



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN  
ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



SELÜLOZ ASETAT KAPSÜLENMİŞ  
BODİPY TÜREVLİ  
FOTODUYARLAŞTIRICININ FOTODİNAMİK  
ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

**Kübra Ece COŞKUNER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Haziran-2023  
KONYA  
Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Kübra Ece COŞKUNER tarafından hazırlanan “Selüloz Asetat Kapsüllenmiş BODİPY Türevli Fotoduyarlayıcılarının Fotodinamik Antikanser Aktivitelerinin Araştırılması” adlı tez çalışması 21/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Fatma ZİLİFDAR FOTO

#### Danışman

Doç.Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

#### Üye

Dr. Öğr. Üyesi Kemal ÇETİN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../20.. gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Şerife Yurdagül KUMCU  
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 221315007 nolu proje ile desteklenmiştir.

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Kübra Ece COŞKUNER

Tarih: 19/07/2023

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# SELÜLOZ ASETAT KAPSÜLLENMİŞ BODIPY TÜREVLİ FOTODUYARLAŞTIRICININ FOTODİNAMİK ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kübra Ece COŞKUNER

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

2023, 47 Sayfa

Jüri

Doç.Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Kemal ÇETİN

Dr. Öğr. Üyesi Fatma ZİLİFDAR FOTO

Kanser, Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre milyonlarca insanın ölümüne sebep olan genetik bir hastalıktır. Günümüzde, çeşitli tedavi yöntemleri geliştirilmesine rağmen görülme sıklığı artmaya devam etmektedir. Kanser tedavisinde uygulanan konvansiyonel yöntemler metastatik olmayan küçük tümörlerde başarı sağlayabilmektedir. Ancak kemoterapötik tedaviler ciddi yan etkilere neden olabilmekte ve istenmeyen sonuçlara yol açabilmektedir. Ayrıca, kanser hücrelerinin kemoterapiye direnç geliştirmesi sonucunda tedavi başarısı düşmekte ve bu da hastalığın nüksü ile sonuçlanabilmektedir. Son zamanlarda fotodinamik tedavi yöntemi kanser tedavileri için umut vaatmektedir. Fotodinamik tedavi; ışık kaynağı, ışığa duyarlaştırıcı ajan ve oksijenin birlikteliğinde çalışan bir yöntemdir. Fotodinamik kanser tedavisi, cerrahi işlem gerektirmemesi, tekrarlanabilir olması ve tedavide kullanılan fotoduyarlaştırıcı maddelerin doz aşımı tehlikesinin olmaması nedenleriyle birçok avantaja sahiptir. Bu bakımdan işlevsel ve güvenilir bir yöntem olarak görülmektedir.

Tez çalışmamızda, BODIPY çekirdeği kullanılarak yeni sentezlenmiş fotoduyarlaştırıcı potansiyeli olan molekülün, melanoma SK-MEL-30, kolorektal karsinoma HT29 ve kontrol olarak sağlıklı fibroblast L929 hücre hatları üzerindeki antikanser etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu bağlamda, BODIPY temelli fotoduyarlaştırıcı molekülün, bu molekülün selüloz asetat ile kapsüle edilmiş formunun ve boş selüloz asetat kapsüllerinin hücreler üzerindeki *in vitro* etkileri incelendi. Deneysel çalışmamızda molekülün sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile, apoptotik etkileri Annexin V-FITC kiti kullanılarak akım sitometri yöntemi ile ve ROS miktar tayinini DCFDA kiti ile analiz edildi. Muamele edilen hücrelerin koloni oluşturma kabiliyetleri koloni formasyon deneyi ile belirlendi. BODIPY ile muamele edilen kanser hücrelerinin sağlıklı fibroblastlara kıyasla, özellikle SK-MEL-30 melanoma hücrelerinde, yaklaşık 7-kat yüksek toksik etkilere, %33 oranında total apoptozis düzeyinde artışa, ayrıca özellikle HT29 hücrelerinde, yaklaşık 2.6-kat hücre içi ROS artışına neden olduğu belirlendi. Muamele edilen hücrelerin koloni oluşturma kabiliyetlerinin anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi. L929 hücrelerine göre, HT29 hücrelerinin koloni oluşturma kabiliyeti yaklaşık 2.2-kat, SK-MEL-30 hücrelerinin ise yaklaşık 5.3-kat azaldığı belirlendi.

Tez çalışmamızın sonucunda, BODIPY-aracılı fotodinamik tedavi yönteminin ilaca dirençli SK-MEL-30 ve HT29 hücre hatlarında hücre içi ROS miktarının artışına bağlı olarak sitotoksositeye ve apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu belirledik. Bu bulgular ışığında, selüloz asetat ile enkapsüle edilmiş BODIPY molekülünün melanoma ve kolorektal karsinoma'ya karşı etkili bir ajan olarak kullanılabileceğini ileri sürmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Anti-kanser etkiler, Fotodinamik tedavi, Kolorektal karsinoma, Melanoma, Reaktif oksijen türevleri.

## ABSTRACT

## MS THESIS

# INVESTIGATION OF PHOTODYNAMIC ANTICANCER ACTIVITIES OF A CELLULOSE ACETATE ENCAPSULATED BODIPY DERIVED PHOTSENSITIZER

**Kübra Ece COŞKUNER**

**The Graduate School Of Natural And Applied Science Of Necmettin Erbakan University**

**The Degree Of Master Of Science In Molecular Biology And Genetics**

**Advisor: Doç.Dr. Suray PEHLİVANOĞLU  
2023, 47 Pages**

**Jury  
Doç.Dr. Suray PEHLİVANOĞLU  
Dr. Öğr. Üyesi Kemal ÇETİN  
Dr. Öğr. Üyesi Fatma ZİLİFDAR FOTO**

According to the World Health Organization, cancer is a genetic disease leading cause of deaths worldwide. Although various treatment modalities, the cancer incidence continues to increase. Conventional cancer treatment options can be successful in small non-metastatic tumors. However, chemotherapeutic treatments can cause serious side effects and lead to undesirable morbidities. In addition, treatment success decreases as a result of chemoresistance, and this causes recurrence of the cancer. Recently, photodynamic therapy shows promise for cancer treatment. Photodynamic therapy is a method that works together with a light source, a photosensitizing agent and oxygen. Photodynamic cancer treatment has many advantages, because it does not require surgical procedure, its recursiveness, and does not have the danger of overdose of the used photosensitizers. In this respect, it could be assumed as a functional and reliable therapeutic method.

In this thesis, it was aimed to investigate the anticancer effects of the newly synthesized photosensitizer potential molecule using the BODIPY core on melanoma SK-MEL-30, colorectal carcinoma HT29 and healthy fibroblast L929 cell lines as a control. In this context, the *in vitro* effects of BODIPY-based photosensitizer molecule, its encapsulated form with cellulose acetate and empty cellulose acetate capsules were investigated. In our experimental study, cytotoxic effects of molecules were analyzed by MTT method, apoptotic effects were analyzed by flow cytometric analysis using Annexin V-FITC kit, and ROS quantification was performed with DCFDA kit. Colony forming ability of treated cells was determined by colony formation assay. The treated cancer cells with BODIPY caused approximately 7-fold higher toxic effects, increased apoptotic effects by 33% on SK-MEL-30 cells, and an approximately 2.6-fold increase in intracellular ROS amount, particularly in HT29 cells, compared to healthy fibroblasts. It was determined that the colony forming ability of the treated cells was significantly reduced. Compared to L929 cells, the colony formation ability was decreased approximately 2.2-fold in HT29 cells, and approximately 5.3-fold in SK-MEL-30 cells.

As a result of this study, we determined that BODIPY-mediated photodynamic therapy causes cytotoxicity and apoptotic cell death due to the increase in the amount of intracellular ROS in drug resistant SK-MEL-30 and HT29 cell lines. In the light of these findings, we suggest that BODIPY molecules encapsulated with cellulose acetate can be used as an effective agent against melanoma and colorectal carcinoma.

**Keywords:** Anti-cancer effects, Colorectal carcinoma, Melanoma, Photodynamic therapy, Photosensitizer, Reactive oxygen species.

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim esnasında bilgileri ve tecrübeleriyle bana destek ve yol gösterici olarak bu süreçte yaptığım çalışmalar için bana her türlü imkanı sağlayan, beni akademik hayata hazırlayan, akademik kimliğinin yanında bana karşı her zaman sabırlı olarak, dürüstlüğü ve samimiyeti ile örnek olan danışmanım Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU'na emeklerinden dolayı sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını gerçekleştirirken kullandığım fotosensitizan ajanı sentezleyen ve tezimde kullanmama imkan sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Seda DEMİREL TOPEL'e katkılarından dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca laboratuvarı paylaştığım, bana deneyimleri ile katkı sağlayan ve maddi manevi her anlamda bana destek olan çalışma arkadaşım Feyza KOSTAK'a ve bu süreç boyunca yanımda bulunan desteğini eksik etmeyen tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitim ve öğretim hayatım boyunca beni destekleyen, her daim yanımda olan, hayatımı şekillendirirken tüm tercihlerime saygı duyarak bir birey olma sürecimde arkamda olan annem Emel COŞKUNER'e, babam Selim COŞKUNER'e, moral ve neşe kaynağım kardeşim Aslı Cemile COŞKUNER'e minnetle sevgilerimi sunarım.

Kübra Ece COŞKUNER  
KONYA-2023

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	<b>2</b>
2.1. Kanser .....	2
2.1.1. Melanoma .....	3
2.1.2. Kolorektal Kanser .....	3
2.2. Fotodinamik Terapi.....	3
2.3. Fotodinamik Terapi Mekanizması .....	5
2.3.1. Oksijen .....	5
2.3.2. Işık .....	6
2.3.3. Fotosensitizan ajanlar .....	6
2.3.4. BODIPY .....	8
2.3.4.1. Selüloz Asetat kapsüllenmiş BODIPY .....	9
2.3.5. Reaktif oksijen türevleri (ROS) .....	9
2.4. Kanser Tedavisinde Fotodinamik Terapi .....	10
2.4.1. Apoptoz.....	11
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>14</b>
3.1. Selüloz Asetat ile Kapsülasyon.....	14
3.2. UV-Vis spektroskopik analizi.....	15
3.3. Hücre Kültürü .....	15
3.4. Hücre Canlılık Testi.....	15
3.5. Koloni Oluşturma Deneyi .....	16
3.6. Akım Sitometrik Hücresel ROS Testi .....	16
3.7. Akım Sitometrik Annexin-V Apoptoz Analizi .....	17
3.8. İstatistiksel Analiz.....	18
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA</b> .....	<b>19</b>
4.1. Araştırma Sonuçları .....	19
4.1.1. BODIPY'nin yapısal analizi .....	19
4.1.2. SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY'nin UV-VIS spektrometrik verileri.....	20
4.1.3. BODIPY'nin selüloz asetat ile kapsülasyonu .....	20
4.1.4. Boş SA kapsül, enkapsüle BODIPY ve BODIPY moleküllerinin L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri .....	21
4.1.5. Boş SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY moleküllerinin, L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerinin kültür ortamındaki <i>in vitro</i> etkileri .....	26

4.1.6. Boş SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY moleküllerinin, L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerinin koloni oluşturma kabiliyetleri üzerindeki etkileri .....	28
4.1.7. Boş SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY molekülleri ile muamele edilen L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerin intraselüler ROS düzeyleri .....	30
4.1.8. Boş SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY moleküllerinin L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisi .....	32
4.2. Tartışma .....	36
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>41</b>
5.1 Sonuçlar .....	41
5.2. Öneriler .....	41
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>43</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Fotodinamik terapiyi oluşturan üç temel unsurun şematik gösterimi. ....	5
Şekil 2. Işığın dalga boylarına göre doku penetrasyon derinliği (Ruggiero ve ark., 2016). ....	6
Şekil 3. Fotosensitizan ajanın aktivasyonundan sonra meydana gelebilecek ve hücre ölümüne götürecektir olan reaksiyon tipleri. ....	8
Şekil 4. Apoptotik yolağın fotodinamik terapi ile aktivasyonu (Mokoena ve ark., 2021). ....	13
Şekil 5. SA kapsülasyonunda kullanılan BODIPY PS'nin kimyasal yapısı. ....	14
Şekil 6. 96 kuyulu plakalarda MTT deneyi için gerçekleştirilen ışık maruziyeti görüntüsü. ....	16
Şekil 7. Apoptoz tayini için 6 kuyulu plakalarda gerçekleştirilecek deney öncesi hücrelere uygulanan ışık maruziyeti. ....	18
Şekil 8. BODIPY FS'nin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz). ....	19
Şekil 9. SA Kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY moleküllerinin UV-VIS absorpsiyon spektrumları. ....	20
Şekil 10. Enkapsüle BODIPY'lerin SEM görüntüleri. ....	21
Şekil 11. SA boş kapsül ajanının ışık maruziyeti varlığında L929, HT29, SK-MEL-30 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri. ....	22
Şekil 12. SA kapsüllerin ışık maruziyeti uygulanmadığı durumda L929, HT29, SK-MEL-30 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri. ....	23
Şekil 13. Enkapsüle BODIPY ajanının ışık maruziyeti varlığında L929, HT29, SK-MEL-30 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri. ....	23
Şekil 14. SA kapsüllerin ışık maruziyeti uygulanmadığı durumda L929, HT29, SK-MEL-30 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri. ....	24
Şekil 15. BODIPY ajanının ışık maruziyeti varlığında L929, HT29, SK-MEL-30 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri. ....	25
Şekil 16. BODIPY ajanının ışık maruziyeti uygulanmadığı durumda, L929, HT29, SK-MEL-30 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri. ....	26
Şekil 17. L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerine ait kontrol, SA kapsül (10 ppm), Enkapsüle BODIPY (10 ppm) ve BODIPY (10 ppm) ajanlarının uygulamasının ardından hücrelerin 48. saatteki görüntüleri (40X). ....	27
Şekil 18. L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerinde BODIPY (10ppm) ajanının meydana getirdiği apoptotik keseciklere ait görüntüler (40X). ....	28
Şekil 19. Koloni oluşturma deneyi sonuçları. (A) L929, (B) HT29, (C) SK-MEL-30 hücre hattına ait koloni görüntüleri ve kuyu içerisinde kapladıkları alana ait verilerin grafiği. ....	29
Şekil 20. L929 hücre hattına ait kontrol ve SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY uygulamasının ardından akış sitometrik histogram ve ölçülen floresan yoğunluğuna ait sütun grafikleri. ....	30
Şekil 21. HT29 hücre hattına ait kontrol ve SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY uygulamasının ardından akış sitometrik histogram ve ölçülen floresan yoğunluğuna ait sütun grafikleri. ....	31
Şekil 22. SK-MEL-30 hücre hattına ait kontrol ve SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY uygulamasının ardından akış sitometrik histogram ve ölçülen floresan yoğunluğuna ait sütun grafikleri. ....	32
Şekil 23. (A) L929 hücreleri üzerinde yapılan Annexin V – FITC deney sonuçlarına ait nokta alan ve histogram grafikleri. (B) Meydana gelen total apoptoz miktarı yüzdeleri. ....	33

<b>Şekil 24.</b> (A) HT29 hücreleri üzerinde yapılan Annexin V – FITC deney sonuçlarına ait nokta alan ve histogram grafikleri. (B) Meydana gelen total apoptoz miktarı yüzdeleri. ....	34
<b>Şekil 25.</b> (A) SK-MEL-30 hücreleri üzerinde yapılan Annexin V – FITC deney sonuçlarına ait nokta alan ve histogram grafikleri. (B) Meydana gelen total apoptoz miktarı yüzdeleri. ....	35

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Kısaltmalar

5-ALA	5- Aminolevulinik asit
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutant kinaz
ATP	Adenozin trifosfat
ATR	Serin/Treonin protein kinaz
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene
BSA	Bovine Serum Albumin / Sığır Serum Albümini
CA	Selüloz Asetat
DCFDA	2',7' –diklorofloresin diasetat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FBS	Fetal Bovine Serum
FDT	Fotodinamik Terapi
FITC	Floresan izotiyosiyanat
FS	Fotosensitizan, ışığa duyarlaştırıcı
gr	Gram
IC <sub>50</sub>	İnhibisyon konsantrasyonu
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid
mL	Mililitre
NIR	Near Infrared
nm	Nanometre
PE	Fikoeritrin
PI	Propidyum iyodür
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri / Reactive Oxygene Species
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute

## 1. GİRİŞ

Günümüzde kanser, tedavisi kesin olarak mümkün olmayan ve dünya genelinde görülme sıklığı her geçen gün artan bir hastalıktır. 2020 yılı istatistiklerine göre, dünya çapında kanser hastası sayısı 18 milyon 94 bin kişi olarak açıklanmıştır. Bu vakalar arasında %10.7 oran ve 1 milyon 931 bin vaka ile kolorektal kanser üçüncü sırada ve deri melanomu %1.8 oran ve 324 bin 635 vaka ile 17. sırada yer almıştır.

Fotodinamik terapi (FDT), kullanılan fotosensitizan maddenin ışık uyarımı ile yüksek miktarda ROS üretimi meydana gelmesi ve bu reaktif oksijen türevlerinin hücre ölümünü tetiklemesi şeklinde çalışan bir yöntemdir. Kanser tedavisinde fotodinamik terapi yaklaşımları ile yapılan çalışmalar gün geçtikçe artarak kansere bir çözüm sunma amacıyla gerçekleştirilmektedir. Fotodinamik terapi diğer kanser tedavi yöntemlerine göre daha az yan etkiye sahip olması ve daha spesifik çalışma stratejisinden dolayı avantaj sağlamaktadır. BODIPY molekülleri yüksek tekil oksijen üretimi ile fotodinamik terapi için yeni nesil fotosensitizan maddeler olarak araştırmalarda kullanılmaktadır. BODIPY moleküllerinin istenilen doku penetrasyon derinliği için farklı dalga boylarına göre sentezlenerek FDT’de daha derin dokularda aktivasyonunun sağlanması da yöntem bir avantaj oluşturmaktadır. Tez çalışmasında BODIPY molekülü selüloz asetat nanokapsüller içerisinde kapsüle edilmiş şekilde kullanılacaktır. Selüloz asetat’ın kapsülasyonda tercih edilmesinin nedeni hücre üzerinde toksik etki oluşturmaması, stabiliteye sahip bir yapıda olması ve biyolojik olarak çözünür olması gibi özellikleridir. Bu tezde ileriye dönük stratejiler göz önünde bulundurularak ışığa maruz bırakılabilecek dokularda meydana gelen kanserleşmeler üzerinde fotodinamik terapi kullanılması amaçlı insan melanoma kanseri ve kolon kanseri hücreleri üzerinde çalışılarak tedavinin etkinliği araştırılmak üzere yola çıkılmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Kanser

Çevresel ve endojen faktörlerin etkisi ile hücre DNA'sında ve kromozomların işlevsel alt birimlerinde meydana gelen değişiklikler neticesinde hücreler, kontrolsüz olarak bölünmeye başlar. Meydana gelen anormal hücrelerin kontrol edilemeden çoğalıp, büyüme ve yayılma özelliğine sahip olması ile ortaya çıkan hastalığa kanser adı verilir (Aliustaoğlu, 2014). Kanser, hücrelerin değişmiş metabolizması ve davranış şekli ile karakterize bir hastalıktır (Clayson, 1966). Kanserlerin %10-15'inin, kalıtsal olduğu, diğer %85-90'luk kısmını ise yaşam boyunca hücrelerdeki DNA'nın, mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki hafif progresif değişimler ve DNA replikasyonundaki hatalar neticesinde şekillendiği varsayılmaktadır. Hücre döngüsünün kontrol noktalarında meydana gelen anormallikler ve döngünün düzenlenmesindeki eksiklikler kanser gelişimine yol açmaktadır. Sağlıklı bir hücre döngüsünde üç ayrı kontrol noktası bulunur ve bunlar sırasıyla G1, G2 ve M kontrol noktalarıdır. Döngü sırasında bu noktalara gelindiğinde hücre bölünmeye devam edip etmeyeceğine karar verir. Eğer kontrol esnasında DNA da bir hasar varsa hücre bölünmesinin durması için sinyal oluşur, hücre bölünmesi duraklar ve bununla birlikte hücre mevcut sinyaller sayesinde kontrollü olarak apoptotik sürece giderek ölümü gerçekleşir. Hücreler kültür ortamında konfluent olduğunda ve birbirlerine temas ettiklerinde kontak inhibisyon gerçekleşir. Kontak inhibisyon, hücrelerin buldukları ortamdaki yoğunluklarından dolayı yeterli alana sahip olamaması ve bunun sonucunda hücrenin G0 fazında beklemeye alınarak bölünmesinin durdurulması olayıdır. Kanserleşmiş hücrelerde ise bu durum farklılık gösterir ve kontak inhibisyonundan etkilenmezler. Kanser hücreleri hücre döngüsünde kontrol noktalarında oluşan hiçbir durma sinyalinden etkilenmeden proliferasyona devam ederler. Bu sürekli çoğalma, tümör olarak adlandırılan bir hücre kitlesi oluşumu ile sonuçlanır. Tümörler iyi huylu ve kötü huylu olmak üzere ikiye ayrılır. Kanserin ortaya çıkabilmesi için yalnızca kontrolsüz çoğalma yeterli değildir. Hücrenin invazyon (diğer sağlıklı dokuları istila etme) ve metastaz (dolaşıma geçerek sağlıklı başka dokulara yayılma) gibi diğer malign (kötü huylu) özellikleri de kazanması gerekmektedir (Aliustaoğlu, 2014). Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden farklı ve kendilerine özgün olduğu bilinen özellikleri vardır bunlar, proliferatif sinyalleri indüklemek, büyüme sinyali inhibitörlerinden kaçınmak, invazyon ve metastaz yapabilmek, programlı hücre ölüm mekanizmalarına direnç göstermek, anjiyogenezi indüklemek ve hücre metabolizmasını değiştirmektir (Hanahan, 2022).

