



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**YENİ BODIPY BİLEŞİKLERİNİN
FOTODİNAMİK TERAPİ AMAÇLI *IN VITRO*
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Burak BARUT

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Arzu ÖZEL

TRABZON-2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**YENİ BODIPY BİLEŞİKLERİNİN
FOTODİNAMİK TERAPİ AMAÇLI *IN VITRO*
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Burak BARUT

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Arzu ÖZEL

TRABZON-2020

ONAY

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Burak BARUT'un hazırladığı "Yeni BODIPY Bileşiklerinin Fotodinamik Terapi Amaçlı *In Vitro* Etkinliklerinin İncelenmesi" başlıklı çalışma Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/02/2020

Doç. Dr. Arzu ÖZEL
(Danışman)



Prof. Dr. Halit KANTEKİN



Prof. Dr. Ferhan GİRGİN SAĞIN



Prof. Dr. Yusuf TUTAR



Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ



Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne/...../20..... tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

10/02/2020

Burak BARUT

(İmza)

İthaf

Canım dedem Yaşar TURAN'a rahmetle ve saygıyla

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince her konuda desteğini esirgemeyen, sadece bilimsel bilgi ve tecrübeleri ile değil insani özellikleriyle de gelişimimde öncü, hoşgörüsüyle her daim yanımda olan ve beni ailesinin bir ferdi olarak gören değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Arzu ÖZEL'e;

Tezimin ilerleyişinde ve mesleki hayatımın gelişiminde desteklerini esirgemeyen tez izleme komitesindeki değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Halit KANTEKİN'e ve Sayın Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ'a; lisansüstü eğitim dönemimde ve mesleki yaşantımda şahsıma engin faydaları olan Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma;

Mesleki hayatımın her aşamasında desteğini hissettiğim ve asla hakkını ödeyemeyeceğim Sayın Prof. Dr. Feride Sena SEZEN'e; bu tez kapsamında ortak çalışma imkanı bulduğum Prof. Dr. Zekeriya BIYIKLIOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Can Özgür YALÇIN, Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÇOBAN, Dr. Öğr. Üyesi Ümit DEMİRBAŞ, Arş. Gör. Dr. Suat SARI'ya;

Hayatımın her anında beni daima destekleyen, bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan aileme; ilk gördüğüm andan beri hayatıma renk katan, yolumu aydınlatan, karşılaştığım her zorlukta desteğini esirgemeyen, hayatın güzelliklerini yaşamaktan mutluluk duyduğum sevgili eşim Elif Nur BARUT'a canı gönülden teşekkür ederim...

Son olarak bu yola beraber çıktığımız ancak 5 Ocak 2019 tarihinde aramızdan ayrılan sevgili dedem Yaşar TURAN'a bana hep güvendiği, yapabileceklerime inandığı ve bana vazgeçmemeyi öğrettiği için çok teşekkür ederim, kendisini mahcup etmediysem ne mutlu bana...

Doktora eğitimim boyunca TÜBİTAK BİDEB'e (2228-B), şahsıma yapılan burs desteği için teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tez çalışmalarımı TSA-2019-8134 kodlu projeye destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Arş. Gör. Burak BARUT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xiii
KISALTMA, SİMGE VE FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
ÖZET	xvi
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser	5
2.2. Kolorektal Kanser	6
2.3. Kolorektal Kanserin Tedavisinde Kullanılan Yöntemler	8
2.4. PDT	9
2.4.1. PDT'nin Tarihçesi	9
2.4.2. PDT'nin Mekanizması	10
2.4.3. PDT'nin Uygulanması	15
2.4.4. Kolorektal Kanser Tedavisinde PDT	16
2.5. BODIPY ve Türevleri	18
2.6. DNA ile Moleküllerin Etkileşimleri	20
2.7. TopoizomeraZ Enzimleri	24
2.8. İlaç Taşıyıcı Sistemler	26
2.8.1. Lipozomlar	27
2.8.2. Nanopartiküller	28
2.9. Literatür Özeti	30
3. GEREÇ ve YÖNTEM	35

3.1. Gereç	35
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	35
3.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	36
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Bileşikler	37
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler	39
3.2. Yöntem	41
3.2.1. Fotokimyasal Ölçümler	41
3.2.1.1. Singlet Oksijen Kuantum Verimi (Φ_{Δ})	41
3.2.1.2. Fotobozunma Çalışması	42
3.2.2. DNA Bağlanma Deneyleri	43
3.2.2.1. UV-Vis Absorpsiyon Bağlanma Çalışması	43
3.2.2.2. Yarışmalı EB Bağlanma Çalışması	44
3.2.2.3. Viskozimetre Çalışması	44
3.2.2.4. Elektroforez Bağlanma Çalışması	44
3.2.3. DNA Nükleaz Çalışmaları	45
3.2.3.1. Bileşiklerin Hidrolitik Nükleaz Aktivitesi	45
3.2.3.2. Bileşiklerin Fotonükleaz Aktivitesi	45
3.2.3.3. Bileşiklerin Oksidatif Nükleaz Aktivitesi	46
3.2.3.4. Bileşiklerin Oksidatif Fotonükleaz Aktivitesi	46
3.2.4. Topoizomeras Enzim İnhibisyonları	47
3.2.4.1. Topoizomeras I Enzim İnhibisyonu	47
3.2.4.2. Topoizomeras II Enzim İnhibisyonu	47
3.2.4.3. Topoizomeras I ve II Enzimi Moleküler Modelleme Çalışması	47
3.2.5. Hücre Kültürü	48
3.2.5.1. Hücre Dizisinin Açılması, Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması	48
3.2.5.2. MTT Hücre Canlılık Testi	49
3.2.5.3. Işık Maruziyeti	50
3.2.5.4. Anneksin V-FITC/PI Apoptoz Testi	50
3.2.6. Bileşiklerin Nanotaşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	51
3.2.6.1. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem	51
3.2.6.2. Polimerik Nanopartikül İlaç Taşıyıcı Sistem	52
3.2.6.3. Formülasyonların Karakterizasyonu	53
3.2.7. İstatistiksel Analiz	54

4. BULGULAR	55
4.1. Fotokimyasal Ölçümler	55
4.1.1. Singlet Oksijen Kuantum Verimi (Φ_{Δ})	55
4.1.2. Fotobozunma Çalışması	56
4.2. DNA Bağlanma Deneyleri	57
4.2.1. UV-Vis Absorpsiyon Bağlanma Çalışması	57
4.2.2. Yarışmalı EB Bağlanma Çalışması	60
4.2.3. Viskozite Çalışması	61
4.2.4. Elektroforez Bağlanma Çalışması	62
4.3. Bileşiklerin Nükleaz Aktivitesi	63
4.3.1. Bileşiklerin Hidrolitik Nükleaz Aktivitesi	63
4.3.2. Bileşiklerin Fotonükleaz Aktivitesi	64
4.3.3. Bileşiklerin Oksidatif Nükleaz Aktivitesi	65
4.3.4. Bileşiklerin Oksidatif Fotonükleaz Aktivitesi	67
4.4. Topoizomeraz Enzim İnhibisyonları	68
4.4.1. Topoizomeraz I Enzim İnhibisyonu	68
4.4.2. Topoizomeraz II Enzim İnhibisyonu	69
4.4.3. Topoizomeraz I ve II Enzimi Moleküler Kenetleme Çalışması	71
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	75
4.5.1. <i>In vitro</i> Sitotoksosite / Fototoksosite Çalışmaları	75
4.5.2. Anneksin V-FITC/PI Apoptoz Testi	82
4.6. Bileşiklerin Nanotaşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	83
4.6.1. Formülasyonların <i>in vitro</i> Sitotoksitesitesi / Fototoksitesitesi	85
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	88
6. KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	118

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Kolorektal kanser tedavisinde PDT ile yapılan klinik çalışmalar	18
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan cihazlar	35
Tablo 3.	Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	36
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler (Devamı)	37
Tablo 5.	Lipozomal formülasyonda yer alan maddeler ve kullanım oranları	51
Tablo 6.	Polimerik nanopartikül formülasyonda yer alan maddeler ve kullanım oranları	52
Tablo 7.	Bileşiklerin singlet oksijen kuantum verimi sonuçları	55
Tablo 8.	Bileşiklerin CT-DNA ile bağlanma dataları	57
Tablo 9.	Bileşiklerinin kenetleme skorları (kcal/mol)	71
Tablo 10.	Bileşiklerin 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	76
Tablo 11.	Bileşiklerin ışık varlığında 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	76
Tablo 12.	Bileşiklerin 48 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	76
Tablo 13.	Bileşiklerin ışık varlığında 48 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	76
Tablo 14.	Bileşiklerin 72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	76
Tablo 15.	Bileşiklerin ışık varlığında 72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	77
Tablo 16.	BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin Anneksin V-FITC/PI analizi sonuçları	82
Tablo 17.	Formülasyonların karakterizasyon çalışması sonuçları	84
Tablo 18.	Formülasyonların 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	85
Tablo 19.	Formülasyonların ışık varlığında 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Kanser hastalığının dünyadaki tahmini insidans ve mortalite sayıları	5
Şekil 2.	Oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak PDT'nin iki farklı tip mekanizması	11
Şekil 3.	Jablonski diyagramı	12
Şekil 4.	PDT'nin antikanser etkisi	12
Şekil 5.	PDT'nin hücre ölüm mekanizması	14
Şekil 6.	PDT tedavisinin şematik gösterimi	16
Şekil 7.	BODIPY bileşiği	19
Şekil 8.	DNA molekülü yapısı	20
Şekil 9.	DNA ile moleküllerin kovalent olmayan etkileşim türleri	22
Şekil 10.	DNA'nın nükleaz mekanizması	24
Şekil 11.	Topoizomerez enzimlerinin DNA kırığı oluşum mekanizması	25
Şekil 12.	Topoizomerez I ve II enzimlerinin inhibisyonu	26
Şekil 13.	Lipozom yapısı	27
Şekil 14.	Lipozomlar ile hücrelerin etkileşim mekanizmaları	28
Şekil 15.	Piridinyum grubu içeren 6 ve 7 numaralı BODIPY bileşikler	30
Şekil 16.	İmidazolyum grubu içeren 1 ve 2 numaralı BODIPY bileşiği	31
Şekil 17.	BODIPY 2a ve 3a bileşikler	31
Şekil 18.	BODIPY 1-8 bileşikler	32
Şekil 19.	BODIPY 4 ve 5 bileşikler	32
Şekil 20.	BODIPY 4 ve 5 numaralı bileşikler	33
Şekil 21.	Çalışmada kullanılan BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiği	38
Şekil 22.	Çalışmada kullanılan BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiği	38
Şekil 23.	BODIPY-6a bileşiğinin DMSO içerisindeki singlet oksijen kuantum verimi ölçümleri sırasındaki UV-Vis spektrum değişimleri	56
Şekil 24.	BODIPY-6a bileşiğinin TBS içerisindeki fotokararlılık ölçümleri sırasındaki UV-Vis spektrum değişimleri	57
Şekil 25.	CT-DNA yokluğunda ve varlığında BODIPY-3a bileşiğinin UV-Vis absorpsiyon spektrumu	58

