek dalga boyunda absorpsiyona sahip olması; böylelikle daha derinlere ulaşabilmesi, yüksek dalga boyunda molar absorpsiyonunun yüksek olması özellikleri ile PDT uygulamaları için kullanışlı olması beklenmektedir. Sentetik, porfirin yapıda boyalar olan, ticari anlamda pek çok alanda kullanılan ftalosiyanınların (Pc), ikinci nesil fotoduyarlı yapılar olarak PDT'de kullanılmak üzere

geliştirilmesi oldukça yenidir(Yano ve ark., 2011).

Pc'lerde benzen halkaları ile konjuge haldeki pirol grupları, aza nitrojenlerle birbirine bağlanmıştır. Bu kimyasal yapı, absorpsiyon spektrumunun daha uzun dalga boylarına kaymasına (genellikle 680 nm civarı) neden olur. Bu nedenle Pc'leri uyarmak için dokuda derinlere nüfuz edebilen uzun dalga boyları kullanılır(Mfouo-Tynga ve ark., 2018).

Pc'ler, uzun dalga boylarında (660–700 nm) yüksek molar absorpsiyon katsayısına sahiptirler, kararlıdırlar, karanlıkta toksik özellik göstermezler ve tümör dokusunda seçici olarak birikirler(Mfouo-Tynga ve ark., 2018).

Potansiyel bir fotoduyarlı yapının üçlü fazdaki ömrü uzun olmalıdır. Bu koşul Pc'lerde, Zn ya da Al gibi bir diamagnetik atomun Pc makromolekülüne dahil edilmesiyle sağlanır. Metalsiz bileşikler ve paramagnetik Pc'ler yapılarına katılan pek çok metalle oldukça kararlı yapılar meydana getirebilirler. Katılan bir merkezi metal iyonu ayrıca Pc'nin fotofiziksel özelliklerini de değiştirir. Metal içermeyen Pc'ler ile Cu, Co ve Fe gibi paramagnetik metaller içeren Pc'lerin triplet haldeki ömürleri çok kısadır ve düşük düzeyde fototoksiste oluştururlar(Longo ve ark., 2009; Olgac ve ark., 2017).

Pc'ler genellikle hidrofobik yapıdadırlar ancak suda çözünebilenleri de sentezlenmiştir. Suda çözünebilen ftalosiyanınlar Pc halkasına sülfonik asit, karboksilik asit ve amino gruplarının süstitüe edilmesi mümkün olabilir(Osiecka ve ark., 2009).

2.14 Kanser

2.14.1 Kanser Nedir?

Bugüne dek yapılan bütün çalışmalar göstermiştir ki kanser temel olarak DNA'da meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Meydana gelen bu mutasyonlar kanser hücrelerinin, normal hücrelerin düzenli bir şekilde büyüme ve çoğalmasını sağlayan mekanizmalardan kaçarak kendi hayatta kalma sistemlerinin oluşmasını

sağlamaktadır. Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırt edecek belirli özellikler vardır (Brennan, 2002). Bunlar;

- Büyüme Faktörlerine Bağlı Olmadan Büyüyebilme
- Sınırsız Bölünme Potansiyeli
- Apoptotik Sinyallerden Kaçma
- Büyümeyi Baskılayan Sinyallerden Kaçma
- Anjiyogenez
- Invazyon Ve Metastaz
- Bağışıklık Sisteminden Kaçma
- Kanserleşmeyi Destekleyen İnflamasyon
- Genetik Mutasyonlar
- Enerji Metabolizmasını Değiştirmek olarak başlıklar halinde toplanabilir.

‘Kanser’ terimi 200’den farklı hastalığı kapsayan, temel olarak ise kontrolsüz bölünme ve metastatik potansiyeli kasteden, içeriği çok geniş bir terimdir(Brennan, 2002).

Birçok kanser türünün genetik ve çevresel faktörler arasındaki bir dizi kompleks etkileşim sonucu meydana geldiği bilinmektedir. Bu etkileşimler bireye özgü, cinsiyete özgü veya etnisiteye özgü olarak farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılıklar aslında neden aynı çevresel faktörlere maruz kalan her kişinin kanser geliştirmediği sorusunu da cevaplamaktadır. Kanserlerin % 95’nin çevresel ve genetik faktörlerin birlikte etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kanser meydana gelmesinde (karsinogenez) etkili olduğu bilinen birçok çevresel ve genetik faktör olmakla birlikte, her birinin bağımsız olarak kanser gelişimine etkilerini belirlemek oldukça zordur (Milne ve ark., 2009; Hyndman, 2016).

2.15 Karsinogenezin aşamaları

2.15.1 Doğal Seçim

Karsinogenez esnasında hücreler, bir seri mutasyon kazanmaktadır. Hücreler mutasyon kazanarak bölünme ve hayatta kalma kapasitelerini arttırmakta ve bu yeteneklere sahip olanlar seçilerek hayatta kalabilmektedir. Yeterince mutasyon kazanan hücreler malign tümörler oluşturmak üzere çoğalmaya devam etmektedir. Bununla birlikte zamanla daha

az sayıda mutasyona sahip olan hücreler ise benign tümör oluşturmaktadır. Bir hücrenin tümör oluşturabilme kapasitesi, zamanla kazandığı mutasyon sayısı ile doğru orantı göstermektedir. Neoplazm oluşturmuş bazı hücre tiplerinde, daha fazla mutasyon olduğu belirlenmiştir. Bu tip, önceden mutasyona sahip olan hücreler, başka genetik değişikliklere daha açık olduklarından, tümör oluşturabilme kapasiteleri de diğer dokulara göre artış göstermektedir (Stratton ve ark., 2009).

2.15.2 Tümörün Meydana Gelmesi ve İlerlemesi

Tümörün ortaya çıkması ve ilerlemesi, farklı zaman aralıklarını kapsayan ve aşamalı olarak gerçekleşen bir süreçtir. Tümörün meydana gelişindeki ilk aşamalar: ‘Başlama’ ve ‘İlerleme’dir. İlk aşama olan Başlama aniden gerçekleşebileceği gibi, endojen (reaktif oksijen türevleri gibi) veya ekzojen (sigara dumanı gibi) bir mutajen etkisi ile de ortaya çıkabilmektedir. Başlatıcı ajanlar, DNA’da hasar oluşturarak proto-onkogenleri aktive etmekte ve tümör baskılayıcı genleri de baskılamaktadırlar. Ancak bu ilk etkiler tümör oluşumunda tek başına yeterli olmamakta ve hücreler tümör oluşturabilmek için bir destekleyici ajanın varlığına da ihtiyaç duymaktadırlar. Destekleyici ajan, aslında tek başına karsinogenik etkisi çok az olan başlatıcı bir ajanın varlığında, kanser gelişiminde etki gösteren ajanlardır(Aziz, 1998).

2.15.3 Tümörün gelişmesi ve metastaz

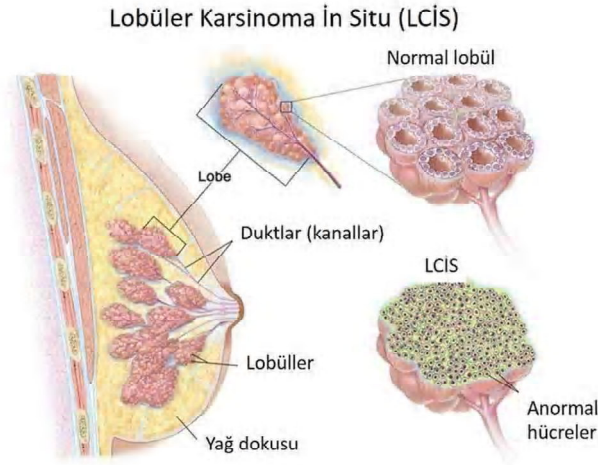
Tümörün daha da gelişmesi ve metastaz yapması, gen ekspresyonlarının değişmesi gibi daha ileri genetik değişiklikler sonucu meydana gelmektedir. Vücutta kanser hücrelerinin ilk bulunduğu yerden daha farklı bölgelere gitmesiyle sonuçlanan süreç metastaz olarak adlandırılmaktadır. Bu süreç hücrelerin çoğalması, anjiyogenez, lokal invazyon, hücrelerin dolaşım sistemine girişi, dahil oluşu ve çıkışı ve hücrelerin yeni bölgeye yerleşmesi aşamalarından oluşmaktadır. Bir hücrenin invazyona başlayıp sonra da metastaz gerçekleştirmesi için daha öncesinden invazif bir fenotip kazanmış olması gerekmektedir. Bu invazif potansiyelin kazanılması için de hücrelerde; proteazların ekspresyon seviyeleri artırılmakta ve hücreye daha fazla hareket kabiliyeti kazandırmak amacı ile hücre-hücre adhezyon molekülleri baskılanmaktadır. Metastazın göreceli olarak daha az sıklıkla görülmesi veya tümörün genelde ileriki aşamalarında meydana gelmesi, tümör popülasyonunda bulunan az sayıdaki hücrelerin metastatik potansiyele sahip olduklarına işaret etmektedir. Bu kavram “metastatik yetersizlik” olarak adlandırılmakta ve günümüzde de hala hücrelerin metastatik potansiyelleriyle ilişkili

genlerin prensibini anlamaya yönelik çalışmalar devam etmektedir. Öte yandan bilim dünyasında metastaz sürecinde farklı genlerin görevli olmadığını, sadece tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerdeki mutasyonlar sonucu bu yeteneğin kazanıldığını savunan görüşlerde mevcuttur. Farklı kanser türleri veya aynı kanser türü olmasına rağmen bireylerin gösterdiği farklılıklar her iki teorisinin de doğru olabileceğini düşündürmektedir(Powell *ve ark.*, 1999).

2.16 Meme Kanseri

Dünyada en sık görülen ve malign tümör olan meme kanseri tüm kanserlerin yaklaşık olarak % 30'unu oluşturmaktadır. Günümüzde bilinen en etkili tedavisi tümör ile tümörden koparılan hücrelerden yayılan lenf nodlarının cerrahi yollarla alınmasıdır. Radyoterapi, kemoterapi ve anti kanser ilaçları ile de bu tümörün ilerlemesinin durdurulmasına yönelik tedaviler uygulanır(Li *ve ark.*, 2021).

Meme kanserinde uygulanacak olan tedavinin seçimi birçok etmenle belirlenir. Bunlar hastanın yaşı, tümörün özellikleri, östrojen reseptör pozitifliği, menapozal durumlar gibi etkenlerdir. Lobuler ve duktal hücrelerin luminal bölgelerinde bulunan progesteron ve östrojen reseptörlü hücreler MCF-7 meme hücre hattı olarak adlandırılır. Meme tümörlerinin % 60-70 oranında bu hücrelerde olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte bu reseptörlerin bulunmadığı meme hücreleri MDA-MB-231 hücre hatları olarak adlandırılmaktadır. Meme kanserinin endokrin tedavisinde önemli bir rol oynayan progesteron reseptörlerinin ekspresyonu, östrojen reseptörü ve hormonun kendisi ile düzenlenmektedir. Progesteron reseptörlerin pozitif olduğu kanser hücreleri hormonal tedavide % 70 oranında cevap verirken, bu reseptörlerin bulunmadığı kanser hücreleri % 25-30 oranında cevap vermiştir(Liu *ve ark.*, 2021).



Şekil 2-12 Meme kanseri oluşum bölgeleri (Dai ve ark., 2017)

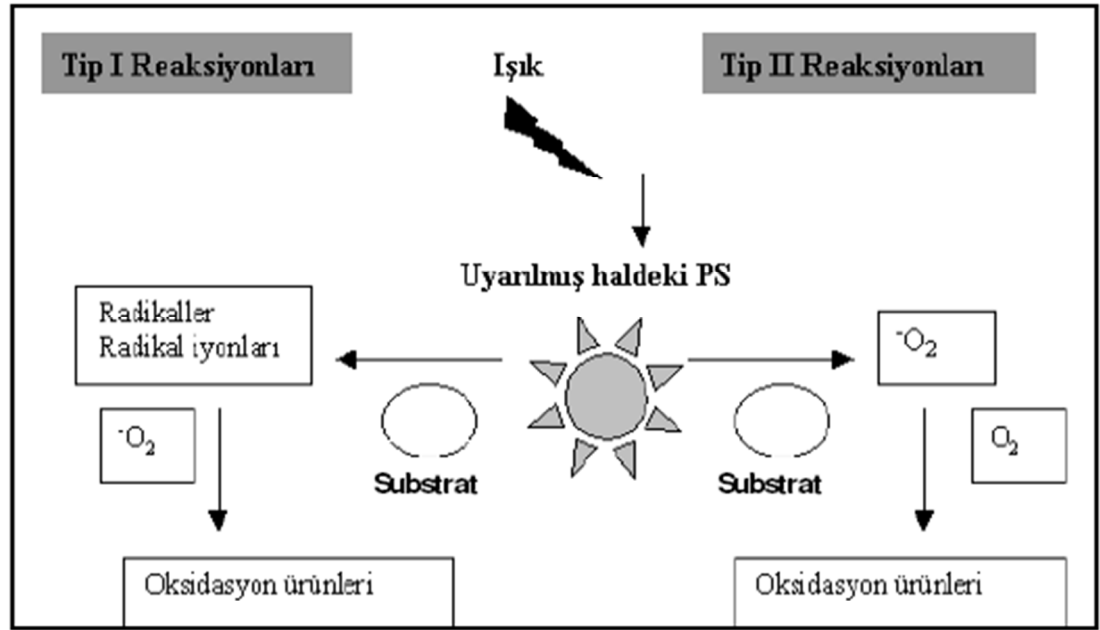
Östrojen reseptörlü meme kanseri hücrelerinde, tümör hücresinin östrojenden yoksun bırakılarak büyüme ve çoğalmayı uyarıcı etkisinin yitirilmesi amaçlanmaktadır. Sağlıklı meme hücresinin büyüme ve çoğalması prolaktin ve östrojen hormonları ile düzenlenir. Bu yüzden memede oluşan tümörün büyüüp çoğalması, hücreye giren östrojen seviyesi düşürülerek engellenmeye çalışılır. Projemiz kapsamında MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına uygulanacak olan metalli ftalosiyanın yüksek dalga boyunda ışıma yapmasının ardından kanserli hücrelerin iç yapılarının oluşturulan reaktif oksijen ürünleri ile bozulmasının yanı sıra membranda da yıkım oluşturulması ve tümörlü hücrelerin besin yollarının kesilmesi amaçlanmıştır. Aynı uygulama sağlıklı meme hücre hattı olan MCF-10a hücre hattına da uygulanarak bu hücrelerde olabildiğince az hasar görülmesi ve oluşturulan bu sentezlerin karşılaştırılmasının yapılması hedeflenmiştir(Dai ve ark., 2017).

2.17 Serbest Radikaller

2.17.1 Singlet Oksijen

O₂ molekülü UV, görünür bölge ve IR'de bir seri absorpsiyon bantları gösterir. Moleküler ¹O₂'in veya oksijenli organik molekülün direk ışıkla uyarımında singlet ¹O₂ oluşur fakat düşük verimli olduğundan uygulamaya yönelik kullanımı zordur. Uyarmanın dolaylı bir yolu da ışığa duyarlı bir madde (fotoduyarlı yapılar) ile yapılan

reaksiyondur. Işığa duyarlı $^1\text{O}_2$ reaksiyonları söndürmenin doğasına bağlı olarak Tip 1 ve Tip 2 olarak ayrılır. Uyarılmış fotoduyarlı yapıların moleküler oksijen ile söndürülmesi (Tip 2 reaksiyonları) ya enerji transferi yolu olan singlet $^1\text{O}_2$ oluşumu ile ya da elektron transferi yoluyla anyonik süperoksit radikali oluşumu (Tip 1 reaksiyonları) ile ilerler(Wang ve ark., 2021).



Şekil 2-13 Singlet oksijen reaksiyonları (Hippeli ve ark., 1999)

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve $\cdot\text{OH}$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Bu özelliklerinden dolayı son zamanlarda singlet oksijen, hava ve su kirlenmesine neden olan kimyasal maddelerin fotobozunmasında ve PDT uygulamalarında geniş kullanım alanı bulmuştur(Rui ve Liu, 2020).

Singlet oksijen iki yolla tüketilebilir:

- ❖ Oksijenin bir söndürücü tarafından fiziksel söndürülmesi. Bu ya söndürücünün elektronik olarak uyarılması (bimoleküler) ya da çözücü moleküllerinin titreşimsel deaktivasyonu ile oluşur (monomoleküler).

- ❖ Bir molekülün singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) tarafından yükseltgenmesi (kimyasal reaksiyon)

2.18 Serbest radikallerin etkileri

2.18.1 Genel etkileri

-Hücrelerin içerisinde bulunan yapılarının (DNA, golgi cisimciği vb.) yanı sıra lipid, karbonhidrat, protein, enzim gibi bütün önemli bileşiklere etkide bulunur.

-Mitokondrideki kapiler permeabiliteyi bozar ve aerobik solunumu durdurucu etki gösterir.

-Hücrenin potasyum kaybını artırır ve trombosit agregasyonunu tetikler.

-Litik olarak bilinen proteaz, oksidaz, elastaz, siklooksijenaz gibi enzimleri aktive ederken, antitripsin ve alfa-1 gibi savunma sistemlerini inaktive edici özellik gösterir.

Pek çok hastalığın patogeneğinde (DM, KAH, HT, psoriasis, RA, Behçet, kanser, yaşlılık vb.) serbest radikal oluşumunun arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı gösterilmiştir. Ancak bu hastalıklarda serbest radikallerin hastalığın sebebi olarak mı oluştuğu yada sonucu olarak mı ortaya çıktığı tam bilinmemektedir (Poprac ve ark., 2017).

2.18.2 Membran lipidlerine etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

-Lipidler serbest radikallere en duyarlı yapılardır. Membranda bulunan kolesterol ve doymamış yağ asitleri ortamda bulunan serbest radikallerle etkileşerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar.

-PUFA (poli-ansatüre yağ asidi)'nın oksidasyonu "lipid peroksidasyonu" olarak bilinir ve meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.

-Membrana bağlı olan lipidler hidrofobik yapıda bulunduklarından radikallerin çoğu burada reaksiyona girerler ve membran yıpratıcı etki gösterirler.

-Membran geçirgenliği ve mikro akışkanlığı bozulur.

-Peroksidasyonla oluşan malondialdehid, polimerizasyona ve membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına sebep olur. Bu durumda enzim aktivitesi, deformasyon, hücre yüzey bileşiklerinin agregasyonu ve iyon transport gibi intrinsek membran özelliklerinin değişmesine sebep olur (Mutajenik, genotoksik, karsinogenik)(Niki, 2014).

2.18.3 Proteinlere Etkileri:

-Doymamış bağı bulunan ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi daha fazladır (fenil alanin, triptofan, metionin, tirozin, sistein, histidin vb..). Reaksiyonları sonucunda karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir.

- Albümin ve immunglobulin gibi fazla disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapılarında bozulma oluşur(Gebicki, 2016).

2.18.4 Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkisi:

-Serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek bozunmaya sebep olurlar, bu durumda hücrede ölüme ve mutasyona sebep olur.

-Oluşan sitotoksisite, nükleik asitlerin baz modifikasyonlarından oluşan kromozom farklılıklarına veya DNA'daki diğer bozunmalara bağlıdır(Gebicki, 2016).

2.18.5 Karbonhidratlara Etkisi:

-Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit (H_2O_2), okzaldehydler ve peroksid yapıları oluşur. Bu yapılar diyabet, astım gibi hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynarlar(Gebicki, 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri ve malzemeler Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Marka / Model
Derin dondurucu, -80°	Nüve
Derin dondurucu, -20°	Bosch
Dalga boyu ayarlanabilir microplate okuyucu	SPECTROstar nano
Hücre sayımı	Olympus R1
Etüv	Binder
Çalkalayıcı	New Brunswick Scientific
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	ACCUMAX
Mikro santrifüj	Thermo IEC Micromax
pH-metre	Hanna Instruments
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
İnvert mikroskop	ZEISS
CO ₂ inkübatör	NÜVE EC-160
Standart T-25 ve T-75 hücre kültür flaskları	NestBiotechnology
Santrifüj	Allegra X-15R
Cam malzemeler (beher, erlen, balon joje)	Isolab
Flow sitometri	MUSE
Hassas analitik terazi	Shimadzu
Vorteks	IKA vortex genius 3
Steril 96 kuyucuklu hücre kültür pleytleri	Biologix
Çeşitli hacimlerde steril Pipet uçları	Axygen
Otoklav	Biobase

3.2 Kullanılan kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, yapıları ve üretici firmalar

Kullanılan maddeler	Üretici firma
Etanol (C_2H_5OH)	Merck
Metanol (CH_3OH)	Merck
DMEM besi yeri	Capricorn
Penisilin/Streptomisin	Capricorn
PBS tablet	Medicano
Tripsin/EDTA çözeltisi	Capricorn
Fetal bovine serum (FBS)	Capricorn
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma
Tripan blue çözeltisi	Sigma
Horse Serum	Invitrogen
EGF	Sigma
Hidrokortizon	Sigma
Kolera Toxin	Sigma
İnsulin (for cell culture)	Sigma
LDH kiti	SunRed

3.3 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

3.3.1 Sentezlenen Organik Bileşiklerin Anti-Kanser Etkilerinin Araştırılması İçin Yapılacak *in-vitro* Çalışmalar

İnsan kanserlerinden üretilmiş devamlı hücre hatları, laboratuvar çalışmalarında ve *in-vitro* kanser araştırmalarında model olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek oranda homojenite göstermeleri, donmuş stoklardan kolaylıkla üretilibilmeleri, sınırlı koşullarda bile neredeyse sınırsız üreme yeteneğine sahip olmaları nedeniyle hücre hatları tercih edilmektedir.

3.3.2 Hücre Kültürü

Çalışmalarda meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231, MCF-7 ve sağlıklı MCF-10A hücreleri kullanılmıştır. İnsan epitel meme adenokarsinom (MDA-MB-231) (ATCC® HTB-26™), insan epitel meme adenokarsinom (MCF-7) (ATCC® HTB-22™) ve sağlıklı insan meme epitel (MCF-10A) (ATCC® CRL-10317™) hücreleri ATCC den ticari olarak temin edilmiştir.

3.3.3 Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması

MDA-MB-231 ve MCF7 hücreleri 25cm²'lik flasklara ekilmiştir. Hücre kültürü ortamı olarak %10 FBS, Penicilin-Streptomycin (100 ünite), L-Glutamine ve NaHCO₃ içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda inkübasyona bırakılıp çoğaltılmıştır. MCF-10A hücre hattı diğer hücre hatlarından farklı olarak besiyerine ekstra bileşenler katılarak büyütülmüştür. Daha önce hazırlanmış olan 500 mL besiyeri içerisine 25 mL horse serum eklendi, ardından 100 µl EGF, 250 µl hidrokortizon, 50 µl kolera toksin ve 500 µl insülin eklenerek hücre hattı büyütülebilmıştır.