### **2.1.1. Melanoma**

Melanoma, epidermiste üç ana hücre çeşidinden biri olan ve cildin rengini veren melanosit hücrelerinde meydana gelen genetik değişimler nedeniyle oluşan agresif ve hızlı ilerleyen bir hastalıktır. Nadir görülmesine rağmen yüksek ölüm oranına sahip olması nedeni ile tehlikeli kabul edilen bir kanser türüdür (Ersoy Acer, 2019). Melanositlerden meydana gelen malign (kötü huylu) tümörler melanoma olarak adlandırılırken, benign (iyi huylu) tümörler ise benler olarak isimlendirilmektedir. Görülme oranına bakıldığında tüm cilt kanserlerinin yalnızca %4'ünü oluşturmasına rağmen cilt kanserleri kaynaklı ölümlerin başlıca nedeni olarak melanoma karşımıza çıkmaktadır (Parlak ve ark., 2014). Cilt kanserleri, özellikle beyaz tenli insanlarda en sık görülen kötü huylu hastalıktır. Bununla birlikte cilt kanserine yakalanma oranı tüm dünyada her geçen gün giderek artmaktadır. Melanoma dünya genelinde yılda ortalama 55.000 kişinin ölümüne sebep olmaktadır ve istatistiksel olarak tüm kanser türlerinden kaynaklanan ölümlerin %0.7'sine karşılık gelmektedir. Ancak ölüm oranlarına bakıldığında ülkelere ve yaşanan coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Açıklanan verilere göre 2008'den 2018'e kadar takip edilen 10 yıllık süreçte, melanoma hastalarının yıllık sayısı, artan ultraviyole ışınlarla maruz kalma miktarına bağlı olarak %53 oranında arttığı görülmüştür (DEMİR, 2021).

### **2.1.2. Kolorektal Kanser**

Kolorektal kanser, kolon veya rektumdan kaynaklı bir kanser türüdür. Kolorektal kanser, en sık görülen üçüncü kanser türüdür. Kolorektal kanser oluşumu modelinde, kanserlerin büyük çoğunluğu, anormal bir kesecik ile başlayıp ve daha sonra erken bir adenoma dönüşen polip yapısından kaynaklanmaktadır. Kolorektal kanserlerin çoğu adenokarsinomlardır. Bahsedilen adenokarsinomlar, kolonun ve rektumun mukus üreten hücrelerinde oluşmaya başlamaktadır. Adenomlar zamanla ileri evre adenoma ve sonunda bir karsinomaya dönüşürler. Bu sürecin meydana gelmesi, mutasyonların ve epigenetik değişikliklerin birikmesiyle gerçekleşmektedir (Kuipers ve ark., 2010). 2018 yılında kaydedilmiş verilere göre kolorektal karsinom'a bağlı ölümler yaklaşık 1 milyon civarındadır ve dünya çapında kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır (Das ve ark., 2020).

### **2.2. Fotodinamik Terapi**

Antikanser ilaçlar kanser hücreleri ile beraber dokudaki sağlıklı hücrelerin de ölümüne neden olur (Maharjan & Bhattarai, 2022). Fotodinamik terapi, kanserin

minimal invaziv tedavisi için alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemde, ışığı absorbe eden temel fotosensitizan madde aktifleşerek, mevcut temel oksijeni reaktif oksijen türlerine dönüştürmesi sonucunda hücrelerin apoptoz ve/veya nekroz yoluyla öldürülmesini sağlar. Ayrıca, tümör mikro damar yapısını bozar ve bağışıklığı uyuracak etkileri başlatır (M. Liu & Li, 2020).

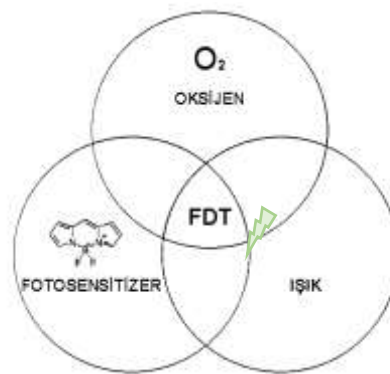
Işığın tıpta (fototerapi) kullanımının tarihçesi cilt hastalıklarının tedavisi için eski Mısır, Hindistan ve Çin'e kadar dayandığı bilinmektedir. Ancak 19. yüzyılda Niels Ryberg Finsen, ışığı çiçek hastalığı ve deri tüberkülozu (lupus vulgaris) tedavisinde kullanmış ve bu yaklaşım kendisine 1903 Nobel Fizyoloji Ödülü'nü kazandırmıştır (Imberti ve ark., 2020). Fotodinamik terapi (FDT) kavramının ortaya çıkışı ise 1900 yılına kadar uzanmaktadır. Münih'te tıp fakültesi öğrencisi olan Oscar Raab, belirli boyalara muamele edilmiş paramesyum gibi mikroorganizmaların ışığa maruz kaldığında öldürülebileceğini ve ışık olmadığı takdirde ise bu boya'nın organizma üzerinde etkisinin olmadığını tesadüfen keşfetmiştir. Daha sonra bu ışık aracılı öldürme etkisinin meydana gelip gerçekleşebilmesi için ortamda bulunan mevcut oksijenin de gerekli olduğu keşfedildiğinde, 'fotodinamik etki' terimi ortaya atılmıştır. Bu keşiflerden bir süre sonra, yüzeysel deri tümörleri boyalar ile boyanarak sonra onları ışığa maruz bırakarak bu olguyu bir kanser tedavisi olarak kullanmak için ilk denemeler yapılmıştır (Abrahamse & Hamblin, 2017).

Fotodinamik terapi (FDT), malign hücrelerde ve dokularda ışığa duyarlı hale getiren ajanların (genellikle yaygın olarak porfirinler veya analogları) seçici lokalizasyonuna dayanan bir kanser terapi yaklaşımıdır. Fotosensitizan olarak adlandırılan ajanlar ile ışığa duyarlı hale getirilen hücrelerin, ışığa duyarlı hale getiren ajanın soğurma bandına karşılık gelen bir dalga boyunda ışığa maruz bırakıldığında, iki farklı olay açığa çıkar; enerji transfer süreci ve floresan ışımaya. Enerji transferi, hücrelerde veya dokularda çözünmüş oksijeni ( $^3\text{O}_2$ ), tekli oksijen ( $^1\text{O}_2$ ) olarak adlandırılan oldukça kararsız reaktif bir ara maddeye dönüştürür.  $^1\text{O}_2$  oluştuktan sonra biyolojik sistemlerle, genellikle yakın çevrede bulunan lipitler ve proteinlerle reaksiyona girer. Yeterli ilaç ve ışık sağlanırsa, tekli oksijenden kaynaklanan oksidatif stres, tümörün ortadan kaldırılması için seçici bir reaksiyon ile sonuçlanır. Diğer yandan reaksiyon sonucunda diğer reaktif oksijen türleri (ROS) de oluşabilir, ancak çoğu durumda fotodinamik terapide ani etkinin  $^1\text{O}_2$  tarafından sağlandığı düşünülmektedir.

FDT, birçok kanser çeşidinin tedavisinde sıklıkla kullanılabilen ve faydalı olan bir araçtır, ancak bu tedavi şeklinin, mevcut tümörün özelliklerine göre ve her hastanın tedavi ihtiyacına göre optimize edilmesi gerekmektedir (Mishchenko ve ark., 2022).

### 2.3. Fotodinamik Terapi Mekanizması

FDT, üç ana unsurun birleşik etkisine dayanan özel bir ışık terapisi türüdür; bir fotosensitizan (ışığa duyarlılaştırıcı), bir ışık kaynağı ve moleküler oksijenin birlikte çalışması ile gerçekleşir. (Niculescu & Grumezescu, 2021).



Şekil 1. Fotodinamik terapiyi oluşturan üç temel unsurun şematik gösterimi.

#### 2.3.1. Oksijen

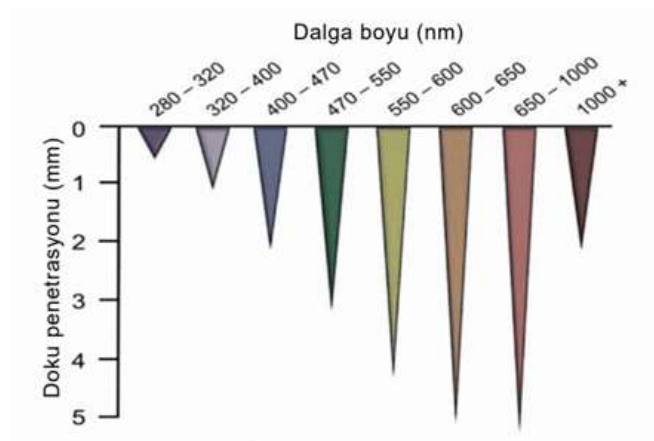
FDT'de oksijen büyük önem taşımaktadır çünkü uygulanılacak bölgedeki oksijen miktarı yöntemin etkinliğini değiştirebilir. Bu durum özellikle derin solid tümörlerde sorun çıkarabilmektedir ancak daha yüzeyle yakın ya da küçük tümörlerde oksijen miktarı yeterlidir. ROS ve tekil oksijen yüksek reaktiviteye ve kısa yarı ömre sahiptir. Bu nedenle, FDT yalnızca bu türlerin üretildiği bölgeye yakın, genellikle 20 nanometre yarıçap içinde olan biyolojik substratları doğrudan etkiler. Bu nedenle, lokalize duyarlılaşmayı destekler (Calixto ve ark., 2016). FDT'de sahip olunan en büyük avantajın kaynağı temelde oksijendir bunun sebebi kanser hücrelerinin hiçbir zaman reaktif oksijen türevlerine karşı direnç gösteremeyecek olmasıdır (Kubrak ve ark., 2022)

Aktif oksijen, vücuttaki diğer maddeleri çok güçlü okside etme etkisine sahip olan oksijendir. Genel olarak, süperoksit radikali, hidroksil radikali, radikalik olmayan hidrojen peroksit ve tekli oksijenlerden ibaret dört çeşidi bulunur. Tekli oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), moleküler O<sub>2</sub>'nin uyarılmış en düşük elektronik halidir. Aktif oksijenden (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) farklı

olarak  $^1O_2$ , çeşitli biyolojik süreçlerde ve biyomedikal teknolojilerde doğal olarak yer alan güçlü ve reaktif bir ajandır (Kessel, 2019),(Liang ve ark., 2020).

### 2.3.2. Işık

Fotodinamik terapi, bir hastaya uygulandığında, tercihen normal doku yerine hastalıklı dokular tarafından seçici olarak tutulabilen ışığa duyarlaştırıcı ilaçları kullanan minimal invaziv bir prosedürdür. Bu ilaçlar, hastalıklı hücrelerin ve yeni damar sisteminin seçici fotokimyasal yıkımını sağlamak için yoğun, görünür ışıkla aktive edilebilir (Mang 2004). Fotodinamik terapide ışığın doku üzerindeki etkisi ışığın dalga boyu ile kontrol edilir. Dalga boyuna göre nüfuz ettiği derinlik ve alan değişir. FDT ışık kaynakları lazerler, LED'ler ve filtrelenmiş lambalar olarak üç ana sınıfa ayrılmaktadır.



Şekil 2. Işığın dalga boylarına göre doku penetrasyon derinliği (Ruggiero ve ark., 2016).

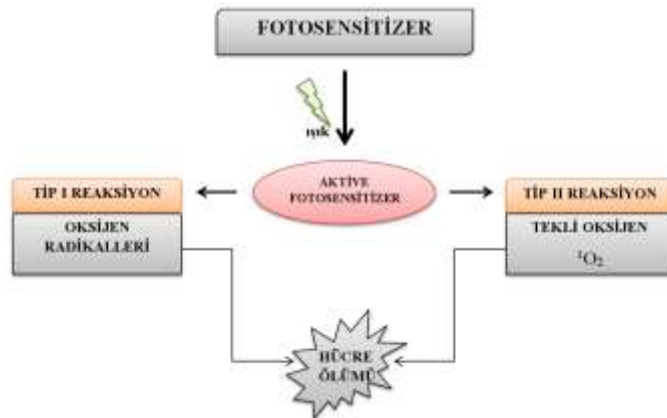
Fotodinamik terapi için günümüzde kullanımı onaylanmış birçok ışık kaynağı vardır. Bu ışık kaynakları görünür ve kızılötesi ışık dalga boylarına sahip LED lambalar, argon lazerler, floresan lambalar, yarı iletken diyot lazerler, metale veya boyaya bağlı olarak farklı dalga boylarına göre ayarlanabilen çeşitli lazerler olmak üzere seçilen tedavinin koşullarına ve gerekli dalga boylarına göre sınıflandırılabilirler (Brancaleon & Moseley, 2002).

### 2.3.3. Fotosensitizan ajanlar

Işığa duyarlı fotosensitizan (FS) ajanlar, terimi belirli bir dalga boyundaki ışık ile aktive olarak enerji transferi yapan madde türlerini ifade etmek için kullanılır.

Geleneksel olarak bazı organik boyalar ve ksanten türevi boyalar (Rose Bengal ve eozin) gibi aromatik hidrokarbonlar ve ayrıca metilen mavisi fotosensitif ajan olarak geçmişte kullanılmıştır. ROS üretimi, boyanın farklı uyarılmış halleri arasındaki elektronik geçişlerle ve ardından bir oksijen türüne elektron veya enerji aktarımıyla sağlanır (Escudero ve ark., 2021). Klinik kullanıma uygun olduğu teorik olarak kanıtlanmış olmasına rağmen kullanımları sınırlıdır. FDT ajanlarının en büyük dezavantajlarından biri oksijene bağımlı yapılar olmalarıdır. Bu durum, hipoksik katı tümörlerde etkinliklerini sınırlar (Wei ve ark., 2021). Birinci nesil ışığa duyarlılaştırıcılar, hematoporfirin türevi (HpD) ve fotofrin II (saflaştırılmış bir HpD formu), FDT'nin erken klinik denemelerinde kullanılmıştır. HpD'nin beyin, gırtlak, akciğer, deri, mide ve özofagus karsinomlarında belirli bir dereceye kadar etkili olduğu bu denemelerde gösterilmiştir (Kou ve ark., 2017). İkinci nesil ışığa duyarlılaştırıcılar elektromanyetik spektrumun görünür-yakın kızılötesi (NIR) bölgesinde yüksek absorpsiyon, yüksek tekli oksijen kuantum verimi ve ayrıca HpD gibi bileşiklerin karışımları olmadıkları için doz-tepki ilişkisinin daha öngörülebilir bir yorumu olan saf ve tek bileşiklerdir (Mfouo-Tynga ve ark., 2021). Birinci ve ikinci nesil ışığa duyarlılaştırıcıların kullanıldığı deneysel çalışmalar sonucunda geliştirilmiş fotodinamik uygulamalar elde edebilmek ve daha iyi terapötik sonuçlar elde etmek için daha gelişmiş ışığa duyarlılaştırıcıların geliştirilmesi gerektiği düşünülmüştür. Hedefleme parçalarıyla biyokonjugasyon ve kapsülleme, ışığa duyarlılaştırıcıların öncüllerinden daha etkili ajanlar geliştirilmesi için yeni stratejiler olarak görülmektedir (Mfouo-Tynga ve ark., 2021). Hedef bölgelerde biriken ışığa duyarlılaştırıcılar, ışık aktivasyonu üzerinden ROS oluşumunu indükler. Genel olarak, bir ışığa duyarlılaştırıcı molekül toksik olmayan bir boyadır ve belirli bir dalga boyundaki ışıkla ideal olarak uyarılmadıkça asla hücrelerde herhangi bir hasara yol açamaz. Belirli ve özgün dalga boyundaki ışığa maruz kaldığında, fotosensitif molekül ışığın fotonlarını emer, böylece temel durumundan aktif uyarılmış tekli durumuna aktive olur. Bununla birlikte, sürekli ışığa maruz kaldığında, uyarılmış tekli durumdaki FS, uyarılmış üçlü durumuna geçerken bir sistemlerarası geçiş yapar. Bu noktada, FS ya serbest radikaller veren indirgeme reaksiyonlarında biyomoleküllerle birleşecek ya da ROS üretmek için oksijenle reaksiyona giren diğer radikal türler olacaktır. Diğer yandan, hücreler oldukça toksik olan Tip II tekli oksijeni üretmek için temel halindeki moleküler oksijenle doğrudan reaksiyona girebilir (Mokoena ve ark., 2019), (Sibata ve ark., 2000). Fotosensitizan maddelerin, kanser tümör yapısından ve kanser hücrelerinin ışığa

duyarlaştırıcı ilaçlar ile olan kimyasal etkileşiminden dolayı tümör dokusuna affinite göstermesiyle yüksek birikim yaparken öte yandan sağlıklı hücre ve dokularda birikimi daha düşük miktarlardadır. Bu durum ışığa maruziyet ile birlikte tümör hücrelerinin öldürülmesinde yüksek seçicilik oluşturur (Wang ve ark., 2023), (Dysart ve ark., 2005)



**Şekil 3.** Fotosensitizan ajanın aktivasyonundan sonra meydana gelebilecek ve hücre ölümüne götüreceği olan reaksiyon tipleri.

#### 2.3.4. BODIPY

Bir fotosensitizan olan boron dipirometen (BODIPY)'in, uygun sönme katsayılarına ve ışıktan karanlığa artış gösteren toksisite oranına sahip olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, FDT'de potansiyel bir ışığa duyarlılaştırıcı ajan ve moleküler görüntüleme için kullanılabilir bir floresan prob olarak kullanılması için geniş çapta araştırılmaya başlanmıştır (Kue et al., 2018).

BODIPY çekirdeği, sayısız uygulamada kullanışlı olması nedeniyle çok yönlü ve sağlam bir florofor olarak bilinmektedir. Biyolojik sistemleri anlamak için proteinlerin, nükleotitlerin, yağ asitlerinin ve diğer biyolojik birimlerin floresan konjugatları yoluyla biyolojik etiketlenmesi için BODIPY çekirdeği kullanılır. Bu durumda yapı fotokararlı hale gelir. BODIPY, yaklaşık 500 nm dalga boylarından absorpsiyon ve emisyon yapar ancak yapısal modifikasyonlarla aktivasyon NIR dalga boylarına ayarlanabilir, bu nedenle esnek sentezlenebilme özelliği söz konusudur. Elektrokimyasal özellikleri gibi çeşitli fotofiziksel özellikleri istenildiği gibi ayarlanabilir. Bu fizikokimyasal özellikler, BODIPY'nin bir FS'ye dönüşmesini sağlamıştır. Şimdiye kadar geliştirilen çoğu BODIPY temelli FS yaklaşık 500 nm uyarılabilirlik özelliğindedir. Dalga boylarındaki bu sınırlama kullanım açısından

dezavantaj oluşturmaktadır. Günümüzde, bu dezavantajın üstesinden gelebilmek için, terapötik uygulamanın 650-800nm aralığında gerçekleştirilebilmesini sağlayan yeni BODIPY molekülleri geliştirilmektedir (Awuah & You, 2012).