Şekil 26.	CT-DNA yokluğunda ve varlığında BODIPY-6a bileşiğinin UV-Vis absorpsiyon spektrumu	58
Şekil 27.	CT-DNA yokluğunda ve varlığında BODIPY-9a bileşiğinin UV-Vis absorpsiyon spektrumu	59
Şekil 28.	CT-DNA yokluğunda ve varlığında BODIPY-12a bileşiğinin UV-Vis absorpsiyon spektrumu	59
Şekil 29.	Bileşiklerin yarışmalı EB bağlanma deneyi çalışmaları	61
Şekil 30.	Bileşiklerin varlığında CT-DNA'nın viskozitesi	62
Şekil 31.	Bileşiklerin elektroforez bağlanma çalışması	63
Şekil 32.	Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik nükleaz aktivitesi	64
Şekil 33.	Bileşiklerin ışık varlığında süpersarmal pBR322 plazmid DNA fotonükleaz aktivitesi	65
Şekil 34.	Bileşiklerin karanlıkta oksidatif nükleaz aktivitesi	66
Şekil 35.	Bileşiklerin oksidatif fotonükleaz aktivitesi	68
Şekil 36.	BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin topoizomerez I inhibisyonu	68
Şekil 37.	BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin topoizomerez I inhibisyonu	69
Şekil 38.	BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin topoizomerez II inhibisyonu	70
Şekil 39.	BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin topoizomerez II inhibisyonu	70
Şekil 40.	DNA-topoizomerez I kompleksine bağlanma biçimleri	72
Şekil 41.	DNA-topoizomerez I kompleksi ile iki boyutlu etkileşme diyagramlar	73
Şekil 42.	DNA-topoizomerez II kompleksine bağlanma biçimleri	74
Şekil 43.	DNA-topoizomerez II kompleksi ile iki boyutlu etkileşme diyagramlar	75
Şekil 44.	BODIPY-3a bileşiğinin karanlıkta ve ışık varlığında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	77

Şekil 45.	BODIPY-6a bileşiğinin karanlıkta ve ışık varlığında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	78
Şekil 46.	BODIPY-9a bileşiğinin karanlıkta ve ışık varlığında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	79
Şekil 47.	BODIPY-6a bileşiğinin karanlıkta ve ışık varlığında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	80
Şekil 48.	BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin Anneksin V-FITC/PI analizi	82
Şekil 49.	Formüle edilen ve edilmeyen BODIPY-6a bileşiğinin karanlıkta ve ışık varlığında 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	86
Şekil 50.	Formüle edilen ve edilmeyen BODIPY-12a bileşiğinin karanlıkta ve ışık varlığında 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları	87

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	HCT-116 hücre hattında görülen morfolojik değişiklikler	81
Resim 2.	BODIPY-6a bileşiğinin lipozom (sol) ve nanopartikül (sağ) TEM görüntüleri	84
Resim 3.	BODIPY-12a bileşiğinin lipozom (sol) ve nanopartikül (sağ) TEM görüntüleri	84



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AA	Askorbik asit
ADMA	α,α' -(antrasen-9,10-diil)bimetilmalonat
ATP	Adenozin trifosfat
ALA	5-Aminolevulinik asit
BODIPY	4,4-Difloro-4-borata-3a-azonia-4a-aza-s-indasen
BSA	Sığır serum albümin
CT-DNA	Calf Thymus – deoksiribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Ditiyoeritrol
DBPF	1,3-Difenilisobenzofuran
EB	Etidyum bromür
EC	Enzim komisyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilkolin
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HpD	Hematoporfirin
KCl	Potasyum klorür
Lc	Çizgisel form
LS11	Talaporfin sodyum
MB	Metilen mavisi
ME	β -merkatoetanol
MgCl₂	Magnezyum klorür
m-THPBC	Meta-tetrahidroksifenilklorin
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromür
NaCl	Sodyum klorür
Nc	Kırık form
PBS	Fosfat tampon çözeltisi

PI	Propidyum iyodür
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik ko-glikolik asit
PVA	Polivinil alkol
PDT	Fotodinamik terapi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Sc	Süpersarmal form
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
Tris	(tris-hidroksimetil)-aminometan
UV-Vis	Ultraviyole visible

Simgeler

<i>K_b</i>	Bağlanma sabiti
μL	Mikrolitre
<i>mL</i>	Mililitre
$\text{\AA}$	Angstrom
<i>M</i>	Molar
μM	Mikromolar
<i>mM</i>	Milimolar
<i>nm</i>	Nanometre
<i>ng</i>	Nanogram
$\pi \rightarrow \pi^*$	π molekül orbitalinden π^* antibağ molekül orbitaline geçiş
<i>W</i>	Watt

ÖZET

Yeni BODIPY Bileşiklerinin Fotodinamik Terapi Amaçlı *in vitro* Etkinliklerinin İncelenmesi

Bu çalışmada piridinyum ve dimetilamino grupları içeren dört farklı suda çözünebilen BODIPY bileşiğinin kolorektal kanseri tedavisinde kullanılmak üzere uygun PDT ajanı potansiyeli olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle bileşiklerin fotokimyasal ve DNA bağlanma özellikleri UV-Vis spektrofotometri, viskozimetri ve agaroz jel elektroforez yöntemleri ile belirlenmiştir. Suda çözünebilen BODIPY türevli bileşiklerin plasmid pBR322 DNA nükleaz ve topoizomerez I/II inhibisyon özellikleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmiştir. Bununla birlikte, bileşiklerin topoizomerez I/II inhibisyonuna ait moleküler kenetleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. BODIPY bileşiklerinin kolorektal kanser hücre hattı (HCT-116) üzerindeki olası sitotoksik/fototoksik etkileri MTT hücre canlılık testi kullanılarak incelenmiştir. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerine karşı yüksek fototoksik etki gösteren BODIPY bileşiklerinin hücre ölüm mekanizmasını belirlemek amacıyla faz kontrast mikroskop ve akış sitometresi kullanılmıştır. Çalışmanın son kısmında yüksek fototoksik etki gösteren bileşikler nanotaşıyıcı sistemlerle formülize edilerek HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında *in vitro* sitotoksik ve fototoksik etkileri MTT yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Tüm bu çalışmaların sonucunda BODIPY-6a bileşiğinin fotokimyasal, DNA etkileşim ve fototoksikite özelliklerinden dolayı kolorektal kanser tedavisinde fotoduyarlastırıcı ajan olma potansiyelinin olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: BODIPY, DNA, Fotodinamik Terapi, Kolorektal Kanser

ABSTRACT

Investigation of *in vitro* Efficacy of Novel BODIPY Compounds for Photodynamic Therapy

The aim of this study was to determine whether four different water soluble BODIPY compounds containing pyridinium and dimethylamino groups are suitable PDT agents for the treatment of colorectal cancer. Therefore, photochemical and DNA binding properties of the compounds were determined by UV-Vis spectrophotometry, viscosimetry and agarose gel electrophoresis methods. Plasmid pBR322 DNA nuclease and topoisomerase I/II inhibition properties of water soluble BODIPY compounds were investigated using agarose gel electrophoresis method. In addition, molecular docking studies of topoisomerase I/II inhibition of compounds have been performed. The cytotoxic / phototoxic effects of BODIPY compounds on the colorectal cancer cell line (HCT-116) were investigated using MTT assay. Flow cytometry and phase contrast microscope were used to determine the cell death mechanism of BODIPY compounds that exhibit high phototoxic effect against HCT-116 cells. Finally, *in vitro* cytotoxic and phototoxic effects of water soluble compounds with nanocarrier systems were investigated using MTT method on HCT-116 cells. As results of all these studies, it was determined that BODIPY-6a has promising photosensitizer agent in the treatment of colorectal cancer due to its photochemical, DNA interaction and phototoxicity properties.

Keywords: BODIPY, Colorectal Cancer, DNA, Photodynamic Therapy

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin kontrolsüz olarak büyümesi ve çoğalması sonucu vücudun bazı bölümlerini işgal etmesi ya da yayılmasıyla karakterize edilen bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporlarına göre, kanser nedeniyle 2018 yılında yaklaşık 9.6 milyon ölüm gerçekleşmiştir. Dünyadaki en önemli ölüm nedenleri arasında yer alan bu hastalığın tedavisi için 2010 yılında yaklaşık olarak 1.16 trilyon dolar harcanmıştır (1). Amerikan Kanser Derneği'nin verilerine göre yalnızca 2030 yılında dünya genelinde 21.6 milyon yeni kanser vakasının tanımlanacağı ve 13 milyon kişinin de kanserden öleceği öngörülmektedir (2).

Kanser türleri arasında insidansı en yüksek türlerden biri olan kolorektal kanser, kolonun veya rektumun iç tabakasında gelişen polip olarak başlayıp, yavaş bir şekilde tümöre dönüşen bir hastalıktır (3). Kolorektal kanserde, kolon mukozasının hızlı çoğalması ve olgunlaşma yetersizlikleri nedeniyle adenomların oluşmasına sebep olmaktadır. Bu adenomlar onkogen aktivasyonları, tümör supresörlerin kaybı ve epigenetik değişiklikler nedeniyle çeşitli aşamalarla adenokarsinoma ve sonunda invaziv kolorektal karsinomaya dönüşmektedir (4, 5).

Günümüzde, kolorektal kanserin tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu uygulanan yöntemlerin alopesi, yutkunma zorlukları, ishal, bulantı, kusma, bağışıklık sisteminin tahrip edilmesi gibi ciddi yan etkilere sahip olduğu bilinmektedir (6). Kolorektal kanser tedavisinde, en sık kullanılan kemoterapötik ilaçlardan biri 5-florourasil'dir. Bu ilacın yanı sıra oksaliplatin, kapesitabin ve topoizomeraz inhibitörü olan irinotekan gibi ilaçlar da kullanılmaktadır. Kolorektal kanser tedavisinde sıklıkla kullanılmasına rağmen, bu ilaçların ciddi gastrointestinal sorunlar, hematolojik, nöronal, dermatolojik ve kardiyak yan etkileri bulunmaktadır (7). Bu nedenle daha güvenli yan etki profiline sahip alternatif tedavi stratejilerine ve hedefe yönelik yeni moleküllere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu alternatif tedavi stratejilerinden biri olan fotodinamik terapi (PDT), son yıllarda deri, akciğer, özafagus, mesane, prostat, yumurtalık gibi kanser türlerinin tedavisinde yeni bir yöntem olarak ortaya çıkmış ve hasta vücudundaki sağlıklı hücrelere daha az zarar vermesinden dolayı tercih edilen bir yaklaşım olmaya başlamıştır (8). PDT'nin temel prensibi, karanlıkta düşük toksik etki gösteren fotoduyarlastırıcı maddelerin ışık ve oksijen varlığında serbest radikaller üretilip kanser hücrelerini veya dokusunu yok etmeleridir (9).