Hücreler büyüdüklerinde farklı ortama geçirilmek için pasajlandı. Pasajlamada, önce DMEM ortamdan uzaklaştırıldı, FBS'yide uzaklaştırmak için DPBS ile flasklar yıkandı. Hücreleri flasktan kaldırmak için flaska Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flask CO₂ etüvünde yaklaşık 1 dakika tutuldu. Tripsin-EDTA'nın aktivitesini durdurmak için flaska FBS içeren medyum konuldu. Hücreler falkon tüpe toplanıp oda sıcaklığında 800

rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz atılıp çöken pellet medyumda süspanse edilip yapılacak işleme göre hücre kültür platelerine ekim yapıldı.

3.3.4 Hücrelerin Açılması, Çoğaltılması ve Pasajlanması

- 1) -80°C' de kriyotüpler içerisinde bulunan % 10 DMSO + % 90 FBS ile dondurulmuş hücre hatları 37°C' ye alındı.
- 2) Kriyotüp içerisine hızlı bir şekilde besi ortamı ilave edildi. Pasteur pipeti yardımıyla karıştırılarak hücreler 15 ml' lik falkon tüp içerisine alındı.
- 3) Falkon tüp içerisine yaklaşık 10 ml daha besiyeri ilave edilerek 1400 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek yıkama yapıldı.
- 4) Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve çöken hücrelerin üzerine 5 ml besiyeri eklenerek 25 cm²' lik flasklara alındı.
- 5) Flasklar, 37°C' deki % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı. 48 saatte bir besi ortamları tazelendi. Hücreler bütün flask yüzeyini kapladığında pasaj yapıldı.
- 6) Flasklarda bulunan ortam döküldü ve flasklar bir kez serumsuz ortam kullanılarak yıkandı.
- 7) Daha sonra hücrelerin üzerine 1 ml tripsin ilave edildi. Bir süre bekletildikten sonra tripsin uzaklaştırılarak flasklar 5-10 dakika boyunca inkübatörde bekletildi.
- 8) İnkübatörden çıkan flasklar inverted mikroskopla incelendi ve tüm hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edildi.
- 9) Flaskda bulunan tüm hücreler kalktıktan sonra, 10 ml FBS'li ortam ilave edildi.
- 10) Flask içerisinde bulunan hücre-ortam karışımının 5 ml' si başka bir flaskta aktararak pasajlama işlemi tamamlanmış oldu.
- 11) Hücrelerin yüzeye yapışarak üremeye devam etmeleri için flasklar inkübatöre kaldırılarak inkübasyona bırakıldı ve çoğalmaları sağlandı.

3.3.5 Hücrelerin Sayılması / Canlılığının Tespit Edilmesi

Hücreler flask yüzeyinin %70-80'lik kısmını kapladıktan sonra hücre pasajlaması yapıldı.

1. İlk olarak flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı.
2. Flasklar 8'er ml PBS ile yıkandıktan sonra her bir flaska 4 ml tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 3 dakika inkübatörde bekletildi.
3. İnkübasyon sonrası 9 ml %10 FBS içeren, hücre için uygun olan DMEM veya EMEM ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı. Hücre süspansiyonu 130 g'de 6 dakika boyunca santrifüjlendi.
4. Süpernatant kısımları 1 ml kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücre süspansiyonlarından 10 µl'si 0.5 ml hacimli kapaklı tüpe alınarak 10 µl tripan blue ile karıştırıldı ve karışım 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
5. Pipetaj yapılarak karışımdan 10 µl alındı ve neubauer hematositometre lamına aktarıldı. İnvert mikroskop ile incelenen hematositometre lamı üzerinde 16'ya bölünmüş dört ayrı kare olduğu görülmektedir. Çapraz iki kare içerisinde bulunan canlı hücreler sayıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısı; “sayılan hücre sayısı x seyreltme oranı x 10^{4n} ” formülü kullanılarak hesaplandı.
6. Hücre sayımı yapıldıktan sonra, içerisinde 15 ml besiyeri bulunan 75 cm²'lik flasklara 2000-10000 hücre/cm² olacak şekilde tekrar hücre ekimi yapıldı. Böylece kültürleme sürecine devam edildi.

3.3.6 Hücre Sayımı

Platelere ekim yapılmadan önce her kuyucuğa belli sayıda hücre ekebilmek için hücreler pasajlandıktan sonra Tripan Mavis ile boyayıp Olympus R1 cihazıyla hücre sayımı yapıldı.



Şekil 3-1 Olympus R1 hücre sayım cihazı



Şekil 3-2 Olympus R1 hücre sayımı için slayt

Karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra slayta 10 μ L yüklenerek cihazda sayım yapılır. Bu durumda ölü hücreler metilen mavisi ile boyanır, canlı hücreler boyanmaz. Yalnızca boyanmamış hücreler sayılarak canlı hücre sayımı gerçekleştirilebilir. Seyrelme faktörü de dikkate alınarak mL başına düşen hücre sayısı hesaplanarak her bir kuyucuğa ekilecek olan hücre miktarı belirlenir.

3.4 Metaloftalosiyeninlerin sentezi

Bu çalışmada ilk olarak yeni ftalonitril türevi 3- (4- (3-oksobütıl) fenoksi) ftalonitril sentezlenmiş, ardından yeni tip periferik olmayan metaloftalosiyenin türevleri, Çinko, Bakır, Kobalt, Manganez, Galyum ve İndiyum ile hazırlandı. Sentezlenen yeni bileşikler, FTIR, ¹H-NMR, UV-Vis ve floresans gibi yaygın spektroskopik yöntemlerle karakterize edildi. Yeni tip metaloftalosiyeninlerin agregasyon davranışları UV-Vis spektroskopisi ile incelenmiş ve pH değişiminin ftalosiyeninlerin optik özelliklerine etkisi yapılmıştır. Yeni tip Çinko, Bakır ve Kobalt metaloftalosiyeninler asidik pH değerlerinde J-tipi agregasyon sergilemişlerdir.

Yeni ftalosiyeninlerin elektronik spektrumları, Agilent Model 8453 diyot dizili spektrofotometre ile kaydedildi. Yeni sentezlenen bileşiklerin titreşim spektrumları Perkin-Elmer spektrum iki FT-IR spektrofotometre ile alınmıştır. ¹H NMR ve ¹³C NMR spektrumları Bruker 300 spektrometre cihazı ile elde edildi. Bileşiklerin floresans spektrumları Hitachi S-7000 floresans spektrofotometresi ile alınmıştır.

3.4.1 3-(4-(3-oksobütıl)phenoxy)phthalonitrile sentezi

4- (4-hidroksifenil) bütan-2-bir (1.04 g, 6.35 mmol) kuru DMF (15 mL) içinde çözüldü ve çözelti susuz K₂CO₃ (5.36 g, 38.88 mmol) oldu. Elde edilen karışım N₂ atmosferi altında yaklaşık 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra DMF (1 g, 5.78 mmol) içerisinde çözüldürülmüş 3-nitroftalonitril, çözeltiye damla damla ilave edildi. Bu karışım, N₂ altında 45°C'de 3 gün etkili bir şekilde karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, elde edilen reaksiyon karışımı buzlu su (250 mL) içerisine döküldü. Katı ürün süzöldü ve su ve dietil eterle birkaç kez yıkandı. Mobil faz olarak CH₂Cl₂ kullanılarak kolon kromatografisi ile daha fazla saflaştırma yapılmıştır.

3.4.2 Ftalosiyenin sentezinin genel prosedürü

3- (4- (3-oksobütıl) fenoksi) ftalonitril (0.10 g, 0.34 mmol) ve susuz metal tuzları (Zn(CH₃COO)₂ veya CuCl₂ veya CoCl₂ veya MnCl₂ veya GaCl₃ veya InCl₃) karışımı n-heksanol (2 ml) ve DBU ortamında 150°C'de N₂ atmosferi altında 8 saat süreyle ısıtıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyon tüpü, oda sıcaklığında soğutuldu ve koyu yeşil bileşik, MeOH ile çökteldi ve süzöldü. Elde edilen yeşil sarı ftalosiyenin türevleri, MeOH, EtOH, heksan ve dietileter ile birkaç kez yıkandı. Daha fazla saflaştırma için kolon kromatografisi kullanıldı. Kloroform, kromatografik saflaştırma işlemlerinde mobil faz olarak kullanılmıştır. Sentezlenen yeni tip metaloftalosiyenin

türevleri, CHCl_3 , CH_2Cl_2 , THF, DMF, DMSO gibi yaygın organik çözücülerde çözünmektedir.

3.4.3 Floresans kuantum verimleri

Çinko, galyum ve indiyum metalofthalosiyanın floresan özellikleri oda sıcaklığında THF solüsyonunda belirlendi. Yeni metalofthalosiyanın floresans kuantum verimleri (Φ_F), oda sıcaklığında THF (Günsel *ve ark.*, 2019; Bilgiçli *ve ark.*, 2020) içinde **Şekil 3.3**'teki denklem ile hesaplandı.

$$\Phi_F = \Phi_F(\text{Std}) \frac{F \cdot A_{\text{Std}} \cdot n^2}{F_{\text{Std}} \cdot A \cdot n_{\text{Std}}^2}$$

Şekil 3.3 Floresans kuantum veri hesabı (Günsel *ve ark.*, 2019)

Bu denklemde, Φ_F , yeni sentezlenmiş bileşiklerin kuantum verimleri, $\Phi_F(\text{Std})$, referans bileşiğin kuantum verimi, F ve F_{Std} , yeni metalofthalosiyanın ve standart olarak ikame edilmemiş çinko ftalosiyanın floresan emisyon eğrilerinin altındaki alanlardır. Sırasıyla referans ve numune bileşiklerinin absorbanası A_{Std} ve A'dır. n^2 ve n_{Std}^2 , sırasıyla numune ve standart için kullanılan çözücülerin kırılma indisleridir. Referans bileşiğin (ikame edilmemiş çinko ftalosiyanın) kuantum verimi, literatüre göre (Saka *ve ark.*, 2011) THF'de $\Phi_F = 0.23$ olarak kullanıldı.

3.5 Sitotoksikite Testleri

3.5.1 Ftalosiyanın bileşiklerinin hücre hatlarındaki IC_{50} dozunun belirlenmesi

IC_{50} dozu, bir inhibitörün hedefinin %50'sini öldürmek için gerekli olan konsantrasyonu belirtmektedir. Bileşiklerin IC_{50} dozu "Cell Proliferation Kit" kullanarak XTT testi ile belirlendi. XTT kit içersinde, XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) ajanı ve aktivasyon ajanı yer almaktadır. Reaktifler 50/1 XTT ajanı (Labelling reagent) /aktivasyon ajanı (electron coupling reagent) olacak şekilde karıştırılarak XTT solüsyonu hazırlandı. XTT bir tetrazolium tuzu olmakla beraber metabolik olarak aktif olan hücrelerde mitokondride bulunan dehidrogenaz enzimiyle parçalanarak suda çözünebilir formazana dönüşmektedir. Formazandan kaynaklanan turuncu rengin yoğunluğu canlı hücre sayısı

ile orantılıdır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan turuncu renk yoğunluğuna bağlı olarak, mikropalak okuyucuda 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunarak hücre canlılığını belirlendi.

Yeni sentez ftalosiyenin ürünlerinin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi aşamasında her bir kuyucukta 10x10⁴ sayıda hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Sağlıklı (MCF-10a) ve kanser hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-231) 24 kuyucuklu plaklara farklı konsantrasyonlarda (2-100 µg/ml) Zn, Cu, Co, Ga ve In metali ftalosiyenin bileşikler uygulanarak 2 saat inkübe edildi. 2 saatin ardından kırmızı diot lazer ile her kuyucuğa (670-750nm) ışınım yapıldı. 90mW gücünde ve 1cm yarı çaplı ışık kaynağıyla her kuyucuğa 4.5 J/cm² olacak şekilde ışık dozu verilmiştir. Bütün bu işlemler oda sıcaklığında karanlık bir ortamda gerçekleştirilmiştir (Maduray ve Odhav, 2013). Belirlenen inkübasyon süreleri sonunda bileşikler kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve XTT kiti uygulandı. Deney sonunda her kuyucuk için absorbans değerleri ölçüldü ve 3 tekrarlı çalışılan sonuçların ortalama absorbans değerleri alınarak hücre canlılıkları hesaplandı. Bulunan sonuçlar grafikler halinde “Sonuç” kısmında gösterilmiştir.

3.6 Antiproliferatif Özelliklerinin İncelenmesi

3.6.1 Flow sitometri (Annexin V)

MCF-7 ve MCF-10A hücre hattında seçici toksisite gösterdiği belirlenen *Zn-PC* ve *Ga-PC*’nin hücrede rolünün araştırması amacıyla MUSE-Annexin-V (dead cell) ve MUSE (cell cycle) ticari kitleri kullanılarak flow sitometrik ölçüm yapıldı. Steril 6 kuyucuklu plaklar kullanıldı. Hücre serileri için; ekstrakt uygun dozlar olacak şekilde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plate içeriği uzaklaştırıldı. PBS ile yıkanan hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 5 dk 800 rpm’de santrifüjlendi. Elde edilen hücreler tripan blue ile sayıldıktan sonra 5 µL Annexin V ve 5 µL PI eklendi. Oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dk bekletildi. İnkübasyon sonrası, 400µL binding buffer buz üzerinde ilave edilerek flow sitometride (emisyona;530 nm, ekzitasyona;488 nm) ölçüm yapıldı.

3.6.2 Hücre Döngüsü ve Apoptozun Flow Sitometrik Olarak Belirlenmesi

Flow sitometri, çeşitli hücrelerin bir süspansiyon halinde akış kanalı boyunca tek tek geçmesi ve bu sırada hücre büyüklüğü ve granülaritesine göre sınıflandırılması esasına

dayanan bir tekniktir (Mfouo-Tynga ve ark., 2018). MCF-7 hücre serisinde seçici toksisite gösterdiği belirlenen Zn-Pc ve Ga-Pc'nin bu etkisinin hangi ana yollar üzerinden gerçekleştiğini ortaya koyabilmek adına flow sitometrik anneksin-V (apoptoz), DNA içerik (hücre döngüsü) analizleri ticari kitler kullanılarak SCÜ Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan flow sitometri cihazı kullanılarak yapıldı.

3.6.3 Hücre Döngüsü Analizi Reaktiflerin Hazırlanması

Üretici firmadan gerekli koşullar altında temin edilen ve -20 °C'de saklanan tüm kit bileşenlerinin çalışma öncesi oda sıcaklığında bekletilerek çözünmeleri sağlandı. Tüm reaktifler üretici firma tarafından kullanıma hazır şekilde tasarlanmıştı. Hücre döngüsü analiz aşamaları sırasıyla;

1. MCF-7 hücreleri 750 000 hücre/flask olacak şekilde T-25 flasklara ekildi ve son hacim zenginleştirilmiş DMEM besi yeri ile 4'er mL' ye tamamlandı.
2. Hücrelerin flasklara yapışması için 24 saat beklendi. 24 saat sonrasında flask içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir flaska 4'er mL taze DMEM besi yeri ilave edildi.
3. Deney grupları sitotoksite verileri de göz önüne alınarak flasklardaki son konsantrasyonlar 25, 50, 75, 100 µg/mL olacak şekilde Zn-Pc ve Ga-Pc ekstraktları ilave edilip flasklar 24 saat inkübasyona bırakıldı.
4. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücrelere 630 nm dalga boyunda 4,5 J/cm² gücünde ışın verildi ve tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon sonrası flask içerikleri uzaklaştırıldı ve flasklar 5'er mL PBS ile yıkandı. Flasklara 1'er mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 5 dakika inkübatörde bekletildi.
6. Süre sonunda 4'er mL zenginleştirilmiş DMEM besi yeri ile hücreler falkon tüpler içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonları 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
7. Süpernatantlar tüpün dibinde 50 µL sıvı kalıncaya dek atılarak hücre pelletleri 1'er mL yıkama tamponu (DMSO içinde çözülmüş sükroz-sodyum sitrat) ile pipetajlanarak süspanse hale getirildi.
8. Karışım 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi ve bu yıkama işlemi 2 kez daha tekrarlandı.
9. Üçüncü yıkama sonrası pelletler 1'er mL yıkama tamponu ile çözüldü.

10. Hücre süspansiyonlarından 10'ar μL alınarak 10'ar μL tripan blue ile karıştırılıp neubauer lamında hücre sayımları yapıldı. Her tüpteki hücre sayısı 10^6 olacak şekilde ayarlandı. Hücre sayıları eşitlenen tüpler 400 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
11. Tüm süpernatantlar dikkatlice uzaklaştırıldı. Her tüpe 250'şer μL A (spermin tetrahidroklorür içinde tripsin içerendeterjan tamponu) solüsyonundan ilave edilerek tüpler hafifçe alt üst edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
12. Süre sonunda her tüpe 200'er μL B (ribonükleaz A and tripsin inhibitörü içeren spermin tamponu) solüsyonundan ilave edilerek tüpler hafifçe alt üst edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
13. İnkübasyon sonrası tüpler buz üzerine alındı. Her tüpe 200'er μL C (propidyum iyodür içeren spermin tamponu) solüsyonundan ilave edilerek tüpler hafifçe alt üst edildi ve 10 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin hücre döngüsü analizleri SCÜ Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan flow sitometri cihazında gerçekleştirildi, her tüp için 10000 hücre saydırıldı ve her deneme 3 kez tekrarlandı (n=3). Sonuçlar % hücre olarak verildi.

3.6.4 Anneksin V Analizi Reaktiflerin Hazırlanması Anneksin V

Analiz kit bileşenlerinin deney öncesi oda sıcaklığında bekletilerek çözünmeleri sağlandı. 10X Anneksin V bağlama tamponu (0.1 M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl_2) distile su ile 1:9 oranında seyreltilerek 1X Anneksin V çalışma taponu hazırlandı. Diğer reaktifler üretici firma tarafından kullanıma hazır şekilde tasarlanmıştır. Anneksin V analiz aşamaları sırasıyla;

1. MCF-7 hücreleri 750 000 hücre/flask olacak şekilde T-25 flasklara ekildi ve son hacim zenginleştirilmiş DMEM besi yeri ile 4'er mL' ye tamamlandı.
2. Hücrelerin flasklara yapışması için 24 saat beklendi. 24 saat sonrasında flask içerikleri uzaklaştırıldı. Her bir flaska 4'er mL taze DMEM besi yeri ilave edildi.
3. Deney grupları sitotoksite verileri de göz önüne alınarak flasklardaki son konsantrasyonlar 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde Zn-Pc ve Ga-PC ilave edilip flasklar 24 saat inkübasyona bırakıldı.
4. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücrelere 630nm dalga boyunda $4,5 \text{ J/cm}^2$ gücünde ışın verildi ve tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakıldı.

5. İnkübasyon sonrası flask içerikleri uzaklaştırıldı ve flasklar 5'er mL PBS ile yıkandı. Flasklara 2'er mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Flasklar 3 dakika inkübatörde bekletildi.
6. Süre sonunda 4'er mL zenginleştirilmiş DMEM besi yeri ile hücreler falkon tüpler içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonları 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
7. Süpernatantlar tüpün dibinde 50 µL sıvı kalıncaya dek atılarak hücre pelletleri 1'er mL soğuk PBS ile pipetajlanarak süspansiyon hale getirildi ve tüpler içindeki hücre süspansiyonları 300 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
8. Süpernatantlar tüpün dibinde 50 µL sıvı kalıncaya dek atılarak hücre pelletleri 1'er mL 1x Anneksin V çalışma taponu ile pipetajlanarak süspansiyon hale getirildi.
9. Hücre süspansiyonlarından 10'ar µL alınarak 10'ar µL tripan blue ile karıştırılıp neubauer lamında hücre sayımları yapıldı.
10. Her tüpteki hücre sayısı 100 µL de 10^5 olacak şekilde ayarlandı. 100'er µL hücre süspansiyonları üzerine 5'er µL FITC ve 5'er µL PI ilave edilerek elde edilen karışımlar yavaşça vortekslendi, oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
11. İnkübasyon sonunda her bir tüpe 400'er µL 1x Anneksin bağlama tamponu ilave edildi. Hücrelerin Anneksin V analizleri Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan flow sitometri cihazında gerçekleştirildi, her tüp için 5000 hücre saydırıldı ve her deneme 3 kez tekrarlandı (n=3).

3.7 LDH aktivite tayini

Glikoliz sırasında laktatın pirüvata dönüşümünü sağlayan LDH molekülü tüm hücrelerde bulunan stabil bir enzimdir. Hücre zarının hasar görmesiyle birlikte hızlı bir şekilde besiyerine salınır. Ölü veya hücre zarı hasarlı olan hücrelerin miktarındaki artış besiyerindeki LDH aktivitesinin artması ile sonuçlanmaktadır. LDH aktivitesindeki bu artış da deney sonunda oluşan renkli formazan kristalinin miktarının artmasına dolayısı ile elde edilen absorbansın yüksek olmasına neden olmaktadır (George ve ark., 2017). Kit prosedüründe yer alan adımlar izlenerek hücrelerin oluşturduğu LDH miktarları bulunmuştur. Prosedürde yer alan adımlar şu şekildedir;

1. Bütün kit içeriği önceden buzdolabından çıkarılarak 30 dakika boyunca oda

sıcaklığında bekletilmiştir. Kullanılan kit SunRed Human (LDH) kitidir (Cat. No: 201-12-0748). Serum, plazma, doku örnekleri ve hücre kültüründe LDH ölçümleri için uygundur.

2. Kit prosedürüne göre işlem gören hücrelerimiz steril ependorflara kaldırılarak 20 dakika boyunca 2500 rpm’de santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Ardından PBS ile dilüe edildi ve hücre konsantrasyonları 10^6 /mL şeklinde ayarlandı.
3. Standart örnekler sırası ile dilüe edildi ve ayrı ependorflarda hazır hale getirildi. Standart konsantrasyonları 640, 320, 160, 80 ve 40 U/L şeklinde belirlendi.
4. Bütün standartlar, hücre örnekleri ve blank kuyucuğu 3 tekrarlı çalışıldı.
5. Blank kuyucuğuna herhangi bir örnek ve biyotin bağlanmış LDH-antibody eklenmedi; Standart kuyucuklarına önceden hazırlanmış olan 50 µl standart çözeltileri ve 50 µl Streptavidin-HRP çözeltisi eklendi; Örnek kuyucuklarına ise 40 µl örnek çözeltisi, 10 µl LDH-antibody ve 50 µl Streptavidin-HRP çözeltileri eklendi; Bu eklemelerden sonra plak ağzı kapatılarak 60 dakika boyunca 37°C’de karıştırılarak inkübasyona bırakıldı.
6. Inkübasyon sırasında yıkama tampon 30x seyreltilerek hazırlandı ve inkübasyonun ardından çoklu pipet yardımıyla plak 5 kez yıkandı.
7. Yıkamanın ardından her kuyucuğa 50 µl kromojen çözeltisi A ve 50 µl kromojen çözeltisi B eklendi. Ardından plak ağzı kapatılarak 37°C’de ışıktan korunaklı bir şekilde 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
8. Inkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek kuyucuklardaki reaksiyon sonlandırıldı.
9. Blank kuyucuğu “0” absorbans kabul edilerek 450 nm’de kuyucukların absorbans ölçümleri gerçekleştirildi ve excelde standart grafiği çizilerek örneklerin absorbans değerlerinden konsantrasyonları hesaplandı.