Son zamanlarda, 4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene çekirdeği yapısındaki BODIPY moleküllerinin FDT için fotoduyarlaştırıcı ajan olarak kullanılması önerilmektedir. Genel olarak bu tür bileşikler yüksek soğurma katsayıları, ışığın yokluğunda düşük toksisite özellikleri ve yüksek emisyon verimliliğine sahiptir. 2 ve 6 pozisyonlarından ağır atomlar ile süstitüye olduklarında singlet oksijen üretme özelliğine sahiptirler. Örneğin, BODIPY'nin çekirdek yapısında iki iyot atomunun kullanılması durumunda ROS kuantum verimi 50 kata kadar artar. Genel olarak BODIPY tabanlı ışığa duyarlaştırıcılar hidrofobik olmakla birlikte, uygun kimyasal değişikliklerden sonra hidrofilik türevleri elde edilebilmektedir (Escudero ve ark., 2021).

#### **2.3.4.1. Selüloz Asetat kapsüllenmiş BODIPY**

FDT'yi daha iyi ve etkin hale getirebilmek için yeni stratejiler aranırken, FS'lerin nanoteknoloji ile entegre edilmesi, terapinin etkinliğini artırmak için oldukça umut verici bir çözüm olarak kullanılmaya başlanmıştır. Son zamanlarda nanomalzemeler, spesifik hedefleme, yüksek miktarlarda ilaç yükleme, çok işlevli entegrasyon, hidrofobik FS'lerin çözünürlüğünün geliştirilmesi, Fotosensitizan'ın dağıtım hızının sabit olarak korunması ve sağlıklı hücreler üzerindeki toksisitesinin azaltılmış olması açısından etkili sonuçlar elde edildiği için FDT'de önemli bir rol almaya başlamıştır (Yan ve ark., 2020)(Niculescu & Grumezescu, 2021).

Selüloz asetat, nispeten iyi mekanik özelliklere sahip, toksik ve tahriş edici olmayan bir malzemedir (Spasova ve ark., 2021). Ayrıca, düşük maliyetli, iyi fiziko-mekanik ve bariyer özelliklerine sahip, biyolojik olarak bozunabilen, geri dönüştürülebilir bir polimerdir (Kargarzadeh et al., 2018). İlaç salımı için taşıyıcı olarak kullanımında mikro ve nanoliflerinin kullanımı daha etkilidir. Çünkü, ilaç lokal olarak hedef organ veya dokuya salınır ve sonuç olarak daha az miktarda ilaca ihtiyaç duyulur. Bunun sonucunda daha az yan etki görülmektedir (Tsiapla ve ark., 2018).

#### **2.3.5. Reaktif oksijen türevleri (ROS)**

Reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini tanımlar. ROS, protein, lipid ve DNA gibi yapılara zarar verebilmekle

birlikte, son yıllarda yapılan araştırmalarda önemli hücre içi ve hücre dışı sinyal molekülleri olarak rolleri tanımlanmıştır. Mitokondri, hücre içindeki ROS'un ana kaynağıdır ve proliferatif, apoptotik ve metabolik yolların düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Diebold & Chandel, 2016). FDT'de, temelde toksisite oluşturmayan bir ışığa duyarlılaştırıcı madde, ışıkla eksitasyonu neticesinde bir dizi fotokimyasal reaksiyonun sonucunda aktive olmaktadır (Hwang ve ark., 2018).

ROS'un kanser hücreleri üzerindeki etkileri, büyük ölçüde hücredeki mevcut ROS miktarlarına, ROS'un türüne ve üretildiği yerin kaynağına bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir. Örneğin, düşük ve tolere edilebilir miktarlarda hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve süperoksit ( $O_2^-$ ) çeşitli kanser türlerinde proliferasyonu artırarak tümör büyümesinin teşvik edilmesiyle ilişkilendirilirken, aynı tiplerdeki ROS'un yüksek konsantrasyonları kanser hücresinin kontrollü ya da kontrolsüz ölümünü indükleyebilir. Bununla birlikte ROS'un neden olduğu tümör hücresi ölümünde yer alan hücre ölüm mekanizması tipinin hücre içi ROS konsantrasyonuna bağlı olduğu düşünölmektedir. Düşük düzeyde, ancak tolere edilemeyen ROS seviyelerinin maruziyeti durumunda apoptoza giden tümör hücreleri, yüksek ROS seviyelerine maruz kaldıklarında nekroza girerler. Nekrotik durumda, hücre içi ROS'un yüksek konsantrasyonlarının, ROS'a en duyarlı organel olan mitokondrinin disfonksiyonunu hızlandırdığı ortaya konulmuştur. Bu olay, hücrede sırayla, enerji arzı eksikliği ile beraber ATP'nin tükenmesine yol açar ve sonunda nekroza neden olmaktadır (Yee & Li, 2021).

#### **2.4. Kanser Tedavisinde Fotodinamik Terapi**

Temelde FDT tarafından tetiklenen hücre ölüm şekilleri apoptoz, otofaji ve nekroz olarak bilinerek üç kategoriye ayrılmış olsa da güncel çalışmalarda keşfedilen başka düzenlenmiş hücre ölümü şekillerinin, FDT'ye maruz kalan kanser hücrelerinin, paraptoz, piroptoz, nekroptoz ve ferroptoz gibi yeni tanımlanmış hücre ölüm yollarından ölüme gidebileceği de gösterilmiştir (Mishchenko ve ark., 2022). Yine de genellikle FDT'de hücrenin ölümü apoptotik, nekrotik ya da ikisinin eř zamanlı meydana gelmesi ile gerçekleşir. Işığa duyarlılaştırıcının hücre içindeki lokalizasyonunun, FDT sonuçları üzerinde kilit bir faktör olduğu görölmüştür. Mitokondriyal lokalize fotosensitizan maddeler çok hızlı bir şekilde apoptozu indükleyebilmektedir. Bununla birlikte lizozomal lokalize fotosensitizanlar ise nekrotik veya apoptotik bir yanıt ortaya çıkarabilmektedir. Plazma membranına yerleşen çeşitli

ışığa duyarlılaştırıcıların, apoptoz ve nekroz için bir hedef başlatabildikleri bilinmektedir (Kessel, 2019),(Moor, 2000).

FDT'ye maruz kalan kanser hücrelerinin gideceği ölüm yolağı büyük ölçüde tümörün kökenine, FS'nin fotokimyasal ve fotofiziksel özelliklerine, dokudaki dağılımına, maddenin kanser hücreleri tarafından alınmasına, hücreye alındıktan sonra hücre içi lokalizasyonuna ve ışınlama miktarına bağlıdır (Mishchenko ve ark., 2022). ROS türleri tümörün vasküler hasarına neden olmaktadır. Tümör hücrelerinin doğrudan öldürülmesinin yanı sıra endotel hücrelerinde, damar zarında, vazoaktif moleküllerde, damar geçirgenliğinde ve damar daralmasında geri dönüşü olmayan hasarlara neden olur. Bu hasarlar, tümör mikrovaskülatürünün progresif bozulmasıyla azalan oksijen ve besin seviyeleri nedeniyle daha fazla tümör yıkımına yol açabilmektedir (Hwang ve ark., 2018).

ROS aracılığı ile hücrenin programlı ölümü, kanser hücrelerinin terapisinde meydana gelen olağan bir durumdur. Programlı ölüm, bir enzim ailesi olan ve kaspazlar olarak adlandırılan, içsel ya da dışsal yollar ile aktif hale gelen bir dizi proteaz tarafından gerçekleştirilir. Kaspazların aktivasyonu, apoptozun en belirgin ve öne çıkan özelliklerindedir. Kaspaz-bağımlı apoptozis sonucunda DNA'nın kırılarak fragmente olması ve hücrenin ölümü gerçekleşir. Yüksek düzeylerdeki ROS, iç ve dış apoptotik yollardaki kaspaz miktarını ve işlevini doğrudan etkileyebilir. Hücrenin maruz kaldığı toksik ROS düzeylerinin, mitokondride intrinsik (içsel) apoptotik sinyalleşme veya ölüm reseptör yolları tarafından ekstrinsik (dışsal) apoptotik sinyalleşme ile başlatılan hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Hücre için toksik miktarda olan ROS seviyeleri, mitokondri membranına zarar verir bununla birlikte sitokrom c sitoplazmaya sızar. Sitokrom C, Apaf-1 ve pro-kaspaz 9'dan oluşan apoptozom kompleksinin oluşmasını sağlar ve kaspaz-3/7'nin kesilerek aktive olmalarını indükleyerek apoptoz tetiklenir (Moloney & Cotter, 2018), (Fulda & Debatin, 2006).

#### **2.4.1. Apoptoz**

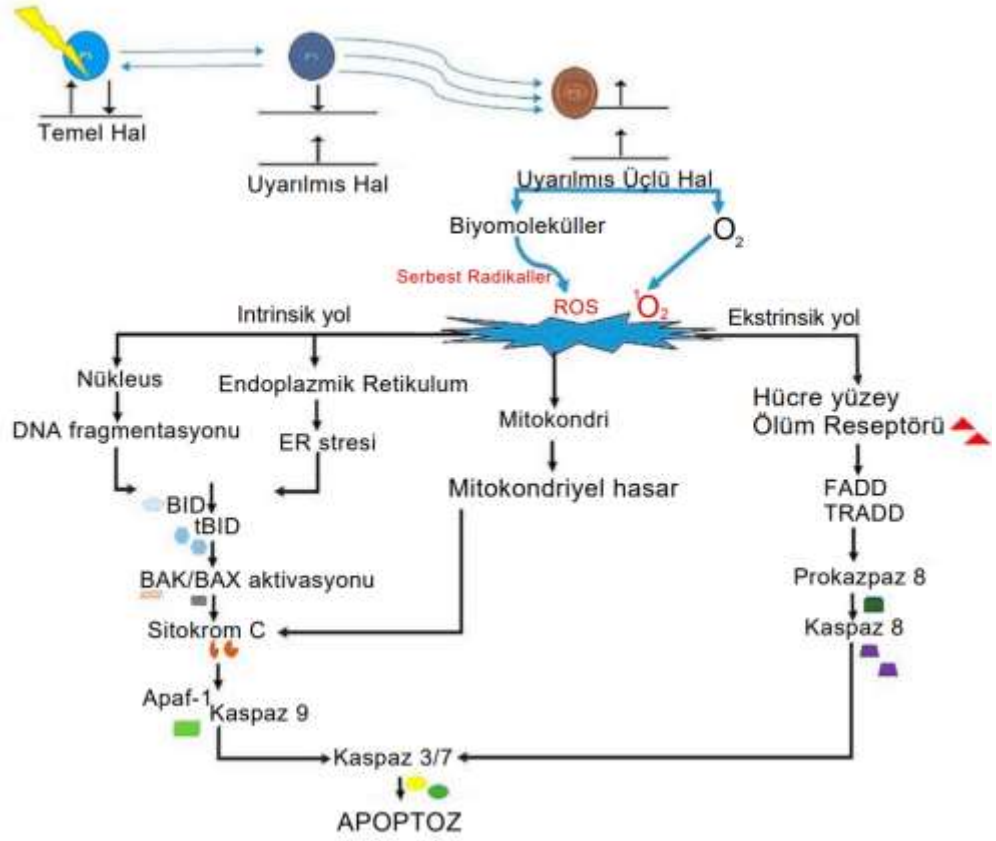
Apoptoz, bir hücrenin büyümesini ve bölünmesini durdurduğu ve bunun yerine, hücre içeriğinin ortama dağılmadan, kesecikler içerisine hapsedildiği hücrenin kontrollü ölümüyle sonuçlanan bir hücre ölüm sürecidir (Arcy, 2019).

Apoptozun başlaması, kaspazlar olarak bilinen bir dizi sistein-aspartik proteazın aktivasyonuna bağlıdır. Başlatıcı kaspazlar ve öldürücü kaspazlar olmak üzere iki kaspaz kategorisi vardır. Hücre hasarı tespit edildiğinde, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 ve

9) aktif olmayan prokaspazlar tarafından aktive edilir ve efektör kaspazları (kaspaz 3, 6 ve 7) aktive etmeye devam eder. Öldürücü kaspazlarının aktivasyonu, endonükleazların aktivasyonundan DNA parçalanmasına, proteinlerin ve hücre iskeletinin yıkımına, proteinlerin çapraz bağlanmasına, fagositik hücreler için ligandların ekspresyonuna ve apoptotik cisimlerin oluşumuna neden olan bir dizi olayı başlatır. Genel olarak, apoptoz, hem görüntü olarak mikroskop altında hem de Annexin V-FITC boyama ile akış sitometrisi ve DNA fragmentasyon deneyleri gibi moleküler biyolojik yöntemler ile kanıtlanabilir. Apoptozda, ölen hücrenin içeriğini hapseden apoptotik kesecikler çevredeki hücreler tarafından fagosite edilebilir, ancak bu fagosite edilme olayı genellikle in vitro ortamda hücre kültüründe gözlenir, makrofajlar, in vivo ortamda genellikle apoptotik hücreleri parçalanmadan önce uzaklaştırır. Bu, çevredeki hücrelere sinyal iletilmesi ile oluşacak ikincil hasar riskini ortadan kaldırır. (Arcy, 2019).

Fotodinamik terapi ile meydana gelen ölüm, pro-apoptotik proteinlerin indüklenmesi ile gerçekleştirilebilir. Bcl-2/Bax oranı hücrenin ölüme gidip gitmeyeceğini belirler yani proapoptotik Bax protein miktarı artışa geçtiğinde ve anti apoptotik Bcl-2 protein miktarı azaldığında apoptozda görev alan kaspazların aktivasyonu gerçekleşir (Gunaydin ve ark., 2021).

Kanser tedavisinde kullanılan ve denenilen yöntemlerin fotodinamik terapi de dahil olmak üzere büyük çoğunluğu apoptotik yolları indüklemek üzerine geliştirilmektedir. Fotodinamik terapi kullanılan fotosensitizan moleküle ve kanser türüne göre mitochondri aracılı içsel ya da reseptör aracılı dışsal yollar gibi farklı apoptotik yolları aktive edebilmektedir. (Buytaert2007, Ortel 2009). Fotodinamik terapi çoğunlukla apoptozu mitokondriyel yolak üzerinden gerçekleştirir ve öncelikli olarak kaspaz içeren yolları tetiklediği ortaya koyulmuştur. Bu sebeple mitokondriye lokalize olan fotosensitizan maddeler terapi için daha etkilidir. (Yoo ve ha 2012, Oleinick 2002 ).

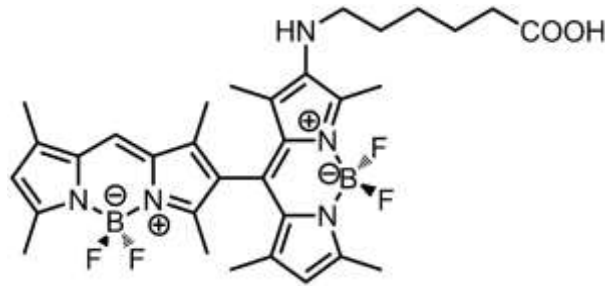


Şekil 4. Apoptotik yolağın fotodinamik terapi ile aktivasyonu (Mokoena ve ark., 2021).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Selüloz Asetat ile Kapsülasyon

Tez projesi kapsamında kullandığımız Selüloz asetat (SA) kapsül, enkapsüle BODIPY ve BODIPY molekülleri Antalya Bilim Üniversitesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Seda DEMİREL TOPEL tarafından temin edildi. Buchwald-Hartwig palladyum katalizörlü kenetlenme tepkimesi ile elde edilen BODIPY fotosensitizanın kimyasal formülü Şekil 5'deki gibidir (Ferreira ve ark., 2003). BODIPY PS'nin yapısal analizinde Bruker DPX-400 marka Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) cihazı kullanılmıştır. Bileşiğin yapısı <sup>1</sup>H-NMR spektroskopisi tekniği ile dötoro-kloroform (CDCl<sub>3</sub>) içerisinde TMS (trimetoksisilan) ile beraber kaydedilmiştir. Kimyasal kayma değerleri ppm cinsinden verilmiştir.



Şekil 5. SA kapsülasyonunda kullanılan BODIPY PS'nin kimyasal yapısı.

SA kapsülasyonu için, selüloz asetat (1 g) ve BODIPY PS (150 mg) DCM (60 mL) ve aseton (20 mL) karışımı içerisine eklenmiştir. Elde edilen karışım damla damla 300 mL'lik %1 (m/m) sulu SDS çözeltisinin üzerine ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat 10.000 rpm'de karıştırıldı. Süre sonunda solüsyon başka bir SDS solüsyonuna (%1, 300 mL) 1500 rpm'de ilave edildi ve 40 °C'de 4 saat ısıtıldı. Nihai karışımın ortam sıcaklığına soğutulmasından sonra çökeltildi, 12.000 rpm'de ultrasantrifüj yoluyla toplandı. Deiyonize su (50 mL) ile üç kez yıkanan hazırlanan BODIPY içerikli CA kapsülleri, 40 °C'de vakum altında kurutuldu. BODIPY yüklü CA kapsüller kullanılarak çökeltme tekniğiyle yapıldı. Aynı metot, BODIPY PS içermeden tekrarlanarak içi boş SA kapsülleri elde edildi. (Topel ve ark., 2021),(Demirel Topel, 2023).

### 3.2. UV-Vis spektroskopik analizi

SA kapsül, enkapsüle BODIPY ve BODIPY moleküllerinin ölçülmek üzere her birinden 96well... 100'er  $\mu\text{L}$  100 ppm konsantrasyon olacak şekilde ... absorpsiyon spektrumları hazırlanmıştır. Daha sonra bu örnekler eşit hacimlerde kuyulara yüklenmiştir. MultiskanGO (Thermo) cihazı kullanılarak 300nm ve 800nm dalga boyları aralığında ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.3. Hücre Kültürü

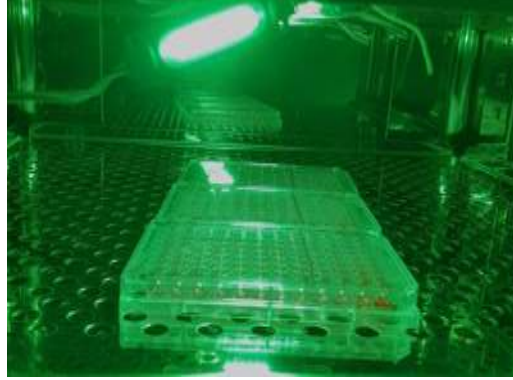
Sağlıklı fare fibroblast hücreleri (L929) ve insan kolorektal karsinomu (HT29) hücre hatları T-25 (ThermoFischer) hücre kültür flasklarında 10% (v/v) FBS (Biowest) içeren DMEM (SİGMA) içerisinde 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub>'li ortam koşullarında kültüre edildi. İnsan melanoma (SK-MEL-30) hücre hatları T-25 (ThermoFischer) hücre kültür flasklarında 10% (v/v) FBS (Biowest) içeren RPMI-1640 içerisinde 37 °C de, %5 CO<sub>2</sub> ortam koşullarında steril hücre kültür inkübatöründe (ESCO) kültüre edildi.

### 3.4. Hücre Canlılık Testi

Selüloz asetat kapsüllenmiş BODIPY moleküllerinin, L929 sağlıklı fare fibroblast hücreleri, HT29 insan kolorektal karsinomu ve SK-MEL-30 melanoma hücreleri üzerindeki hücre canlılığına etkisi MTT sitotoksikite testi ile ölçüldü.