4,4-difloro-4-borata-3a-azonia-4a-aza-s-indasen (BODIPY) ve türevleri, ilk olarak yüksek floresans özelliklerinden dolayı görüntüleme ajanı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda yüksek absorpsiyon katsayısı, yüksek saflıkta sentezlenebilme, singlet oksijen verimine sahip olabilme, toksik olmayan çözücülerde çözünürlük, hücre içine kolay alınma, karanlıkta düşük toksisite gibi özelliklerinden dolayı PDT’de kullanılan fotoduyarlaştırıcı bileşiklerden olmuşlardır (10). Fotoduyarlaştırıcı bileşiklerin en büyük dezavantajlarından biri yaygın organik çözücülerde çözünürlüklerinin düşük olmasıdır. BODIPY bileşiklerinin yaygın organik çözücülerdeki çözünürlüğünü artırmak için dallanmış ve dallanmamış alifatik düz zincir içeren gruplar tercih edilmektedir. Ayrıca suda çözünürlüğü sağlayabilmek için BODIPY bileşiklerinin türevlendirilmesinde azot grubu bulunduran grupları içeren dallanmış ve dallanmamış ligandlar sıkça kullanılmaktadır (8).

Deoksiribonükleik asit (DNA), canlı organizmalarda genetik bilginin depolanması ve nesilden nesile aktarılması açısından oldukça önemli bir biyomoleküldür. Gen mutasyonlarında, onarım mekanizması bozukluklarında, kontrolsüz hücre çoğalmasında önemli rol oynamaktadır (11). DNA’da gerçekleşen bu geri dönüşümsüz değişikliklerle kanser oluşumunun oldukça ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle DNA, yeni antikanser ilaçların bulunmasında en önemli hedeflerden biri haline gelmiştir. Etkili bir antikanser ilaç tasarımı, DNA ile bileşiklerin etkileşiminin belirlenmesi oldukça önemlidir (12).

Topoizomerez enzimleri, DNA’nın gevşemesini ve kıvrılmasını sağlayarak DNA replikasyonunda, transkripsiyonunda ve kromatinin yeniden modellenmesinde etkilidir. Topoizomerez enzimleri topoizomerez I ve II olarak sınıflandırılmaktadır. Topoizomerez I enzimi DNA’nın tek zincirinde, topoizomerez II enzimi DNA’nın çift zincirinde önce kırılmaya ve sonra birleşmeye sebep olurken replikasyonun ve transkripsiyonun devam etmesini sağlamaktadırlar (13). Kanser hücrelerinde topoizomerez enzimlerinin ekspresyonunun arttığı, bu enzimlerin kontrolsüz hücre bölünmesinde önemli rollerinin olduğu yapılan çalışmalarda görülmektedir (14, 15). Klinikte çeşitli kanser türlerinde kullanılan topoizomerez inhibitörleri kamptotesin, irinotekan, topotekan, doksorubisin ve etopozit; karaciğer hasarı, alopesi, ateş, titreme, gastrointestinal sorunlar, kardiyotoksisite, immun sistemin baskılanması gibi ciddi yan etkilere sahiptirler. Topoizomerez enzimlerinin çoğalma proseslerinde önemli rol oynaması ve mevcut klinikte kullanılan

ilaçların ciddi yan etkilere sahip olması bilim insanlarını alternatif arayışlara sürüklemektedir (16). Bu nedenle bu enzimin inhibitörleri, yeni antikanser ilaçların gelişiminde önemli hedeflerden biri haline gelmiştir. Literatürden elde edilen bilgiler doğrultusunda PDT’de kullanılabilen ajanların topoizomerez inhibitör etkisinin var olmasının PDT’nin etkinliğini arttıracığı düşünülmektedir.

PDT etkinliğini arttırabilmek için fotoduyarlaştırıcı maddelerin tümöre selektif olması gerekmektedir (10). Bu nedenle fotoduyarlaştırıcının selektif doku veya hücre içerisinde birikmesi için nanopartikül, lipozom, mikroküre ve albümin gibi çeşitli taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır (17). Lipozomlar, ilaç emiliminin arttırılması, biyolojik yarı ömrün uzatılması veya metabolizmasının azaltılmasıyla bir ilacın terapötik indeksini arttırmak amacıyla tercih edilmektedir (18). İlaçların taşınma hızının ve selektifliğinin arttırılması için kullanılan yöntemlerden biri de nanoteknolojik formülasyonlardır. Farmasötik bilimlerde nanopartiküllerin kullanılması ilaçların toksisitesini ve yan etkisini azaltmakta olup, hastaların yaşam kalitesini arttırmaktadır. Kanseri hücrelerine selektif ilaç taşınması, toksisiteyi azaltmasıyla sürdürülebilir terapötik etkisi, daha güvenli ve biyoyumlu olması nanopartikül formülasyonunun avantajları arasında sayılabilmektedir (19). Bu çalışma kapsamında lipozomal ve polimerik nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemleri kullanarak BODIPY bileşiklerinin hücre içerisine daha yüksek verimle taşınması hedeflenmektedir ve böylece PDT etkinliğinin artacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Zekeriya BIYIKLIOĞLU ve ekibi tarafından sentezlenen piridinyum ve dimetilamino grupları içeren dört farklı suda çözünebilen BODIPY bileşiğinin kolorektal kanseri tedavisinde kullanılmak üzere uygun PDT ajanı olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda bileşiklerin PDT potansiyellerini ortaya koymak için suda çözünebilen BODIPY bileşiklerinin fotokimyasal özellikleri, singlet oksijen kuantum verimi ve fotobozunma yüzdeleri incelenmiştir. Daha sonra suda çözünebilen BODIPY bileşiklerinin DNA bağlanma modları, UV-Vis spektrofotometri, viskozimetri ve agaroz jel elektroforez yöntemleri ile belirlenmiştir. Ayrıca, suda çözünebilen BODIPY türevli bileşiklerin plasmid pBR322 DNA nükleaz ve topoizomerez I/II inhibisyon özellikleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmiştir. Bununla birlikte bileşiklerin topoizomerez I/II inhibisyonuna ait moleküler kenetleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. BODIPY bileşiklerin HCT-116 kolorektal kanser hücre hattı

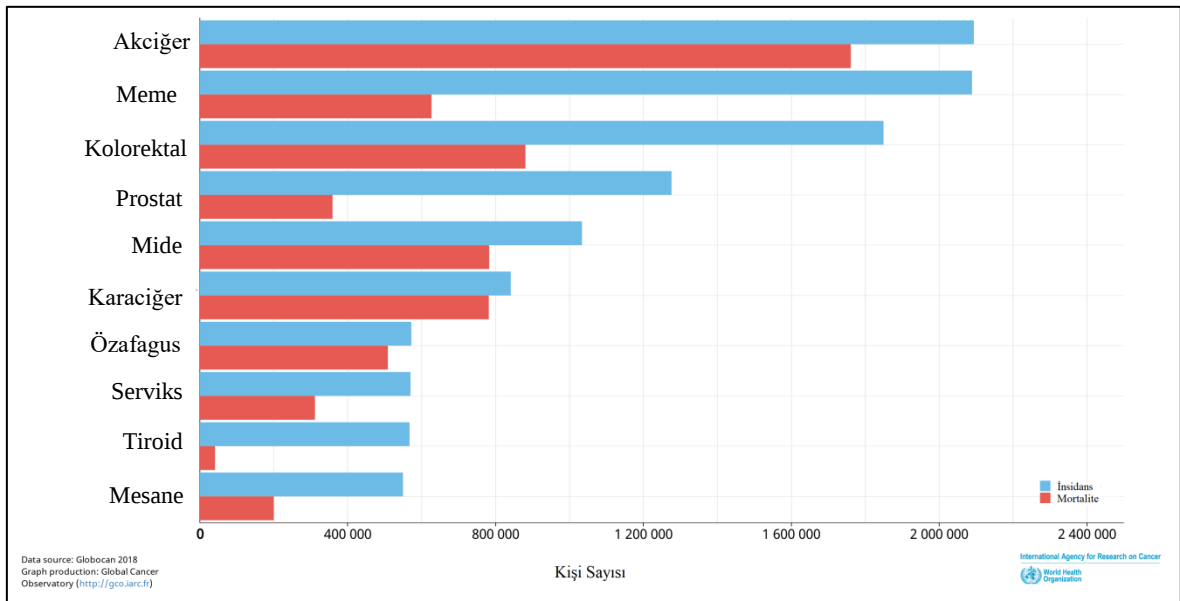
üzerindeki olası sitotoksik/fototoksik etkileri 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromür (MTT) hücre canlılık testi ile incelenmiştir. HCT-116 kolorektal kanser hücresine karşı yüksek fototoksik etki gösteren BODIPY bileşiklerinin hücre ölüm mekanizmasını belirlemek amacıyla faz kontrast mikroskop ve akış sitometresi kullanılmıştır. Çalışmanın son kısmında yüksek fototoksik etki gösteren bileşikler nanotaşıyıcı sistemlerle formülize edilerek, bu formülasyonların HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında *in vitro* sitotoksik ve fototoksik etkileri MTT hücre canlılık yöntemi ile incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin kontrolsüz olarak büyümesi ve çoğalması sonucu vücudun bazı bölümlerini işgal etmesi ya da yayılmasıyla karakterize edilen bir hastalıktır. Kanserin nedeninin net olarak bilinmemesine rağmen, kalıtsal olan (genetik mutasyonlar, bağışıklık sistemi gibi) ve olmayan (sigara kullanımı, obezite gibi) birçok faktörün hastalığın oluşumunu arttırdığı düşünülmektedir. Bu faktörler, kanser büyümesini başlatmak veya hızlandırmak için aynı anda veya sırayla hareket edebilir. DSÖ raporlarına göre, kanser nedeniyle 2018 yılında yaklaşık 9.6 milyon ölüm gerçekleşmiştir. 2018 yılında akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi en yüksek olan kanser türü olarak belirlenmiştir. Meme kanseri ise insidansı yüksek olmasına rağmen, tedavi oranı oldukça yüksektir. Kolorektal kanserin, en yaygın üçüncü ve ölüm oranının ikinci sırada olduğu görülmektedir (Şekil 1). Kanserin tedavisi için 2010 yılında yaklaşık olarak 1.16 trilyon dolar harcandığı DSÖ raporlarında yer almaktadır (1). Amerika Sağlık Hizmeti Araştırma ve Kalite Kurumu (The Agency for Healthcare Research and Quality) raporlarında ise, 2015 yılında kanser için sağlık harcamaları toplamının 80.2 milyar dolar olduğu açıklanmıştır (20). Gelecek yıllarda kanserin insidansına bağlı olarak tedavi maliyetlerinin artmasının muhtemel olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1. Kanser hastalığının dünyadaki tahmini insidans ve mortalite sayıları (DSÖ'den, 1)

Amerikan Kanser Derneği verilerine göre, 2019 yılı içerisinde 1.7 milyondan fazla yeni kanser vakasının tespit edileceği tahmin edilmektedir. Ayrıca, 2030 yılında dünya genelinde 21.6 milyon yeni kanser vakasının tanımlanacağı ve 13 milyon kişinin de kanserden öleceği öngörülmektedir (2).