3.8 İstatistiksel Analizler

Veriler, ortalama ve standart sapma ($\bar{x} \pm SD$) şeklinde ifade edildi. Gruplar arasındaki ilişkileri ortaya çıkarmak için Anova ve Tukey istatistik analizleri kullanıldı. Kullanılan istatistik programlarına göre gruplar arasındaki farklar $p < 0.0001$ için anlamlı kabul edildi. Grafiklerin çiziminde Graph Pad 8.0 programı kullanıldı. Deneyde en az üç bağımsız veri alındı.

4. BULGULAR

4.1 Sentez ve spektroskopik karakterizasyon

Başlangıç malzemesi 3- (4- (3-oksobutil) fenoksi) ftalonitril, aromatik yer değiştirme reaksiyonu ile 4- (4-hidroksifenil) bütan-2-on ve 3-nitroftalonitrilden sentezlendi. Yeni metaloftalosiyanınların sentezi, yeni ftalonitril türevinin siklotetramerizasyon reaksiyonu ile elde edildi. Reaksiyon, baz olarak DBU ve ilgili susuz metal tuzları kullanılarak 8 saatte 150°C'de kuru n-heksanol içinde ısıtılarak gerçekleştirildi (**Ek-1**). Yeni sentezlenen 3-(4-(3-oksobutil)fenoksi) ftalonitril ve metaloftalosiyanın türevleri, elüent olarak CH₂Cl₂ ile kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

4- (4-hidroksifenil) bütan-2-bir ve 3-nitroftalonitril arasındaki aromatik yer değiştirme reaksiyonundan sonra, 1536 cm⁻¹ ve 1348 cm⁻¹'deki nitro grubu zirveleri kayboldu ve C≡N titreşimi ile 2234 cm⁻¹ ila 2227 cm⁻¹. 3200-3000 cm⁻¹ arasında aromatik pikler ve 3000-2800 cm⁻¹ arasında alifatik pikler gözlenmiştir (**Ek-2**). Siklotetramerizasyon reaksiyonu ile yeni tip metaloftalosiyanınların sentezinden sonra, 2227 cm⁻¹'de C≡N titreşim zirvesi kayboldu. Tüm metaloftalosiyanın türevlerinin FTIR spektrumları, küçük germe kaymaları haricinde çok benzerdir (**Ek-3**).

UV-Vis spektroskopisi, genişletilmiş konjuge π -sistemi nedeniyle ftalosiyanınların karakterizasyonu için basit ve çok yararlı bir tekniktir. Ftalosiyanınların elektronik spektrumlarında karakteristik piklere sahip olduğu iyi bilinmektedir. Bunlar Q-bandı ve B-bandı olarak adlandırılırlar. Q-bandı, π - π * geçişi nedeniyle 650-700 nm'de görünürken, B-bandı daha derin π - π * geçişi nedeniyle 300-400 nm'de görünür. Ayrıca Q bandının tek veya çift olması da ftalosiyanınların metal içerip içermediği konusunda ipuçları vermektedir. Yeni metaloftalosiyanınların elektronik spektrumları, Agilent Model 8453 diyot dizili spektrofotometre kullanılarak oda sıcaklığında THF'de kaydedildi. Yeni tip periferik olmayan metaloftalosiyanın türevlerinin Q-bandı absorpsiyon değerleri sırasıyla 692 nm, 691 nm, 696 nm, 745 nm, 711 nm ve 714 nm'de görüldü (**Tablo 4.1** ve **Ek-4**). Bu değerler, çevresel konumlarından ikame edilmiş

ftalosiyeninlerle karşılaştırıldığında, beklendiği gibi yaklaşık 20 nm kırmızı kaymış olarak bulunur (Bilgiçli ve ark., 2012; Günsel ve ark., 2017). Elektronik spektrumlarda periferik olmayan metaloftalosiyenin türevlerinin B bandı değerleri sırasıyla 326 nm, 330 nm, 342 nm, 353 nm, 334 nm ve 377 nm'de gözlemlendi (**Tablo 4.1** ve **Ek-4**)

Tablo 4.1 THF'de yeni sentezlenmiş metaloftalosiyeninlerin spektral parametreleri ve fotofiziksel özellikleri (Φ_F).

Absorbans				Floresans			
Bileşikler	λ_{max}^{abs} (nm) (Q-band)	λ_{max}^{abs} (nm) (B-band)	λ_{max}^{abs} (nm) (n- π^*)	λ_{max}^{em} (nm) (Emission)	λ_{max}^{exc} (nm) (Excitation)	$\Delta\lambda$ (nm) (Stokes Shift)	Φ_F , % (Quantum yield)
Zn-Pc	692	326	624	708	693	16	0,18
Cu-Pc	691	330	620	-	-	-	-
Co-Pc	696	342	631	-	-	-	-
Mn-Pc	745	353	668	-	-	-	-
Ga-Pc	711	334	641	728	708	17	0,09
In-Pc	714	377	648	732	715	14	0,11
ZnPc ^a	666	342		673	666	7	0,23

4.1.1 Agregasyon çalışmaları

Ftalosiyeninlerin yüksek hidrofobik özellikleri, topaklaşma davranışı sergilemelerine neden olur. Topaklaşma oluşumu yalnızca çözünürlüğü azaltmakla kalmaz, aynı zamanda bir ışığa duyarlılaştırıcı olarak etkinliğini de azaltır. Bu nedenle, agregasyon biyolojik özellikleri üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Ftalosiyeninlerin toplanmasının ana nedeni, yüksek π -konjugasyon sistemleridir. Bununla birlikte, hacimli fonksiyonel grupların çevresel veya çevresel olmayan konumlarına eklenmesi, toplanma eğilimini önleyebilir veya azaltabilir. Bu bilgilere dayanarak, çözücü ortamda periferik olmayan konumlardan ikame edilen yeni ftalosiyeninlerin topaklaşma davranışı araştırıldı. Bu amaçla, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ftalosiyenin bileşiklerinin

elektronik spektrumları UV-Vis spektroskopisi ile kaydedildi. Konsantrasyon arttıkça, Q bantlarının yoğunluğu Zn-Pc için 692 nm, Cu-Pc için 691 nm, Co-Pc için 696 nm, Mn-Pc için 745 nm, In-Pc için 711 nm bulunmuştur kümelenme nedeniyle yeni bant oluşumu gözlenmemiştir. Q-bantının konsantrasyonla artışı Lambert-Beer yasasına göre davranmıştır (**Ek-6 – Ek-11**).

4.1.2 Floresans Özellikleri

Yeni sentezlenmiş ZnPc, GaPc ve InPc metaloftalosiyenin floresans özellikleri oda sıcaklığında THF'de incelenmiş ve elde edilen sonuçlar **Tablo 4.1**'de özetlenmiştir. ZnPc için 708 nm'de, GaPc için 728 nm'de ve InPc için 732 nm'de gözlemlenmiştir. **Ek-12 - Ek-14** incelendiğinde, soğurma ve uyarma spektrumlarının benzer olduğu görülecektir.

Bileşik ZnPc, GaPc ve InPc için dalga boyunun absorpsiyon ve uyarma spektrumlarındaki benzerlik, uyarılmış durum ve temel durumun nükleer konfigürasyonlarının THF'de uyarılma nedeniyle etkilenmediğini gösterir. Ayrıca yeni metaloftalosiyenin emisyon spektrumları, uyarma spektrumunun ayna görüntüsüdür. Bu bileşiklerin Stokes Shift değerlerinin bileşik ZnPc için 16 nm, bileşik GaPc için 17 nm ve 14 nm bileşik InPc olduğu bulundu (**Tablo 4.1**). ZnPc, GaPc ve InPc metaloftalosiyenin floresans kuantum verimleri (Φ_F) sırasıyla 0.18, 0.09 ve 0.11 olarak bulundu (**Tablo 4.1**). ZnPc'nin floresan kuantum verimi, THF'deki ikame edilmemiş çinko ftalosiyaninden daha düşüktür (Kırbaç ve Erdoğan, 2020). Bu değer, ftalosiyenin, 4- (4-hidroksifenil) bütan-2-on grupları ile periferik olmayan ikamesinin söndürülmesine neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca GaPc ve InPc için floresans kuantum verimleri, bu ftalosiyenin türevlerindeki daha ağır atom etkisinden dolayı ZnPc ve ikame edilmemiş galyum veya indiyum ftalosiyaninden daha düşüktür. Ağır atomlar, sistemler arası geçişin artması nedeniyle kuantum veriminin azalmasına neden olur (Chauke ve ark., 2007).

4.1.3 Ftalosiyaninlerdeki pH değişiminin UV-vis ve Floresans spektrumları üzerindeki etkisi

Sentezlenen ftalosiyenin bileşiklerinin UV-Vis ve floresan spektrumları farklı pH değerlerine sahip THF'de araştırıldı. Yeni sentezlenmiş ftalosiyenin türevlerinin, elektronik spektrumlarda beklendiği gibi karakteristik Q ve B bantlarına sahip olduğu görüldü. Ancak pH'ın 7-8'den 1'e değişmesi, ZnPc, CuPc ve CoPc için J-tipi

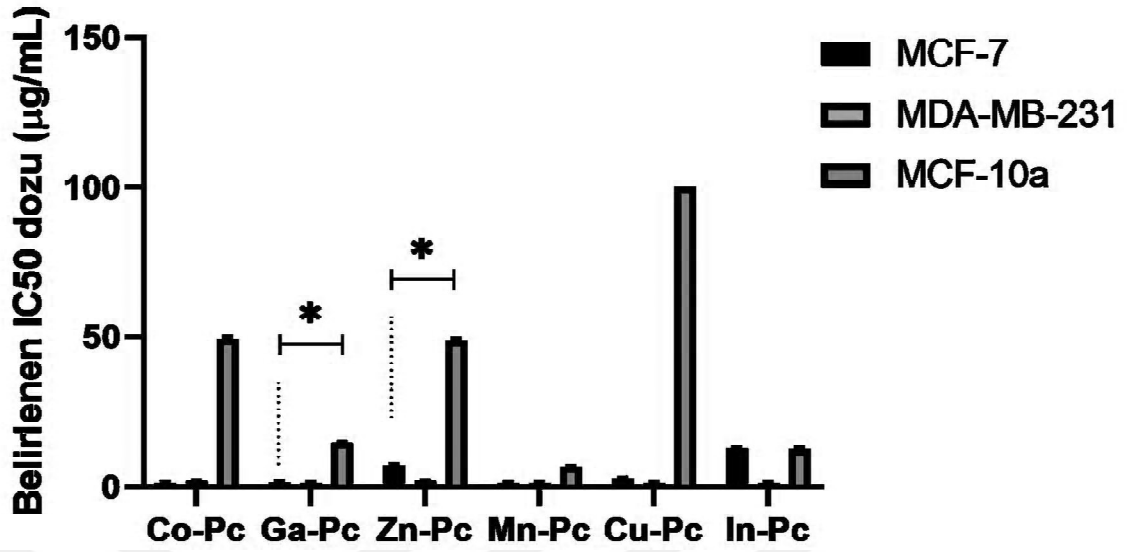
agregasyona neden olmuştur (**Ek 15-18**). Aynı durum MnPc, GaPc ve InPc için görülmemiştir (**Ek 18-20**). ZnPc, CuPc ve CoPc'ün 692, 691 ve 696 nm'deki maksimum absorpsiyon pikleri, asidik değerlere doğru artan pH ile kademeli olarak azalmış ve J tipi kümelenmelerin oluşumundan dolayı kırmızıya kaymış olarak 741, 745 ve 756 nm'de yeni pikler oluşturmuştur. Bu durum, ZnPc, CuPc ve CoPc'ün pH indüklü J-tipi agregasyon sergilediğini ve birikmelerin asidik pH değerlerinde kademeli olarak biriktiğini gösterir. Özellikle ZnPc, diğer ftalosiyaninlere göre pH değişimine karşı çok yüksek bir duyarlılığa sahiptir. PH'daki küçük değişiklik, ZnPc için şiddetli J tipi agregasyona neden olmaktadır. Bu nedenle pH sensörü olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. PH'daki değişiklik ayrıca ZnPc'nin floresan emisyon spektrumunda önemli değişikliklere neden olmuştur. PH'ın asidik değerlere yaklaşımı, emisyon pikinin 721 nm'de söndürülmesine ve 744 nm'ye doğru kaymasına neden olmuştur (**Ek 12**). GaPc ve InPc emisyon spektrumları, pH değişiminden önemli ölçüde etkilenmemiştir. PH'ı 7-8'den asidik değerlere getirerek GaPc için 728 nm'de ve InPc için 732 nm'de emisyon yoğunluğunda sadece bir miktar azalma gözlemlenmiştir.

4.2 IC₅₀ dozunun belirlenmesi

XTT ile yapılan çalışmalar sonucu bütün yeni sentez yapıların IC₅₀ dozları Graph Pad 8 yardımı ile bulunmuştur. Bu doğrultuda Graphpad 8 programında IC₅₀ değerlerinin istatistiksel ilişkileri Tukey's multiple comparison test ile değerlendirilmiş ve yorumlanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda sağlıklı ve kanser hücre hatlarında denenmiş olan yeni sentez yapılarının IC₅₀ dozları **Tablo 4.2**'deki gibi bulunmuştur.

Tablo 4.2 Hücre hatlarının yeni sentez yapılar içerisindeki IC₅₀ değerleri

Hücre Hattı	MCF7 / (µg/mL)	MDA-MB-231/ (µg/mL)	MCF-10a/ (µg/mL)	MCF 7 vs. MDA-MB-231	MCF 7 vs. MCF 10a	MDA-MB-231 vs. MCF 10a
				<i>p değerleri</i>		
Co-Pc	1,492 ± 0,98	1,866 ± 1,03	49,49 ± 1,18	0,9	0<0,001	0<0,001
Ga-Pc	1,721 ± 0,4	1,485 ± 0,37	14,77 ± 1,09	0,9	0<0,001	0<0,001
Zn-Pc	7,406 ± 0,32	1,976 ± 0,12	48,90 ± 0,69	0<0,001	0<0,001	0<0,001
Mn-Pc	1,486 ± 0,18	1,489 ± 0,58	6,846 ± 0,77	0,9	0<0,001	0<0,001
Cu-Pc	2,793 ± 0,46	1,491 ± 0,68	>100	0,9	0<0,001	0<0,001
In-Pc	12,82 ± 0,74	1,480 ± 0,61	12,55 ± 0,91	0<0,001	0,9	0<0,001

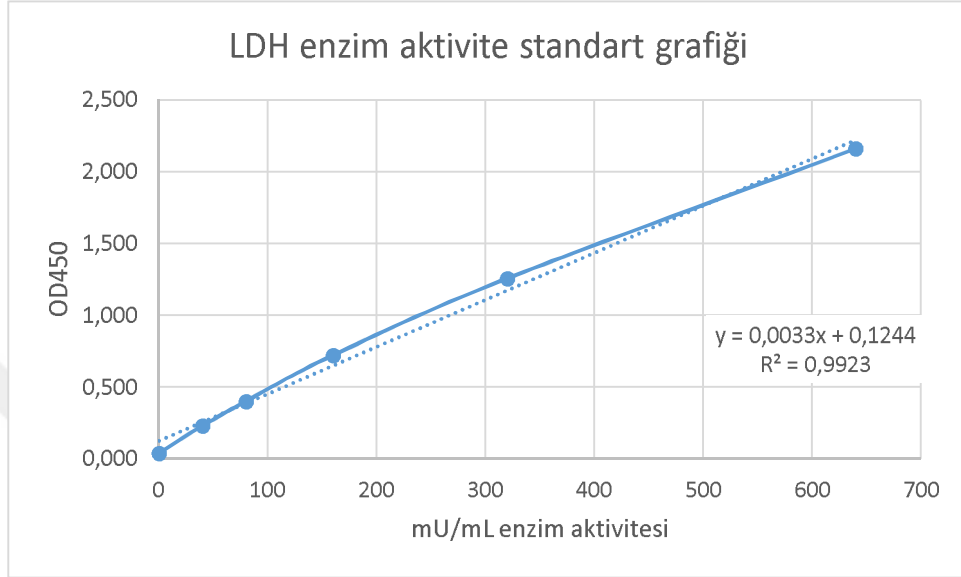


Şekil 4-1 Hücrelerin belirlenen IC₅₀ değerleri (* : $p < 0,0001$)

İstatistiksel veriler incelendiğinde Zn-Pc verilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki değerler kendi arasında anlamlı çıkmamıştır ($p=0,0943$). Bununla birlikte MCF-10a ve MCF-7 arasındaki veriler ile MCF-10a ve MDA-MB-231 arasındaki veriler, Zn-Pc verilen hatlarda anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$). Ga-Pc verilen hücre hatlarının birbiri ile karşılaştırılması ile bulunan sonuçlarda MCF-7 ve MDA-MB-231 değerleri birbirleri arasında anlamlı çıkmamıştır. Bununla birlikte MCF-10a ve MCF-7 ile MCF-10a ve MDA-MB-231 kendi içlerinde GaPc verilen hücre hatlarında anlamlı sonuç vermiştir ($p < 0,0001$). Co-Pc verilen hücrelerin istatistiği incelendiğinde MCF-10a ile MCF-7 ve MCF-10a ile MDA-MB-231 hücrelerinin IC₅₀ dozları arasında anlamlı ilişki bulunurken, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin dozları arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Bir diğer sentez olan Cu-Pc’de ise MCF-10a ile MCF-7 ve MCF-10a ile MDA-MB-231 hücrelerinin IC₅₀ dozları arasında anlamlı ilişki bulunurken, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin dozları arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Mn-Pc ve In-Pc verilen hücre hatlarının ise birbirleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Oluşan absorbands dalgalanmaları sonucu elde edilen bazı R^2 değerleri çok düşük çıkmıştır ($R^2 < 0,75$). Bu yüzden sadece R^2 değerleri 0,95 ve üzeri çıkan ve birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan hücrelerin çalışılmasına karar verilmiştir. Bu durumu takiben çalışmanın sonraki aşamalarına Zn-Pc ve Ga-Pc

sentezlerinin MCF-10a ve MCF-7 hücre hatları üzerinde devam edilmesi kararlaştırılmıştır.

4.2 LDH aktivite sonuçları



Şekil 4-2 Çalışılan kit sonucu elde edilen standart eğri grafiği

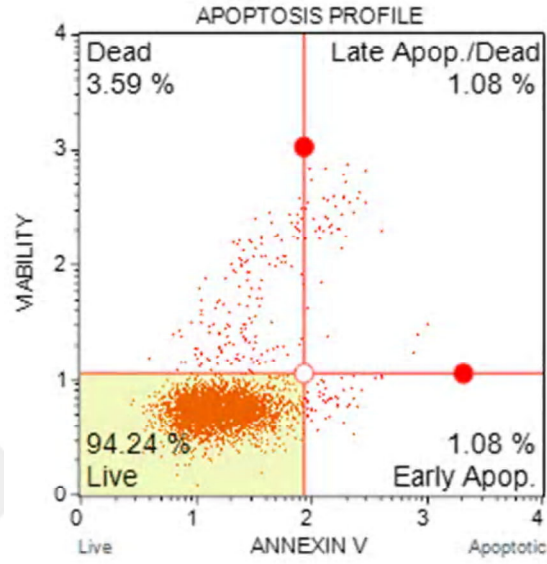
Tablo 4.3 MCF-7 hücre hattı üzerinde 5 tekrarlı çalışılan LDH enzim aktivite değerleri

MCF7 hücre hattı LDH düzeyleri	
	Enzim Aktivitesi (mU/mL)
Zn-Pc	440,485 ± 17,589
Ga-Pc	435,030 ± 22,358
5-FU	442,606 ± 17,228
Canlı	134,424 ± 67,121

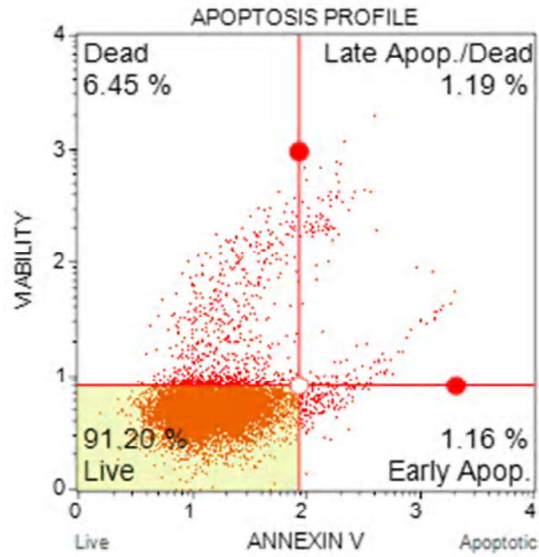
Bulunan aktivite sonuçları incelendiğinde hiçbirşey uygulanmayan MCF-7 hücre hattındaki LDH düzeyine kıyasla Zn-Pc ve Ga-Pc verilen hücre hatlarında belirgin bir artış görülmüştür. İstatistiksel olarak incelendiğinde canlı hücrelere kıyasla yeni sentez yapıların verildiği hücre hatlarında anlamlı bir artış söz konusudur ($p < 0,0001$). Bununla birlikte kanser tedavisinde kullanılan 5-FU ilacı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve bu ilacın uygulandığı MCF-7 hücre hatlarındaki LDH düzeyi ile yeni sentez yapıların uygulandığı hücre hatlarındaki LDH düzeyi paralellik göstermektedir.