Hücreler Tripsin - EDTA ile tripsinize edildikten sonra tripan mavisi ile boyanarak thoma lamı üzerinde sayıldı. Daha sonra bir ışıklı ve ışiksiz olmak üzere 2 tane farklı 96 kuyulu plakalara  $5 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı. Ekim sonrasında hücreler 37 °C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub>'li nemli kültür koşullarında gece boyu inkübasyona bırakıldı. Adeziv olan hücreler tutunduktan sonra 10.000ppm (2mg/200 $\mu\text{L}$ ) hazırlanmış stok SA kapsül, Enkasüle BODIPY ve BODIPY solüsyonlarından her iki 96 kuyulu plakaya duplike olacak şekilde 100-50-20-5-1-0,5-0,1ppm olmak üzere 7 dilüsyon hazırlandı. Ardından tutunmuş olan hücreler üzerine muamele edildi. Muamelesi yapılan 96 kuyulu plakalardan ışık/+ test grubu olan plaka inkübatör içerisinde 10 dakika yeşil ışık kaynağı ile ışığa maruz bırakıldı. Işık/- test gurubu ise ışık kaynağı bulunmayan ortamda 10 dakika bekletildi. Daha sonra her iki plaka da inkübatörde kültüre bırakıldı. 48. Saatte deney sonlandırıldı ve tüm kuyulara 10'ar  $\mu\text{L}$  MTT solüsyonu eklenerek 3 saat inkübasyona bırakıldı. 3 saat sonunda kuyulardaki ilaçlı besiyeri aspire dilerek her kuyuya 100'er  $\mu\text{L}$  DMSO (dimetilsülfoksit) eklendi. Oluşan formazan tuzu 15 dk sonunda DMSO ile tamamen

çözdürüldükten sonra plaka okuyucu (Thermo Scientific-Multiskan GO) ile 540 ve 690 nm dalga boylarında ölçüm yapıldı ve sonuçlar kaydedildi.



Şekil 6. 96 kuyulu plakalarda MTT deneyi için gerçekleştirilen ışık maruziyeti görüntüsü.

### 3.5. Koloni Oluşturma Deneyi

L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücre hatlarının, tripsinize edildikten sonra thoma lamı ile sayım yapılarak, 2 tane 24 kuyulu plakalara (Thermo Scientific) 500hücre/kuyu olacak şekilde ekimleri yapıldı. Bir gece boyunca kültüre bırakıldı ve hücreler tutunduktan SA kapsül 10ppm, enkapsüle BODIPY 10ppm ve BODIPY 10ppm konsantrasyonlarda muameleleri yapıldı. Uygulamadan sonra ışık/+ plaka 10 dakika boyunca ışığa maruz bırakılırken, ışık/- plaka 10 dakika boyunca ışısız ortamda bekletildi. Daha sonra her iki plate de kültür için inkübatöre bırakıldı. 24 saat sonunda ilaçlı besiyeri aspire edildi ve hücreler beslendi. Ardından hücreler gün aşırı beslenerek 7 gün boyunca koloni oluşturma yetenekleri gözlemlendi. 7 günün sonunda oluşan koloniler kuyulardan besiyeri uzaklaştırılıp fikse edildi. Kristal viyole boyası ile boyandı. Boyanmış koloniler kuyular tamamen kurutulduktan sonra fotoğraflandı.

### 3.6. Akım Sitometrik Hücresel ROS Testi

Selüloz asetat kapsüllenmiş BODIPY türevli moleküllerinin, L929 sağlıklı fare fibroblast hücreleri, HT29 insan kolorektal karsinomu ve SK-MEL-30 melanoma hücrelerine muamele edilip ışık maruziyeti ardından sonra oluşan hücresel ROS DCFDA (abcam) kiti ile ölçüldü. Bu yöntemde, hücresel ROS düzeyleri floresan bir boya olan DCFDA yardımı ile belirlenmiştir. DCFDA intraselüler hidroksil, peroksil ve diğer ROS türevlerinin düzeyini belirler. DCFDA ajanı hücre içinde esterazlar tarafından deasetillenir ve mevcut ROS türevleri ile okside edilerek floresan özelliğe

sahip 2',7'-diklorofloresan (DCF)'a dönüşür. DCF, 485 nm dalgaboyundaki ışık ile eksite edilerek 535 nm dalgaboyunda floresan ışımaya verir.

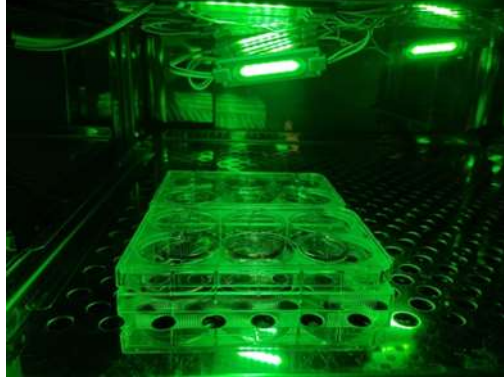
Hücre kültür flasklarında çoğalan hücreler tripsinize edildikten sonra tripan mavisi ile boyanarak sayımı yapıldı. Sayım sonunda her hücre hattından 6 tane ependorf tüpe 100.000'er hücre koyuldu. Daha sonra santrifüj yapılarak mevcut besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler kit tampon solüsyonu ile tekrar süspansiyon hale getirildi. TBHP ve negatif kontrol tüpleri haricinde diğer tüplerde bulunan hücre süspansiyonu içerisine 20µM DCFDA eklendikten sonra hücreler 30dk, 37 °C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda TBHP, negatif kontrol ve pozitif kontrol dışındaki üç tüpe SA kapsül, Enkasüle BODIPY ve BODIPY bileşikleri 50'şer ppm muamele edildi. Ardından 6 tüpün tamamı 10dk boyunca ışığa maruz bırakıldı.

Işık aktivasyonundan sonra akış sitometri cihazı (Beckman Coulter) kullanılarak örnekler ölçüme alındı ve hücrel ROS verileri kantitatif olarak elde edildi.

### **3.7. Akım Sitometrik Annexin-V Apoptoz Analizi**

Annexin V - FITC apoptoz kiti temelinde, hücre zarının iç yüzeyinde konumlanmış negatif yüklü bir fosfolipid olan fosfatidilserinin, apoptoz sırasında bütünlüğü bozulmayan ancak asimetrisini kaybeden hücre zarının dış yüzeyine hareket eder. Makrofajlar için sinyal oluşturmak üzere gerçekleştirdiği hareketinin ardından FITC Annexin V, proteinlerin yüksek affinite göstererek ona bağlanması ile apoptotik hücrelerin boyanması yöntemine dayanır. Bu şekilde hücre bütünlüğü kaybedilmeden apoptotik hücre tespiti ve ölçümü yapılabilmektedir.

L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücre hatları 6 kuyulu plakalara ekildi ve kültüre bırakıldı. 24 saat sonunda tutunan hücrelere 10ppm selüloz Asetat kapsül, 10ppm enkapsüle BODIPY ve 10ppm BODIPY muamele edildi. Ardından hücreler 10 dakika ışığa maruz bırakıldıktan sonra 48 saat boyunca inkübasyona bırakılarak kültür takibi yapıldı. 48.saatın sonunda her kuyudan hücreler ayrı tüplere toplandı ve annexin V - FITC kiti (Beckman Coulter – IM3546) uygulaması yapıldı. Uygulamanın ardından örneklerin akış sitometrisi cihazında (Beckman Coulter) PE-A ve FITC-A kanalları seçilerek ölçümü yapıldı.



**Şekil 7.** Apoptoz tayini için 6 kuyulu plakalarda gerçekleştirilecek deney öncesi hücrelere uygulanan ışık maruziyeti.

### **3.8. İstatistiksel Analiz**

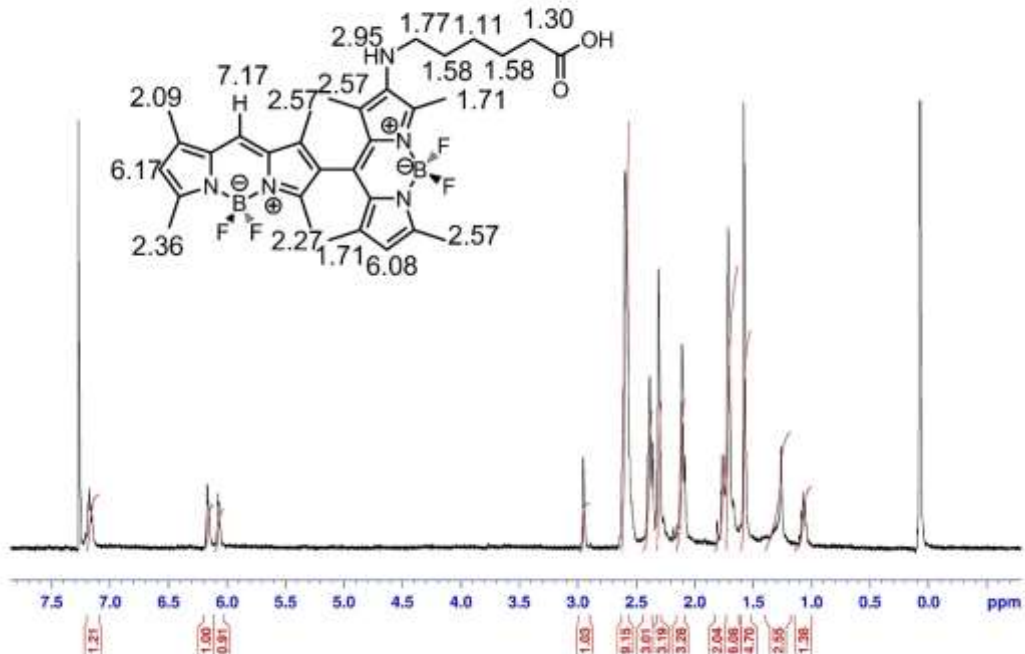
Elde edilen verilerin ortalama, yüzde, standart sapma ve standart hata değerlerinin hesaplamaları yapıldı. GraphPad Prism 8 online programı kullanılarak t testi yapıldı, güven aralıkları ve p değerleri hesaplandı. Alınan sonuçların istatistiksel anlamlılıkları belirlendi ve grafik çizimleri yapıldı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Araştırma Sonuçları

#### 4.1.1. BODIPY'nin yapısal analizi

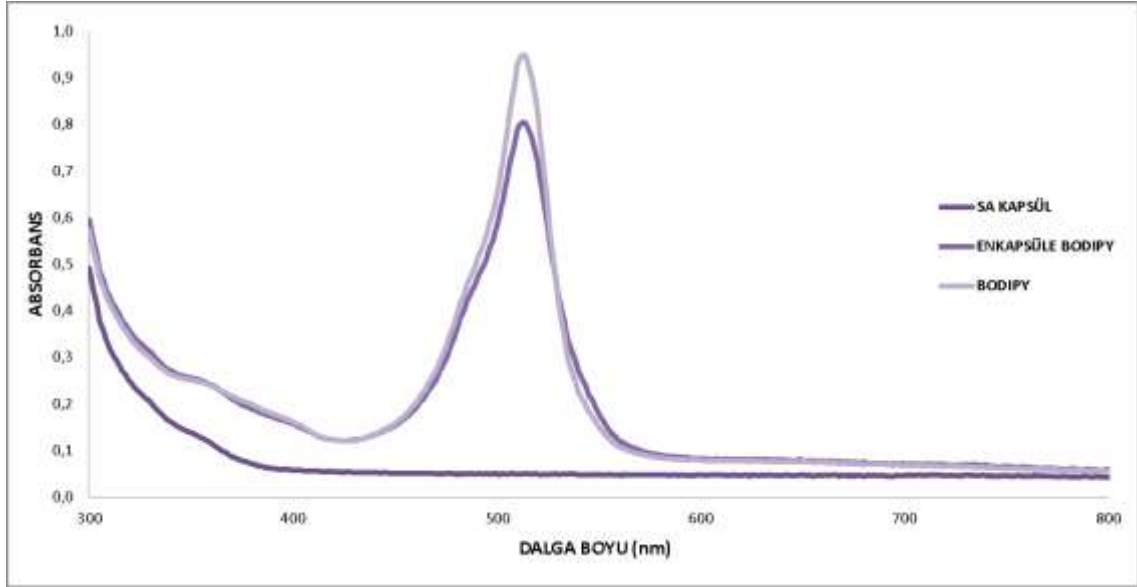
BODIPY FS'nin yapısal analizi  $^1\text{H-NMR}$  tekniği ile aydınlatılmıştır.  $^1\text{H-NMR}$  için, yapıda bulunan hidrojen atomlarının sayıları ile uyum halindedir. BODIPY PS'nin Şekil 8'deki  $^1\text{H-NMR}$ 'ı incelendiğinde, BODIPY iskeletine ait kimyasal kayma değerleri 7,16 (s, 1H, CH), 6,17 (s, 1H, CH) ve 6,08 (s, 1H, CH) ppm olarak bulunmuştur. BODIPY'ye süstitüe metil protonları ile sırası ile 2,57 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 2,36 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,27 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,09 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ve 1,71 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ) ppm olarak tespit edilmiştir. Bileşikteki sekonder amin protonuna ait (-NH) kimyasal kayma değeri 2,95 (s, 1H, NH)'da gözlenmiştir. Bileşikteki alifatik zincir üzerindeki hidrojenler ise sırasıyla (1,77 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,58 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1,30 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ve 1,11 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ppm olarak gözlenmiştir.



Şekil 8. BODIPY FS'nin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

#### 4.1.2. SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY'nin UV-VIS spektrometrik verileri

SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY'lerin absorpsiyon spektrumları 300-800 nm dalga boyları aralığında ölçülmüştür.

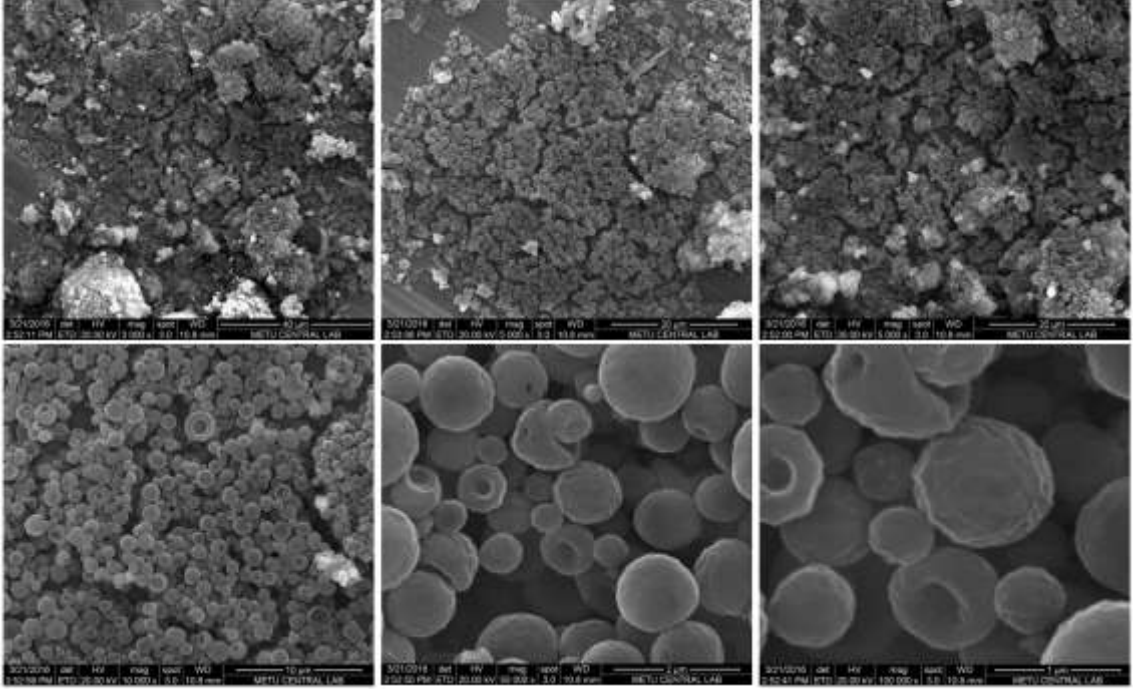


Şekil 9. SA Kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY moleküllerinin UV-VIS absorpsiyon spektrumları.

Gerçekleştirilen ölçüm sonucunda BODIPY molekülüne ait maksimum absorpsiyon değerinin 513 nm olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte SA ile kapsüle edilmiş enkapsüle BODIPY'lerde aynı şekilde 513 nm'de maksimum absorpsiyon değeri ölçülmüştür. SA kapsüllerin spektroskopik ölçüm sonucunda BODIPY'e ait herhangi bir absorpsiyon değeri saptanmamıştır. (Şekil 9). Bu sonuçlara göre enkapsüle BODIPY'lerin içerisinde BODIPY molekülü içerdiği ve kapsüllemenin başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.

#### 4.1.3. BODIPY'nin selüloz asetat ile kapsülasyonu

SA enkapsüle BODIPY'lerin boyut ve morfolojisini belirlemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi yapılmıştır. SEM görüntülerine göre, kapsüllerin partikül boyutlarının ortalama 1 µm olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 10. Enkapsüle BODIPY'lerin SEM görüntüleri.

#### 4.1.4. Boş SA kapsül, enkapsüle BODIPY ve BODIPY moleküllerinin L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri

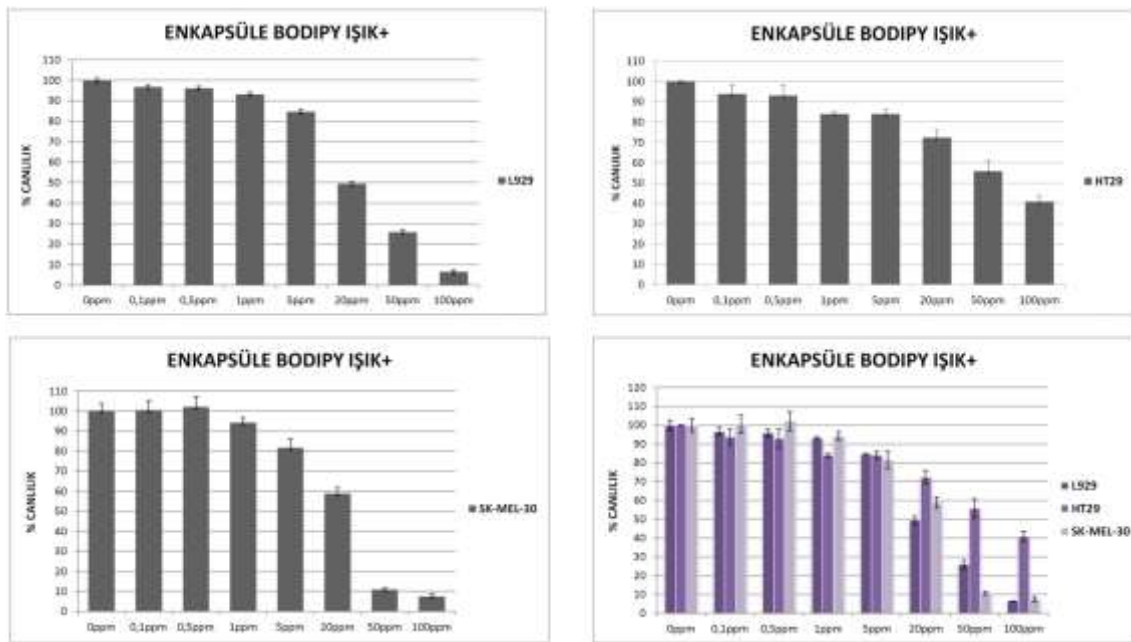
Tez çalışmasında ilk olarak fotodinamik terapide kullanılacak olan fotosensitif maddelerin hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri incelemek amacıyla MTT deneyi uygulanmıştır. MTT deneyinde tüm deneysel muameleler 48 saat sürede olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Işık maruziyeti 10 dakika süre ile uygulanmış ve SA boş kapsüller (0,1-100 ppm) ile muamele edilmiş L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerin sitotoksosite düzeylerinde anlamlı bir değişim saptamadık. Bu sonuca göre, boş SA kapsüllerinin ışık varlığında sitotoksositeye neden olmadığı anlaşılmıştır (Şekil



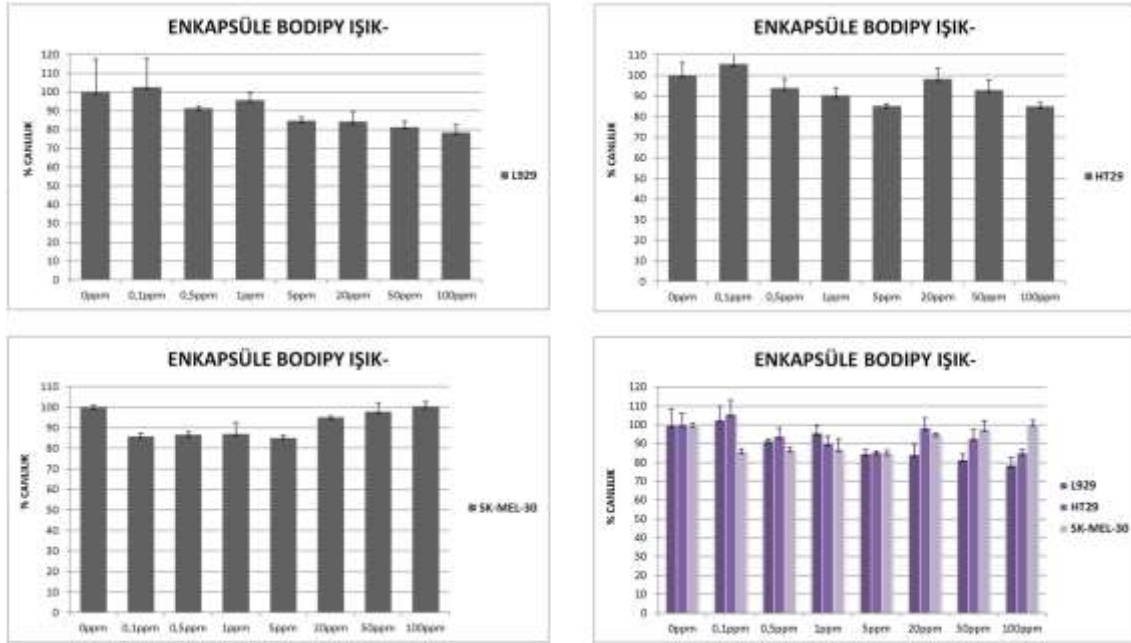
**Şekil 12.** SA kapsüllerin ışık maruziyeti uygulanmadığı durumda L929, HT29, SK-MEL-30 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.