2.2. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser, kolonun veya rektumun iç tabakasında gelişen polip olarak başlayıp, yavaş bir şekilde tümöre dönüşen bir hastalıktır. Oluşan tümör, kan veya lenf dolaşımı sayesinde diğer anatomik bölgelere metastaz gerçekleştirebilmektedir. Kolorektal bölgede başlayan kanserlerin büyük çoğunluğu (%95'in üzerinde) adenokarsinom olarak sınıflandırılmaktadır. Adenokarsinom, kolon ve rektumu kaplayan mukus bezlerinde başlar. Kolorektal bölgede gerçekleşen diğer kanser türleri; hormon üreten bağırsak hücrelerinde başlayan karsinoid tümörleri, Cajal interstisyel hücrelerinden oluşan gastrointestinal stromal tümörleri, bağışıklık sisteminden kaynaklanan lenfoma, genel olarak kan damarlarında başlayan, ancak bazen kolorektal duvarlarda oluşan sarkoma olarak sınıflandırılmaktadır (3).

Kolorektal kanser dünyada en sık görülen üçüncü kanser türü olup, onkolojik hastalıklarda ölüm oranının ikinci sırada olduğu bilinmektedir. Bu hastalık, tüm kanser insidansının %9'dan fazlasını oluşturmaktadır. Amerika'da 2016 yılında 134.490 yeni kolorektal kanser vakası tespit edilirken, 49.190 kişi bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmiştir (1, 21). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından yayınlanan 2014 yılı Türkiye Kanser İstatistiklerine göre Türkiye'de kolorektal kanser hem kadınlarda hem de erkeklerde görülme sıklığı açısından üçüncü sırada yer almaktadır. Kadınlarda yüz binde 13.8, erkeklerde ise yüz binde 22.8 sıklığında görülmekte olduğu belirtilmiştir (22).

Kolorektal kanserin insidansı birkaç risk faktörü ile ilişkilidir. Kontrol edilemeyen (kalıtsal ve yaş) ve edilebilen (fiziksel aktivite, sigara ve içki kullanımı, beslenme) faktörler kolorektal kanserin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır.

Kolorektal kanser vakalarının %90'ı 50 yaş ve üstü kişilerde görüldüğü bilinmektedir. İnsidans oranı 60-79 yaşları arasında, 40 yaşından küçük olanlara oranla 50 kat daha yüksektir. Bununla birlikte, kolorektal kanser genç insanlar arasında da artmaktadır. Amerika'da kolorektal kanser, 20-49 yaşları arasındaki kadın ve erkekler arasında en sık görülen kanser türlerinden biridir (23, 24)

Sık rastlanan bir kanser türü olduğundan kolorektal kanserin genetik mekanizması ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda çok sayıda mutasyonun bu hastalığa neden olduğu belirlenmiştir. Kolorektal kanserin gelişiminde tümör supresör genler (Adenomatous Polyposis Coli (APC), Deleted in Colorectal Cancer (DCC), p53), protoonkogenler (Ras) ve DNA onarımı ile ilgili genler rol oynamaktadır (25).

Kolorektal kanserin %90'dan fazlasının APC geninde meydana gelen mutasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. 5q21 Bölgesinde yer alan APC geni tarafından kodlanan 2843 aminoasitten oluşan ve molekül ağırlığı yaklaşık 310 kDa olan APC proteini, hücreler arası sinyal iletiminin bir parçasıdır. APC proteini Wnt yolağında etkili rol oynamaktadır. Bu protein, hücre çekirdeğine bölünme uyarısı veren β -katenin'i kontrol etmektedir. APC proteini işlevini gerçekleştirmediğinde β -katenin'i fosforilleme etkisi ortadan kalkıp, sinyal yolunun sürekli aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu durum sonrasında hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına ve çok sayıda polip gelişerek erken adenom dönemine geçilmesine sebebiyet vermektedir (26-28).

18q22'de yerleşim gösteren tümör supresör DCC geni, transmembran bir protein olan DCC proteinini kodlamaktadır. Bu protein, Transformasyon Edici Büyüme Faktörü (TGF- β) arayolunda oldukça etkilidir. Bu arayol normal hücre büyümesini baskılayarak kontrol altında tutmaktadır, bu arayolun devreden çıkması ile gelişim hızlanır ve geç dönem adenomlar gelişmektedir (29, 30).

Tümör supresör genlerden bir diğeri olan TP53 geni 17p13'de yerleşim göstermektedir. Bu gen, DNA'ya bağlı olarak nükleusta bulunan p53 proteininin sentezinden sorumludur. Bu protein DNA hasarı gerçekleştiğinde DNA onarımı ve sentezinin kontrolü ve programlanmış hücre ölümünde önemli rol oynamaktadır. Bu genin inaktive olması adenomun karsinomaya dönüşümüne neden olmaktadır ve kolorektal kanserin geç dönemlerinde ortaya çıkan önemli bir basamaktır (28, 31, 32).

Kolorektal kanserin oluşumunda sinyal iletiminin düzenlenmesinde görev alan protoonkogenlerin rol aldığı bilinmektedir. Bunlardan biri de Ras genidir. Kolorektal kanser vakalarının %30-50'sinde Ras geninin mutasyona uğradığı belirlenmiştir. Ras genindeki mutasyonlar ile APC genindeki mutasyonlar ard arda gelince polipler giderek büyümekte ve parmaklı uzantılara sahip bir hal almaktadır. Bu aşama orta seviyede adenom aşaması olarak tanımlanmıştır (32).

Ayrıca, Herediter nonpolipozis kolorektal kanseri (HNPCC), Muir-Torre, Ailesel Polipozis Koli (FAP), Gardner, Turcot, Cowden gibi genetik sendromların kolorektal kanser ile ilişkili olduğu bilinmektedir (21, 33).

Genetik faktörlere ek olarak kolorektal kanserin ortaya çıkmasında kültürel, sosyal ve yaşam tarzlarını içeren çevresel faktörler yer almaktadır. Bu çevresel faktörlerden biri beslenme alışkanlığı olarak belirlenmiştir. Beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler kanser riskini %70 oranında azaltmaktadır. Özellikle yağ içeriği yüksek hayvansal gıdalar kolorektal kanser için önemli bir risk faktörüdür. Et tüketimi ile kolorektal kanser arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Bunun nedeni kırmızı et içerisinde oldukça fazla hem demiri bulunması ve yüksek ısıda etlerin pişirilmesi sonucunda kanserojenik olduğu düşünülen heterosiklik aminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonların üretimidir. Bu nedenle sebze ve meyve içeren diyetin kolorektal kanser riskini azaltmaya yardımcı olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak aşırı sigara ve alkol tüketimi de kolorektal kanseri için oldukça yüksek risk oluşturmaktadır. Sigaranın adenoma poliplerinin oluşumunda ve büyümesinde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Alkolün prostaglandinleri, lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen türlerini oluşturmasından dolayı risk oluşturduğu düşünülmektedir (34-41).

2.3. Kolorektal Kanserinin Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

Kolorektal kanserin tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve hedeflenmiş terapi kullanılmaktadır (42). Kanserinin evresine göre kombine tedavi yöntemleri de tercih edilmektedir. Hastalığın erken teşhisinde öncelikli olarak tercih edilen yöntem cerrahidir. Bu yöntemde sağlıklı dokuyu çevreleyen tümör ve bitişik lenf düğümleri çıkarılmaktadır. Sistemik metastaz durumunda bu yöntem başarısız olmaktadır (7). Bu nedenle en çok tercih edilen yöntem kemoterapidir. Bu yöntem temel olarak apoptoz, hücre yaşlanması ve otofaji yoluyla kanser hücrelerine etki etmektedir (43). Kemoterapötik ajanlar; mitoz inhibitörleri, DNA replikasyon inhibitörleri ve diğer sitotoksik ajanlar gibi etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadırlar. Kolorektal kanserde kullanılan en yaygın kemoterapötik ajanlar platin türevleri (oksaliptin), kapesitabin, topoizomera inhibitörleri (irinotekan) ve 5-fluorourasil'dir. Hastalığın evresine göre bu ilaçların kombinasyonları da kullanılabilir. Ancak kemoterapötiklere karşı direncin yüksek olması ciddi dezavantaj içermektedir. Ayrıca bu ilaçların kanserli dokuya selektif olmaması nedeniyle ciddi yan etkiler oluşturduğu bilinmektedir. Kemoterapötik ilaçlar sadece kanserli hücreyi

değil, sağlıklı hücreyi de etkilemektedir. Örneğin; 5-florourasil gastrointestinal, hematolojik, nörolojik, kardiyak ve dermatolojik sorunlara neden olmaktadır. Oksaliplatin nöropati, ototoksisite, kusma, bulantı, hipokalemi, rabdomiyaliz gibi yan etkilere sahiptir. Bu tedavide kullanılan ilaçların olumsuz etkileri hastanın yaşam kalitesini bozar, tedavi sürecini, sonucunu ve maliyetini olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle yeni tedavi stratejilerine ve düşük yan etki profiline sahip ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (44-49).

2.4. PDT

PDT, ışığa duyarlı fotoduyarlaştırıcı bileşiğin kanserli dokuda birikmesi ve ışığa maruz bırakılmasıyla oluşan serbest radikallerin kanserli dokuyu yok etmesi esasına dayanan alternatif bir kanser tedavi yöntemidir (50). Son yıllarda deri, akciğer, özafagus, mesane, prostat, yumurtalık gibi kanser türlerinin tedavisinde kullanılmakta olup, hasta vücudundaki sağlıklı hücrelere daha az zarar vermesinden dolayı tercih edilen bir yaklaşım olmaya başlamıştır (8).