4.3 Flow Sitometri Sonuçları

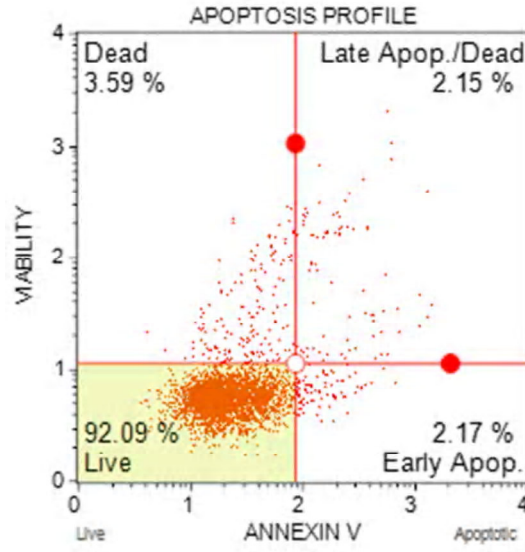
4.3.1 Annexin V



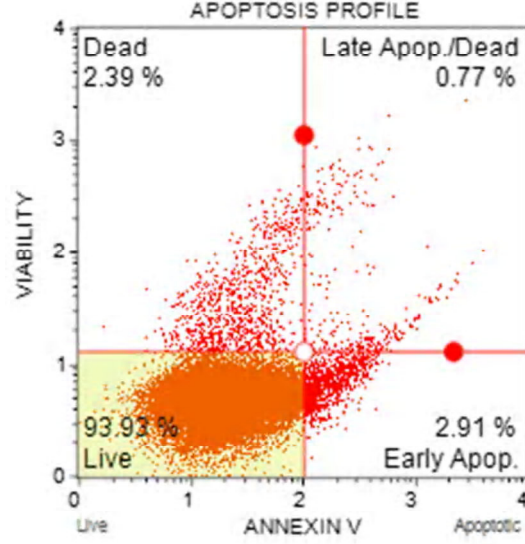
Şekil 4-3 MCF-10a kontrol hücrelerinin ölüm hücre tablosu



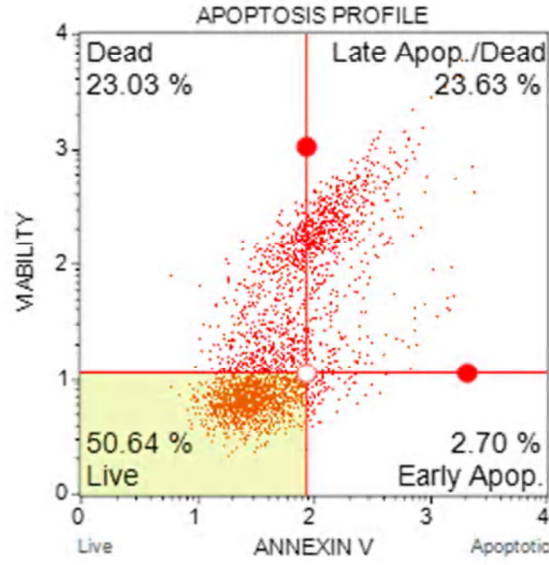
Şekil 4-4 MCF-10a hücrelerinin Zn-PC ile etkileşime girmesi sonucu oluşan ölüm hücre tablosu



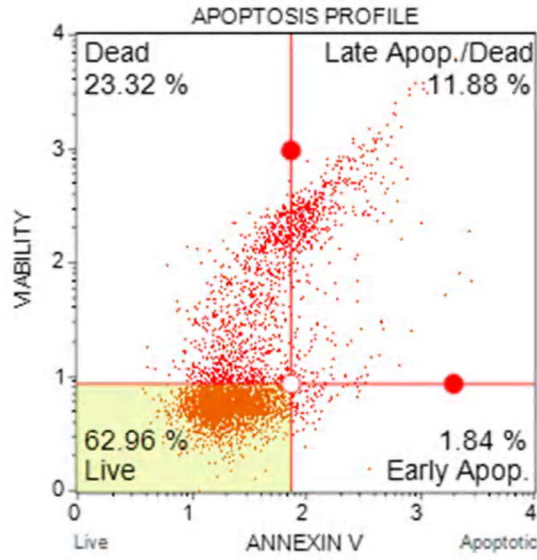
Şekil 4-5 MCF-10a hücrelerinin Ga-PC ile etkileşime girmesi sonucu oluşan ölüm hücre tablosu



Şekil 4-6 MCF-7 kontrol hücrelerinin ölüm hücre tablosu



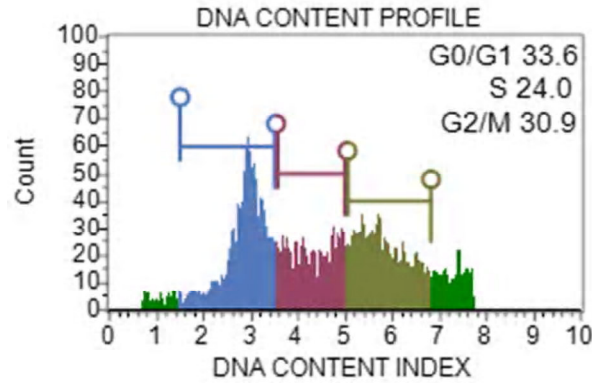
Şekil 4-7 MCF-7 hücrelerinin Zn-PC ile etkileşime girmesi sonucu oluşan ölüm hücre tablosu



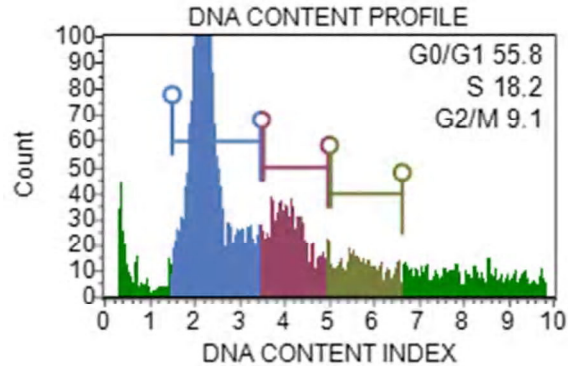
Şekil 4-8 MCF-7 hücrelerinin Ga-PC ile etkileşime girmesi sonucu oluşan ölüm hücre tablosu

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (Bratton *ve ark.*, 1997) Etkili kanser ilaçlarında ilaç hücreyi apoptoza götürerek öldürür (Baines, 2010). Bu nedenle apoptoz/nekroz oranının büyümesi ilacın etkinliğinin arttığını gösterir. Bu çalışmada çalışılan moleküllerden elde edilen sonuçlara bakıldığında oranın yüksek olduğu görülmektedir. Sağlıklı hücre hatlarında yapılan çalışmada sentezlenen maddelerin canlı hücrelere toksik etki yapmaması beklenmektedir. Sentezlenen ilaçların da burada toksik etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

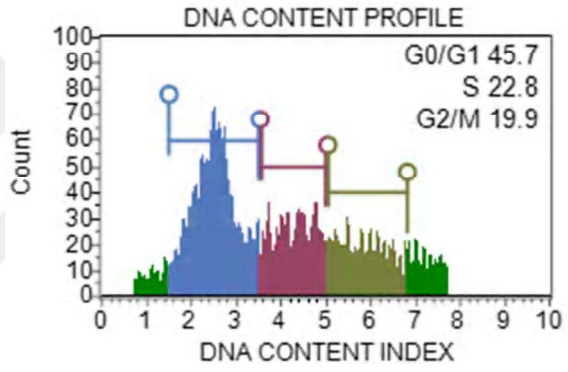
4.3.2 Hücre döngüsü



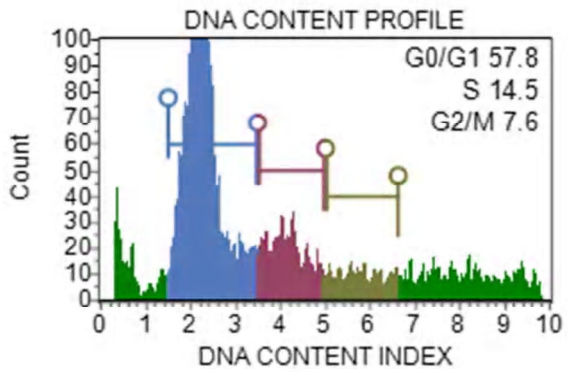
Şekil 4-9 MCF-7 hücrelerinin Zn-PC ile etkileşime girmeden önce oluşan hücre döngü grafiği



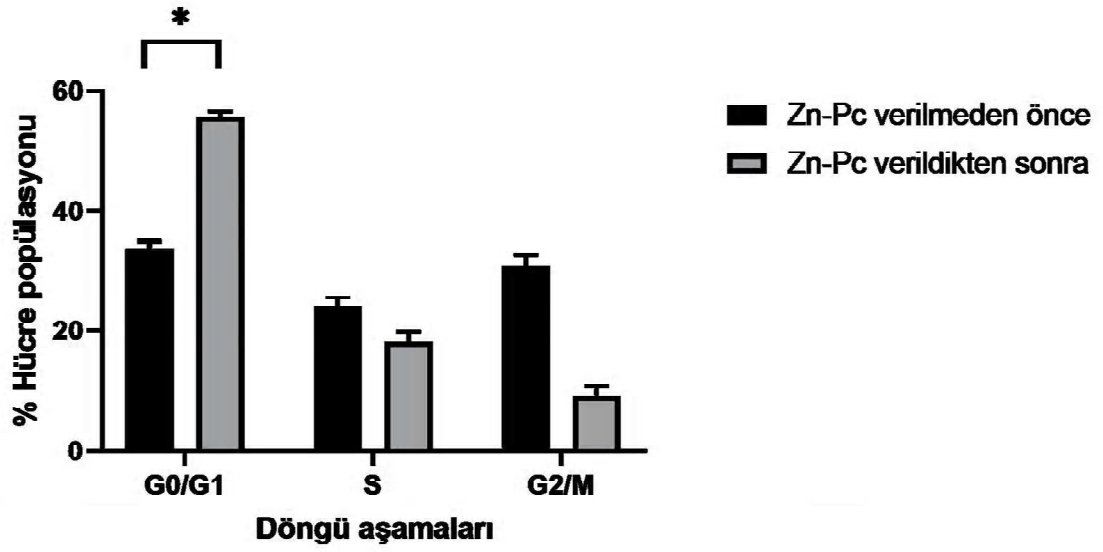
Şekil 4-10 MCF-7 hücrelerinin Zn-PC ile etkileşime girmesi sonucu oluşan hücre döngü grafiği



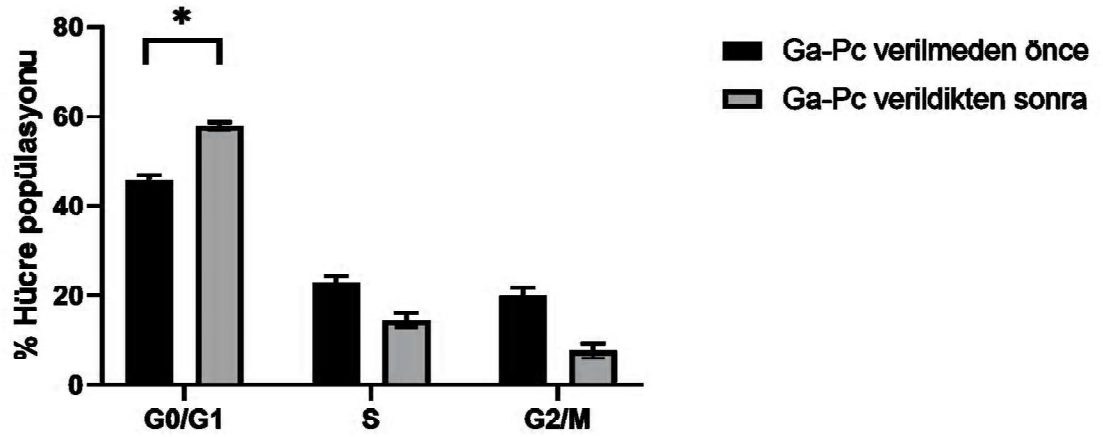
Şekil 4-11 MCF-7 hücrelerinin Ga-PC ile etkileşime girmeden önce oluşan hücre döngü grafiği



Şekil 4-12 MCF-7 hücrelerinin Ga-PC ile etkileşime girmesi sonucu oluşan hücre döngü grafiği



Şekil 4-13 Çinko bağlı ftalosiyenin verilerek ışıma yapılan ve verilmeden bulunan MCF-7 hücre hattındaki döngülerin karşılaştırılması



Şekil 4-14 Galyum bağlı ftalosiyenin verilerek ışıma yapılan ve verilmeden bulunan MCF-7 hücre hattındaki döngülerin karşılaştırılması

Elde edilen hücre döngüsü analiz sonuçlarına göre; Ga-PC ve Zn-PC verilerek yüksek dalga boyunda uyarılan MCF-7 hücre hattında G0/G1 fazında anlamlı bir şekilde hücre döngüsünün durdurulduğu gözlemlenmiştir ($p<0,0001$).



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde PDT alanında dokuya derinlemesine etkilerinden ve yüksek dalga boyunda absorbans özelliklerinden ftalosiyaninler, naftalosiyaninler ve bunların metal komplekslerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Fotoduyarlı yapılarda istenilen en önemli özellik yüksek dalga boylarında (650-750 nm) güçlü absorbans yapabilmesidir. Böylelikle dokuya derinlemesine etki ederek PDT ile bütün kanser hücrelerine ulaşılabilmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca fotoduyarlı yapıların stabil özellik göstermesi istenir. Naftalosiyaninler 740-780nm gibi yüksek dalga boylarında absorbans gösterirler fakat stabil değildirler. Metal yapılı ftalosiyanin kompleksleri naftalosiyaninlere göre daha stabildirler. Bu yüzden bizde bu çalışmada metal yapılı ftalosiyaninlere ağırlık verilmiştir. Çinko, aliminyum, galyum, ve silikon bağlı ftalosiyanin komplekslerinin yüksek triplet kuantum ürünleri oluşturduğu ve uzun triplet ömürleri olduğu bilinmektedir ki bu PDT için istenilen bir özelliktir.

Ogbodu ve arkadaşları (Ogbodu *ve ark.*, 2015) yaptıkları çalışmada çinko bağlı 3 farklı ftalosiyanin komplekslerinin MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksitelerini incelemişler ve fotodinamik aktivitelerini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmanın in-vitro sitotoksitite testleri sonucu 3 kompleksinde ışık yokluğunda MCF-7 kanser hücre hattında toksik olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca fotodinamik aktiviteleri incelendiğinde yüksek reaktif oksijen ürünlerinin oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Kimani ve çalışma arkadaşları (Kimani *ve ark.*, 2013) ise çinko bağlı ftalosiyaninlerin glikozilasyon ile MCF-7 kanser hücre hattına alımlarını, birikim kinetiklerini, hücre altı yerleşimlerini, in vitro fotositotoksitelerini ve oluşturdukları reaktif oksijen ürünlerini incelemişlerdir. Sonuç olarak fotoduyarlı yapıların hücre içi alımlarında glikozilasyonun ne kadar önemli olduğunu göstermişler ve çinko bağlı ftalosiyaninlerin fotodinamik terapideki güçlü reaktif oluşturma özelliklerini ortaya çıkarmışlardır.

Souto ve diğerkleri (Souto *ve ark.*, 2013) fotobiyolojik aktivitesi yüksek bir foto duyarlı yapı geliştirmek için İndiyum bağılı ftalosiyanın oluşturmuş ve bu metalo-ftalosiyanın MCF-7 kanser hücresleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş In-ftalosiyanın'ın MCF-7 hücresleri üzerinde oluşturdukları reaktif oksijen ürünleri karşılaştırıldığıında enkapsüle yapıların daha rahat çözündüğü ve daha çok hücre içerisine etki ederek fazla reaktif ürün oluşturduğı gözlemlenmiştir.

Young ve çalışma arkadaşları da (Young *ve ark.*, 2016) çinko ve alüminyum bağılı ftalosiyanın yapılarının serbest ve lipozomal şekilde kanserli hücre hatlarına (HSC-3, HeLa) uygulandıklarında (0,1 - 1 μ M konsantrasyon aralığında verildiklerinde) karanlık ortamda toksik olmadıklarını göstermişlerdir. Yüksek dalga boyunda ışıma yapıldıktan sonra ise serbest ve lipozomal olarak verilen ftalosiyanın yapılarının fototoksik olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte çinko bağılı ftalosiyanın HSC-3 (insan dil skuamoz hücresi) hücre hattında, alüminyum bağılı ftalosiyanın ise HeLa (insan apitel adenokarsinom hücre hattı) hücre hattında daha hassas olduğı gözlemlenmiştir. Buda bize farklı kanser hücre hatlarında farklı metalo-ftalosiyanın yapılarının etkilerinin değışebileceğini göstermiştir.

Muehlmann (Muehlmann *ve ark.*, 2015) ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile Alüminyum bağılı ftalosiyanın bileşiklerinin in vitro ortamda MCF-7 kanser hücreslerine karşı etkili olmadığını göstermişlerdir. Bununla birlikte metal bağılı ftalosiyanın molekülleri gibi yapıların hidrofobik olduklarını ve genellikle bunların ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyduklarını belirtmişlerdir. Bu doğırltuda bir nanoemülsiyon geliştirerek alüminyum bağılı ftalosiyanın yapılarının MCF-7 kanser hücresleri üzerindeki etkilerini gözlemlemişlerdir. Sonucunda ise hedefe yönlendirilmiş Al-Pc yapılarının güçlü sitotoksik etkileri ile kanser hücreslerini fotodinamik terapi yöntemi sonucu etkisiz hale getirdiğı gözlemlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak aynı yöntemin uygulanması ile Galyum ve Çinko bağılı ftalosiyanın yapılarının ilaç taşıyıcı sistemler ile meme kanseri hücre hatları üzerindeki etkisi fotodinamik terapi ile araştırılabilir.

Maduray ve Odhav (Maduray ve Odhav, 2013) fotodinamik terapi uygulamak üzere akciğer kanserini seçmişler (A549) ve bu hücre hattına galyum, indium, demir bağılı ftalosiyanın yapılarını uygulamışlardır. Aynı zamanda farklı ışın dozlarındaki (2,5 J/cm², 4,5 J/cm² ve 8,5 J/cm²) etkilerinde incelendiğı çalışmada 40 μ g/mL Fe-Pc verilerek 4,5 J/cm² ışık dozu uygulanan akciğer kanseri hücreslerinin hiçbirinin canlı

kalmadığı belirtilmiştir. Aynı şekilde Ga ve In bağlı ftalosiyanın yapılarında bu kanser hücre hattının öldürülmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma doğrultusunda meme kanseri hücre hatlarına $4,5 \text{ J/cm}^2$ ışık dozu altında IC_{50} dozları uygulandı ve etkileri gözlemlendi.

George ve arkadaşları (George ve ark., 2017) meme kanseri hücre hatları üzerinde Rubus ekstraktını ve ftalosiyanın yapılarını birlikte kullanmışlar ve Maduray'dan farklı olarak yüksek dozda (5 J/cm^2 , 10 J/cm^2 ve 15 J/cm^2) kızıl ötesi ışın (680nm) kullanmışlardır. Sonuç olarak kanserli hücrelerde apoptotik hücre ölümü gözlemlenmiştir ayrıca, ATP proliferasyonunun düşüşü, LDH enziminin artışı da gösterilmiştir. Bulunan bu bulguları da Annexin V/PI flow sitometri sonuçları ile “sitokrom c” miktarının arttığını gösteren verileriyle desteklemişlerdir. Yapılan bu çalışmada benzer yol izlenerek IC_{50} dozlarının belirlenmesinden sonra LDH kiti aracılığı ile enzim değerleri ölçüldü. Ardından yeni sentez olarak oluşturulan 5 sentez arasından en verimli sonuç alınan Çinko ve Galyum bağlı ftalosiyanınların flow sitometrisinde hücre ölüm yollarına ve hücre döngülerine bakıldı.

Karaciğer kanser hücre hattı olan HepG2 üzerine yapılan bir çalışmada Shao ve arkadaşları (Shao ve ark., 2012) öncü foto duyarlı yapı olan fotosiyanın ile çalışmış ve verimli sonuçlar elde etmiştir. Bu sonuçlara göre yüksek dalga boyunda ışıma yapıldıktan sonra fotosiyanın verilmiş olan karaciğer kanser hücrelerinde mitokondri membran potansiyalinin zayıfladığı ve kaspaz 3 aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir.

Avşar ve arkadaşları (Avşar ve ark., 2016) yaptıkları çalışmada Zn (çinko) bağlı ftalosiyanın yapılarının farklı kanser hücre hatlarının hücre içine alınma düzeylerini incelemişlerdir. Bu çalışma sonucu ZnPc 'e nükleer bir yapı olan I-131 yapısını bağlamışlar ve hücre hatları üzerinde görüntüleme yapmışlardır. Ayrıca hücrelerin oluşturdukları singlet oksijen miktarını UV/vis absorpsiyon spektroskopisi ile göstermişlerdir. Sonuç olarak MCF-7 hücre hatlarının yüksek oranda ZnPc 'i hücre içerisine aldıkları ve bu alınan ftalosiyanın sonucunda yüksek dalga boyunda uyarılmasıyla reaktif oksijen ürünlerinin ortaya çıktığı gösterilmiştir.

Calavia ve arkadaşları (García Calavia ve ark., 2018) meme kanseri hücre hatları üzerinde yaptıkları çalışmada bu hücrelere daha hızlı ve hedefe yönelik etki edebilmek için altın nanopartiküllerini kullanmışlardır. Bir laktoz türevi ile çözünebilir hale getirilmiş ve altın nano partikülleri ile stabilize edilmiş çinkolu ftalosiyanın yapılarını

MDA-MB-231 ve SK-BR-3 meme kanseri hücre hatlarına uygulayarak sitotoksosite ölçümü gerçekleştirmişlerdir. Kullanılan laktoz sayesinde sentezlenen yapılar kolaylıkla hücrelerin membranında bulunan galaktin-1 reseptörüne bağlanmış ve hücre içerisine alımı kolaylaştırmıştır. Dube ve arkadaşları (Dube *ve ark.*, 2018) ise altın nano partiküllerini glikozlaştırılmış ftalosiyanın ile birleştirerek farkı nano boyutlarda (küre ve çubuk şeklinde) stabil hale getirerek MCF-7 hücre hattına uygulayarak PDT çalışması yapmışlardır. Sonucunda altın nano partikül ile konjuge edilmiş ftalosiyanın yapılarının sade ftalosiyanine kıyasla daha çok triplet ve singlet oksijen ürünü ürettikleri sonucuna varmışlar. Bununla beraber stabil hale getirilen yapılardan çubuk yapılı altın nano partiküllü ftalosiyanın, küresel yapıya göre daha etkili olduğu belirtilmiş. Yapılan bu çalışmalar ile çalışılan bu proje kıyasladığımızda ilerideki çalışmalarda denenmek üzere ftalosiyanın yapılarının farklı nanopartiküllerle kaplanarak hedefe yönelik olması sağlanabilir.

Bir diğer altın nano partiküllerin kullanıldığı çalışmayı Mfouo-Tyanga ve arkadaşları (Mfouo-Tynga *ve ark.*, 2018) yapmıştır. Altın nano partikülleri ile kapsüle edilen ZnPc'ler MCF-7 hücre hattına uygulanarak hücre geçirgenliklerindeki değişimler, kaspaz aktiviteleri, hücre ölüm yolları ve mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim gözlemlenmiştir. Ayrıca ELISA yöntemiyle sitokrom c miktarları ölçülmüş ve RT-PCR yöntemi ile gen ekspresyonlarındaki değişim araştırılmıştır. 680nm ve 10 J/cm² ışık şiddeti altında yapılan PDT sonucu hücresel hasara sebep olan sitotoksik bulgular edinilmiştir. Kaspaz aktivitesinin arttığı, apoptotik hücresel aktivitelerin olduğu ve apoptotik yolu tetikleyen genlerde upregulasyon olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada da görüldüğü üzere yapılan bu çalışma geliştirilmelere açık ve umut vaat edicidir.

Matlou ve çalışma arkadaşları (Matlou *ve ark.*, 2018) MCF-7 hücre hattı üzerine farklı türde çinko bağlı ftalosiyanın yapıları uygulamışlar ve gözlem yapmışlardır. Bu yapılardan birincisi folik aside bağlanmış, diğeri ise amin ile işlevselleştirilerek manyetik nano partikül haline getirilmiştir. Fotoduyarlı yapıya bağlanan folik asit sayesinde suda çözünür hale gelen ZnPc'nin aynı miktarda singlet oksijen ürettiği gösterilmiştir. Manyetik hale getirilen ftalosiyanın ürününün de suda çözünür olduğu gösterilmiştir. İki kompleks yapının aynı anda MCF-7 hücre hattına uygulandığında kara toksisiteyi düşürdüğü gözlemlenmiştir. Fakat ayrı ayrı uygulandığından ışımaya sonra folik asit bağlı yapıların manyetik etkili yapılara kıyasla daha fazla singlet oksijen ürettiği

gözlemlenmiş. Bu çalışma ışığında ileride yapılacak geliştirme çalışmalarında etkin olarak bulduğumuz Zn ve Ga bağlı ftalosiyanınların folik asitle bağlanması sonucu DMSO yerine suda çözünür hale getirilebilir ve uygulamaları bu şekilde yapılabilir.