Işık maruziyeti varlığında enkapsüle BODIPY'ler ile muamele edilen tüm test edilen hücrelerde göreceli olarak toksik etkiler görülmüştür. Enkapsüle BODIPY'ler (50 ppm) L929 için %74, HT29 için %44, ve dikkat çekici bir şekilde SK-MEL-30 için %89 oranında hücre canlılık düzeylerini azaltmıştır. Enkapsüle BODIPY, sağlıklı kontrole (L929) göre; HT29 hücrelerini yaklaşık 2-kat daha düşük düzeyde etkilerken, SK-MEL-30 üzerinde yaklaşık 2.4-kat daha fazla sitotoksik etkiye neden oldu. HT29 hücrelerine göre ise SK-MEL-30 hücrelerinde 5.1-kat daha sitotoksik olduğu saptandı. 100 ppm oranındaki enkapsüle BODIPY'ler tüm hücreler için tamamen toksik olduğu görülmektedir. Işığa maruziyet neticesinde enkapsüle BODIPY molekülleri belirli dozlardan sonra ancak sitotoksik etkiye neden olabildiği ve SA kapsüllemenin güvenilirliğini sağladığını söyleyebiliriz (Şekil 10). Deney sonucuna bağlı olarak, ışık varlığında enkapsüle BODIPY'nin IC<sub>50</sub> değerinin, L929 için 14.54 ppm, HT29 için 58.6 ppm ve SK-MEL-30 hücreleri için 9.6 ppm olduğu saptanmıştır.



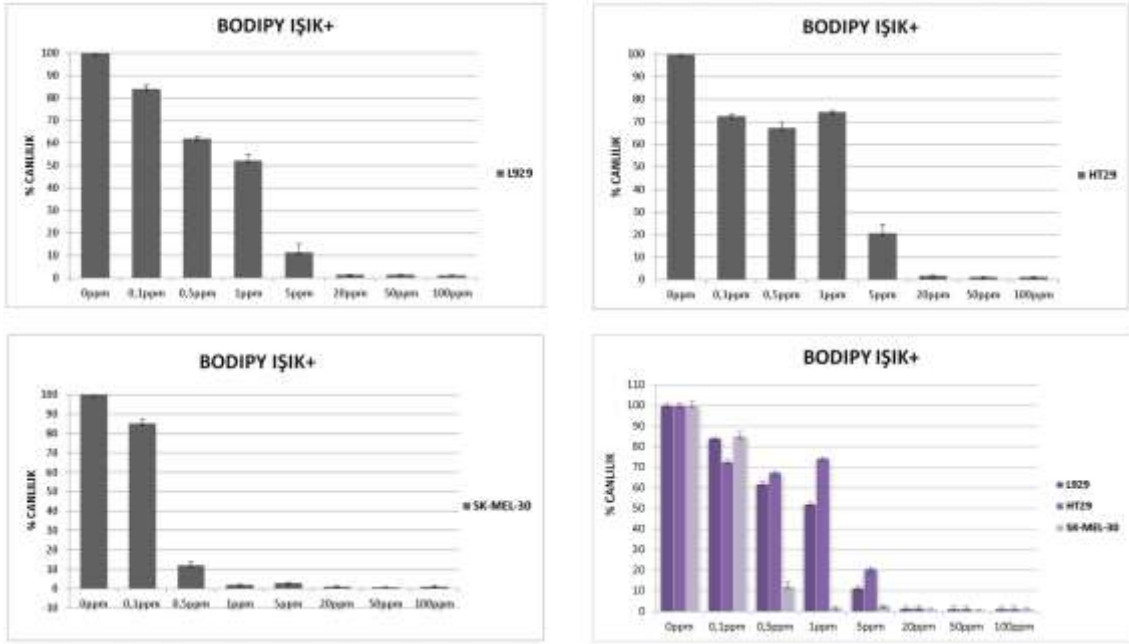
**Şekil 13.** Enkapsüle BODIPY ajanının ışık maruziyeti varlığında L929, HT29, SK-MEL-30 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.

Enkapsüle BODIPY'ler ile ışık yokluğunda muamele edilen L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerinin canlılığı değişmemiştir. Bu sonuca göre enkapsüle BODIPY'ler ışık yokluğunda aktive olamaması dolayısıyla sitotoksik etki göstermedi. (Şekil 11).



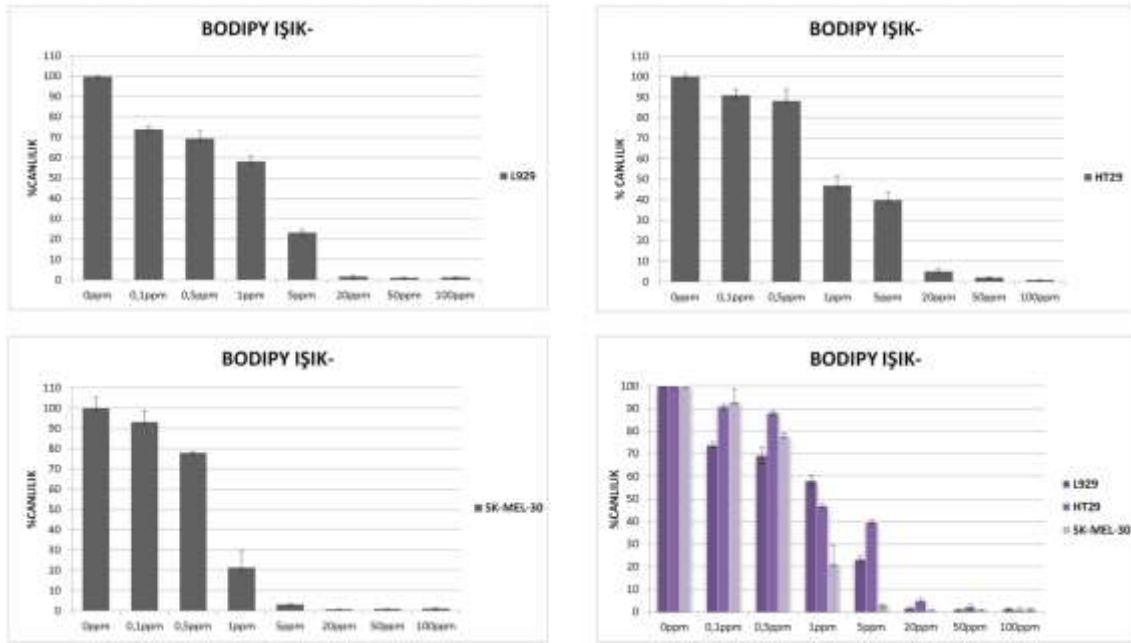
Şekil 14. SA kapsüllerin ışık maruziyeti uygulanmadığı durumda L929, HT29, SK-MEL-30 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.

BODIPY'nin ışık maruziyeti ile birlikte tüm hücreler üzerinde toksik etkiler oluşturmuştur. Bu sitotoksik etkiler çok düşük konsantrasyonlarda meydana gelmiştir. BODIPY 0,5 ppm konsantrasyonda; L929 için %38, HT29 için %33 ve SK-MEL-30 için dikkat çekici bir şekilde %88 oranında hücre canlılık düzeylerini azaltmıştır. BODIPY, sağlıklı kontrole (L929) göre; HT29 hücreleri sağkalımı üzerinde anlamlı bir değişime neden olmamıştır. SK-MEL-30 hücreleri üzerinde ise 2.3-kat daha yüksek düzeyde sitotoksik olduğu saptandı. HT29 hücrelerine göre, SK-MEL-30 hücrelerinde 2.6-kat daha etkili olduğu saptandı. BODIPY'nin 20 ppm ve üzerindeki konsantrasyonları tüm hücreler için tamamen toksik olduğu görüldü. (Şekil 12). Deney sonucunda, ışık varlığında BODIPY molekülünün  $IC_{50}$  değeri, L929 için 1.41 ppm, HT29 için 2.22 ppm ve SK-MEL-30 hücreleri için 0.21 ppm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 15. BODIPY ajanının ışık maruziyeti varlığında L929, HT29, SK-MEL-30 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.

Işık yokluğunda, BODIPY (5 ppm) uygulaması L929 hücrelerinde %77, HT29 hücrelerinde %60 ve SK-MEL-30 hücrelerinde %97 oranında hücre canlılık düzeylerini azaltmıştır. BODIPY, sağlıklı kontrole (L929) göre; HT29 hücrelerinde 1,7-kat daha az etkili olmuş ve dikkat çekici bir şekilde SK-MEL-30 hücrelerinde 7.6-kat daha yüksek düzeyde etkili olmuştur. HT29 hücrelerine kıyasla SK-MEL-30 hücreleri üzerinde yaklaşık 13-kat daha fazla etkili olduğu saptanmıştır. Bu verilere göre BODIPY ajanının ışık aktivasyonuna gerek olmaksızın sitotoksik etkiye sebep olabildiğini saptadık. Bunun yanı sıra, BODIPY'nin sitotoksik etkisinin, ışık varlığında aktivasyonu ile tüm test edilen hücreler için en az 2-kat artırdığını söyleyebiliriz (Şekil 13). Deney sonucunda, ışık yokluğunda BODIPY molekülünün  $IC_{50}$  değerleri, L929 için 2.26 ppm, HT29 için 3.08 ppm ve SK-MEL-30 hücreleri için 0.70 ppm olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 16.** BODIPY ajanının ışık maruziyeti uygulanmadığı durumda, L929, HT29, SK-MEL-30 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.

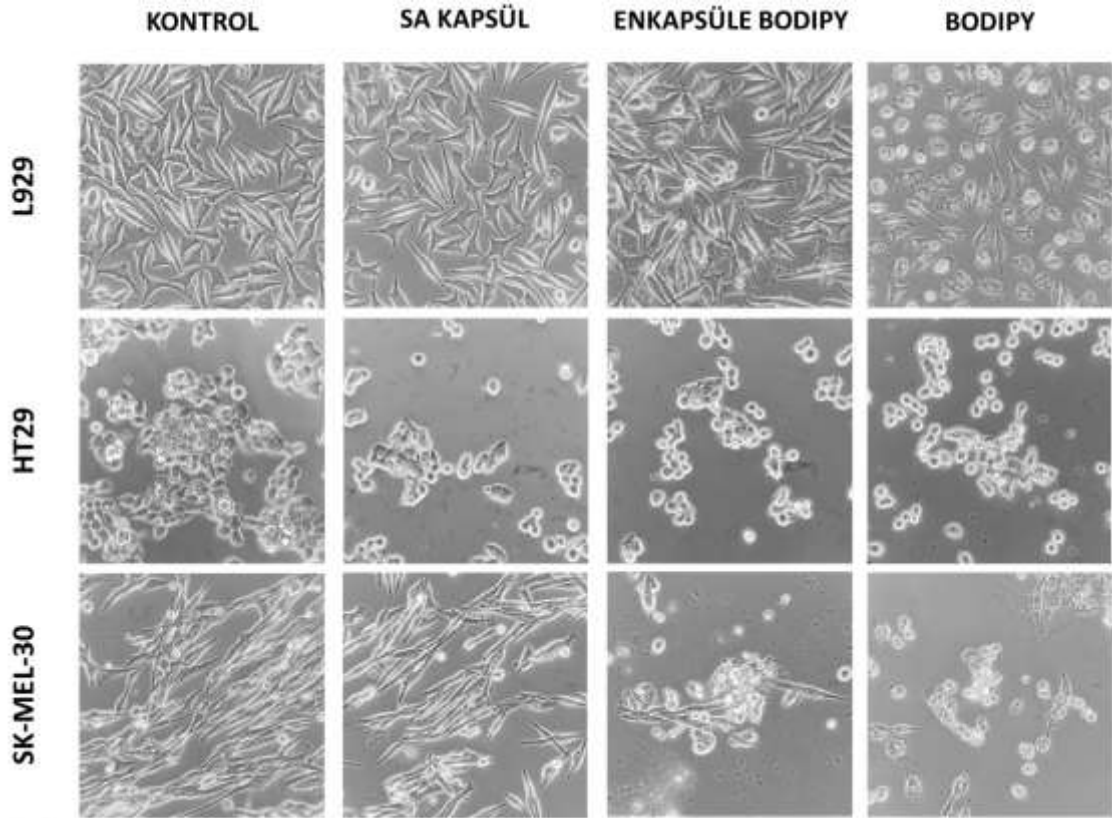
Özetle, BODIPY'nin ışık ile aktivasyonu sonucunda sitotoksik etkisinin arttığını belirledik. SA enkapsüle edilen BODIPY moleküllerinin, enkapsüle edilmemiş formlarından farklı olarak ışık yokluğunda toksik etki oluşturmamakta ve enkapsüle edilmenin istenmeyen doz bağımlı sitotoksisiteden koruduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca, elde edilen verilere göre, BODIPY moleküllerinin SK-MEL-30 hücreleri üzerinde önemli ölçüde toksik etkiler göstermiştir.

Bu sonuçlara bağlı olarak takip edilen diğer deneylerde tüm muamele dozları 10 ppm olacak şekilde belirlenmiştir.

#### **4.1.5. Boş SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY moleküllerinin, L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerinin kültür ortamındaki *in vitro* etkileri.**

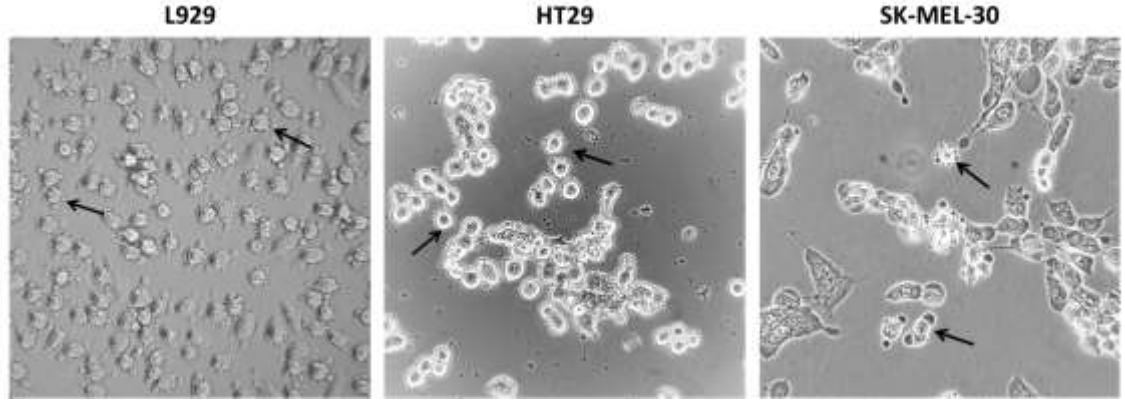
Fotosensitif ajanların belirlediğimiz dozlarda uygulandıktan hemen sonra ışık maruziyeti gerçekleştirildikten sonra 48 saat boyunca kültüre edilmiştir. Süre sonunda, sağlıklı fare fibroblast (L929), insan kolorektal karsinoma (HT29) ve insan melanoma (SK-MEL-30) hücrelerine ait hücre görüntüleri invert mikroskobu (Zeiss) yardımıyla elde edildi. Uygulanan ajanların hücreler üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkiler sonucunda boş SA kapsüllerin hücre morfolojisi üzerinde anormal bir etki oluşturmadığı ve hücrelere zarar vermediğini gözlemledik. Enkapsüle BODIPY ajanının, maruziyeti sonrasında sağlıklı hücreler (L929) üzerindeki etkisinin kanser

hücrelerine göre daha düşük düzeyde olduğunu belirledik. Ayrıca, kanser hücreleri (HT29 ve SK-MEL-30) üzerinde toksisiteye bağlı olarak morfolojik değişimlere sebep olduğunu saptadık. Kapsüle edilmemiş olan BODIPY ajanının ise sağlıklı ve kanser dahil olmak üzere tüm hücre hatlarının ölümüne sebep olarak ciddi apoptotik ve nekrotik hücresel değişimlere sebep olduğunu belirledik. Ancak sağlıklı L929 fibroblast hücrelerinin, bu ajana karşı HT29 kolorektal kanser ve SK-MEL-30 cilt kanseri hücrelerine göre daha az etkilendiğini söyleyebiliriz (Şekil 14).



**Şekil 17.** L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerine ait kontrol, SA kapsül (10 ppm), Enkapsüle BODIPY (10 ppm) ve BODIPY (10 ppm) ajanlarının uygulamasının ardından hücrelerin 48. saatteki görüntüleri (40X).

BODIPY ajanının ışıkla aktive edilmesiyle beraber kültür ortamında hücrelerin tamamı göreceli olarak farklı olsa da etkilendiğini belirledik. Hücrelerin morfolojik yapıları incelendiğinde, hücre yuvarlaklaşması, hücre genişlemesi ve blebbing (apoptotik kesecikler) gibi apoptotik hücre morfolojileri izlendi (Şekil 15).



**Şekil 18.** L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerinde BODIPY (10ppm) ajanının meydana getirdiği apoptotik keseciklere ait görüntüler (40X).