PDT'nin kanser tedavisinde günümüzde kullanılan yöntemlere göre avantajları şu şekilde belirtilmiştir:

- 1- Karanlıkta düşük yan etki profiline sahiptir.
- 2- Kemo ve radyoterapiye dirençli tümörlere karşı kullanılabilir.
- 3- Tümörlü dokularda, sağlıklı dokulara göre daha çok birikmektedir.
- 4- Diğer tedavi yöntemleriyle kombine edilebilir.
- 5- Cerrahi operasyona gerek duymadan uygulanabilecek bir tedavi şeklidir.
- 6- Etkisi 24-48 saat gibi kısa bir sürede görülmektedir.
- 7- Tüm kanser hücrelerini, gözle görülemeyen kanser hücreleri de dahil olmak üzere, ortadan kaldırdığından, kanserin nüksetme olasılığı düşüktür (51).

2.4.1. PDT'nin Tarihçesi

Bu yöntem Mısır, Çin ve Hindistan genelinde 1000 yıldan fazla bir süredir fototerapi adıyla uygulanmaktadır. Ancak eski yıllarda üzerinde pek fazla çalışma yapılmamıştır. Bu konudaki ilk deneysel gözlem 1890 yılında Almanya'da tıp öğrencisi olan Oscar Raab tarafından gerçekleştirilmiştir. Oscar Raab, akridin boyası varlığında ışık altında *Paramecium* spp. hücrelerini gözlemlemeye çalışırken, ışık ve boyanın etkisiyle bir takım reaksiyonların gerçekleşerek hücrelerin öldüğünü tespit etmiştir (52). 1900 yılında PDT'nin ilk klinik gözlemi epilepsi hastalığını tedavi etmek için oral eozin kullanan

nörolog Jean Prime tarafından gerçekleştirilmiştir (53). 1903 yılında von Tappeiner ve Jesionek isimli araştırmacılar eozin ve ışığı kullanarak deri tümörlerini tedavi etmeye çalışmışlardır (54). Bu araştırma PDT'nin tümör üzerinde kullanıldığı ilk çalışma olarak yayınlanmıştır. Daha sonra Tappeiner, moleküler oksijenin Raab tarafından gözlemlenen olayların önemli bir bileşeni olduğunu belirledi ve “fotodinamik etki” ifadesini ortaya koydu (55). Tappeiner'in çalışmalarından sonra 1950 yılına kadar PDT'nin antikanser potansiyelinden çok, teşhis alanında kullanılmasıyla ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. 1950 ile 1960 yılları arasında farklı tümörlere karşı PDT'nin antikanser etkisine dair birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (56). Uzun yıllar süren çalışmalar sonucunda 1972 yılında Thomas Dougherty tarafından hemetoporfirin bileşiğinin birçok kanser türü için antikanser ilaç potansiyelinin olduğu ileri sürülmüştür (57-59). 1976 yılında Kelly ve Snell isimli araştırmacılar mesane kanseri tedavisinde hemetoporfirin kullanmış olup sonuçların oldukça etkili olduğunu belirtmiştir (60). 1999'da Amerikan Yiyecek ve İlaç Kurulu (Food and Drug Administration (FDA)), kanser öncesi cilt lezyonlarının tedavisi için PDT'yi onaylamıştır (52). Günümüzde ise birçok fotoduyarlaştırıcı bileşik Amerika, Almanya, Japonya, İngiltere, Fransa, Kanada gibi ülkelerde kullanılmak üzere sağlık kurumları tarafından onaylanmıştır. Ayrıca PDT kanser dışında, üroloji, immünoloji, oftalmoloji, diş, dermatoloji gibi alanlarda da sıklıkla kullanılan bir tedavi yöntemi olmuştur (61-65).

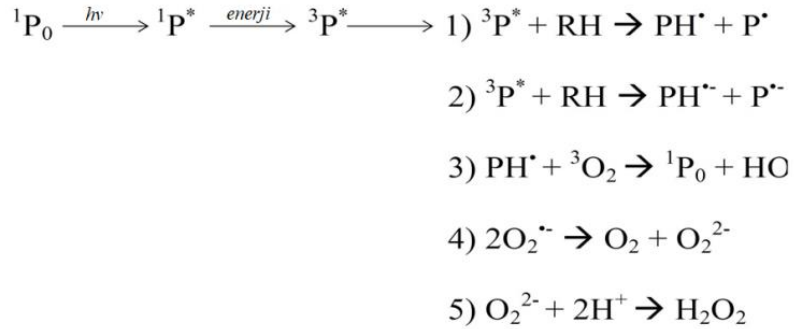
2.4.2. PDT'nin Mekanizması

PDT birçok hastalığın hem teşhisi hem de tedavisi için umut verici bir tekniktir. PDT'nin etkinliği üç temel bileşene bağlıdır;

- 1- Hastalıklı dokunun hassasiyetinden sorumlu olan fotoduyarlaştırıcı bileşik,
- 2- Fotoduyarlaştırıcı bileşiği harekete geçiren ışık,
- 3- Tedavi edilecek dokudaki oksijen miktarı.

Araştırmacılar dokulardaki oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak PDT'yi iki mekanizma üzerinden incelemektedir (66) (Şekil 2).

Tip 1 mekanizması:

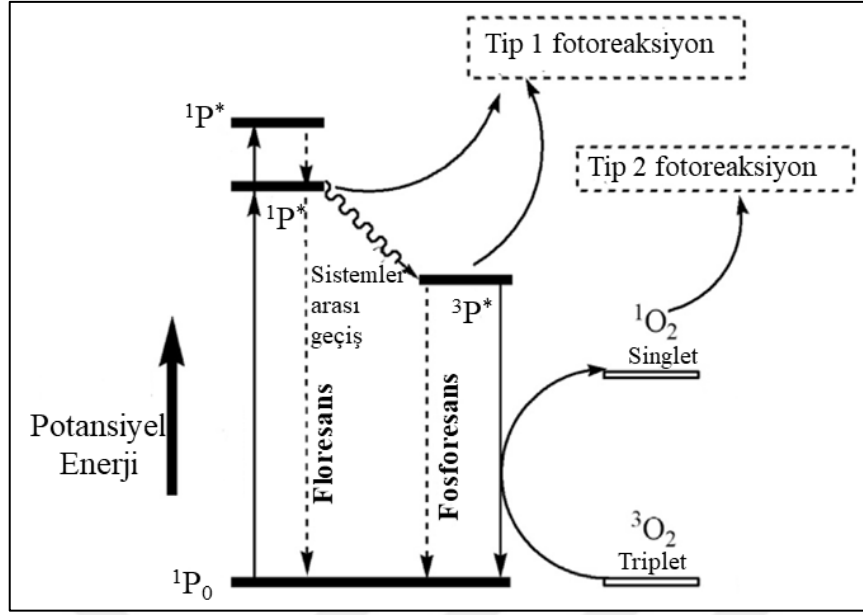


Tip 2 mekanizması:



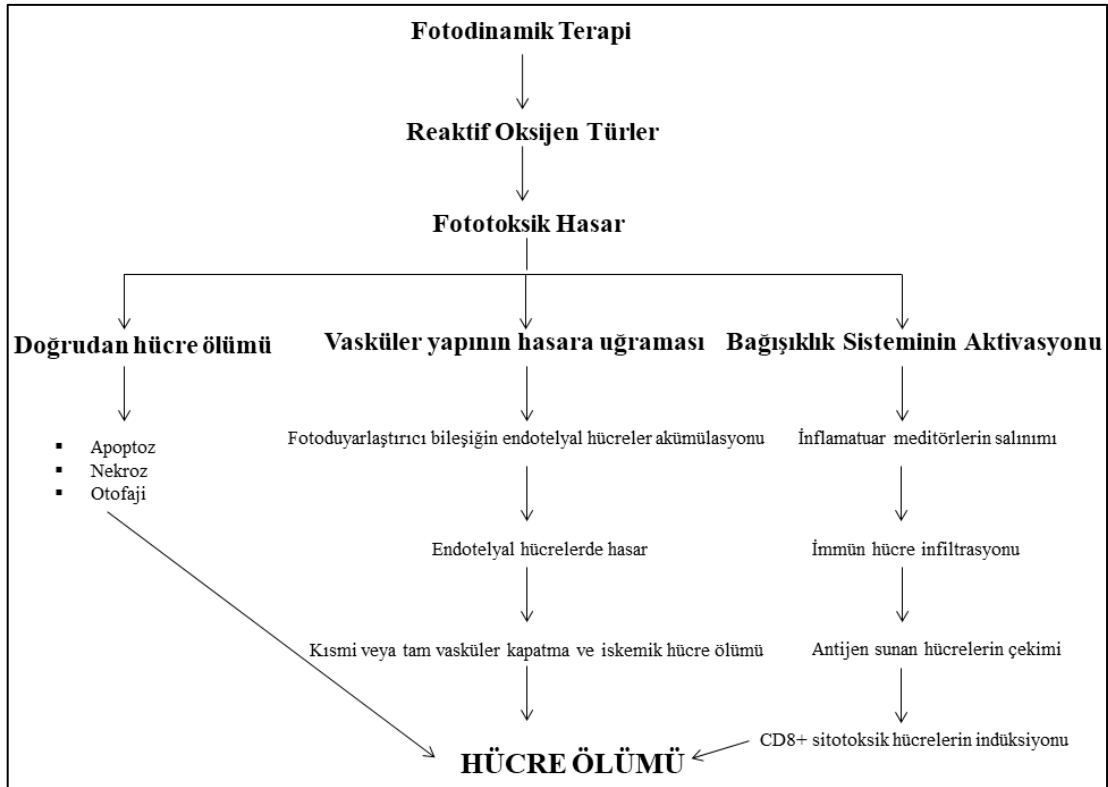
Şekil 2. Oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak PDT'nin iki farklı tip mekanizması (Oniszczuk'tan, 51)

Şekil 3'de de görüldüğü gibi temel enerji seviyesindeki fotoduyarlayıcı bileşik (1P_0) ışığı absorpladığında uyarılmış (${}^1P^*$) hale geçmektedir. Uyarılan molekül ya floresans ışıma yaparak temel hale geri dönebilir ki bileşiklerin bu özelliği hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır ya da spin değiştirip sistemler arası geçiş yaparak triplet (${}^3P^*$) düzeye geçmektedir. Triplet (${}^3P^*$) düzeydeki molekül fosforesans ışıma yaparak temel hale dönüş yapabilmektedir. Ancak daha önemlisi hücre membranı ya da diğer biyomoleküller gibi substratlarla doğrudan etkileşime girerek reaktif oksijen türleri (süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit) oluşturmaktadır. Bu duruma Tip 1 mekanizması adı verilir ve düşük oksijen konsantrasyonu durumunda meydana gelmektedir. Ayrıca, triplet (${}^3P^*$) düzeydeki molekül temel düzeye dönmek yerine enerjisini triplet temel düzeydeki oksijene (3O_2) aktarır ve oksijenin singlet düzeye (1O_2) uyarılmasına neden olur. Oluşan singlet oksijen oldukça reaktif olup, hastalıklı dokulara kolaylıkla zarar verebilmektedir. Bu duruma ise Tip 2 mekanizması adı verilmektedir ve yüksek oksijen konsantrasyonu varlığında gerçekleşmektedir. Birçok deneysel çalışma *in vivo* PDT çalışmalarında Tip 2 mekanizmasının daha fazla rol oynadığını göstermektedir (67-70).