Fotodinamik terapide fotoduyarlı yapıların kullanılması kadar bunların dışında farklı yapılar kullanılarakta bu tedavi süreci yönetilmeye çalışılıyor. Santos ve arkadaşları (dos Santos ve ark., 2017) yaptıkları çalışmada metilen mavisini kullanarak sağlıklı ve meme kanseri hücre hatlarında fotodinamik terapi uygulamışlardır. 640 nm dalga boyu ve 4.5 J/cm^2 ışınım sonrasında sağlıklı hücrelere kıyasla meme kanseri hücre hattında hücrelerin apoptoza ve otofajiye daha çok gittikleri gözlemlenmiştir.

Kiew ve diğerlerinin (Kiew ve ark., 2017) yaptığı bir başka çalışmada suda çözünmüş fotoduyarlı yapıların fotodinamik etkilerinin düşüklüğünden bahsedilmiş ve bu durumu gidermek için ftalosiyanın ile glutamik asit konjuge edilerek yeni bir sentez oluşturulmuş. Oluşturulan bu sentezde sade ftalosiyanın kullanılan bir başka örnekle karşılaştırılmış. Yeni sentez ürün kıyaslandığında yüksek hücre oranda hücre içerisine alımı, yüksek oranda singlet oksijen oluşturmasıyla fotodinamik terapi için çok daha yüksek verimli bir yapı olduğunu göstermiştir. Ayrıca ZnPc ile kıyaslandığında konjuge yapının çok daha düşük karanlık toksisite yarattığı ve bunun sonucunda istenmeyen yan etkilerin azaltılabileceği öngörülmüştür.

Etkin sonuç elde ettiğimiz galyum bağlı ftalosiyanınlar (GaPc), Mayahi ve arkadaşları (Mayahi ve ark., 2020) tarafından benzer bir yöntem kullanılarak çalışılmıştır. Bu çalışmada galyum ftalosiyanın klorür (GaPcCl) bileşiklerinin MCF-7 hücre hattında fotodinamik terapideki rolüne ve ekstra radyoterapi ile etkisi incelenmiştir. Farklı dozlarda yapılan denemeler sonucu $100 \mu\text{g/mL}$ GaPcCl verilen MCF-7 hücre hattında yüksek dalga boyunda aktive edilmeden %15 gibi bir hücre ölümü oluşturduğu görülmüştür. Aktive edildikten sonra ise %55 civarında hücreyi apoptoza götürdüğü görülmüştür. Radyoterapi ile kombine edilen PDT'nin ise çok daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Çinko ve kobalt bağlı ftalosiyanınların sentezi üzerine çalışan Şener ve arkadaşları (Şener ve ark., 2019) yaptıkları sitotoksik çalışmada IC_{50} dozlarının bulunmasının ardından MCF-7 hücre hatlarına bu yeni sentezleri uygulayarak PDT aktivitelerini gözlemlemiştir. Bu gözlem sonucu iki sentezinde meme kanseri üzerinde etkili

olduğu fakat ZnPc'nin kıyaslandığından CoPc'ye göre 17.3 kat daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Yapılan bu çalışmalar ışığında yeni sentez elde edilen Zn-Pc, Cu-Pc, Co-Pc, Ga-Pc, In-Pc ve Mn-Pc sentez aşamalarında verimli sonuçlar göstermiş, meme kanseri hücre hattı çalışmalarında ise MCF-7 hücre hattı üzerinde fotodinamik terapi ile ZnPc ve GaPc yapılarının etkin olduğu ortaya konulmuştur. Bahsedilen çalışmalardaki örnekler uygulanarak bu yapılar farklı kaplama yöntemleri uygulanarak hedef kanser dokuya daha kolay ulaşılabilir hale getirilebilme ve etkili bir kanser tedavi yöntemi olarak meme kanserinde kullanılabilme potansiyelinin yüksek olduğu öngörülmüştür.



6. KAYNAKLAR

- Agostinis, P. ve ark. (2011) 'Photodynamic therapy of cancer: an update.', *CA: a cancer journal for clinicians*. Wiley, 61(4), pp. 250–81. doi: 10.3322/caac.20114.
- Al-Husein, B. ve ark. (2012) 'Antiangiogenic therapy for cancer: An update', *Pharmacotherapy*. Pharmacotherapy, pp. 1095–1111. doi: 10.1002/phar.1147.
- Allen, C. M. ve ark (2001) 'Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer', *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. John Wiley and Sons Ltd, 05(02), pp. 161–169. doi: 10.1002/jpp.324.
- Allen, R. L. M. ve Allen, R. L. M. (1971) 'Phthalocyanine pigments and dyes', in *Colour Chemistry*. Springer US, pp. 231–240. doi: 10.1007/978-1-4615-6663-2_15.
- Allison, R. R. ve ark. (2004) 'Photosensitizers in clinical PDT.', *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(1), pp. 27–42. doi: 10.1016/S1572-1000(04)00007-9.
- Allison, R. R. ve Sibata, C. H. (2010) 'Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review', *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, pp. 61–75. doi: 10.1016/j.pdpdt.2010.02.001.
- Andriianova, A. N., Biglova, Y. N. ve Mustafin, A. G. (2020) 'Effect of metal phthalocyanines on the synthesis and physicochemical properties of polyaniline', *Mendeleev Communications*. Elsevier Ltd, 30(5), pp. 624–626. doi: 10.1016/j.mencom.2020.09.024.
- Avşar, G. ve ark. (2016) 'Intracellular uptake and fluorescence imaging potential in tumor cell of zinc phthalocyanine', *International Journal of Pharmaceutics*.

- Elsevier B.V., 505(1–2), pp. 369–375. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.023.
- Aziz, K. J. (1998) ‘Tumor Markers: Reclassification and New Approaches to Evaluation’, *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, 33(C), pp. 169–199. doi: 10.1016/S0065-2423(08)60208-5.
- Baines, C. P. (2010) ‘Role of the mitochondrion in programmed necrosis’, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media SA, 1 NOV(1). doi: 10.3389/fphys.2010.00156.
- Baldes, E. J. (1960) ‘The Photodynamic Properties of a Particular Hematoporphyrin Derivative’, *Archives of Dermatology*. *Arch Dermatol*, 82(4), pp. 508–516. doi: 10.1001/archderm.1960.01580040026005.
- Basanagouda, M. ve ark. (2014) ‘Synthesis, structure–activity relationship of iodinated-4-aryloxymethyl-coumarins as potential anti-cancer and anti-mycobacterial agents’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, pp. 225–233. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.12.061.
- Beg, A. A. (2002) ‘Endogenous ligands of Toll-like receptors: Implications for regulating inflammatory and immune responses’, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd, pp. 509–512. doi: 10.1016/S1471-4906(02)02317-7.
- Ben-Hur, E. ve ark. (no date) Release of clotting factors from photosensitized endothelial cells: a possible trigger for blood vessel occlusion by photodynamic therapy.
- Bilgiçli, A. T. ve ark. (2012) ‘Highly selective thioalcohol modified phthalocyanine sensors for Ag(i) and Pd(ii) based on target induced J- and H-type aggregations: Synthesis, electrochemistry and peripheral metal ion binding studies’, *Dalton Transactions*. The Royal Society of Chemistry, 41(23), pp. 7047–7056. doi: 10.1039/c2dt30244f.
- Bilgiçli, A. T. ve ark. (2020) ‘The new ball-type zinc phthalocyanine with S[bnbd]S bridge; Synthesis, computational and photophysicochemical properties’, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Elsevier B.V., 389, p. 112287. doi: 10.1016/j.jphotochem.2019.112287.
- Brackett, C. M. ve ark. (2011) ‘IL-6 potentiates tumor resistance to photodynamic

- therapy (PDT)', *Lasers in Surgery and Medicine*, 43(7), pp. 676–685. doi: 10.1002/lsm.21107.
- Bratton, D. L. ve ark. (1997) 'Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium- mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase', *Journal of Biological Chemistry. J Biol Chem*, 272(42), pp. 26159–26165. doi: 10.1074/jbc.272.42.26159.
- Braun, A. and Tcherniac, J. (1907) 'Über die Produkte der Einwirkung von Acetanhydrid auf Phthalamid', *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. John Wiley & Sons, Ltd*, 40(2), pp. 2709–2714. doi: 10.1002/cber.190704002202.
- Brennan, P. (2002) 'Gene-environment interaction and aetiology of cancer: What does it mean and how can we measure it?', *Carcinogenesis. Oxford University Press*, 23(3), pp. 381–387. doi: 10.1093/carcin/23.3.381.
- Brown, S. B. ve ark. (2004) 'The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment', *Lancet Oncology*, pp. 497–508. doi: 10.1016/S1470-2045(04)01529-3.
- Castano, A. P., Demidova, T. N. ve Hamblin, M. R. (2004) 'Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization', *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. Elsevier*, pp. 279–293. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4.
- Castano, A. P., Mroz, P. ve Hamblin, M. R. (2006) 'Photodynamic therapy and anti-tumour immunity', *Nature Reviews Cancer. NIH Public Access*, pp. 535–545. doi: 10.1038/nrc1894.
- Cecic, I. ve Korbelik, M. (2002) 'Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors', *Cancer Letters. Cancer Lett*, 183(1), pp. 43–51. doi: 10.1016/S0304-3835(02)00092-7.
- Chauke, V., Durmuş, M. ve Nyokong, T. (2007) 'Photochemistry, photophysics and nonlinear optical parameters of phenoxy and tert-butylphenoxy substituted indium(III) phthalocyanines', *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 192(2–3), pp. 179–187. doi: 10.1016/j.jphotochem.2007.05.022.

- Chen, B. ve ark. (2005) 'Combining vascular and cellular targeting regimens enhances the efficacy of photodynamic therapy', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 61(4), pp. 1216–1226. doi: 10.1016/j.ijrobp.2004.08.006.
- Chlu, S. M. ve Olelnick, N. L. (2001) 'Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy', *British Journal of Cancer*. *Br J Cancer*, 84(8), pp. 1099–1106. doi: 10.1054/bjoc.2000.1714.
- Cho, Y. ve ark. (2011) 'RIP1-Dependent and Independent Effects of Necrostatin-1 in Necrosis and T Cell Activation', *PLoS ONE*. Edited by J. Alberola-Ila. Public Library of Science, 6(8), p. e23209. doi: 10.1371/journal.pone.0023209.
- Christofferson, D. E. ve ark. (2012) 'A novel role for RIP1 kinase in mediating TNF α production', *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group, 3(6), p. 320. doi: 10.1038/cddis.2012.64.
- Conrad, M. ve ark. (2016) 'Regulated necrosis: Disease relevance and therapeutic opportunities', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, pp. 348–366. doi: 10.1038/nrd.2015.6.
- Dai, X. ve ark. (2017) 'Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping', *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher, pp. 3131–3141. doi: 10.7150/jca.18457.
- Daniell, M. D. ve Hill, J. S. (1991) 'A HISTORY OF PHOTODYNAMIC THERAPY', *Australian and New Zealand Journal of Surgery*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 340–348. doi: 10.1111/j.1445-2197.1991.tb00230.x.
- Davidenko, N. A. ve ark. (2020) 'Photoconducting polymeric nanocomposites and their application in holographic interferometry', in *Handbook of Nanomaterials for Manufacturing Applications*. Elsevier, pp. 345–417. doi: 10.1016/b978-0-12-821381-0.00016-8.
- Demir, F. ve ark. (2019) 'Metallo-phthalocyanines containing thiazole moieties: Synthesis, characterization, electrochemical and spectroelectrochemical properties and sensor applications', *Journal of Electroanalytical Chemistry*.

- Elsevier B.V., 832, pp. 254–265. doi: 10.1016/j.jelechem.2018.11.003.
- Denes, G. (1998) 'Phthalocyanines: Properties and Applications, Volume 4 Edited by C. C. Leznoff and A. B. P. Lever (York University, Canada). VCH: New York, 1996. vi + 524 pp. \$150.00. ISBN 1-56081-916-2.', *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society (ACS), 120(1), pp. 241–242. doi: 10.1021/ja965771a.
- Di, X. ve ark. (2013) 'Accumulation of autophagosomes in breast cancer cells induces TRAIL resistance through downregulation of surface expression of death receptors 4 and 5', *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 4(9), pp. 1349–1364. doi: 10.18632/oncotarget.1174.
- Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D. and Jain, R. K. (2003) 'Photodynamic therapy for cancer', *Nature Reviews Cancer*, pp. 380–387. doi: 10.1038/nrc1071.
- Dube, E. ve ark. (2018) 'Glycosylated zinc phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates for photodynamic therapy: Effect of nanoparticle shape', *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier B.V., 203, pp. 85–95. doi: 10.1016/j.saa.2018.05.081.
- Engelberg-Kulka, H. ve ark. (2006) 'Bacterial Programmed Cell Death and Multicellular Behavior in Bacteria', *PLoS Genetics*. Edited by S. Rosenberg. Public Library of Science, 2(10), p. e135. doi: 10.1371/journal.pgen.0020135.
- Erental, A., Sharon, I. ve Engelberg-Kulka, H. (2012) 'Two programmed cell death systems in escherichia coli: An apoptotic-like death is inhibited by the mazef-mediated death pathway', *PLoS Biology*. Public Library of Science, 10(3), p. 1001281. doi: 10.1371/journal.pbio.1001281.
- Ewenstein, B. M. ve ark. (1987) 'Composition of the von Willebrand factor storage organelle (Weibel-Palade body) isolated from cultured human umbilical vein endothelial cells', *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press, 104(5), pp. 1423–1433. doi: 10.1083/jcb.104.5.1423.
- Filipan-Litvić, M., Litvić, M. ve Vinković, V. (2008) 'A highly efficient biomimetic aromatization of Hantzsch-1,4-dihydropyridines with t-butylhydroperoxide, catalysed by iron(III) phthalocyanine chloride', *Bioorganic and Medicinal*

- Chemistry. Pergamon, 16(20), pp. 9276–9282. doi: 10.1016/j.bmc.2008.09.004.
- Fingar, V. H. ve ark. (1999) ‘Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD)’, *British Journal of Cancer*. Churchill Livingstone, 79(11–12), pp. 1702–1708. doi: 10.1038/sj.bjc.6690271.
- Fingar, V. H., Wieman, T. J. ve Haydon, P. S. (1997) ‘The Effects of Thrombocytopenia on Vessel Stasis and Macromolecular Leakage after Photodynamic Therapy Using Photofrin’, *Photochemistry and Photobiology*. American Society for Photobiology, 66(4), pp. 513–517. doi: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb03182.x.
- Foote, C. S. (1991) ‘Definition Of Type I And Type II Photosensitized Oxidation’, *Photochemistry and Photobiology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 659–659. doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x.
- Galluzzi, L. ve ark. (2012) ‘Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012’, *Cell Death and Differentiation*. Cell Death Differ, pp. 107–120. doi: 10.1038/cdd.2011.96.
- García Calavia, P. ve ark. (2018) ‘Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using lactose-phthalocyanine functionalized gold nanoparticles’, *Journal of Colloid and Interface Science*. Academic Press Inc., 512, pp. 249–259. doi: 10.1016/j.jcis.2017.10.030.
- Garg, A. D., Nowis, D., Golab, J., Vandenabeele, P., ve ark. (2010) ‘Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation’, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Biochim Biophys Acta, pp. 53–71. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.08.003.
- Garg, A. D. ve ark. (2010) ‘Photodynamic therapy: Illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity’, *Apoptosis*. Apoptosis, pp. 1050–1071. doi: 10.1007/s10495-010-0479-7.
- Garg, A. D. ve ark. (2015) ‘Autophagy, a major adaptation pathway shaping cancer cell death and anticancer immunity responses following photodynamic therapy’, *Photochemical and Photobiological Sciences*. Royal Society of Chemistry, pp.

1410–1424. doi: 10.1039/c4pp00466c.

- Gebicki, J. M. (2016) 'Oxidative stress, free radicals and protein peroxides', *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press Inc., pp. 33–39. doi: 10.1016/j.abb.2015.10.021.
- George, B. P., Abrahamse, H. ve Hemmaragala, N. M. (2017) 'Anticancer effects elicited by combination of Rubus extract with phthalocyanine photosensitizer on MCF-7 human breast cancer cells', *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier B.V., 19, pp. 266–273. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.06.014.
- George, B. P., Abrahamse, H. ve Hemmaragala, N. M. (2017b) 'Anticancer effects elicited by combination of Rubus extract with phthalocyanine photosensitizer on MCF-7 human breast cancer cells', *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier B.V., 19, pp. 266–273. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.06.014.
- Giorgi, C., Bonora, M., Missiroli, S., ve ark. (2015) 'Intravital imaging reveals p53-dependent cancer cell death induced by phototherapy via calcium signaling', *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 6(3), pp. 1435–1445. doi: 10.18632/oncotarget.2935.
- Giorgi, C., Bonora, M., Sorrentino, G., ve ark. (2015) 'P53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca²⁺-dependent manner', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 112(6), pp. 1779–1784. doi: 10.1073/pnas.1410723112.
- Gök, Y. ve ark. (2018) 'Novel peripherally and non-peripherally hydrobenzoin substituted optically active phthalocyanines: Synthesis, characterization, aggregation, electrochemical properties and catalytic applications', *Polyhedron*. Elsevier Ltd, 153, pp. 128–138. doi: 10.1016/j.poly.2018.06.053.
- Gollnick, S. O. ve ark. (2003) 'Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation', *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 88(11), pp. 1772–1779. doi: 10.1038/sj.bjc.6600864.
- Gozuacik, D. ve Kimchi, A. (2007) 'Autophagy and Cell Death', *Current Topics in Developmental Biology*. Curr Top Dev Biol, pp. 217–245. doi: 10.1016/S0070-2153(06)78006-1.

- Günsel, A. ve ark. (2017) 'Synthesis and investigation of photophysicochemical properties of novel ketone-substituted gallium (III) and indium (III) phthalocyanines with high singlet oxygen yield for photodynamic therapy', *Journal of Luminescence*. Elsevier B.V., 192, pp. 888–892. doi: 10.1016/j.jlumin.2017.08.014.
- Günsel, A. ve ark. (2019) 'Selective chemosensor phthalocyanines for Pd 2+ ions; synthesis, characterization, quantum chemical calculation, photochemical and photophysical properties', *Journal of Molecular Structure*. Elsevier B.V., 1180, pp. 127–138. doi: 10.1016/j.molstruc.2018.11.094.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2000) 'The hallmarks of cancer', *Cell*. Cell, pp. 57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: The next generation', *Cell*. Elsevier, pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hippeli, S., Heiser, I. ve Elstner, E. F. (1999) 'Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants', *Plant Physiology and Biochemistry*. ESME - Gauthier-Villars, pp. 167–178. doi: 10.1016/S0981-9428(99)80031-X.
- Hwang, H. S. ve ark. (2018) 'Combination of photodynamic therapy (PDT) and anti-tumor immunity in cancer therapy', *Journal of Pharmaceutical Investigation*. Springer Netherlands, pp. 143–151. doi: 10.1007/s40005-017-0377-x.
- Hyndman, I. J. (2016) 'Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours', *Cancer Microenvironment*. Springer New York LLC, pp. 63–69. doi: 10.1007/s12307-016-0183-4.
- Jain, K. ve ark. (2013) 'Autophagy in breast cancer and its implications for therapy', *American Journal of Cancer Research*. E-Century Publishing Corporation, pp. 251–265. Available at: www.ajcr.us/ (Accessed: 22 September 2020).
- Juarranz, Á. ve ark. (2008a) 'Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications', *Clinical and Translational Oncology*. Springer, 10(3), pp. 148–154. doi: 10.1007/s12094-008-0172-2.

- Juarranz, Á. ve ark. (2008b) 'Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications', *Clinical and Translational Oncology*. Clin Transl Oncol, 10(3), pp. 148–154. doi: 10.1007/s12094-008-0172-2.
- Ke, B. ve ark. (2016) 'Targeting Programmed Cell Death Using Small-Molecule Compounds to Improve Potential Cancer Therapy', *Medicinal Research Reviews*. John Wiley and Sons Inc., 36(6), pp. 983–1035. doi: 10.1002/med.21398.
- Kessel, D. ve Reiners, J. J. (2007) 'Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage', in *Photochemistry and Photobiology*. NIH Public Access, pp. 1024–1028. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00088.x.
- Kiew, L. V. ve ark. (2017) 'Near-infrared activatable phthalocyanine-poly-L-glutamic acid conjugate: increased cellular uptake and light–dark toxicity ratio toward an effective photodynamic cancer therapy', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Elsevier Inc., 13(4), pp. 1447–1458. doi: 10.1016/j.nano.2017.02.002.
- Kim, D. H., Hwang, H. S. ve Na, K. (2018) 'Photoresponsive Micelle-Incorporated Doxorubicin for Chemo-Photodynamic Therapy to Achieve Synergistic Antitumor Effects', *Biomacromolecules*. American Chemical Society, 19(8), pp. 3301–3310. doi: 10.1021/acs.biomac.8b00607.
- Kimani, S. G. ve ark. (2013) 'Fully Protected Glycosylated Zinc (II) Phthalocyanine Shows High Uptake and Photodynamic Cytotoxicity in MCF-7 Cancer Cells', *Photochemistry and Photobiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 89(1), pp. 139–149. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01204.x.
- Kırbaç, E. ve Erdoğan, A. (2020) 'New non-peripherally substituted zinc phthalocyanines; synthesis, and comparative photophysical properties', *Journal of Molecular Structure*. Elsevier B.V., 1202, p. 127392. doi: 10.1016/j.molstruc.2019.127392.
- Kroemer, G. ve ark. (2009) 'Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, pp. 3–11. doi: 10.1038/cdd.2008.150.

- Krzykawska-Serda, M. ve ark. (2014) 'The role of strong hypoxia in tumors after treatment in the outcome of bacteriochlorin-based photodynamic therapy (PDT)', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.003.
- Kurohane, K. ve ark. (2001) 'Photodynamic therapy targeted to tumor-induced angiogenic vessels', *Cancer Letters*. *Cancer Lett*, 167(1), pp. 49–56. doi: 10.1016/S0304-3835(01)00475-X.
- Lamkanfi, M. ve ark. (2007) 'Caspases in cell survival, proliferation and differentiation', *Cell Death and Differentiation*. *Cell Death Differ*, pp. 44–55. doi: 10.1038/sj.cdd.4402047.
- Lemasters, J. J. (2005) 'Dying a thousand deaths: Redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis', *Gastroenterology*. W.B. Saunders, 129(1), pp. 351–360. doi: 10.1053/j.gastro.2005.06.006.
- Li, L. ve ark. (2021) 'Expert consensus on diagnosis, treatment and fertility management of young breast cancer patients', *Journal of the National Cancer Center*. Elsevier. doi: 10.1016/j.jncc.2021.02.001.
- Li, W. ve ark. (2013) 'Coumarins and Lignans from *Zanthoxylum schinifolium* and Their Anticancer Activities', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(45), pp. 10730–10740. doi: 10.1021/jf403479c.
- Li, X. ve ark. (2017) 'Activatable Photosensitizers: Agents for Selective Photodynamic Therapy', *Advanced Functional Materials*. Wiley-VCH Verlag. doi: 10.1002/adfm.201604053.
- Li, X., Lee, S. ve Yoon, J. (2018) 'Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy', *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry, pp. 1174–1188. doi: 10.1039/c7cs00594f.
- Liu, T. ve ark. (2021) 'Small-molecule inhibitors of breast cancer-related targets: Potential therapeutic agents for breast cancer', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson s.r.l., p. 112954. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112954.