#### **4.1.6. Boş SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY moleküllerinin, L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerinin koloni oluşturma kabiliyetleri üzerindeki etkileri**

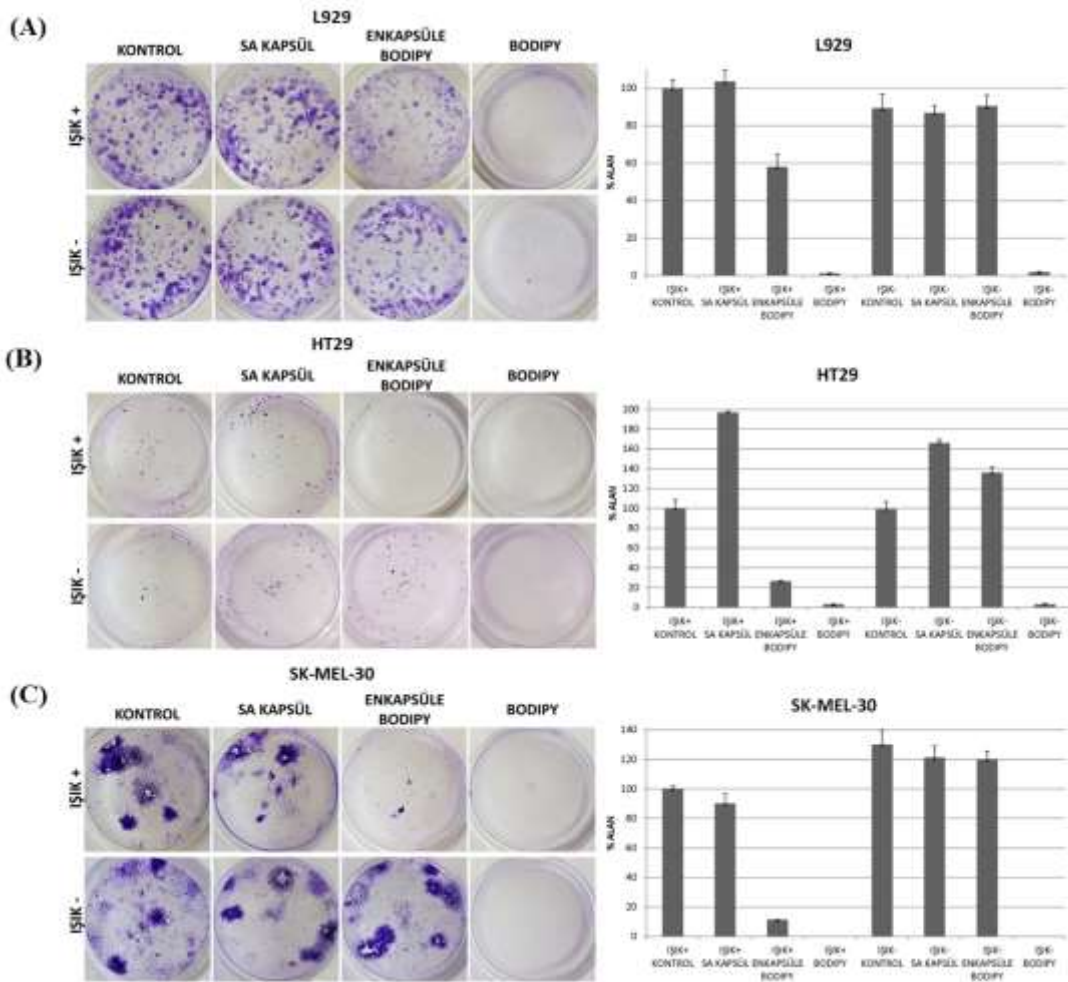
Muamele edilen hücrelerinin koloni oluşturabilme kabiliyetleri *in vitro* koloni formasyon deneyi ile değerlendirildi.

Hücreler 24-kuyucuklu plakalarda (500 hücre/kuyucuk) 7 gün boyunca boş SA kapsül, enkapsüle BODIPY ve BODIPY molekülleri ile muamele edildikten sonra, her kuyucuk kristal viyole ile boyanmıştır. Oluşan kolonilerin büyüklük ve sayıları göz önüne alınarak ImageJ yazılımı yardımı ile hücrelerin kültür kabındaki % değerleri belirlenmiştir. Işık verilen deney grubunda PBS ile muamele edilen kontrol hücreleri temel alınmış ve buna göre normalizasyon hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen deney sonuçlarına göre, boş SA kapsüllerin koloni oluşturma yeteneği üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığını belirledik. BODIPY ajanı tüm hücre hatlarının koloni oluşturma yeteneğini yaklaşık %97 oranında azaltmıştır. Enkapsüle BODIPY ajanı ise muamele edilmeyen hücelere kıyasla, koloni oluşturma kabiliyetlerinin L929 hücrelerinde %58, HT29 hücrelerinde %26, SK-MEL-30 hücrelerinde ise %11 oranlarında olduğunu belirledik. Bu verilere göre, ışık uygulanan deney setinde enkapsüle BODIPY'nin kontrole göre koloni oluşturma yeteneğini L929 hücrelerinde 1.7-kat, HT29 hücrelerinde 3.8-kat ve SK-MEL-30 hücrelerinde 8.7-kat azaldığı tespit edilmiştir. Kanser hücrelerine bakıldığında ise SK-MEL-30 hücrelerinde HT29'a oranla 2.3-kat azalmıştır.

Işık uygulanmayan deney setinde ise kontrol gruplarına göre bakıldığında SA kapsül ve Enkapsüle BODIPY ajanları tüm hücre hatlarının koloni oluşturma

yetenekleri üzerinde olumsuz bir etki göstermediğini, ancak BODIPY ajanının bu yeteneği tüm hücre hatları üzerinde %95 oranında düşürdüğünü saptadık.

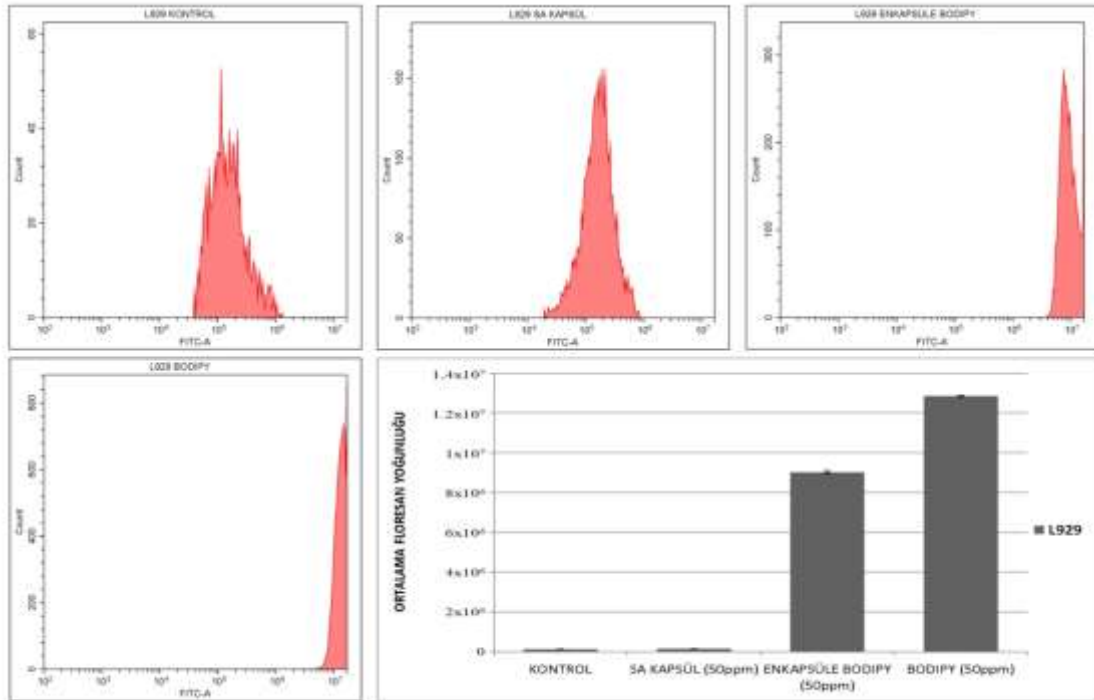
Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda kapsüllemenin ışık varlığında, serbest halde kontrolsüz toksisite yaratan BODIPY ajanının kontrollü etki göstermesini sağladığını ve ışık uygulanmadığında salım yapmayarak hücrenin koloni oluşturma yeteneğini engellemediği gördük. Işıklı deney grupları göz önünde bulundurulduğunda sağlıklı fibroblast hücreleri olan L929 hücre hattı hücrelerinin, kanser hücreleri olan HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerine göre koloni oluşturma yeteneklerinin daha az etkilenmiş olması da ilgili ajanın sağlıklı hücreler üzerindeki etkisinin daha tolere edilebilir düzeyde olduğunu söyleyebiliriz (Şekil 16).



Şekil 19. Koloni oluşturma deneyi sonuçları. (A) L929, (B) HT29, (C) SK-MEL-30 hücre hattına ait koloni görüntüleri ve kuyu içerisinde kapladıkları alana ait verilerin grafiği.

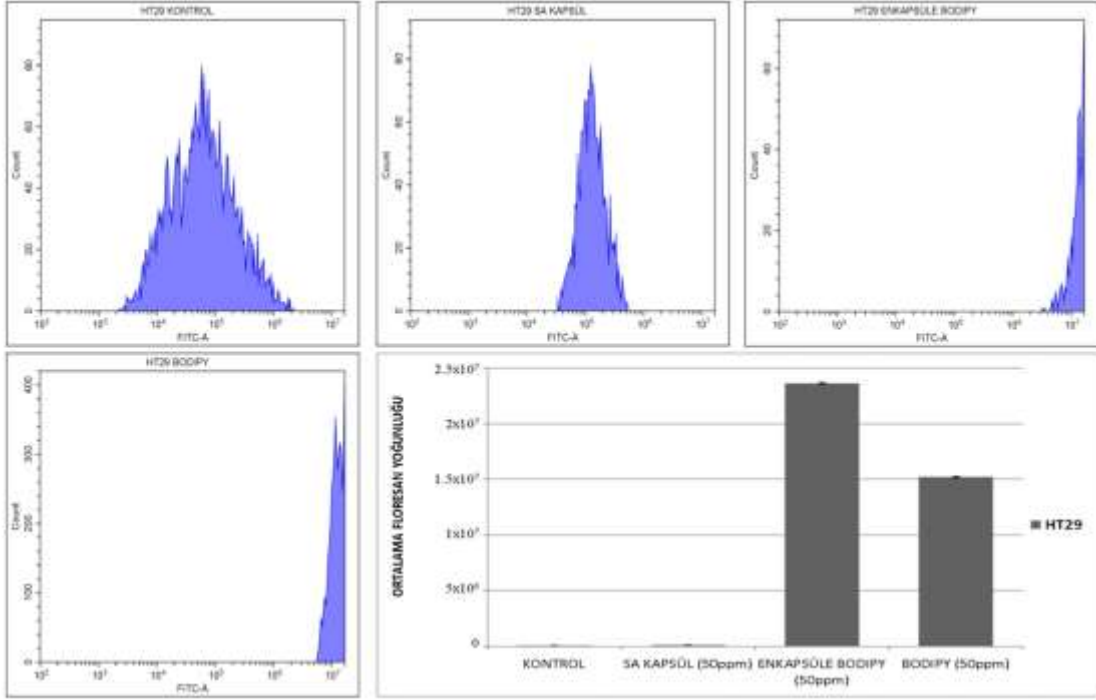
#### 4.1.7. Boş SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY molekülleri ile muamele edilen L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerin intraselüler ROS düzeyleri

Hücre içi ROS miktar tayini DCFDA kiti kullanılarak akım sitometri yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen akım sitometrik verilere göre L929 hücrelerinde, boş SA kapsüllerin hücresel ROS düzeyini değiştirmedini belirledik. Enkapsüle BODIPY'nin, kontrol ve SA kapsüllere göre hücresel ROS miktarını yaklaşık 55-kat, enkapsüle olmayan serbest BODIPY'nin ise 79-kat artırdığı saptanmıştır. BODIPY ajanı, enkapsüle BODIPY formuna göre 1.43-kat daha fazla ROS üretimine sebep oldu (Şekil 17).



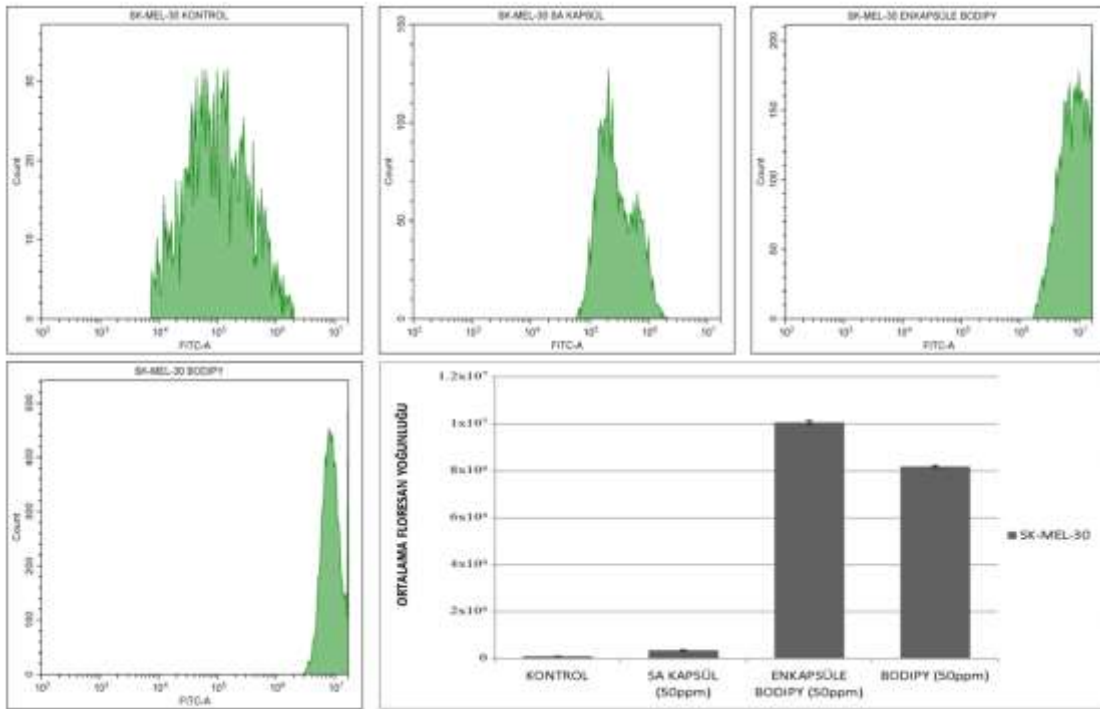
**Şekil 20.** L929 hücre hattına ait kontrol ve SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY uygulamasının ardından akış sitometrik histogram ve ölçülen floresan yoğunluğuna ait sütun grafikleri.

HT29 hücrelerinde SA kapsülleri tek başına ROS üretimini indükledi. Enkapsüle BODIPY, hücresel ROS miktarını kontrol ve SA kapsüllere göre 192-kat, enkapsüle olmayan serbest BODIPY ise 123-kat artırdığını saptadık. Enkapsüle BODIPY ajanının ürettiği ortalama ROS miktarının, BODIPY ajanına göre 1.6-kat fazla olduğunu saptadık (Şekil 18).



**Şekil 21.** HT29 hücre hattına ait kontrol ve SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY uygulamasının ardından akış sitometrik histogram ve ölçülen floresan yoğunluğuna ait sütun grafikleri.

SK-MEL-30 hücrelerinde diğer hücrelerde elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde SA kapsülleri anlamlı düzeyde ROS miktarını artırmadı. Enkapsüle BODIPY'nin, hüresel ROS miktarını kontrol ve SA kapsüllere göre yaklaşık 28-kat arttırdığını, enkapsüle olmayan serbest BODIPY ise 23-kat arttırdığını saptadık. SK-MEL-30 hücrelerinde, enkapsüle BODIPY serbest BODIPY ajanına göre 1.2-kat daha yüksek düzeyde ROS üretimini tetikler (Şekil 19).



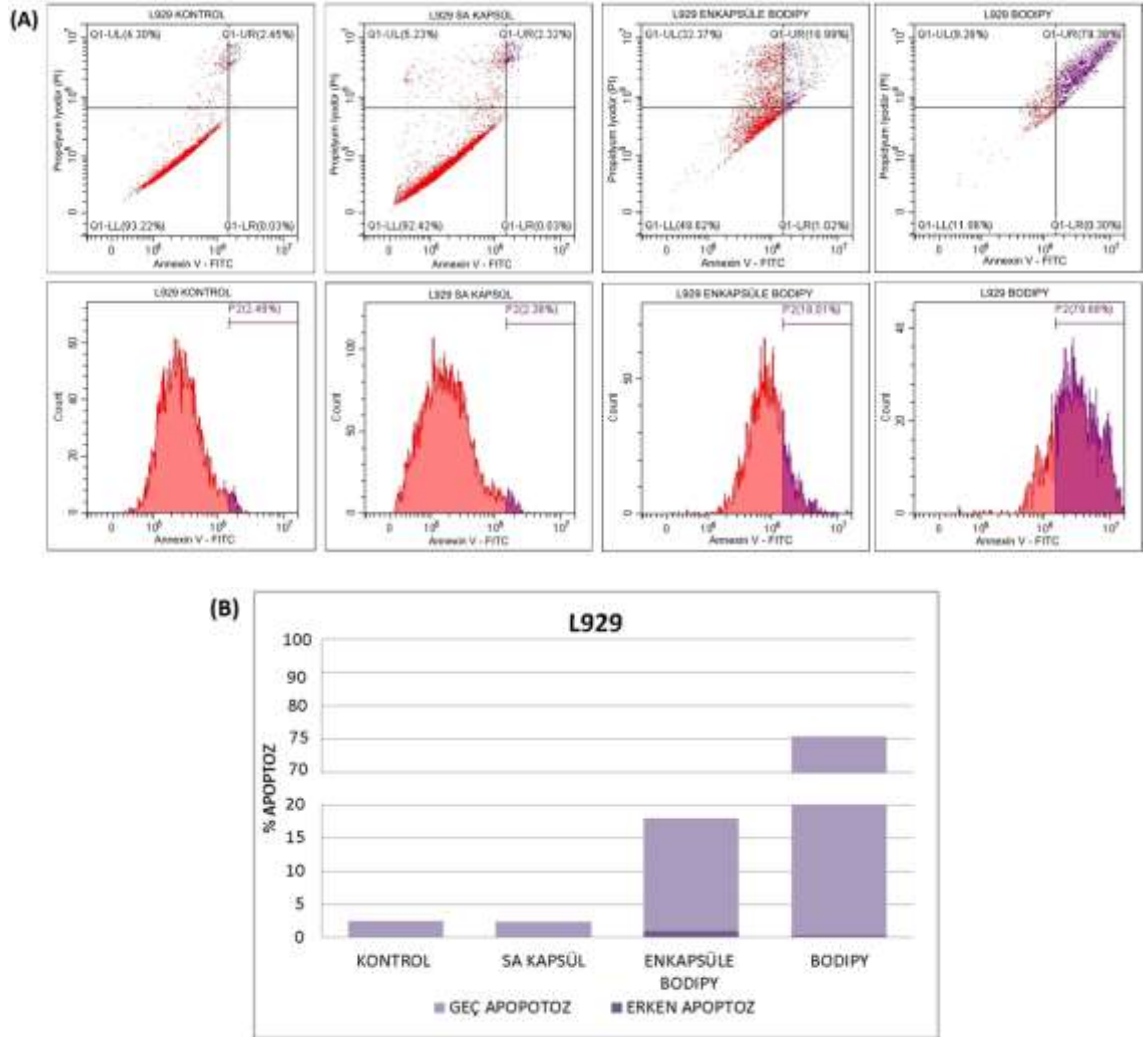
**Şekil 22.** SK-MEL-30 hücre hattına ait kontrol ve SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY uygulamasının ardından akış sitometrik histogram ve ölçülen floresan yoğunluğuna ait sütun grafikleri.

ROS miktar tayini verilerine göre, SA kapsüllerinin tüm test edilen hücrelerde hücreSEL ROS miktarını artırmadığını, toksik olmadığını ve biyoyumlu yapıda olduğunu belirledik. Enkapsüle BODIPY, enkapsüle olmayan serbest BODIPY ajanına göre, sağlıklı L929 hücrelerinde 1.43-kat daha düşük düzeyde ROS üretimini sağlarken, SK-MEL-30 ve HT29 hücrelerinde 1.2-1.6 kat daha yüksek düzeyde ROS üretimine neden olmuştur. Bu durum, ışık muamelesi yokluğu durumunda, toksik etki oluşturmayan güvenli enkapsüle BODIPY ajanının ışıkla aktivasyonu ile sağlıklı hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde, serbest BODIPY'e göre, daha yüksek düzeyde hücreSEL ROS üretimini artırmıştır.