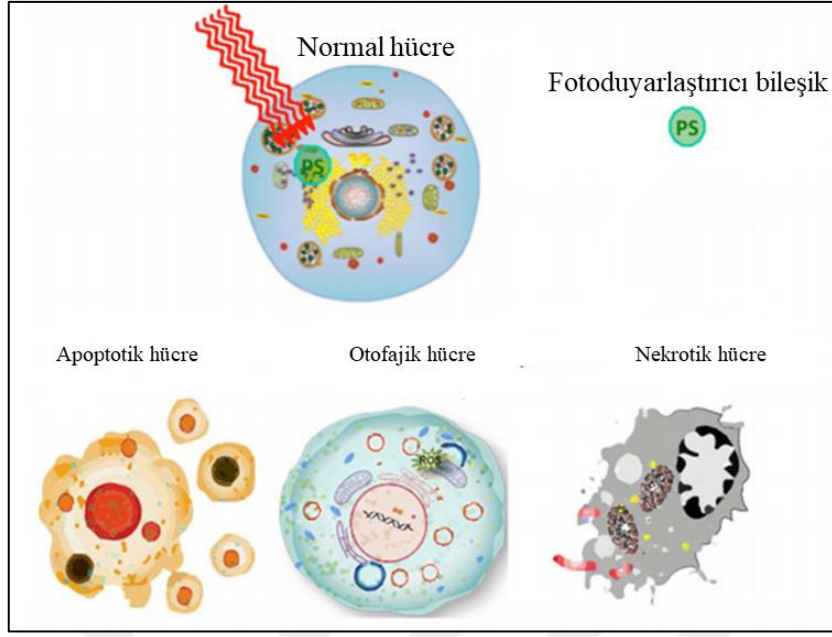
Şekil 3. Jablonski diyagramı (Zhang'tan, 66)

PDT'nin antikanser etkisi; doğrudan hücre ölümü, vasküler yapısının hasara uğraması ve bağışıklık sisteminin aktivasyonundan kaynaklanmaktadır (71-74) (Şekil 4).



Şekil 4. PDT'nin antikanser etkisi (Akbulut'tan, 80)

PDT apoptoz, nekroz ve otofaji olmak üzere üç temel yöntem ile doğrudan hücre ölümüne sebebiyet vermektedir. Apoptoz, hücre içi ve dışı sinyaller tarafından düzenlenen programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Apoptoz, komşu hücrelere hasar vermeden hedeflenen hücrelerin yok edilmesi esasına dayanmaktadır. Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller arasında; DNA hasarı, hücre içi kalsiyum düzeyi artışı, ortamın asitliğinin artışı, hücre döngüsü bozuklukları yer almaktadır. Hücre dışı sinyaller arasında ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu gibi etkenler yer almaktadır (51). Nekroz ise hipoksi, yüksek sıcaklık, yüksek basınç, fiziksel hasar, ağır metaller ve UV gibi hücre dışı uyaranlarla hücre membranının hasar görmesi ve hücre içeriğinin sızması sonucu meydana gelmektedir. Otofaji ise hücrenin yaşlanmış ve bozulmuş yapılarının, hücrenin kendi lizozomu tarafından sindirilmesi olayına verilen isimdir. Bu süreç kanser tedavisi için oldukça önemlidir. Otofajinin temel amacı homeostazdır ancak birçok durumda bu süreç tüm hücrenin tahrip olmasına neden olmaktadır (51). PDT’de otofaji hem hücre canlılığını korumak hem de hücre ölümü olmak üzere çift yönlü etki etmektedir. Hücre canlılığı açısından PDT’ye karşı savunma sistemi olarak düşünülebilir. Otofaji ve apoptoz ilişkisi hücrelerin hayatta kalması ve ölümü için oldukça önemlidir. Hem sitotoksik hem de sitoprotektif etkilerinden dolayı otofaji hem fotohasarlı hücrelerin tamirinde hem de hücre ölümlerinde rol almaktadır (75). Fotoduyarlaştırıcı bileşiğin hücre içinde farklı organellerdeki lokasyonu hücre ölüm mekanizmasının belirlenmesinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Bunun en önemli nedeni üretilen singlet oksijenin yarı ömrünün az olmasıdır. Bu nedenle fotoduyarlaştırıcı bileşiğin hücre içerisindeki lokasyonu, hangi organelin öncelikli olarak hasar göreceğini belirlemektedir. Örneğin mitokondride meydana gelen hasar membran geçirgenliğinin bozulmasına ve sitokrom c’nin sitoplazmaya geçmesine neden olur. Apoptotik proteaz aktive eden faktör (Apaf-1) ve prokaspas-9 sitoplazmada bulunan sitokrom-c ile bağlanıp kaspas-3, 7, 6, 2, 9’u aktive ederek, apoptotik yolağın aktifleşmesini sağlar. Endoplazmik retikulumun membran yapısının bozulması depo edilen Ca^{+2} ’nin sitoplazmaya geçmesine neden olur. İkinci mesajcı olarak Ca^{+2} hücreyi apoptoza götüren sinyal iletim mekanizması için de gereklidir (6) (Şekil 5).



Şekil 5. PDT'nin hücre ölüm mekanizması (Akbulut'tan, 80)

Ayrıca, PDT dozu da (fotoduyarlastırıcı konsantrasyonu $\times$ ışık dozu) rol oynayan bir diğer faktördür. PDT uygulamalarında yüksek enerjili ışık ve bileşiğin yüksek konsantrasyonu (yüksek PDT doz) kullanıldığı durumlarda hücre ölümünün nekroz yoluyla gerçekleştiği görülmüştür. Düşük enerjili ışık ve fotoduyarlastırıcı bileşik düşük konsantrasyonlarda (düşük PDT doz) kullanıldığında ise ölümün apoptoz yoluyla gerçekleştiği belirlenmiştir (76, 77).

PDT'nin vasküler mekanizması, kanser tedavisi için umut verici olmuştur. Bu yaklaşım ile mikrovasküler hasar ve angiogenesis oluşumu engellenip, PDT etkinliğinin artması öngörülmektedir (78). Kanser tedavisinde bu mekanizmanın asıl amacı tümör vasküler tıkanmayı indükleyerek maksimum hücre ölümünü sağlamaktır. Bu mekanizmada vasküler hasar, hipoksi ve besin maddelerinin yoksunluğu sonucu oluşmaktadır. Moleküler mekanizması incelendiğinde ise Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B)'nin önemli rol oynadığı görülmektedir. Endotelial hücrelerde NF- κ B'nin aktivasyonu fotoduyarlastırıcı ile indüklenen vasküler tümör mekanizmasında rol oynamaktadır. Fotoduyarlastırıcı bileşikler kanda yüksek yoğunluklu lipoprotein veya düşük yoğunluklu lipoproteine bağlandıklarından dolayı endotel hücreleri ve tümör vasküler endoteline güçlü bir afiniteyle tutunurlar. Bu mekanizma özellikle de prostat kanserine karşı PDT etkisinin temelidir. Vasküler sistemde ışık varlığında serbest radikaller oluşup oksijen

konsantrasyonunun azalmasına, vasküler ve yakınlardaki tümör hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır (79).

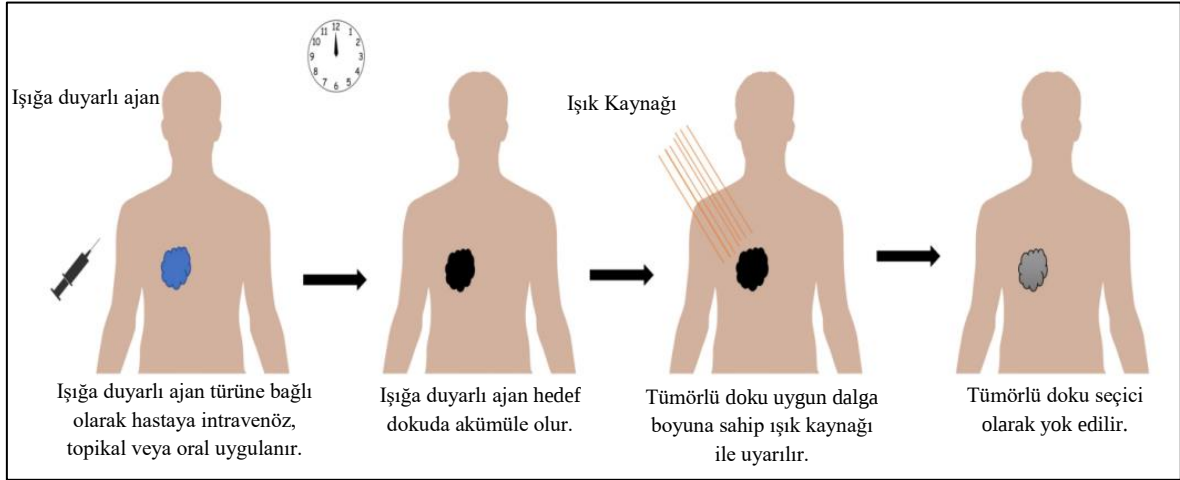
PDT bağışıklık sistemi ile yakından ilişkilidir. Fotoduyarlayıcı bileşikler, vasküler ve bağışıklık sistemler ile birlikte tümör hücreleriyle savaşmaktadır. Araştırmalar, PDT'nin bağışıklık sisteminin düzenlenmesini indüklediğini göstermektedir. PDT tümörün mikroçevresini değiştirerek pıhtılaşma kaskadların, proteinazların, peroksidazların, lökosit kemoatraktanların ve büyüme faktörlerinin salınımı uyarmaktadır. Bağışıklık mekanizması sitokinlerin ve inflamasyon seviyelerinin artmasına dayanmaktadır (51). Vücut PDT'den kaynaklanan tümör dokusu hasarını tanımakta ve tedavi edilen bölgeye nötrofillerin ve makrofajların salınımını sağlamaktadır. Bununla birlikte antitümör bağışıklığı, aktiveleştirilmiş antijen sunucu hücrelerin varlığına bağlıdır. PDT antijen sunucu hücrelerin aktivitesini artırıp CD4 yardımcı T lenfositleri salgılamaktadır. Bu da, CD8 sitotoksik T hücrelerini aktive ederek nekrozu indükleyebilir. Aynı zamanda apoptoza neden olarak uzun süreli tümör kontrolünü sağlayabilir (80).