- Longo, J. P. F. ve ark. (2009) 'Photodynamic therapy with aluminum-chlorophthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors', *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Elsevier, 94(2), pp. 143–146. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.11.003.
- Lv, D. ve ark. (2020) 'Effects of single layer graphene and graphene oxide modification on the properties of phthalocyanine blue pigments', *Dyes and Pigments*. Elsevier Ltd, 180, p. 108449. doi: 10.1016/j.dyepig.2020.108449.
- Maduray, K. ve Odhav, B. (2013) 'The in vitro photodynamic effect of laser activated gallium, indium and iron phthalocyanine chlorides on human lung adenocarcinoma cells', *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Elsevier, 128, pp. 58–63. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.08.003.
- Mansoori, B. ve ark. (2019) 'Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products', *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier B.V., pp. 395–404. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.04.033.
- Matlou, G. G. ve ark. (2018) 'Photodynamic therapy activity of zinc phthalocyanine linked to folic acid and magnetic nanoparticles', *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Elsevier B.V., 186, pp. 216–224. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.07.025.
- Matroule, J.-Y., Volanti, C. ve Piette, J. (2006) 'NF- κ B in Photodynamic Therapy: Discrepancies of a Master Regulator', *Photochemistry and Photobiology*. Wiley, 82(5), p. 1241. doi: 10.1562/2006-03-30-ir-862.
- Mayahi, S. ve ark. (2020) 'Investigation of combined photodynamic and radiotherapy effects of gallium phthalocyanine chloride on MCF-7 breast cancer cells', *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. Springer, 25(1), pp. 39–48. doi: 10.1007/s00775-019-01730-w.
- Mfouo-Tynga, I. ve Abrahamse, H. (2015) 'Cell death pathways and phthalocyanine as an efficient agent for photodynamic cancer therapy', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, pp. 10228–10241. doi: 10.3390/ijms160510228.
- Mfouo-Tynga, I., Houreld, Nicolette N. ve Abrahamse, H. (2018) 'Characterization of a multiple particle delivery complex and determination of cellular photodamage in

- skin fibroblast and breast cancer cell lines', *Journal of Biophotonics*. Wiley-VCH Verlag, 11(2), p. e201700077. doi: 10.1002/jbio.201700077.
- Mfouo-Tynga, I., Houreld, Nicolette Nadene ve Abrahamse, H. (2018) 'Evaluation of cell damage induced by irradiated Zinc-Phthalocyanine-gold dendrimeric nanoparticles in a breast cancer cell line', *Biomedical Journal*. Elsevier B.V., 41(4), pp. 254–264. doi: 10.1016/j.bj.2018.05.002.
- Michaud, M. ve ark. (2014) 'An autophagy-dependent anticancer immune response determines the efficacy of melanoma chemotherapy', *OncoImmunology*. Landes Bioscience, 3(7). doi: 10.4161/21624011.2014.944047.
- Milne, A. N. ve ark. (2009) 'Nature meets nurture: Molecular genetics of gastric cancer', *Human Genetics*. Hum Genet, pp. 615–628. doi: 10.1007/s00439-009-0722-x.
- Mizushima, N. ve Klionsky, D. J. (2007) 'Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism', *Annual Review of Nutrition*. Annual Reviews, 27(1), pp. 19–40. doi: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093749.
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, Gitika B., ve ark. (2011) 'Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer', *Cancers*. Cancers (Basel), pp. 2516–2539. doi: 10.3390/cancers3022516.
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, Gitika B, ve ark. (2011) 'Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer', *Cancers*. Molecular Diversity Preservation International, 3(2), pp. 2516–2539. doi: 10.3390/cancers3022516.
- Mroz, P., Hashmi, J. T., ve ark. (2011) 'Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy', *Expert Review of Clinical Immunology*, pp. 75–91. doi: 10.1586/eci.10.81.
- Muehlmann, A. L. ve ark. (2015) 'Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells', *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central Ltd., 13(1), p. 36. doi: 10.1186/s12951-015-0095-3.

- Nelson, J. S., Liaw, L.-H. ve Berns, M. W. (1987) 'Tumor Destruction In Photodynamic Therapy', *Photochemistry and Photobiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 46(5), pp. 829–836. doi: 10.1111/j.1751-1097.1987.tb04855.x.
- Niki, E. (2014) 'Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier, pp. 809–817. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.03.020.
- Nikoletopoulou, V. ve ark. (2013) 'Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Biochim Biophys Acta, pp. 3448–3459. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.
- O'Connor, A. E., Gallagher, W. M. ve Byrne, A. T. (2009) 'Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy', *Photochemistry and Photobiology*. Photochem Photobiol, pp. 1053–1074. doi: 10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x.
- Ogbodu, R. O. ve ark. (2015) 'Photophysical properties and photodynamic therapy effect of zinc phthalocyanine-spermine-single walled carbon nanotube conjugate on MCF-7 breast cancer cell line', *Synthetic Metals*. Elsevier Ltd, 204, pp. 122–132. doi: 10.1016/j.synthmet.2015.03.011.
- Oleinick, N. L., Morris, R. L. and Belichenko, I. (2002) 'The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how', *Photochemical and Photobiological Sciences*. The Royal Society of Chemistry, pp. 1–21. doi: 10.1039/b108586g.
- Olgac, R. ve ark. (2017) 'Zinc(II) phthalocyanine fused in peripheral positions octa-substituted with alkyl linked carbazole: Synthesis, electropolymerization and its electro-optic and biosensor applications', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier Ltd, 98, pp. 202–209. doi: 10.1016/j.bios.2017.06.028.
- Oliveira, C. S. ve ark. (2011) 'Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency', *Free Radical Biology and Medicine*. Pergamon, 51(4), pp. 824–833. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.023.
- Ormond, A. ve Freeman, H. (2013) 'Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy',

- Materials. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 6(3), pp. 817–840. doi: 10.3390/ma6030817.
- Osiecka, B. ve ark. (2009) ‘A brief history of photodynamic therapy in Wrocław’, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier, 6(2), pp. 79–81. doi: 10.1016/j.pdpdt.2009.07.004.
- Ou, C. ve ark. (2021) ‘Structural, photophysical and nonlinear optical limiting properties of sandwich phthalocyanines with different rare earth metals’, *Dyes and Pigments*. Elsevier Ltd, 184, p. 108862. doi: 10.1016/j.dyepig.2020.108862.
- Ouyang, L. ve ark. (2012) ‘Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis’, *Cell Proliferation*. Cell Prolif, 45(6), pp. 487–498. doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.
- Peng, W. ve ark. (2020) ‘Targeted Photodynamic Therapy of Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with Anti-epidermal Growth Factor Receptor Antibody Cetuximab and Photosensitizer IR700DX in the Mouse Skin-fold Window Chamber Model’, *Photochemistry and Photobiology*. Blackwell Publishing Inc., 96(3), pp. 708–717. doi: 10.1111/php.13267.
- Piotrowski, W. J. ve ark. (2004) ‘Inhalations of 5-ALA in photodynamic diagnosis of bronchial cancer’, *Monaldi Archives for Chest Disease - Pulmonary Series*. PI-ME Tipografia Editrice S.r.l., 61(2), pp. 86–93. doi: 10.4081/monaldi.2004.705.
- Poprac, P. ve ark. (2017) ‘Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases’, *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 592–607. doi: 10.1016/j.tips.2017.04.005.
- Powell, M. E. B. ve ark. (1999) ‘Improvement in human tumour oxygenation with carbogen of varying carbon dioxide concentrations’, *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier, 50(2), pp. 167–171. doi: 10.1016/S0167-8140(98)00123-6.
- R, A. ve ark. (2001) ‘The history of photodetection and photodynamic therapy’, *Photochemistry and photobiology*. Photochem Photobiol, 74(5). doi: 10.1562/0031-8655(2001)074<0656:THOPAP>2.0.CO;2.
- Reginato, E. (2014) ‘Immune response after photodynamic therapy increases anti-

- cancer and anti-bacterial effects', *World Journal of Immunology*. Baishideng Publishing Group Inc., 4(1), p. 1. doi: 10.5411/wji.v4.i1.1.
- Reiter, G. (2014) 'Some unique features of polymer crystallisation', *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry, pp. 2055–2065. doi: 10.1039/c3cs60306g.
- Rui, Z. ve Liu, J. (2020) 'Understanding of free radical scavengers used in highly durable proton exchange membranes', *Progress in Natural Science: Materials International*. Elsevier B.V., pp. 732–742. doi: 10.1016/j.pnsc.2020.08.013.
- Saidi, R. F., Marcon, N. E. ve Marcon, E. (1998) 'Nonthermal ablation of malignant esophageal strictures: Photodynamic therapy, endoscopic intratumoral injections, and novel modalities', *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*. W.B. Saunders, pp. 465–491. doi: 10.1016/s1052-5157(18)30273-3.
- Saka, E. T., Durmuş, M. ve Kantekin, H. (2011) 'Solvent and central metal effects on the photophysical and photochemical properties of 4-benzyloxybenzoxy substituted phthalocyanines', *Journal of Organometallic Chemistry*. Elsevier, 696(4), pp. 913–924. doi: 10.1016/j.jorganchem.2010.10.024.
- dos Santos, A. F. ve ark. (2017) 'Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells', *BMC Cancer*. BioMed Central Ltd., 17(1). doi: 10.1186/s12885-017-3179-7.
- Şener, S. ve ark. (2019) 'Synthesis, characterization, and DFT study of novel metallo phthalocyanines with four carboranyl clusters as photosensitisers for the photodynamic therapy of breast cancer cells', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier B.V., 129, pp. 124–131. doi: 10.1016/j.ejps.2018.12.017.
- Separovic, D. ve ark. (2011) 'Combining anticancer agents photodynamic therapy and LCL85 leads to distinct changes in the sphingolipid profile, autophagy, caspase-3 activation in the absence of cell death, and long-term sensitization', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. NIH Public Access, 409(3), pp. 372–377. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.091.
- Shao, J. ve ark. (2012) 'Inhibition of human hepatocellular carcinoma HepG2 by phthalocyanine photosensitiser PHOTOCYANINE: ROS production, apoptosis,

- cell cycle arrest', *European Journal of Cancer*. Pergamon, 48(13), pp. 2086–2096. doi: 10.1016/j.ejca.2011.10.013.
- Shao, J. ve ark. (2013) 'Intracellular distribution and mechanisms of actions of photosensitizer Zinc(II)-phthalocyanine solubilized in Cremophor EL against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 330(1), pp. 49–56. doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.017.
- Souto, C. A. Z. ve ark. (2013) 'Improved photodynamic action of nanoparticles loaded with indium (III) phthalocyanine on MCF-7 breast cancer cells', *Journal of Nanoparticle Research*. Springer, 15(9), pp. 1–19. doi: 10.1007/s11051-013-1879-8.
- Stott, B. ve Korbelik, M. (2007) 'Activation of complement C3, C5, and C9 genes in tumors treated by photodynamic therapy', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56(5), pp. 649–658. doi: 10.1007/s00262-006-0221-z.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J. ve Futreal, P. A. (2009) 'The cancer genome', *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 719–724. doi: 10.1038/nature07943.
- Tsujimoto, Y. ve Shimizu, S. (2005) 'Another way to die: Autophagic programmed cell death', *Cell Death and Differentiation*. Cell Death Differ, pp. 1528–1534. doi: 10.1038/sj.cdd.4401777.
- Vabulas, R. M., Wagner, H. and Schild, H. (2002) 'Heat shock proteins as ligands of Toll-like receptors', *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Verlag, pp. 169–184. doi: 10.1007/978-3-642-59430-4_11.
- De Vree, W. J. A. ve ark. (1996) Evidence for an Important Role of Neutrophils in the Efficacy of Photodynamic Therapy in Vivo¹, *CANCER RESEARCH*.
- Wang, X. Q. ve ark. (2021) 'Free radicals for cancer theranostics', *Biomaterials*. Elsevier Ltd, p. 120474. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120474.
- Wen, X., Li, Y. ve Hamblin, M. R. (2017) 'Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: An update', *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier B.V., pp. 140–152. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.06.010.
- Wöhrle, D. (1993) 'Phthalocyanines: Properties and applications. Edited by C. C.

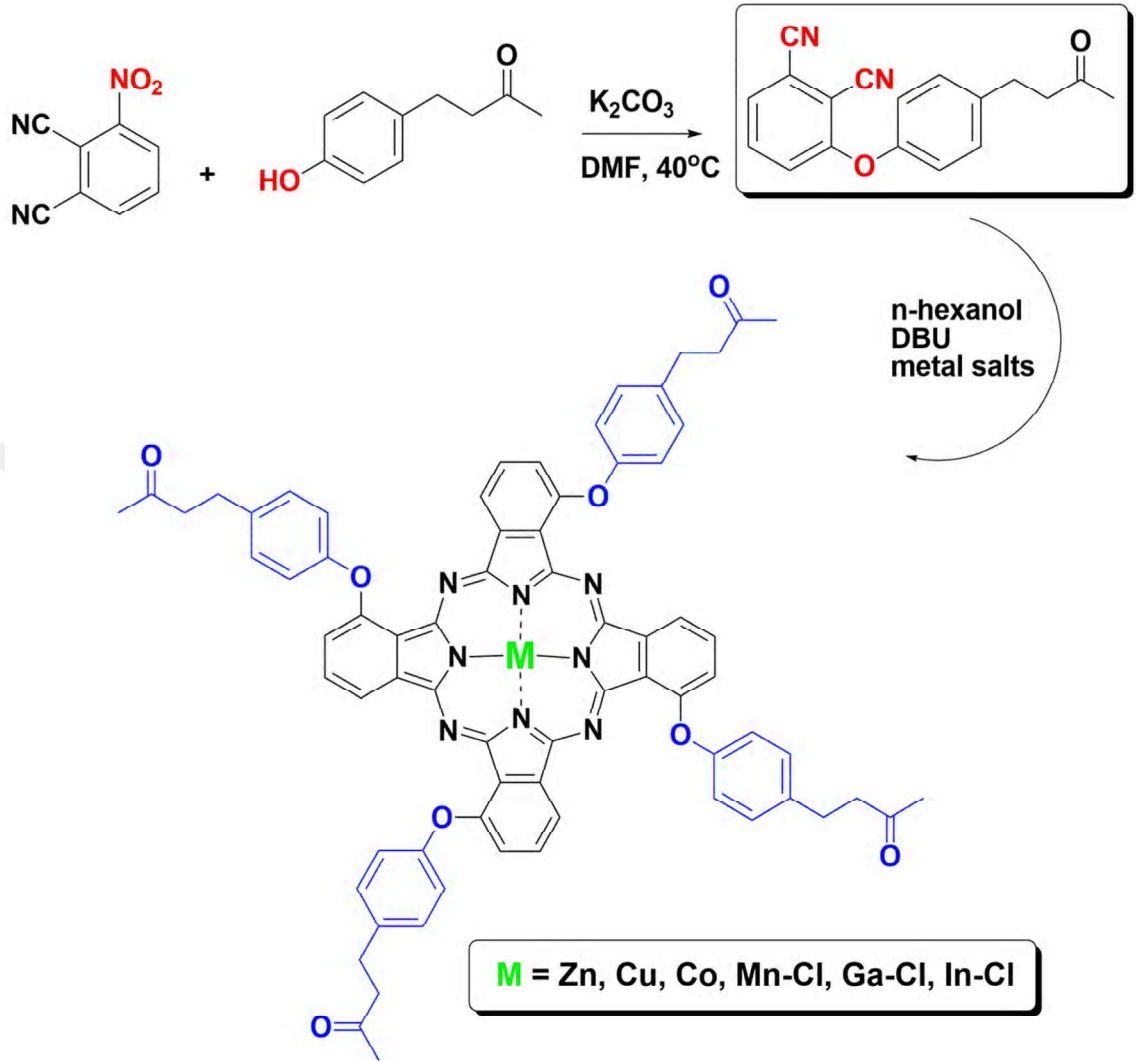
- Leznoff and A. B. P. Lever, VCH, Weinheim. Volume 1, 1989, 436 pp., ISBN 3-527-26955-X; Volume 2, 1993, 305 pp., DM 268, ISBN 3-527-89544-2', *Advanced Materials*. Wiley, 5(12), pp. 942–943. doi: 10.1002/adma.19930051217.
- Wöhrle, D. (1993b) 'Phthalocyanines: Properties and applications. Edited by C. C. Leznoff and A. B. P. Lever, VCH, Weinheim. Volume 1, 1989, 436 pp., ISBN 3-527-26955-X; Volume 2, 1993, 305 pp., DM 268, ISBN 3-527-89544-2', *Advanced Materials*. Wiley, 5(12), pp. 942–943. doi: 10.1002/adma.19930051217.
- Wood, S. R., Holroyd, J. A. ve Brown, S. B. (1997) 'The subcellular localization of Zn(II) phthalocyanines and their redistribution on exposure to light', in *Photochemistry and Photobiology*. Blackwell Publishing Inc., pp. 397–402. doi: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb08577.x.
- Woźniak, Z. ve ark. (2020) 'Photodynamic diagnosis and photodynamic therapy in basal cell carcinoma using a novel laser light source', *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier B.V., 31, p. 101883. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101883.
- Xiao, W. ve ark. (2021) 'Fluorinated dendritic silicon (IV) phthalocyanines nanoparticles: Synthesis, photoinduced intramolecular energy transfer and DNA interaction', *Dyes and Pigments*. Elsevier Ltd, 186, p. 109013. doi: 10.1016/j.dyepig.2020.109013.
- Xie, Z. ve Klionsky, D. J. (2007) 'Autophagosome formation: Core machinery and adaptations', *Nature Cell Biology*. Nat Cell Biol, pp. 1102–1109. doi: 10.1038/ncb1007-1102.
- Xue, L. Y., Chiu, S. M. and Oleinick, N. L. (2010) 'Atg7 deficiency increases resistance of MCF-7 human breast cancer cells to photodynamic therapy', *Autophagy*. Taylor and Francis Inc., 6(2), pp. 248–255. doi: 10.4161/auto.6.2.11077.
- Yan, Y. ve ark. (2020) 'A fullerene based hybrid nanoparticle facilitates enhanced photodynamic therapy via changing light source and oxygen consumption', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V., 186, p. 110700. doi:

10.1016/j.colsurfb.2019.110700.

- Yano, S. ve ark. (2011) 'Current states and future views in photodynamic therapy', *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. Elsevier, pp. 46–67. doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2011.06.001.
- Young, J. ve ark. (2016) 'Phototoxicity of Liposomal Zn- and Al-phthalocyanine Against Cervical and Oral Squamous Cell Carcinoma Cells In Vitro', *Medical science monitor basic research*. International Scientific Information, Inc., 22, pp. 156–164. doi: 10.12659/MSMBR.901039.
- Yu, L. ve ark. (2006) 'Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, pp. 4952–4957. doi: 10.1073/pnas.0511288103.
- Yuan, J. ve Kroemer, G. (2010) 'Alternative cell death mechanisms in development and beyond', *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 2592–2602. doi: 10.1101/gad.1984410.
- Zhang, H., Ma, W. and Li, Y. (2009) 'Generation of effective vaccines against liver cancer by using photodynamic therapy', *Lasers in Medical Science*. *Lasers Med Sci*, 24(4), pp. 549–552. doi: 10.1007/s10103-008-0609-4.

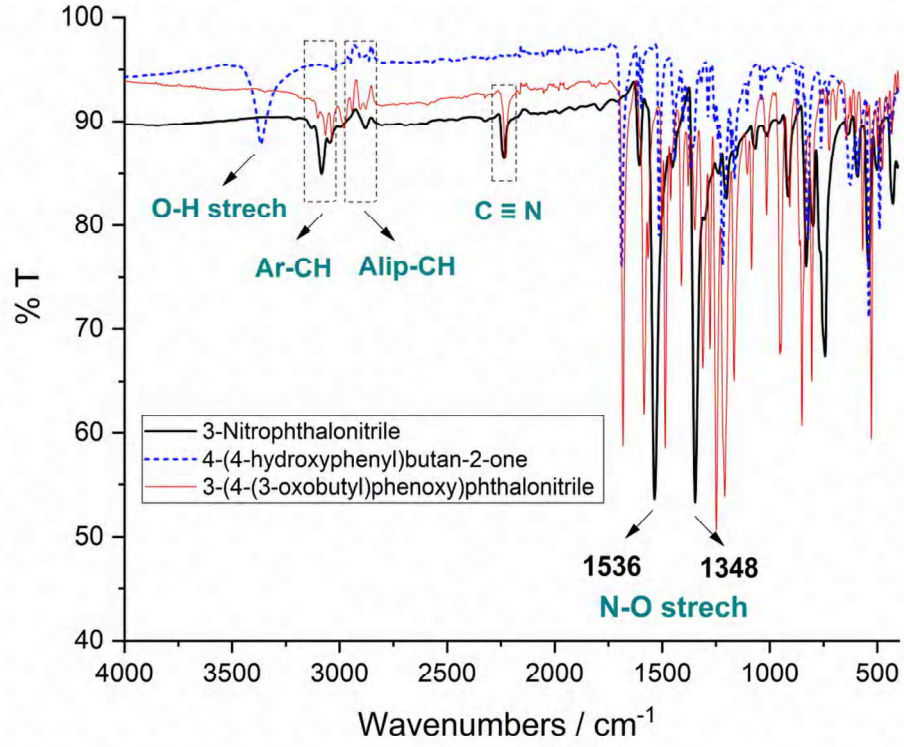
EKLER

Ek-1



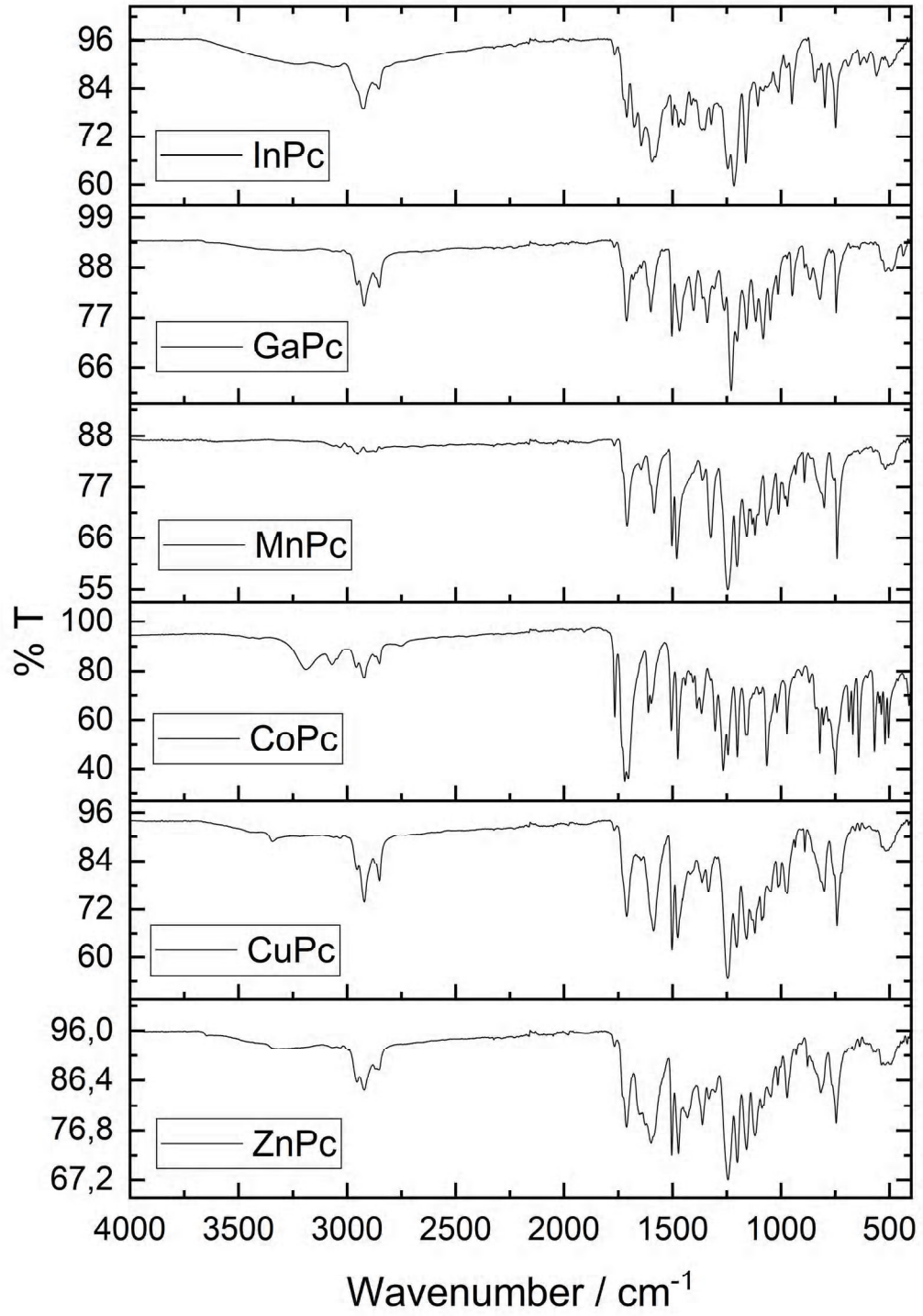
Ek-1 3- (4- (3-oksobutyl) fenoksi) ftalonitril (1) ve yeni tip metaloftalosiyenin türevlerinin sentezi