#### **4.1.8. Boş SA kapsül, Enkapsüle BODIPY ve BODIPY moleküllerinin L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisi**

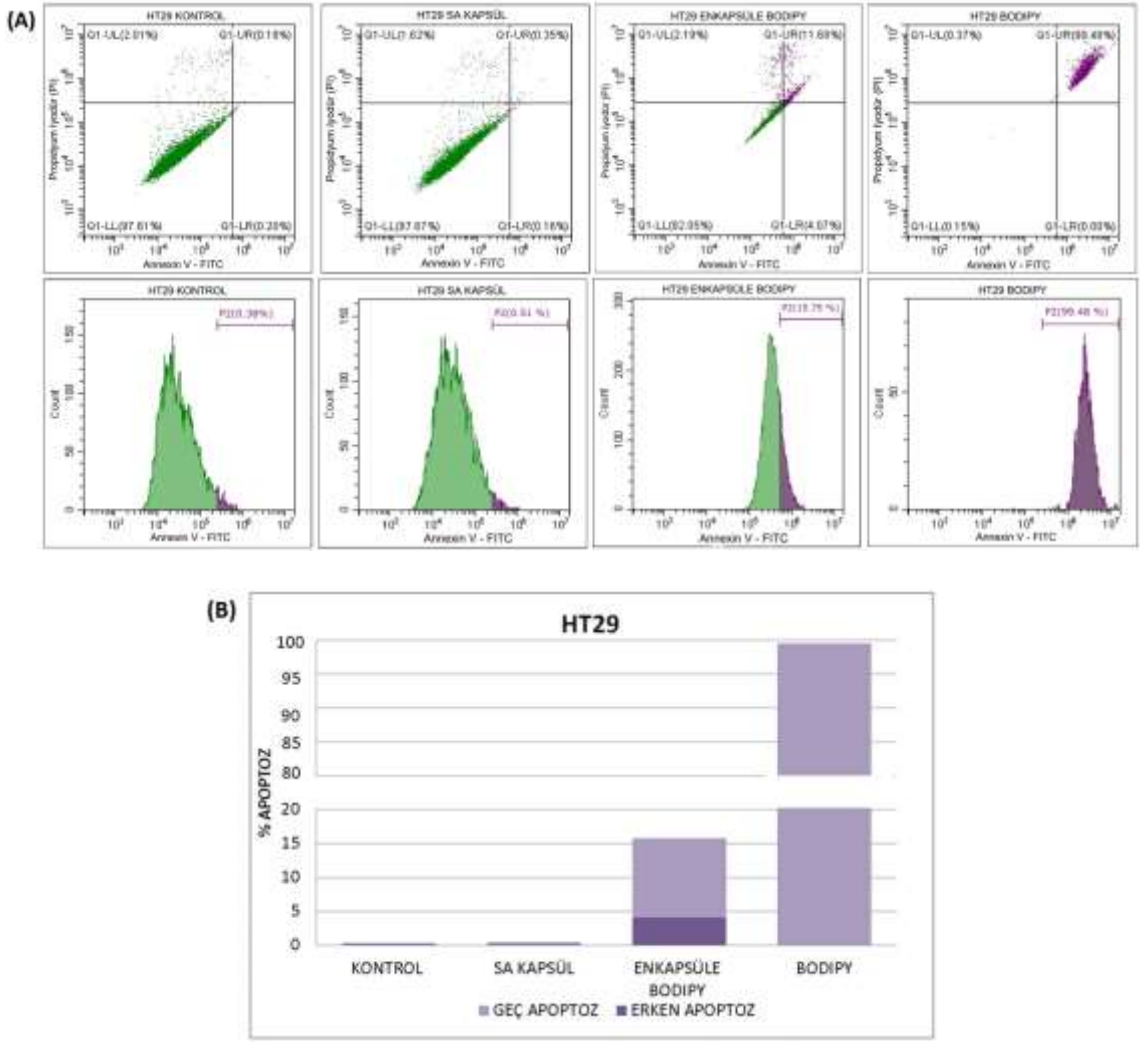
Apoptoz analizi, Annexin V-kiti kullanılarak akım sitometri cihazında gerçekleştirilmiştir. Muamele edilen L929 hücrelerinde canlılık oranları; kontrol, %93; SA kapsül, %92; enkapsüle BODIPY %50, serbest BODIPY %11'dir. Apoptoz oranları ise; kontrol, %2.5; SA kapsül, %2.4; enkapsüle BODIPY %18, serbest BODIPY

%80'dir. Enkapsüle BODIPY, apoptoz oranını kontrol ve SA kapsüllere göre 7-kat, enkapsüle olmayan serbest BODIPY ise 32-kat arttırdığını saptadık (Şekil 20).



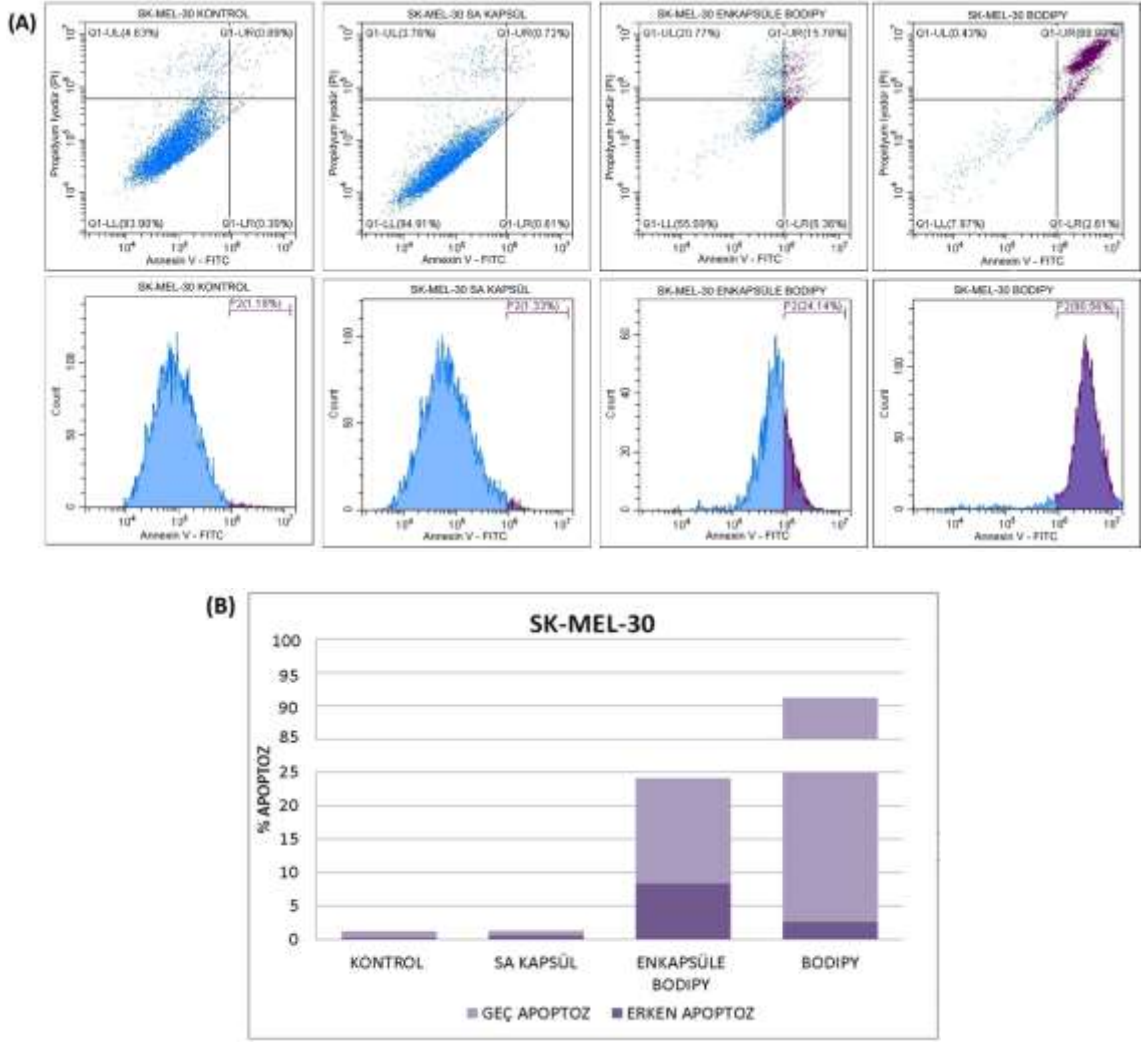
**Şekil 23.** (A) L929 hücreleri üzerinde yapılan Annexin V – FITC deney sonuçlarına ait nokta alan ve histogram grafikleri. (B) Meydana gelen total apoptoz miktarı yüzdeleri.

Muamele edilen HT29 hücrelerinde canlılık oranları; kontrol, %97; SA kapsül, %97; enkapsüle BODIPY %82, serbest BODIPY %0.2'dir. Apoptoz oranları ise; kontrol, %0.4; SA kapsül, %0.5; enkapsüle BODIPY %16, serbest BODIPY %99.5'dir. Enkapsüle BODIPY, apoptoz oranını kontrol ve SA kapsüllere göre 32-kat, enkapsüle olmayan serbest BODIPY ise 200-kat arttırdığını saptadık (Şekil 23).



**Şekil 24.** (A) HT29 hücreleri üzerinde yapılan Annexin V – FITC deney sonuçlarına ait nokta alan ve histogram grafikleri. (B) Meydana gelen total apoptoz miktarı yüzdeleri.

Muamele edilen SK-MEL-30 hücrelerinde canlılık oranları; kontrol, %94; SA kapsül, %95; enkapsüle BODİPY %55, serbest BODİPY %8'dir. Apoptoz oranları ise; kontrol, %1.1; SA kapsül, %1.3; enkapsüle BODİPY %24.1, serbest BODİPY %90.5'dir. Enkapsüle BODİPY, apoptoz oranını kontrol ve SA kapsüllere göre 22-kat, enkapsüle olmayan serbest BODİPY ise 82-kat arttırdığını saptadık (Şekil 24).



**Şekil 25.** (A) SK-MEL-30 hücreleri üzerinde yapılan Annexin V – FITC deney sonuçlarına ait nokta alan ve histogram grafikleri. (B) Meydana gelen total apoptoz miktarı yüzdeleri.

Işıkla aktivasyon neticesinde enkapsüle ve serbest BODIPY molekülleri tüm hücrelerde apoptozu indüklemiştir. SA kapsüller ise bunun aksine tüm test edilen hücreler için apoptotik etki oluşturmamıştır. Serbest BODIPY molekülleri, enkapsüle olanlara göre güçlü apoptotik etkilere yol açmıştır ve muamele edilen tüm hücreler geç apoptozla girmiştir. Enkapsüle BODIPY ile muamele edilen hücrelerde, serbest BODIPY'e göre, erken apoptoz oranlarının daha yüksek olduğu saptandı. Bu sonuç, enkapsülasyonun BODIPY'nin kontrolsüz etkisini baskıladığını göstermektedir. Enkapsüle BODIPY ile muamele edilen hücrelerde erken apoptoz oranları; L929 için %1, HT29 için %4 ve SK-MEL-30 için %8.4 iken, geç apoptoz oranları; L929 için %17, HT29 için %12 ve SK-MEL-30 için %16'dır. Bu verilere göre, enkapsüle BODIPY sağlıklı kontrol hücrelere göre, kanser hücrelerinde erken apoptozu artırmaktadır.

## 4.2. Tartışma

Bu tez çalışmasında, yeni sentezlenmiş BODIPY türevli bir fotoduyarlaştırıcı molekülün ve selüloz asetat (SA) ile enkapsüle edilmiş formunun HT29 ve SK-MEL-30 kanser hücre hatları üzerindeki antikanser etkisi araştırıldı.

Çalışmamızda, ışık kaynağının sağlıklı ve kanser hücrelerinin sağkalımı üzerinde olumsuz bir etkisi saptanmadı. Boş SA kapsülleri ile muamele edilen hücrelerde ışık muamelesinin varlığı ve yokluğu durumunda sitotoksik etki oluşturmadı. Ancak, enkapsüle BODIPY ve BODIPY ajanları özellikle ışık stimülasyonunda sitotoksik etkilere neden olmuştur. Enkapsüle BODIPY'ler ışıksız koşulda hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki oluşturmadı. Bunun nedeni olarak, SA enkapsülasyonunun BODIPY'lerin direk hücre sel biyomoleküller ile interaksyonunu engellemesidir. Serbest BODIPY ajanının ışık yokluğunda dahi sebep olduğu sitotoksitenin tolere edilemeyen dozlara bağımlı olarak arttığını saptadık. Bu sonuç, enkapsülasyonun molekülün istenmeyen kontrolsüz toksisite etkisini engellendiğini göstermektedir.

Noghreiyani V. ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada, fotoduyarlaştırıcı indosiyani yeşili ve protoporfirin IX molekülleri kullanılmıştır. Söz konusu ajanların sitotoksik etkileri HT29 hücre hattı üzerinde test edilmiştir. Sonuçlara göre 30µM indosiyani yeşili, 2 dakika ışık muamelesi ile 48 saat süre sonunda hücrelerin canlılık oranını %40, 50µM uygulandığında ise %20 oranına düşmüştür. Diğer yandan protoporfirin 5µM konsantrasyon, 2 dakika ışık muamelesi sonunda canlılık oranı %20'nin altına düşmüştür (Vejdani Noghreiyani ve ark., 2020). 2023 yılında yapılan çalışmada Sampedro ve ark., Pt(II)-BODIPY kompleksi kullanarak fotodinamik tedavi (FDT) uygulaması gerçekleştirmişlerdir. HT29 hücrelerine FDT uygulandığında ışık uygulamasına bağımlı olarak sitotoksik etkilerin meydana geldiği, ancak karanlıkta dahi olsa doz artışına bağımlı olarak hücre canlılığının azaldığını ortaya koymuşlardır ve kullanılan ajanların FDT için umut verici olduğu görülmüştür (Durán-Sampedro ve ark., 2023). Bilkan ve ark. tarafından 2023 yılında TiO<sub>2</sub>-NP'ler ile gerçekleştirilen UV ışın aktivasyonlu FDT uygulamasında SK-MEL-30 hücreleri üzerinde yapılan hücre canlılığı deneyinde, TiO<sub>2</sub>-NP ile UV ışık maruziyetinden 48 saat sonra hücre canlılığını %50'nin altına düştüğü gösterilmiştir. (Bilkan ve ark., 2023). Bu bağlamda, tez çalışmamızda enkapsüle BODIPY ile serbest BODIPY molekülleri HT29 ve SK-MEL-30 hücreleri üzerinde ışık maruziyetine bağımlı olarak toksisite gösterdiğini saptadık. Enkapsüle BODIPY ile muamele edilen HT29 hücrelerinde canlılık oranı %56, SK-

MEL-30 hücrelerinde canlılık oranı %11 iken, serbest BODIPY ajanı ile muamele edildiğinde hücrelerin tamamı canlılığını kaybetmiştir. Enkapsüle BODIPY'ler MTT deneyi sonuçlarına göre, doz farketmeksizin ışık maruziyeti olmadığı koşulda hücre canlılığını olumsuz etkilemediği ve sitotoksositeye neden olmadığı gösterildi. Dolayısıyla, enkapsüle BODIPY ajanının ışık ile aktive edilmediği durumda uygulanmasının güvenilir olduğunu gösterdik.

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen fotodinamik terapi sonucunda mikroskop ile takibi yapılan hücrelerde apoptotik morfolojinin indüklendiği ve buna bağlı olarak hücre ölümünün gerçekleştiği görüldü. İlgili ajanlar ile muamele edilen hücreler ışık maruziyetinin ardından devam eden inkübasyon süresince mikroskopik takipleri yapıldığında SA kapsüllerin sağlıklı ve kanser olmak üzere üç hücre tipi için de herhangi bir olumsuz etkiye neden olmamıştır. Bunun yanında enkapsüle BODIPY molekülleri, sağlıklı L929 hücreleri üzerinde ciddi sitotoksik etkilere neden olmazken, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerine bakıldığında hücrelerin yuvarlaklaşarak adeziv özelliğin ve morfolojik şeklin kaybolduğu, ayrıca apoptotik cisimciklerin meydana geldiği izlenmiştir. BODIPY ajanı tüm hücre hatları üzerinde etkili olduğu gözlemlendi. Işık muamele süresinin ve uygulama dozlarının aynı olduğu durumda, sağlıklı L929 hücrelerinin, kanser hücrelerine göre, serbest BODIPY ajanına karşı daha dirençli oldukları saptanmıştır. Bu doğrultuda L929 hücrelerinin serbest BODIPY ajanını kanser hücrelerine göre daha iyi tolere ettiği söylenebilir. Literatürde, metastatik melanom hücreleri üzerinde AuNP'lerden oluşan fotoduyarlatıcı ilaç konjugatı kullanılarak yapılan FDT uygulamaları sonucunda, hücresel şekil kaybı ve serbest yüzen hücreler gibi morfolojik yapı değişikliklerinin meydana geldiği ve hücre ölümünün indüklendiği gösterilmiştir (Naidoo ve ark., 2019). Acedo ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, FDT uygulamasından sonra hücrelerde apoptotik süreç ışık mikroskobu ile morfolojik olarak takip edilmiş ve apoptotik morfolojiler rapor edilmiştir (Acedo ve ark., 2014). FDT uygulamasına bağlı olarak hücre morfolojilerinde meydana gelen apoptotik hücresel yapılar, apoptoz-bağımlı sitotoksitenin meydana geldiğini gösterir.

FDT sonucu meydana gelen hücresel ROS artışı sitotoksik etkilere neden olarak, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve tümör oluşturma kapasitelerini olumsuz bir şekilde etkilemektedir (Dujic ve ark., 2009), (Li ve ark., 2021). Tez çalışmamızda hücrelerin proliferatif ve tümör geliştirme kabiliyetleri koloni oluşturma deneyi ile test

edilmiştir. Deneysel sonuçlarına göre, uygulanan ışık muamelesinin tek başına L929, HT29 ve SK-MEL-30 hücrelerinin koloni oluşturma kabiliyetleri üzerinde olumsuz etkilere neden olmamıştır. Enkapsülasyon aşamasında kullanılan boş SA kapsüllerin, hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerini ne ışık varlığında ne de karanlıkta olumsuz etkilemedi. Serbest BODIPY ajanının tüm test edilen hücrelerde klonal gelişimi %97 oranında düşürerek ciddi ölçüde koloni oluşumunu engellediğini saptadık. Buna bağlı olarak serbest BODIPY ajanının çok güçlü etki gösterdiğini ve ışık aktivasyonundan bağımsız bir şekilde, hücrelerde ayırım gözetmeksizin, koloni oluşumunu engelledi. Enkapsüle BODIPY'ler ise sadece ışık varlığında hücreler üzerinde etkili olmuştur. Sağlıklı L929 hücrelerinde oluşan kolonilerin oluşturduğu konfluensi oranı %60 civarlarındayken, kolorektal kanser (HT29) hücrelerinde %30'un altına ve melanoma (SK-MEL-30) hücrelerinde %15'in altına indirdiğini tespit ettik. İki kanser hücre hattını karşılaştırdığımızda ise SK-MEL-30 hücrelerinin, HT29'a göre koloni oluşturma yeteneklerinin 2.3-kat azaldığını söyleyebiliriz. Bu sonuçlara göre SA-enkapsüle BODIPY'lerin FDT terapi için kullanımının klonal gelişme üzerinde etkili olduğunu ve bu etkinin ışık varlığı ile kontrol edilebildiğini göstermiş olduk. 2022 yılında 5-ALA aracılığı ile CA1 ve Luc4 oral karsinom hücre hatları üzerinde yapılan çalışmada gerçekleştirilen koloni oluşturma deneyinde, fotodinamik terapi öncesinde 5-ALA verilen hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri olumsuz etkilenmediği gösterilmiştir. Bunun yanında fotodinamik terapide kullanılacak olan LED ışık kaynağının da iki hücre hattının koloni oluşturma yeteneklerini etkilemediği gösterilmiştir. 5-ALA ile birlikte LED ışık kaynağının hücreler üzerinde FDT uygulaması sonucunda Ca1 hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri %25 civarında azalırken, Luc4 hücrelerinin ise %50 oranında azaldığı gösterilmiştir (Pinto ve ark., 2022). Ayrıca, A375 melanoma hücrelerinde gerçekleştirilen metilen mavisi ve rutosid ile kombine edilmiş FDT'de rutosid ve MB-PDT beraberliğinde koloni oluşturma yeteneği serbest MB veya kontrol gruplarına kıyasla daha da azaldığı gösterilmiştir (Khorsandi ve ark., 2020). Bu bağlamda bahsedilen deneysel bulgular doğrultusunda, elde ettiğimiz verilerin literatür ile uyumlu olduğu söylenebilir.