2.4.3. PDT'nin Uygulanması

PDT'nin genel tedavi prosedürü sırasında fotoduyarlayıcı bileşik hastaya intravenöz, topikal veya oral olarak uygulanmaktadır. Hastaya uygulandıktan 24-72 saat sonra, fotoduyarlayıcı bileşiğin tümörlü dokularda konsantrasyonu artmaktadır. Tümörlü doku ile sağlıklı doku arasındaki fizyolojik farklılıkların bu birikmeye neden olduğu düşünülmektedir. Bu farklılıklar;

- 1- Tümörlü dokunun sağlıklı dokudan daha büyük bir interstisyel hacme sahip olması,
- 2- Tümörlü dokudaki mikrodamarlarda çatlakların bulunması,
- 3- Tümörlü dokuda sağlıklı dokudan daha fazla sayıda makrofajın bulunması,
- 4- Tümörlü dokuda lenfatik drenajın düşük olması,
- 5- Tümörlü dokunun hücre dışı pH'nın düşük olması,
- 6- Tümörlü dokunun sağlıklı dokudan fazla miktarda kollajen içermesi,
- 7- Tümör dokusunda yer alan hücrelerin sağlıklı hücrelerden daha fazla sayıda lipoprotein reseptörüne sahip olması şeklindedir (6).

Fotoduyarlastırıcı bileşik tümörlü dokuda biriktikten sonra ışık tümörlü dokuya verilmekte ve fotokimyasal reaksiyonlar sonucu üretilen reaktif oksijen türlerin etkisiyle doku yok edilmektedir (50) (Şekil 6).



Şekil 6. PDT tedavisinin şematik gösterimi (Akbulut'tan, 80)

2.4.4. Kolorektal Kanser Tedavisinde PDT

PDT birçok farklı onkolojik alanda kullanılmaktadır. Gastroenterolojide hem premalign lezyon hem de kolorektal kanser tedavisinde uygulanmaktadır. Kolorektal kanserin tedavisinde PDT ile yapılan klinik çalışmalar Tablo 1'de verilmiştir. Bu hastalığın PDT ile tedavisinde endoskopik ve kolonoskopik yöntemler kullanılmaktadır. Kolorektal kanserin PDT ile tedavisi ilk olarak 1986 yılında yayınlanan pilot çalışma ile ortaya konulmuştur. Herrera-Ornelas ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, hematorporfirin türevi (HpD) bileşik 14 kolorektal kanser hastası üzerinde denenmiş ve olumlu sonuçlar görülmüştür (81). Bir başka pilot çalışmada, Mlkvy ve arkadaşları kolorektal poliplere karşı 5-aminolevulinik asit (ALA) kullanılarak PDT tedavisini 39 hastaya (ortalama yaş: 59) uygulamıştır. Bu çalışmanın sonucunda tedavinin etkili ve umut verici olduğu ortaya konulmuştur (82). Bir başka çalışma ise, cerrahi müdahalenin mümkün olmadığı 6 hasta üzerinde, ayrı ayrı oral olarak ALA (60 mg/kg) ve intravenöz olarak Photofrin® (2.0 mg/kg) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ALA'nın kullanımından 6 saat, Photofrin®'in kullanımından 48 saat sonra altın buharı lazeri ile PDT uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda, daha etkili olmasına rağmen Photofrin®'in 3 ay boyunca fototoksik yan etkiler gösterdiği belirlenmiştir. ALA'nın ise 48 saat içinde tüm vücuttan atılımının

gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (83). Lusting ve arkadaşları talaporfin sodyum (LS11) kullanarak 21 hasta üzerinde faz I çalışması gerçekleştirmiştir (84). Hahn ve arkadaşları tarafından tümörlü ve sağlıklı dokuda birikimi belirlemek amacıyla hastalara cerrahi müdahaleden 48 saat önce intravenöz olarak Photofrin® (2.5 mg/kg) uygulandıktan sonra ışın verilmiştir. Cerrahi müdahale sonrası alınan tümörlü ve sağlıklı dokular homojenize edilip, spektrofotometrik yöntemlerle içerisindeki fotoduyarlastırıcı bileşik miktarı analiz edilmiştir. 100 hastanın 58'sinden toplanan 301 örnekte gerçekleştirilen çalışma sonucunda ince bağırsak kanseri hastalarında 3.32 – 5.31 ng/mg, kolon kanseri hastalarında 2.09 – 2.45 ng/mg Photofrin® tespit edilmiştir. Bu çalışmaların sonucu tümörlü dokularda fotoduyarlastırıcı bileşiğin daha fazla biriktiğini göstermektedir (85). Çin Hunan Üniversitesi Hastanesi'nde kolorektal kanser tedavisinde PDT uygulamalarında başarılı sonuçlar görülmesinden sonra faz II/III çalışmalarına başlanmıştır. İki gruba ayrılan hastaların bir grubu sadece kemoterapi alırken, diğer grup ise kemoterapi ve PDT tedavisini kombine olarak almaktadır. PDT tedavisinde intravenöz olarak Photofrin® (2.0 mg/kg) kullanılmakta olup, 633 nm dalga boyunda 2000 mW ışın uygulanmaktadır (86). Ancak çalışma 2013 yılında durdurulmuştur. Şu anda kolorektal kanser tedavisinde ticari olarak kullanılan PDT ajanı bulunmamaktadır. Photofrin® ve benzeri PDT ajanlarının kolorektal kanser tedavisinde kullanılması için çeşitli faz çalışmaları devam etmektedir. Ancak bu bileşiklerin düşük dalga boyunda absorpsiyon, aşırı fotoduyarlılık, çözünürlüğünün az, sentezinin zor olması gibi dezavantajlarının bulunması nedeniyle alternatif molekül arayışları devam etmektedir (87, 88).

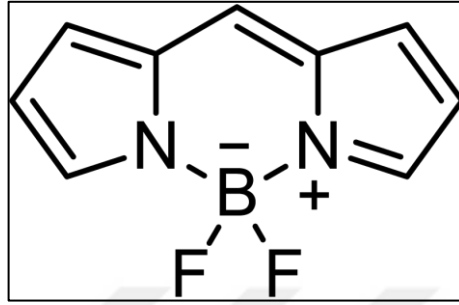
Tablo 1. Kolorektal kanser tedavisinde PDT ile yapılan klinik çalışmalar (Kawczyk Krupka'tan, 88)

Faz	Hasta Sayısı	Fotoduyarlaştırıcı	Uyarma	Kaynak
Pilot	16	HpD, 2.5-5.0 mg/kg i.v.	632 nm, 300-400 mW	(89)
Pilot	21	HpD, 2.5-5.0 mg/kg i.v.	632 nm, 300-400 mW	(89)
Pilot	2	HpD, 2.5 mg/kg i.v.	627.8 nm, 150-280 mW	(90)
Pilot	11	HpD, 2.5 mg/kg i.v.	630 nm, 50 J/cm ²	(91)
Pilot	11	HpD, 3 mg/kg i.v.	630 nm, 100-400 J/cm ²	(81)
		Photofrin [®] , 2-3 mg/kg i.v.		
Pilot	15	Photofrin [®] , 1-2 mg/kg i.v.	630 nm, 37.5 J/cm ²	(92)
		ALA cream, topically	100 J/cm ²	
Pilot	8	HpD, Photofrin [®]	630 nm, 50 J/cm ²	(93)
Pilot	1	%20 ALA cream topical	630 nm, 125 J/cm ²	(94)
Pilot	6	ALA, 30-60 mg/kg p.o.	628 nm, 50 ve 100 J/cm ²	(83)
		Photofrin [®] , 2 mg/kg i.v.		
Pilot	20	m-THPC, 0.15 mg/kg i.v.	650 nm, 10-15 J/cm ²	(95)
Pilot	1	ALA, 60 mg/kg p.o.	633 nm	(96)
Pilot	15	m-THPC 0.075-0.15 mg/mL	652 nm, 10-15 J/cm ²	(97)
			532 nm, 105-210-340 J/cm ²	
I	21	LS11, 40 mg/m ² i.v.	660 nm, 250-2000 J/cm ²	(84)
I	11	LS11, 0.5-3.5 mg/kg i.v.	664 nm, 25-100 J/cm ²	(98)
I	28	m-THPBC 0.3-0.6 mg/kg i.v.	740 nm, 60 J/cm ²	(99)
I	11	Npe6, 0.5-3.5 mg/kg i.v.	664 nm, 25-100 J/cm ²	(100)
I/II	6	Photofrin [®] , 2 mg/kg i.v.	200 J/cm ²	(101)
I/II		ALA		(102)
II	58	Photofrin [®] , 2.5 mg/kg i.v.		(85)
II		LS11, 40 mg/m ² i.v.	200 J/cm ²	(103)
II		LS11, 40 mg/m ² i.v.	200 J/cm ²	(104)
II/III		Photofrin [®] , 2 mg/kg i.v.	633 nm, 200 mW	(86)
II/III	8	Photofrin [®] , 1.2 mg/kg i.v.	630 nm, 200-300 J/cm ²	(105)

2.5. BODIPY ve Türevleri

BODIPY ve türevleri, ilk olarak sahip oldukları yüksek floresans özelliklerinden dolayı biyomoleküllerin görüntülenmesinde ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır (Şekil

7). 1968 yılında Treibs ve Kreuzer tarafından keşfedilen BODIPY bileşikleri son yıllarda oldukça ilgi çekici bileşikler haline gelmiştir. 2014-2019 yılları arasında BODIPY türevli bileşiklere ait 352 patent bulunurken, 2019 Scopus verilerine göre yaklaşık 3000 makale yayınlanmıştır (106, 107).