Ek-2



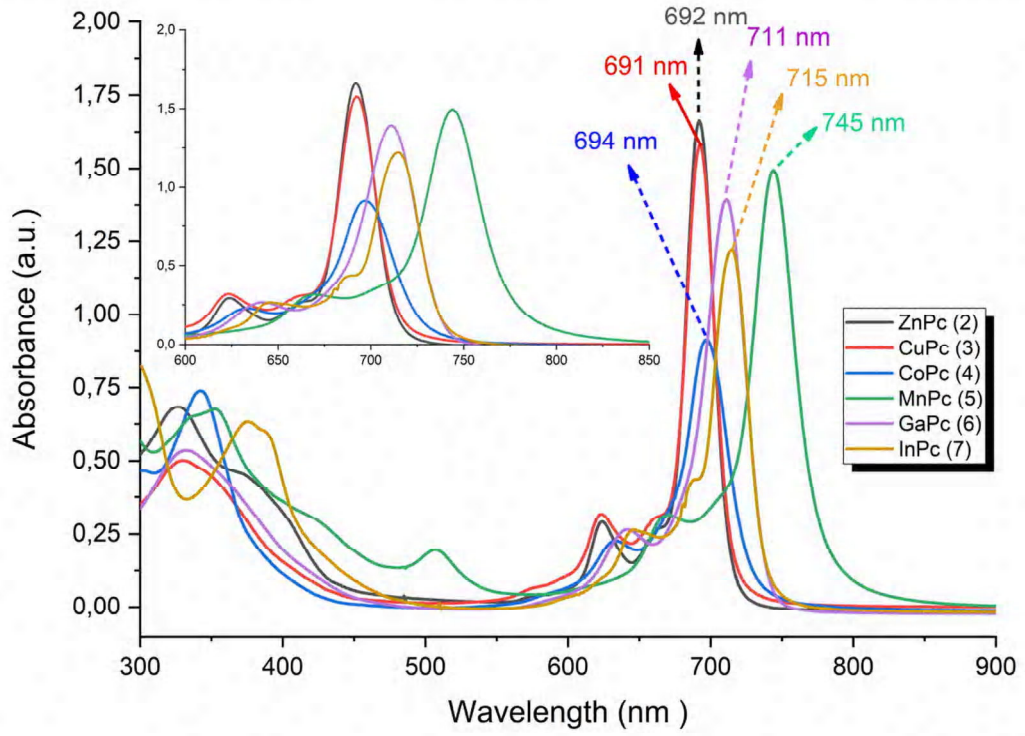
Ek-2 3-nitroftalonitril, 4- (4-hidroksifenil) bütan-2-on ve 3- (4- (3-oksobutil) fenoksi) ftalonitril FTIR spektrumları

Ek-3



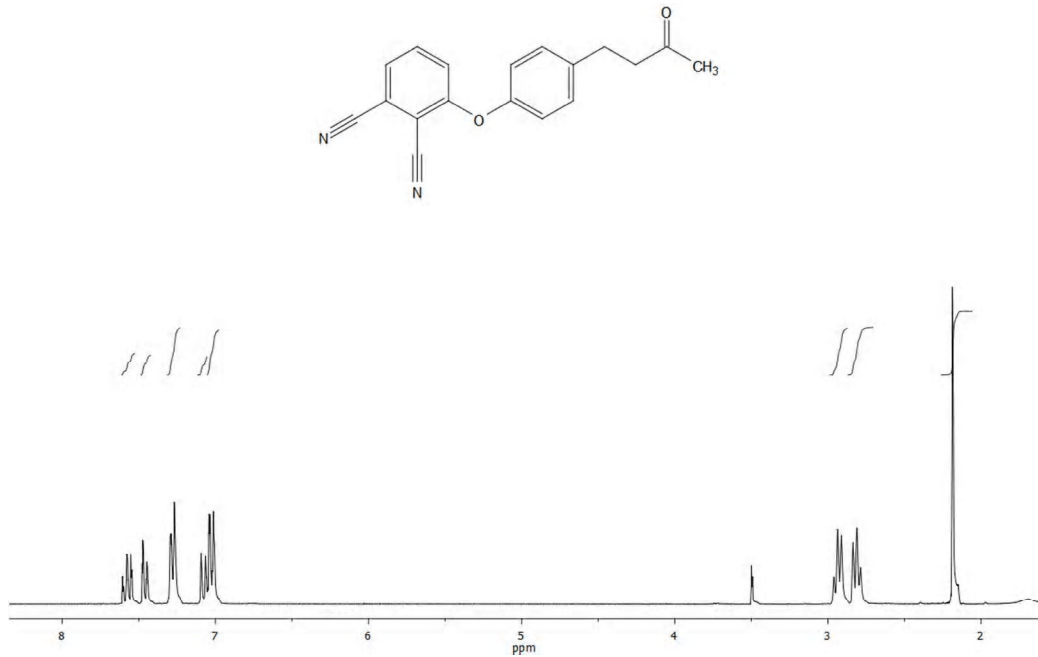
Ek-3 Yeni sentezlenmiş ftalosiyeninlerin FTIR spektrumları

Ek-4



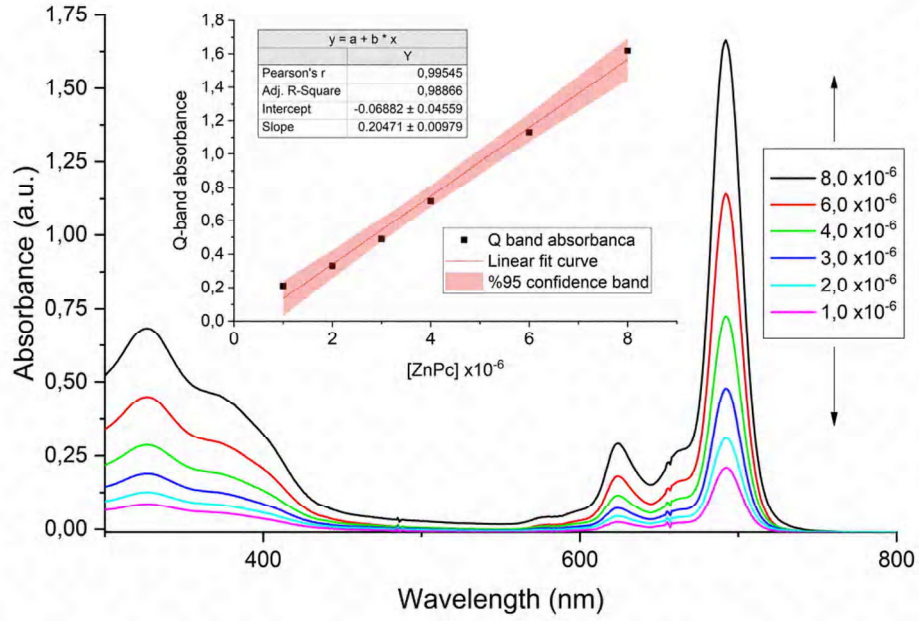
Ek-4 THF'de yeni sentezlenmiş ftalosiyanınların UV-Vis spektrumları (ek: 600 nm ile 850 nm arasındaki elektronik spektrum bölgesi).

Ek-5



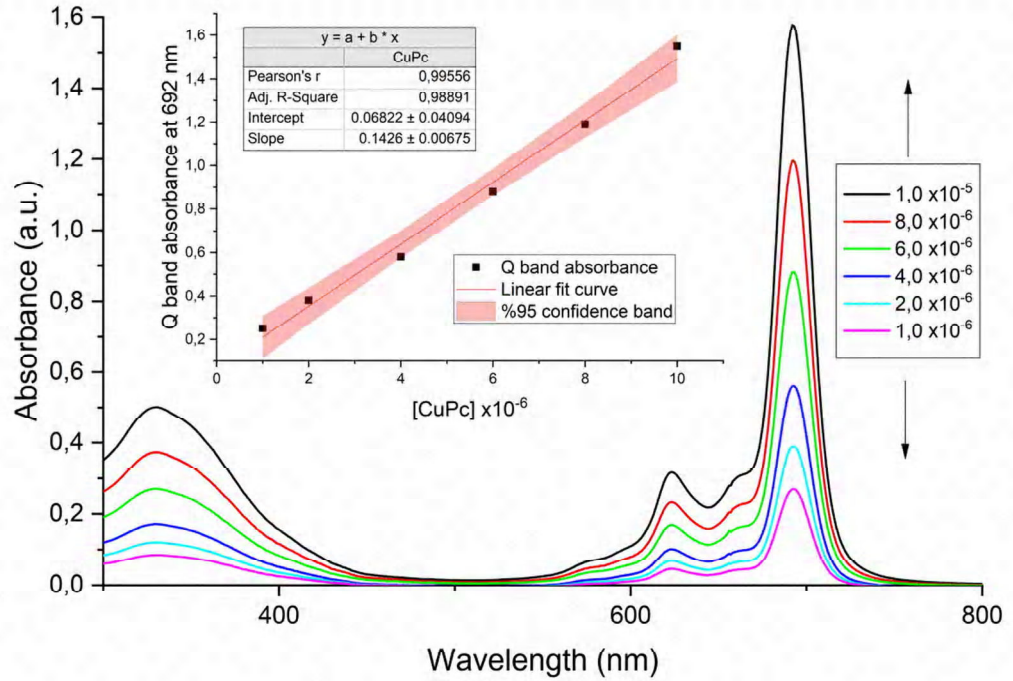
Ek-5 3- (4- (3-oksobutyl) fenoksi) ftalonitrilin -NMR spektrumları

Ek-6



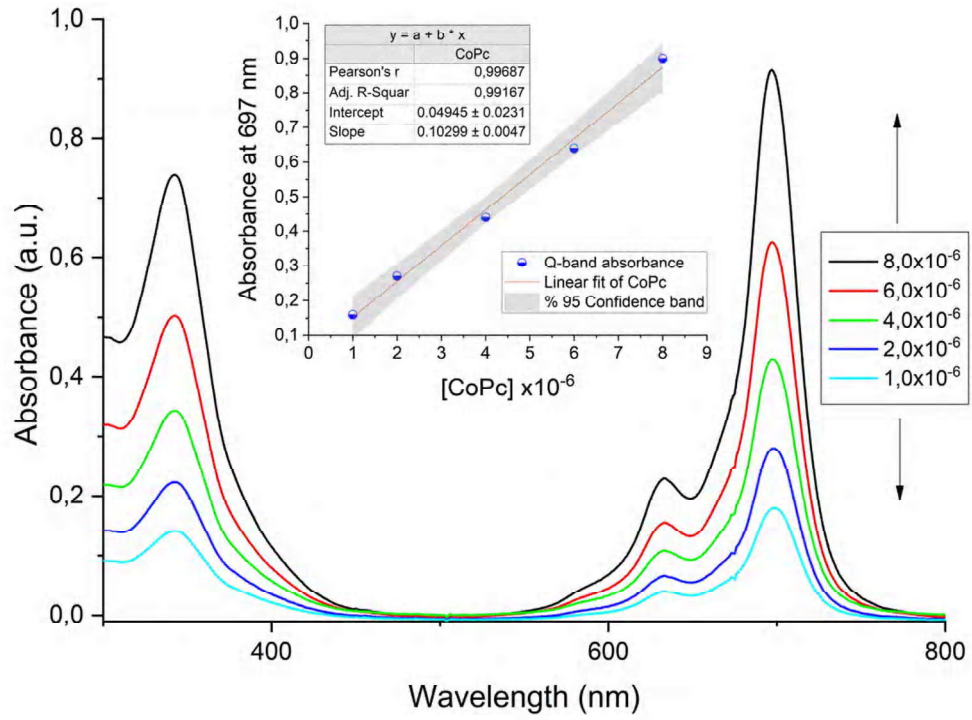
Ek-6 THF'de farklı konsantrasyon değerlerinde ZnPc'nin elektronik spektrumları (ek: konsantrasyona karşı Q-bandı absorbansı).

Ek-7



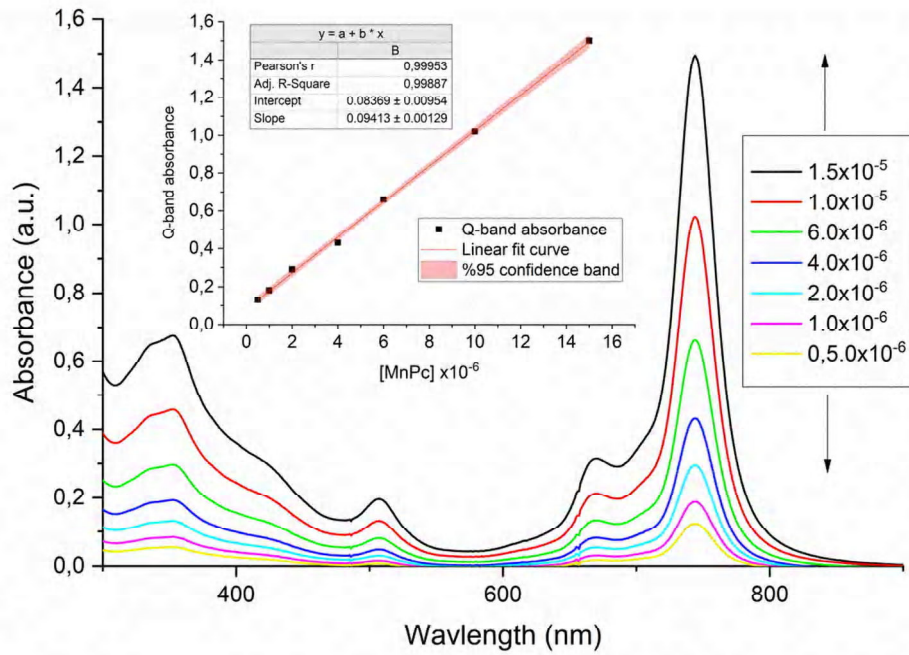
Ek-7 THF'de farklı konsantrasyon değerlerinde CuPc'nin elektronik spektrumları (ek: konsantrasyona karşı Q-bandı absorbansı).

Ek-8



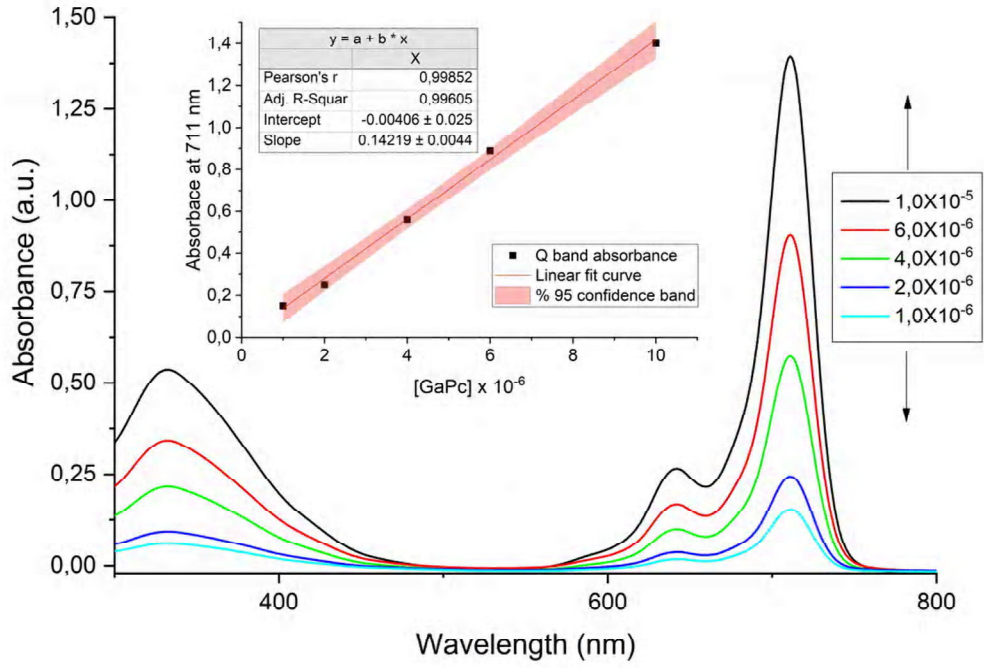
Ek-8 THF'de farklı konsantrasyon değerlerinde CoPc'nin elektronik spektrumları (ek: konsantrasyona karşı Q-bandı absorbansı).

Ek-9



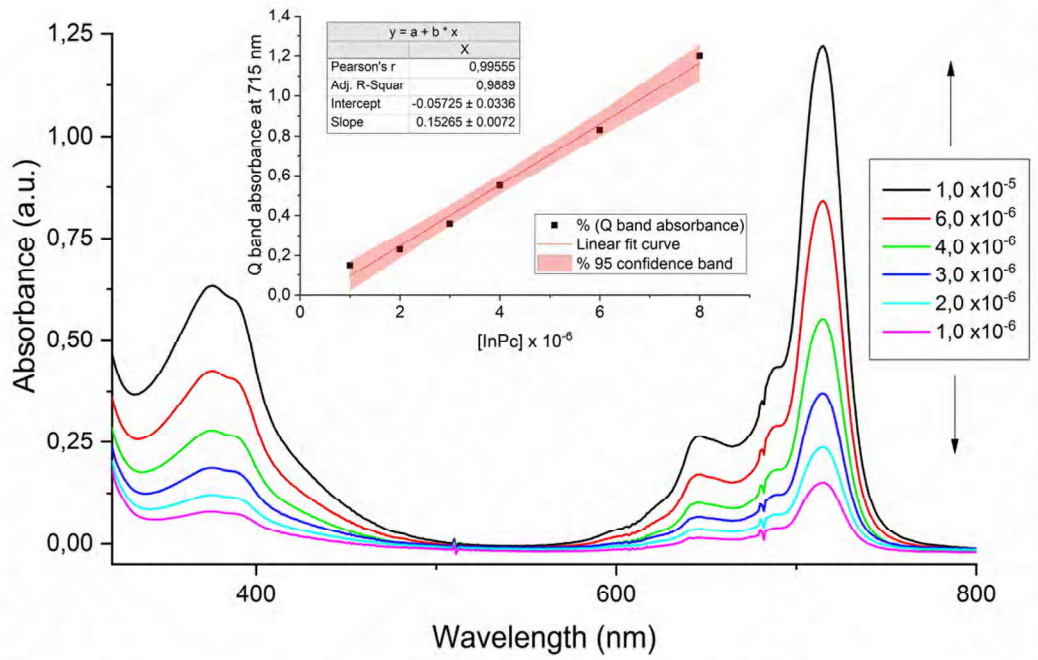
Ek-9 THF'de farklı konsantrasyon değerlerinde MnPc'nin elektronik spektrumları (ek: konsantrasyona karşı Q-bandı absorbansı).