FDT'ye bağlı hücre ölümü, temel olarak oksijen varlığında oluşan ROS temellidir. ROS oluşumunun artışı FDT'nin anti-tümör etkisinin de artırılması anlamına gelmektedir (Ming ve ark., 2021), (Zhou ve ark.,2016). Tez çalışmamızda hücre içi ROS miktarı DCFDA kiti yardımı ile akım sitometrik olarak tayin edildi. Enkapsüle BODIPY'lerin sağlıklı L929 hücrelerine göre, HT29 hücrelerinde 2.6-kat ve SK-MEL-

30 hücrelerinde 1.1-kat ROS'u artırmıştır. Hücresel ROS tayini sonuçlarına göre ortalama floresan yoğunluğu açısından, PBS muamelesi yapılan kontrol grupları ile boş SA-kapsül uygulaması yapılan grupları arasında anlamlı düzeyde fark saptanmadı. Bu bulgu boş SA-kapsüllerin hücre içi ROS üretimine yol açmadığı göstermektedir. Enkapsüle BODIPY'ler, serbest BODIPY ajanına göre, sağlıklı L929 hücrelerinde daha düşük düzeyde ROS üretimine neden oldu. Bunun aksine kanser hücrelerinde kontrole göre, daha yüksek düzeyde ROS üretimine neden oldu. Bu durum, toksik etki oluşturmayan enkapsüle BODIPY'lerin sadece ışıkla aktivasyonu durumunda kanser hücrelerinde, serbest BODIPY'e göre, daha yüksek düzeyde hücresel ROS üretimini sağlamıştır. Literatürde, fotosensitif ajanların çeşitli hücre hatları üzerindeki etkilerini inceleyen bilimsel yayınlar gün geçtikçe artmaktadır. Killer-Red fotosensitizan proteini aracılı FDT'nin K562, NB4 ve THP1 kanser hücrelerinde sağlıklı kontrole göre yaklaşık 10-kat ROS miktarını artırdığı saptanmıştır. Bu ajan, ROS miktarını NB4 promiyelositik lösemi hücrelerine göre, K562 kronik miyelositik lösemi hücrelerinde 1.2-kat ve THP1 akut monositik lösemi hücrelerinde 1.1-kat artırmıştır (Yuan ve ark., 2019). Literatür verilerine paralel olarak, tez çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre kullandığımız fotoduyarlayıcı BODIPY molekülünün ROS üretimini sağlaması açısından oldukça etkili olduğu söylenebilir. ROS ölçüm sonuçlarına göre, tüm hücreler arasında HT29 hücrelerinde en yüksek düzeyde ROS oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca, SA-enkapsüle BODIPY'ler sağlıklı hücrelerde daha az ROS üretimine neden olurken, kanser hücrelerinde daha yüksek miktarlarda ROS oluşumuna sebep olmuştur.

Çalışmamızda, apoptoz analizi Annexin V kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SA kapsülleri hücrelerde apoptoza anlamlı düzeyde neden olmamıştır. Ancak, SA-enkapsüle BODIPY'ler ve serbest BODIPY molekülleri kanser hücrelerinde apoptozu tetiklemiştir. Erken apoptoz verilerine göre, Enkapsüle BODIPY molekülleri serbest BODIPY'e göre, özellikle SK-MEL-30 melanoma hücrelerinde daha yüksek düzeyde etkili olduğu saptandı. Literatürde, BODIPY türevli platin II kompleksi ile gerçekleştirilen FDT'de Annexin V – FITC kiti ile yapılan apoptoz deneyinde MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine 0,4µM konsantrasyonda 520nm yeşil ışık maruziyerinden sonra apoptotik hücre yüzdesi %21,5 olarak ölçülmüştür (Y. Wang ve ark., 2023). 2023 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise FDT için bir ön ilaç olarak hazırlanan ve tirozinazlar ile aktive edilen Pt(II) kompleksi ile yapılan bir çalışmada A375 melanoma hücrelerinde apoptozun indüklendiği belirtilmiştir (Liu ve ark., 2023). Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak, muamele edilen hücrelerin apoptoz yüzdesi

HT29 hücrelerinde %16, SK-MEL-30 hücrelerinde ise %24 olarak ölçülmüştür. Ancak, serbest BODIPY ajanı hem HT29 hem de SK-MEL-30 hücrelerinde %90'ın üzerinde apoptozu tetiklemiştir. Bu sonuçlara göre, FDT ajanı olarak kullandığımız moleküllerin apoptotik etkilerinden dolayı söz konusu kanser hücrelerine karşı terapötik ajan olarak değerlendirilebileceğini öngörmekteyiz.

Çalışmamızda uyguladığımız *in vitro* FDT yönteminin melanoma hücre hattı olan SK-MEL-30 ve kolorektal kanser hücre hattı olan HT29 hücreleri üzerinde sağlıklı L929 hücrelerine oranla daha etkili olduğu söylenebilir. FDT'ye yanıt olarak SK-MEL-30 hücreleri HT29 hücrelerine kıyasla daha yüksek sitotoksik ve apoptotik etkiler göstermiştir. Özellikle, SA-enkapsülasyonun BODIPY moleküllerinin sadece ışık stimülasyonu varlığında etkin olmasını sağlaması ve bu durumdan L929 sağlıklı fibroblast hücrelerinin kanser hücrelerine göre daha düşük düzeyde etkilenmesinin saptanması sonucunda, SA-enkapsüle BODIPY moleküllerinin kanser-hedefli tedaviler için aday terapötik moleküller olarak değerlendirilebileceğini önermekteyiz.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1 Sonuçlar

Tez çalışmamızda, SA-enkapsüle edilmiş BODIPY ajanının HT29 ve SK-MEL-30 kanser hücrelerinin FDT'sinde bir fotoduyarlaştırıcı molekül olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Elde edilen verilere göre;

1. Kapsülasyonda kullanılan SA kapsüllerin, serbest BODIPY'nin ışık-bağımsız sitotoksitesini önemli ölçüde düzenlediği gösterilmiştir.
2. SA-enkapsüle BODIPY'ler HT29 ve SK-MEL-30 kanser hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerini önemli ölçüde azaltmıştır. SK-MEL-30 hücrelerinde klonal gelişimi kolorektal kanser hücrelerine göre 2.3-kat daha fazla baskılandığı saptanmıştır.
3. Enkapsüle BODIPY ve serbest BODIPY'nin hücrel ROS düzeyini önemli ölçüde artırdığı kanıtlanmıştır. Enkapsüle BODIPY, hücrel ROS miktarını L929 hücrelerine göre SK-MEL-30 hücrelerinde 1.11 kat ve HT29 hücrelerinde 2.61 kat fazla artırdığı saptanmıştır. Serbest BODIPY ajanının hücrel ROS miktarı, L929 hücrelerinde, SK-MEL-30'a göre 1.6-kat daha yüksek ölçülmüştür.
4. BODIPY stimülasyonu hücrelerde apoptozu tetiklemektedir. Test edilen hücrelerde morfolojik apoptotik yapılar meydana gelmiştir. Annexin V- FITC kiti ile gerçekleştirilen apoptoz tayin deneyi sonucunda enkapsüle BODIPY uygulamasının apoptoz yüzdesi, sağlıklı kontrole göre SK-MEL-30 hücrelerinde 1.3-kat artış gösterdiği saptanmıştır.

### 5.2. Öneriler

1. Kullanılan fotosensitif ajanların hücreler üzerinde genotoksitesine neden olup olmadığı test edilebilir.
2. Annexin V ile tespit edilmiş olan apoptotik hücre ölümü, apoptotik sinyal yolları çalışılarak p53, Bax, Bcl2 ifade düzeyleri değerlendirilebilir.

3. Apoptotik hücre ölümünün ekstrinsik yolak üzerinden mi yoksa intrinsik yolak üzerinden mi gerçekleştiğinin tespiti yapılabilir.
4. Enkapsüle BODIPY ajanı reseptör hedefli hale getirilebilir ve kanser türüne özgü terapiler için kullanılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2017). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347–364.
- Acedo, P., Stockert, J. C., Cañete, M., & Villanueva, A. (2014). Two combined photosensitizers: A goal for more effective photodynamic therapy of cancer. *Cell Death and Disease*, 5(3), 1–12.
- Allustaoğlu, M. (2014). Temel Kanser Fizyopatolojisi. *Numune, Haydarpaşa Onkoloji, Hastanesi*, 46–49.
- Arcy, M. S. D. (2019). Cell death : a review of the major forms of apoptosis , necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592.
- Awuah, S. G., & You, Y. (2012). Boron dipyrromethene (BODIPY)-based photosensitizers for photodynamic therapy. *RSC Advances*, 2(30), 11169–11183.
- Bilkan, M. T., Çiçek, Z., Kurşun, A. G. C., Özler, M., & Eşmekaya, M. A. (2023). Investigations on effects of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle in combination with UV radiation on breast and skin cancer cells. *Medical Oncology*, 40(1), 1–7.
- Brancaleon, L., & Moseley, H. (2002). Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers in Medical Science*, 17(3), 173–186.
- Calixto, G. M. F., Bernegossi, J., De Freitas, L. M., Fontana, C. R., Chorilli, M., & Grumezescu, A. M. (2016). Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. *Molecules*, 21(3), 1–18.
- CLAYSON, D. B. (1966). Cancer Biochemistry. *Nature*, 210(5039), 875–876.
- Das, P. K., Islam, F., & Lam, A. K. (2020). The Roles of Cancer Stem Cells and Therapy Resistance in Colorectal Carcinoma. *Cells*, 9(6), 1–21.
- DEMİR, F. (2021). Derin Öğrenme Tabanlı Yaklaşımla Kötü Huylu Deri Kanserinin Dermatoskopik Görüntülerden Saptanması. *Firat Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 33(2), 617–624.
- Demirel Topel, S. (2023). Encapsulation of Diiodo-BODIPY in Sodium Dodecyl Sulfate Stabilized Cellulose Acetate Capsules for Enhanced Singlet Oxygen Production in Aqueous Solution. *ChemistrySelect*, 8(9), 1–10.
- Diebold, L., & Chandel, N. S. (2016). Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 86–93.
- Dujic, J., Kippenberger, S., Ramirez-Bosca, A., Diaz-Alperi, J., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Bernd, A., & Hofmann, M. (2009). Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model. *International Journal of Cancer*, 124(6), 1422–1428.

- Durán-Sampedro, G., Xue, E. Y., Moreno-Simoni, M., Paramio, C., Torres, T., Ng, D. K. P., & de la Torre, G. (2023). Glycosylated BODIPY- Incorporated Pt(II) Metallacycles for Targeted and Synergistic Chemo-Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(5), 3448–3459.
- Ersoy Acer, H. K. E. (2019). Sık görülen deri kanserlerinin epidemiyolojisi. *ESTÜDAM Halk Sağlığı Dergisi*, 52–60.
- Escudero, A., Carrillo-Carrión, C., Castillejos, M. C., Romero-Ben, E., Rosales-Barrios, C., & Khiar, N. (2021). Photodynamic therapy: Photosensitizers and nanostructures. *Materials Chemistry Frontiers*, 5(10), 3788–3812.
- Ferreira, I. C. F. R., Queiroz, M. J. R. P., & Kirsch, G. (2003). Tandem palladium-catalyzed borylation and Suzuki coupling (BSC) to thienocarbazole precursors. *Tetrahedron Letters*, 44(23), 4327–4329.
- Fulda, S., & Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798–4811.
- Gunaydin, G., Gedik, M. E., & Ayan, S. (2021). Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Frontiers in Chemistry*, 9(June), 1–25.
- Güneş, S. ve Polat, K., 2009, Elektrokardiyogram (EKG) aritmi teşhisinde en az kareli destek vektör makinaları kullanımına dayalı medikal teşhis destek sistemi, 13. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, BİYOMUT-2009, İstanbul, 170-173.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.
- Hwang, H. S., Shin, H., Han, J., & Na, K. (2018). Combination of photodynamic therapy (PDT) and anti-tumor immunity in cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 48(2), 143–151.
- Imberti, C., Zhang, P., Huang, H., & Sadler, P. J. (2020). New Designs for Phototherapeutic Transition Metal Complexes. *Angewandte Chemie - International Edition*, 59(1), 61–73.
- Kargarzadeh, H., Huang, J., Lin, N., Ahmad, I., Mariano, M., Dufresne, A., Thomas, S., & Gałęski, A. (2018). Recent developments in nanocellulose-based biodegradable polymers, thermoplastic polymers, and porous nanocomposites. *Progress in Polymer Science*, 87, 197–227.
- Kessel, D. (2019). Photodynamic therapy: A brief history. *Journal of Clinical Medicine*, 8(10).
- Khorsandi, K., Hosseinzadeh, R., & Chamani, E. (2020). Molecular interaction and cellular studies on combination photodynamic therapy with rutoside for melanoma A375 cancer cells: an in vitro study. *Cancer Cell International*, 20(1), 1–15.

- Kubrak, T. P., Kołodziej, P., Sawicki, J., Mazur, A., Koziorowska, K., & Aebisher, D. (2022). Some Natural Photosensitizers and Their Medicinal Properties for Use in Photodynamic Therapy. *Molecules*, 27(4), 1–19.
- Kue, C. S., Ng, S. Y., Voon, S. H., Kamkaew, A., Chung, L. Y., Kiew, L. V., & Lee, H. B. (2018). Recent strategies to improve boron dipyrromethene (BODIPY) for photodynamic cancer therapy: An updated review. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 17(11), 1691–1708.
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., Velde, C. J. H. van de, & Watanabe, T. (2010). ESMO Handbook of Cancer in the Senior Patient. *ESMO Handbook of Cancer in the Senior Patient*, iii–193.
- Li, Y., Yang, J., & Sun, X. (2021). Reactive Oxygen Species-Based Nanomaterials for Cancer Therapy. *Frontiers in Chemistry*, 9(April), 1–12.
- Liang, P., Kolodieznyi, D., Creeger, Y., Ballou, B., & Bruchez, M. P. (2020). Subcellular Singlet Oxygen and Cell Death: Location Matters. *Frontiers in Chemistry*, 8(November), 1–11.
- Liu, M., & Li, C. (2020). Recent Advances in Activatable Organic Photosensitizers for Specific Photodynamic Therapy. *ChemPlusChem*, 85(5), 948–957.
- Liu, Y., Zhao, H., Li, L., Yang, B., Yue, Y., Li, M., Shi, X., Zhang, B., Wang, L., Qi, C., Liu, Y., Ren, S., Zhang, K., & Yoon, J. (2023). A tyrosinase-activated Pt(II) complex for melanoma photodynamic therapy and fluorescence imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 374(September 2022).
- Maharjan, P. S., & Bhattarai, H. K. (2022). Singlet Oxygen, Photodynamic Therapy, and Mechanisms of Cancer Cell Death. *Journal of Oncology*, 2022(Figure 1).
- Mfouo-Tynga, I. S., Dias, L. D., Inada, N. M., & Kurachi, C. (2021). Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 34(July 2020), 102091.
- Ming, L., Cheng, K., Chen, Y., Yang, R., & Chen, D. (2021). Enhancement of tumor lethality of ROS in photodynamic therapy. *Cancer Medicine*, 10(1), 257–268.
- Mishchenko, T., Balalaeva, I., Gorokhova, A., Vedunova, M., & Krysko, D. V. (2022). Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer? *Cell Death and Disease*, 13(5), 1–16.
- Mokoena, D. R., George, B. P., & Abrahamse, H. (2019). Enhancing breast cancer treatment using a combination of cannabidiol and gold nanoparticles for photodynamic therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19).
- Mokoena, D. R., George, B. P., & Abrahamse, H. (2021). Photodynamic therapy induced cell death mechanisms in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19).

- Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80, 50–64.
- Moor, A. C. E. (2000). Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 57(1), 1–13.
- Naidoo, C., Kruger, C. A., & Abrahamse, H. (2019). Targeted photodynamic therapy treatment of in vitro A375 metastatic melanoma cells. *Oncotarget*, 10(58), 6079–6095.
- Niculescu, A. G., & Grumezescu, A. M. (2021). Photodynamic therapy—an up-to-date review. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(8), 1–18.
- Parlak, A., Çayırılı, M., Parlak, N., Ekinci, Ş., Asker Hastanesi, A., Basamak Muayene ve Aile Sağlığı Merkezi, B., ve Zührevi Hastalıklar Servisi, D., Ertuğ Etimesgut Devlet Hastanesi, C., Asker Hastanesi Ortopedi Servisi, A., Yazışma adresi, A., Parlak Aile Hekimliği Uzmanı, A., & Tıp Dergisi, K. (2014). DERLEME Melanoma Genel Bakış. *Konuralp Tıp Dergisi*, 6(1), 22–27.
- Pinto, M. A. F., Ferreira, C. B. R., de Lima, B. E. S., Molon, Â. C., Ibarra, A. M. C., Cecatto, R. B., dos Santos Franco, A. L., & Rodrigues, M. F. S. D. (2022). Effects of 5-ALA mediated photodynamic therapy in oral cancer stem cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 235(August).
- Ruggiero, E., Alonso-De Castro, S., Habtemariam, A., & Salassa, L. (2016). Upconverting nanoparticles for the near infrared photoactivation of transition metal complexes: New opportunities and challenges in medicinal inorganic photochemistry. *Dalton Transactions*, 45(33), 13012–13020.
- Sibata, C. H., Colussi, V. C., Oleinick, N. L., & Kinsella, T. J. (2000). Photodynamic therapy: A new concept in medical treatment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(8), 869–880.
- Topel, S. D., Balcioglu, S., Ateş, B., Asilturk, M., Topel, Ö., & Ericson, M. B. (2021). Cellulose acetate encapsulated upconversion nanoparticles – A novel theranostic platform. *Materials Today Communications*, 26(October 2020).
- Tsiapla, A. R., Karagkiozaki, V., Bakola, V., Pappa, F., Gkertsiou, P., Pavlidou, E., & Logothetidis, S. (2018). Biomimetic and biodegradable cellulose acetate scaffolds loaded with dexamethasone for bone implants. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1), 1986–1994.
- Vejdani Noghreiyani, A., Imanparast, A., Shayesteh Ara, E., Soudmand, S., Vejdani Noghreiyani, V., & Sazgarnia, A. (2020). In-vitro investigation of cold atmospheric plasma induced photodynamic effect by Indocyanine green and Protoporphyrin IX. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 31(January).
- Wang, H., Ewetse, M. P., Ma, C., Pu, W., Xu, B., He, P., Wang, Y., Zhu, J., & Chen, H.

- (2023). The “Light Knife” for Gastric Cancer: Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics*, *15*(1), 1–16.
- Wang, Y., Wang, S., Wang, Q., Tang, W., Lin, L., Zhang, T., Hu, M., & Wang, X. (2023). Identification of a luminescent platinum(II) complex with BODIPY derivative as novel photodynamic therapy agent for triple negative breast cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *242*(December 2022), 112160.
- Wei, F., Rees, T. W., Liao, X., Ji, L., & Chao, H. (2021). Oxygen self-sufficient photodynamic therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, *432*, 213714.
- Yan, K., Zhang, Y., Mu, C., Xu, Q., Jing, X., Wang, D., Dang, D., Meng, L., & Ma, J. (2020). Versatile nanoplatforms with enhanced photodynamic therapy: Designs and applications. *Theranostics*, *10*(16), 7287–7318.
- Yee, P. P., & Li, W. (2021). Tumor necrosis: A synergistic consequence of metabolic stress and inflammation. *BioEssays*, *43*(7), 1–12.
- Yuan, M., Liu, C., Li, J., Ma, W., Yu, X., Zhang, P., & Ji, Y. (2019). The effects of photodynamic therapy on leukemia cells mediated by KillerRed, a genetically encoded fluorescent protein photosensitizer. *BMC Cancer*, *19*(1), 1–13.