Ek-10



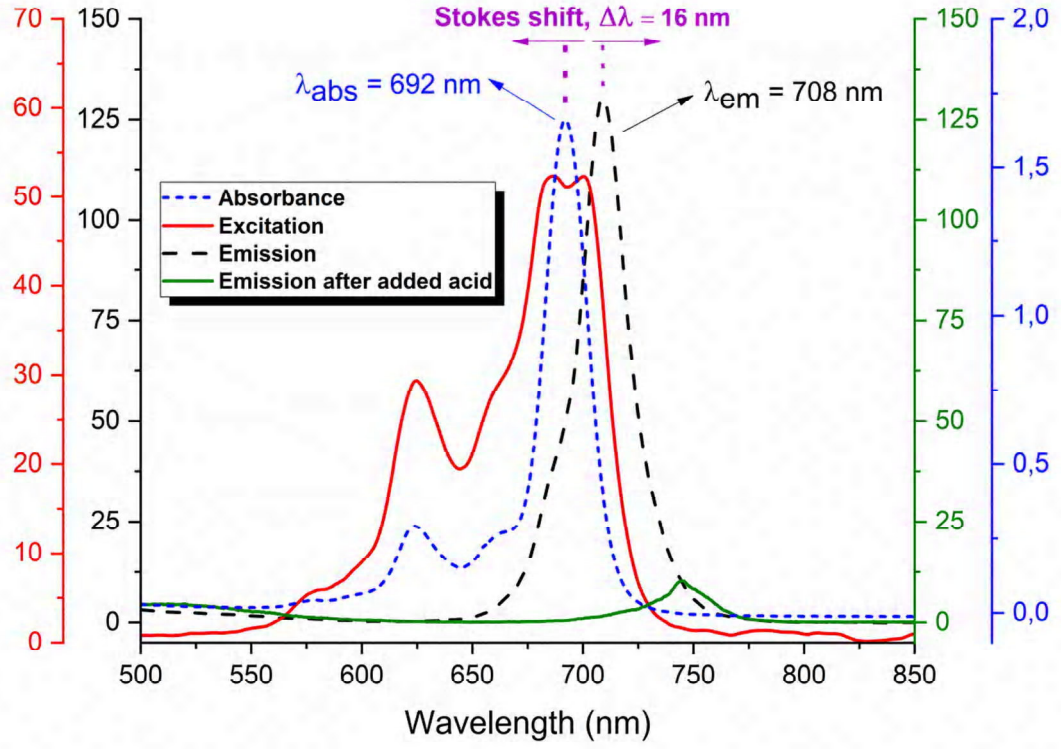
Ek-10 THF'de farklı konsantrasyon değerlerinde GaPc'nin elektronik spektrumları (ek: konsantrasyona karşı Q-bandı absorbansı)

Ek-11



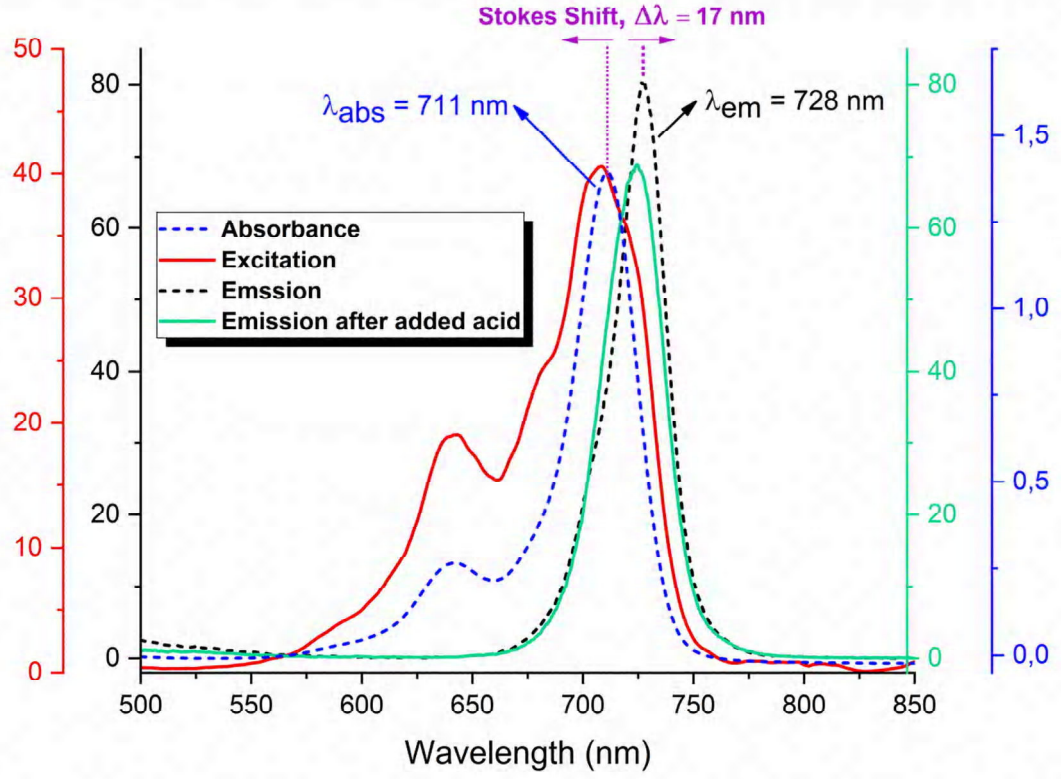
Ek-11 THF'de farklı konsantrasyon değerlerinde InPc'nin elektronik spektrumları (ek: konsantrasyona karşı Q-bandı absorbansı).

Ek-12



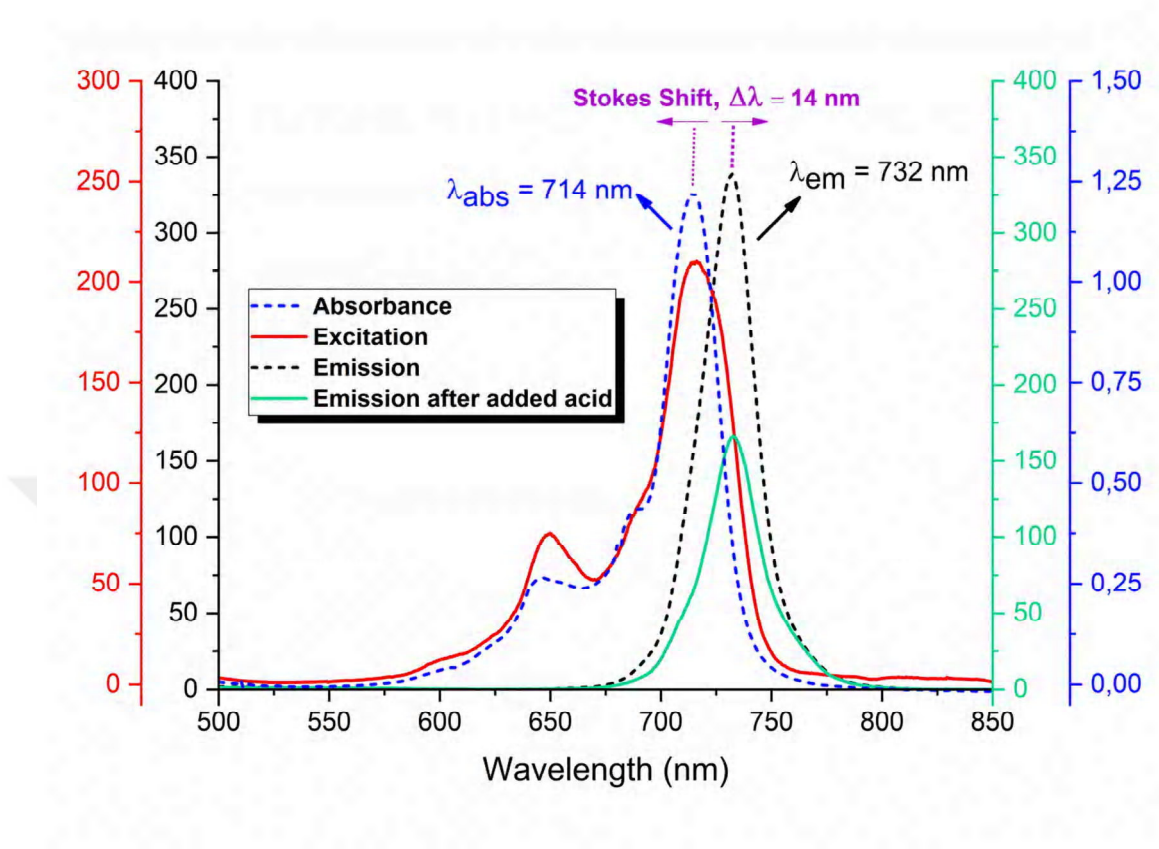
Ek-12 ZnPc'nin soğurma, uyarılma ve emisyon spektrumları ve asit ilavesinden sonra emisyon spektrumlarının değişimi.

Ek-13



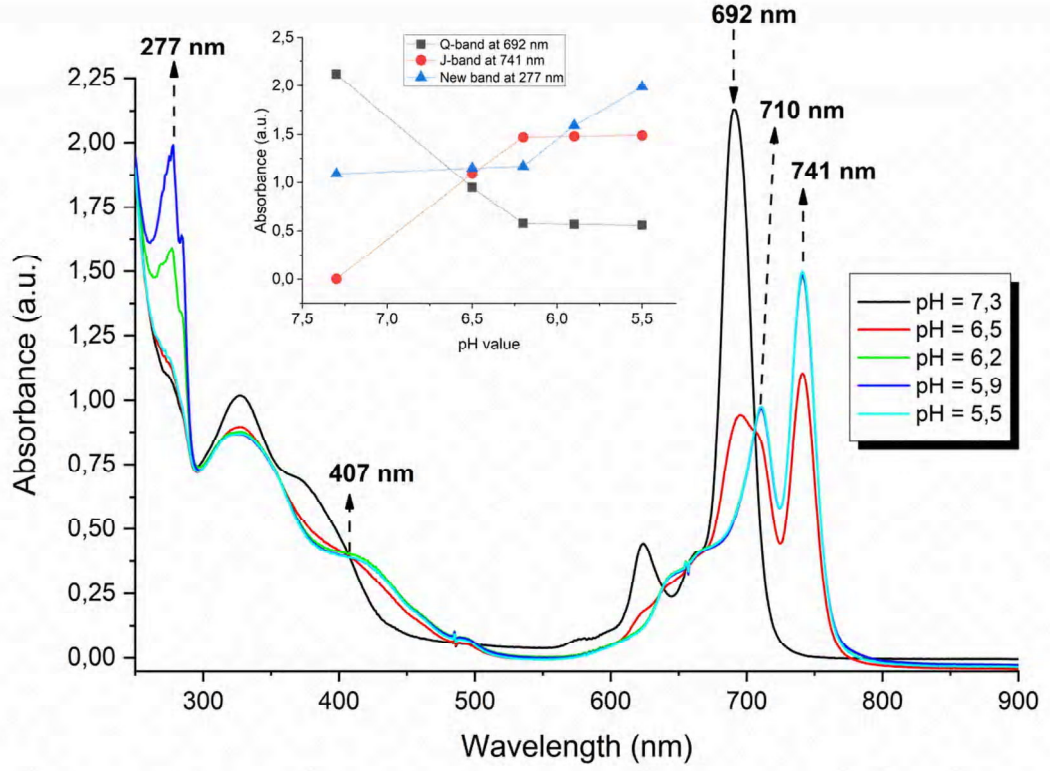
Ek-13 GaPc'nin soğurma, uyarılma ve emisyon spektrumları ve asit ilavesinden sonra emisyon spektrumlarının değişimi.

Ek-14



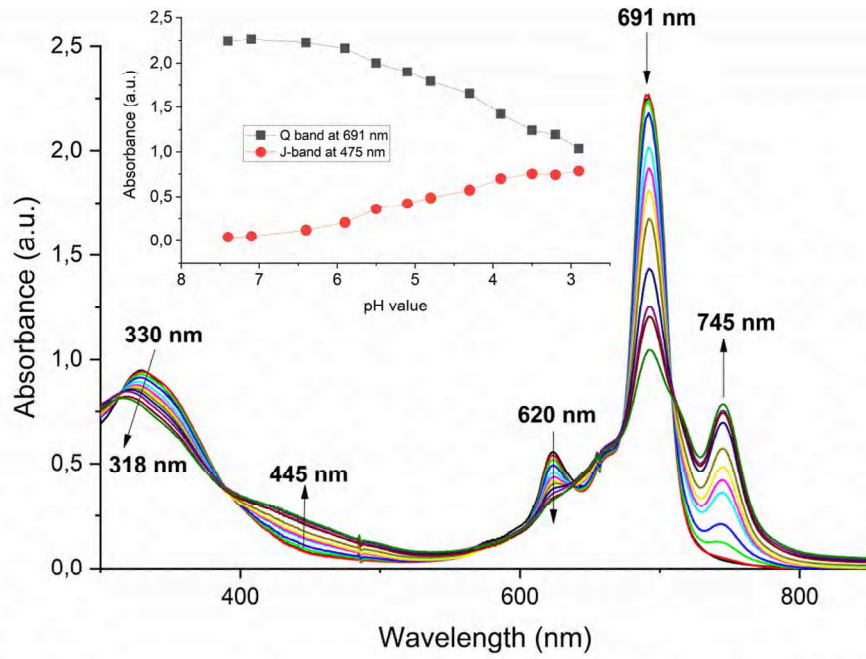
Ek-14 InPc'nin soğurma, uyarılma ve emisyon spektrumları ve asit ilavesinden sonra emisyon spektrumlarının değişimi.

Ek-15



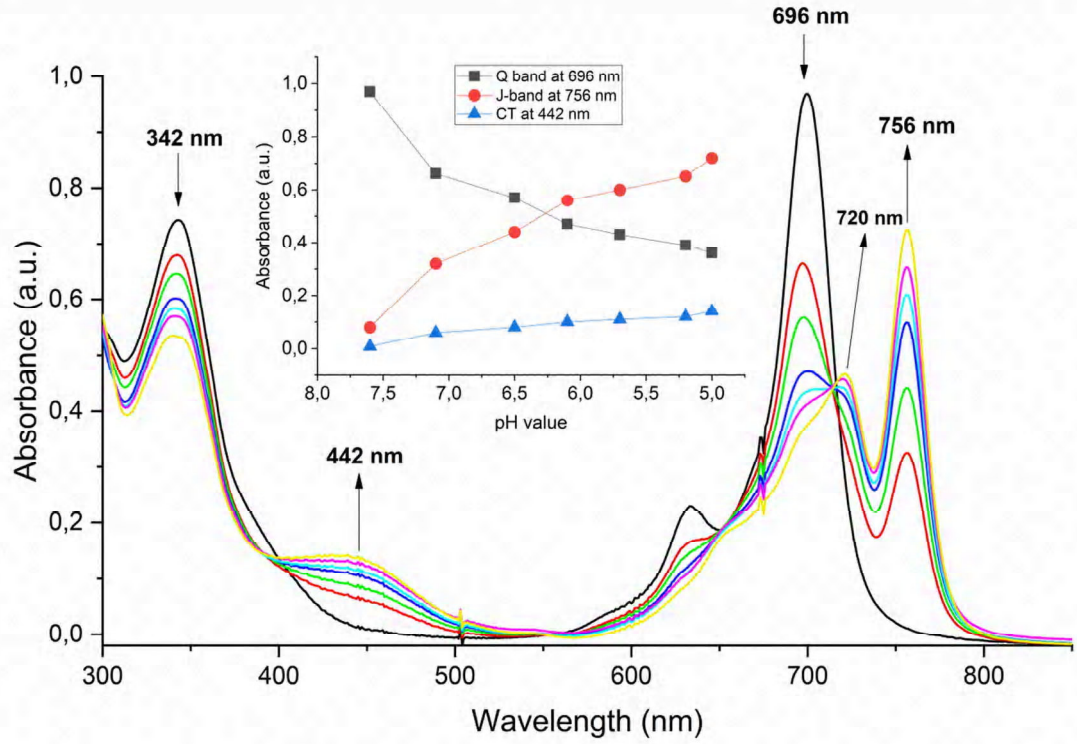
Ek-15 ZnPc'nin farklı pH değerlerinde UV-Vis spektrumları (ek: pH değerine karşı Q-bandı ve J-bandı absorbansının değişimi).

Ek-16



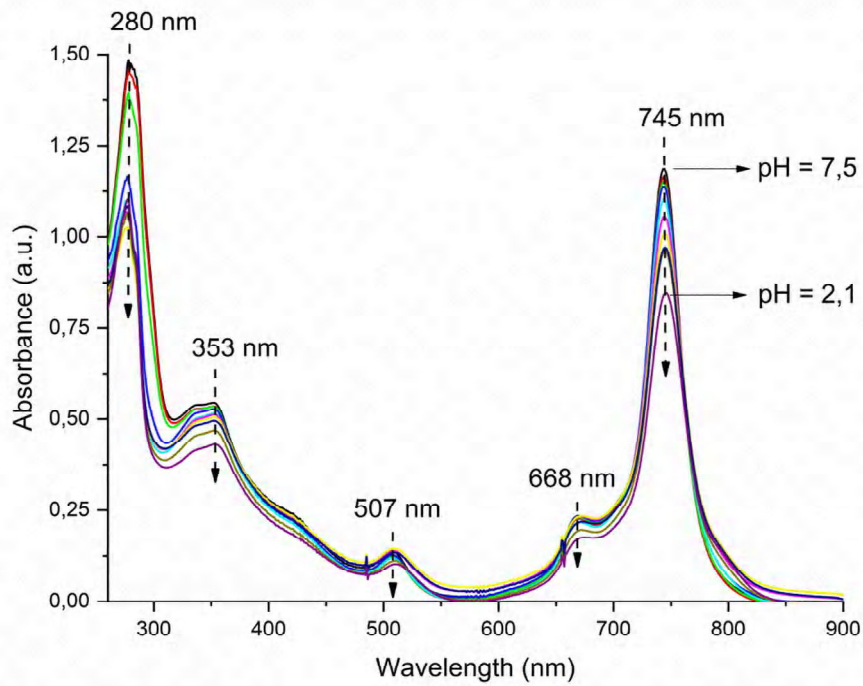
Ek-16 CuPc'in farklı pH değerlerinde UV-Vis spektrumları (ek: Q-bandı ve J-bandı absorbansının pH değerine göre değişimi).

Ek-17



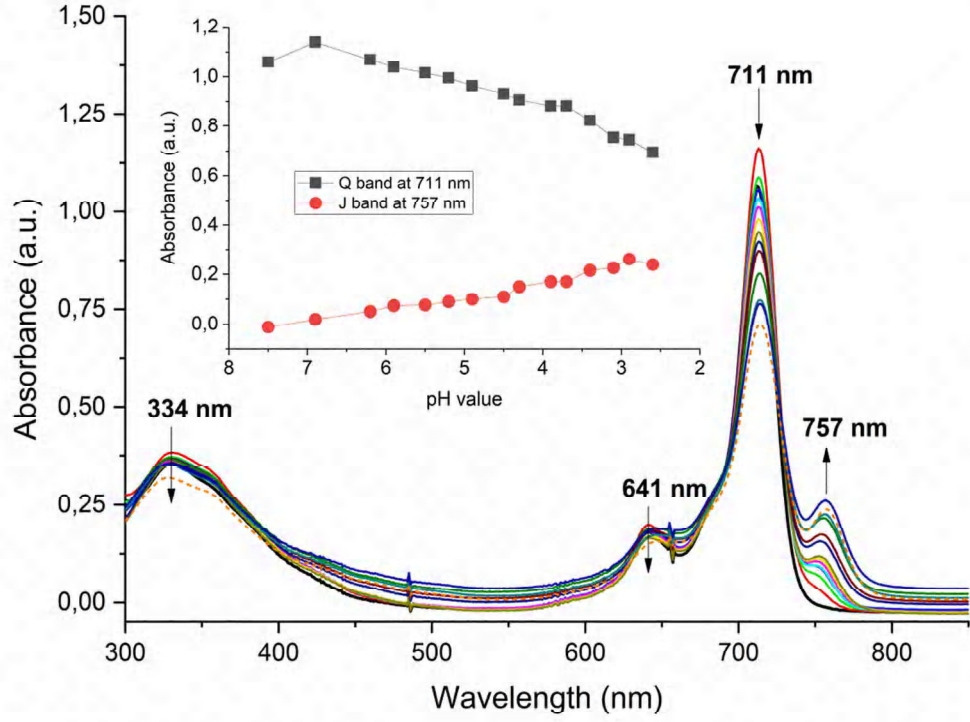
Ek-17 CoPc'in farklı pH değerlerinde UV-Vis spektrumları (ek: Q-bandı ve J-bandı absorbansının pH değerine karşı değişimi).

Ek-18



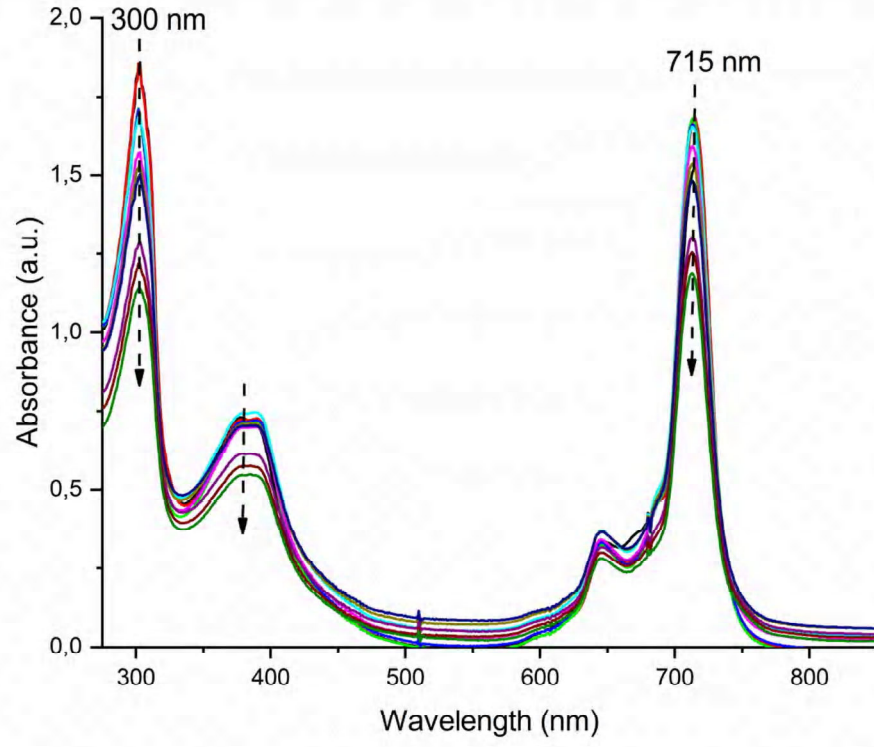
Ek-18 MnPc'in farklı pH değerlerinde UV-Vis spektrumları.

Ek-19



Ek-19 GaPc'nin farklı pH değerlerinde UV-Vis spektrumları (ek: Q-bandı ve J-bandı absorbansının pH değerine göre değişimi).

Ek-20



Ek-20 InPc'nin farklı pH değerlerinde UV-Vis spektrumları

FARKLI METALOF TALOSİYANİN ÜRÜNLERİNİN MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

% **12**
BENZERLİK ENDEKSİ

% **9**
İNTERNET KAYNAKLARI

% **2**
YAYINLAR

% **7**
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
2	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Karadeniz Teknik University Öğrenci Ödevi	%1
4	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
6	Submitted to Ankara University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to Fırat Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
8	files.tekstilteknik.webnode.com.tr İnternet Kaynağı	<%1

Submitted to Trakya University

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Hayrani Eren BOSTANCI

Uyruğu: Türkiye (TC)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Pamukkale Üniv., Tıbbi Biyokimya	2014
Lisans	Ege Üniversitesi, Kimya Müh.	2011
Lise	Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2004

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2015-Halen	Cumhuriyet Üniv., Eczacılık Fak.	Araştırma Görevlisi
2011-2015	Pamukkale Üniv., Tıp Fakültesi	Araştırma Görevlisi
2009-2011	Uzay Kampı Türkiye	Eğitmen

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

- Sanlıalp M., Dodurga Y., Uludağ B., Alihanoğlu Y., Enli Y., Secma M., **Bostancı H.E.**, Sanlıalp S.E., Tok Ö.Ö., Kaftan A., Kılıc I.D., “Peripheral blood mononuclear cell microRNAs in coronary artery disease”, Journal of Cellular Biochemistry, sayı 121 (4), ss 3005-3009, (2020).
- Büber A., Cakaloz B., Işıldar Y., Ünlü G., **Bostancı H.E.**, Aybek H., Herken H. “Increased urinary 6-hydroxymelatonininsulfate levels in attention deficit hyperactivity disorder diagnosed children and adolescent”, Neuroscience Letters, sayı 617, ss 195-200, (2016).

3. Kılıç ID, Dodurga Y., Uludağ B., Alihanoğlu Y., Yıldız B.S., Enli Y., Secme M. **Bostancı H.E.** “MicroRNA-143 and -223 in obesity” Gene, sayı 560 (2), ss 140-142, (2015).
4. Buber A., Cakaloz B., Isildar Y., Unlu G., **Bostancı H.E.**, Aybek H., Alacam H., Herken H., “Urinary 6-OH melatonin-sulfate levels in patients with attention deficit hyperactivity disorder”, Klinik Psikofarmakoloji Bülteni, sayı 25, ss 31, (2015).