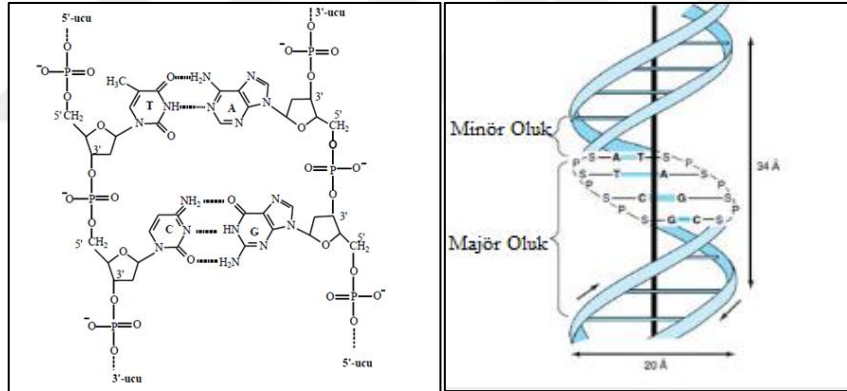
Şekil 7. BODIPY bileşiği

BODIPY bileşiklerinin yüksek absorpsiyon katsayısı, yüksek floresans kuantum verimi, kimyasal kararlılık özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir. Bu bileşiklerin absorpsiyon ve emisyon özellikleri BODIPY çekirdeğinde gerçekleştirilecek modifikasyonlarla değiştirilebilmektedir. Bu nedenle biyomolekül etiketleme ajanı, güneş pili, kemosensör, optik materyal olarak sıklıkla kullanılmaktadır (108-111). Son yıllarda yüksek absorpsiyon katsayısı, yüksek saflıkta sentezlenebilme, yüksek singlet oksijen verimine sahip olabilme, yüksek fotokararlılık, toksik olmayan çözücülerde çözünürlük, hücre içine kolay alınması, karanlıkta düşük toksisite gibi özelliklerinden dolayı PDT’de kullanılan fotoduyarlayıcı bileşiklerden biri olmaya başlamıştır (10). Birçok preklinik çalışma devam etmesine rağmen, BODIPY ve türevli bileşiklere ait klinik çalışmaya rastlanılmamıştır.

Fotoduyarlayıcı bileşiklerin en önemli dezavantajlarından biri yaygın organik çözücülerde çözünürlük sıkıntısı yaşanmasıdır. BODIPY bileşiklerinin yaygın organik çözücülerdeki çözünürlüğünü artırmak için dallanmış ve dallanmamış alifatik düz zincir içeren gruplar tercih edilmektedir. Ayrıca suda çözünürlüğü sağlayabilmek için BODIPY bileşiklerinin türevlendirilmesinde azot grubu bulunduran grupları içeren dallanmış ve dallanmamış ligandlar sıkça kullanılmaktadır. Suda çözünebilir fotoduyarlayıcı bileşiklerin sentezi PDT uygulamalarında biyoyumluluğu ve biyodağılımı arttırdığından dolayı oldukça önemlidir (8).

2.6. DNA ile Moleküllerin Etkileşimleri

DNA, tüm organizmaların canlılık fonksiyonları ve biyolojik gelişmeleri bir nesilden diğerine aktaracak bir şekilde taşıyan ve nükleik asitler olarak adlandırılan uzun doğrusal polimerlerdir. Bu makromoleküllerin her biri şeker, fosfat ve bazdan oluşan çok sayıda birbiriyle bağlantılı nükleotidden oluşmaktadır. Fosfatlar ile bağlantılı şekerler yapısal bir rol oynayan ortak bir omurga oluştururken, nükleik asit zinciri boyunca uzanan baz dizisi genetik bilgiyi taşımaktadır. İki polinükleotit zinciri sağ el vida doğrultusunda ortak bir eksen etrafında dolanmaktadır. Bu iki zincir Şekil 8’de de görüldüğü gibi birbirlerine zıt yönelimli olarak bulunmaktadır, bu nedenle antiparalel olarak adlandırılmaktadır. Bazlar sarmalın eksenine neredeyse diktir ve komşu bazlar 3.4 Å (3.4 nm) mesafededir. Sarmal yapı 34 Å’da bir tekrarlar ve sarmalın her iki dönüş arası turu için 10 baz vardır. DNA molekülünün çapı 20 Å ve uzunluğu da birkaç bin Å kadardır. Eksen üzerinde sıra ile geniş olan majör ve minör oluklar yer almaktadır (112, 113).



Şekil 8. DNA molekülü yapısı (Barut'tan, 50)

DNA sarmalındaki bazların hidrojen etkileşimleri ile bağ yapması hayatın devamlılığı açısından oldukça önemlidir. DNA’da Adenin-Timin ve Sitozin-Guanin bazlarının birbiriyle hidrojen bağı yapabileceğinden zincirlerden birindeki baz sırası sarmaldeki tamamlayıcı zincirin sırasını belirlemektedir. Hidrojen bağlarının zayıf etkileşimler olması nedeniyle bağlar sıcaklık ve mekanik güç gibi faktörlerle kopup tekrar oluşabilmekte, bu şekilde de DNA’nın replikasyonu ve protein sentezi gerçekleşmektedir (114). DNA, gen mutasyonlarında, onarım mekanizması bozukluklarında, kontrolsüz hücre çoğalmasında önemli rol oynamaktadır (11). DNA’da gerçekleşen geri dönüşümsüz

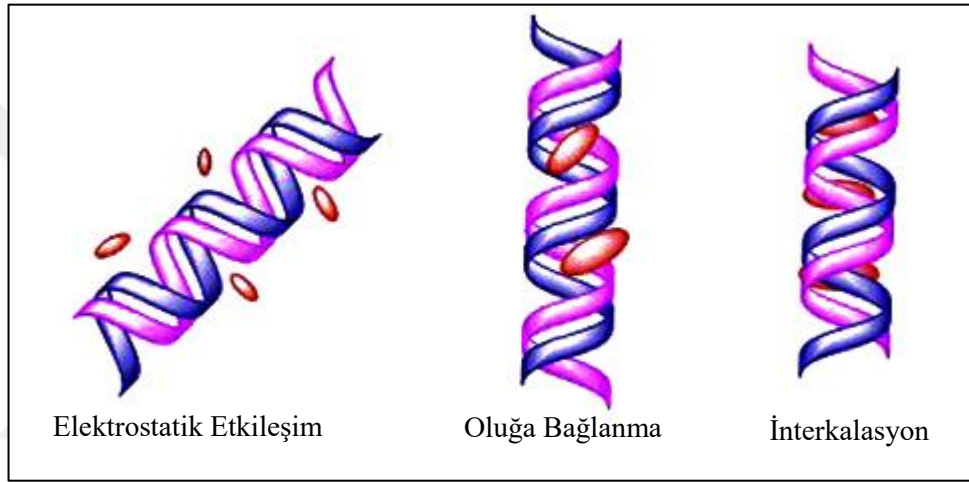
değişikliklerle kanser oluşumunun oldukça ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle DNA, yeni antikanser ilaçların bulunmasında en önemli hedeflerden biri haline gelmiştir (12). DNA ile moleküllerin etkileşiminin üç temel yolu bulunmaktadır. Bunlardan birincisi DNA'ya bağlanan proteinlerin etkileşimini kapsayan transkripsiyon faktörlerinin kontrolüdür. Burada, molekül doğrudan DNA ile etkileşime girmez, bunun yerine DNA molekülüne bağlanan proteinlerle etkileşime girer ve DNA'nın fonksiyonlarını değiştirir. İkinci olarak DNA-RNA hibritlerinin oluşması ile transkripsiyon aktivitesine etki edilmektedir. Üçüncü ve son yol olarak moleküllerin direkt olarak DNA'ya bağlanmasıdır. Burada moleküller DNA ile kovalent ya da kovalent olmayan türlerde etkileşimler gerçekleştirerek DNA'nın fonksiyonunu etkilemektedir.

DNA ile kovalent etkileşimler geri dönüşümsüzdür. Yüksek bağlanma kuvvetiyle DNA'ya bağlanan moleküller, DNA proseslerinin tamamen inhibe olmasına sebep olmaktadır. Bu durum kanserli hücrenin ölümüne sebep olurken yüksek bağlanma kuvveti nedeniyle sağlıklı hücrelerin de ölümüne neden olarak istenmeyen ciddi yan etkiler oluşturmaktadır. Bu nedenle son yıllarda antikanser ilaçların çoğu nükleik asitlerle geri dönüşümlü etkileşimler yapacak şekilde tasarlanmaktadır. DNA ile moleküller kovalent olmayan etkileşimlerle 3 farklı şekilde bağlanma gerçekleştirmektedir (Şekil 9). Bunlar moleküllerin büyüklüğüne, geometrisine ve stereokimyasal özelliklerine bağlı olarak değişen elektrostatik, oluğa bağlanma ve interkalasyon etkileşimleridir (115-117).

Hücre içi ortamda katyonik moleküller negatif yüklü olan DNA ile elektrostatik etkileşimler gerçekleştirerek biyolojik fonksiyonlarda rol oynar. Katyonların DNA ile etkileşmesi sonucu fosfat grupları nötr hale gelir ve karşıt iyonlar serbest kalır. Bu durum DNA'nın konformasyonu ve kararlılığı üzerinde önemli rol oynamaktadır (118).

Oluğa bağlanma etkileşimleri, moleküllerin DNA'nın majör veya minör oluklarının birinde yer alan baz çiftlerinin oluğa bakan yüzeydeki fonksiyonel grupları ile etkileşmesiyle gerçekleşmektedir. Bu moleküller genellikle uzun ve esnek bir yapıya sahip olup, oluklardaki bazlarla etkileşime girer. Moleküller ve bazlar arasında hidrojen bağları ya da van der Waals etkileşimleri gerçekleşmektedir. Bu nedenle büyük konformasyonel değişiklikler görülmemektedir. DNA oluklarına bağlanan distamisin, netropsin gibi küçük moleküller minör oluklar üzerinden etkileşim gerçekleştirirken, makromoleküllerin ise majör oluklar üzerinden etkileştiği bilinmektedir (119, 120).

İnterkalasyon etkileşimleri, temel olarak molekülün iki baz çifti arasına girmesiyle oluşur. İnterkalasyon sürecinde molekülün DNA bazlarının arasındaki boşluğa uyması için DNA omurgasında konformasyonel değişikliğe neden olur. İnterkalatör moleküller, transkripsiyon, replikasyon süreçlerine etki ederek, topoizomeraazlar, DNA onarım sistemleri, transkripsiyon faktörleri gibi DNA ile etkileşen proteinlerin tanınmasını ve fonksiyonlarını engelleyebilir. Bunun sonucunda da hücre ölümü gerçekleşebilmektedir (50). Kanser tedavisinde adriamisin ve daunomisin gibi kullanılan interkalatif ajanlar bulunmaktadır. (121).



Şekil 9. DNA ile moleküllerin kovalent olmayan etkileşim türleri (Chen'den, 122).

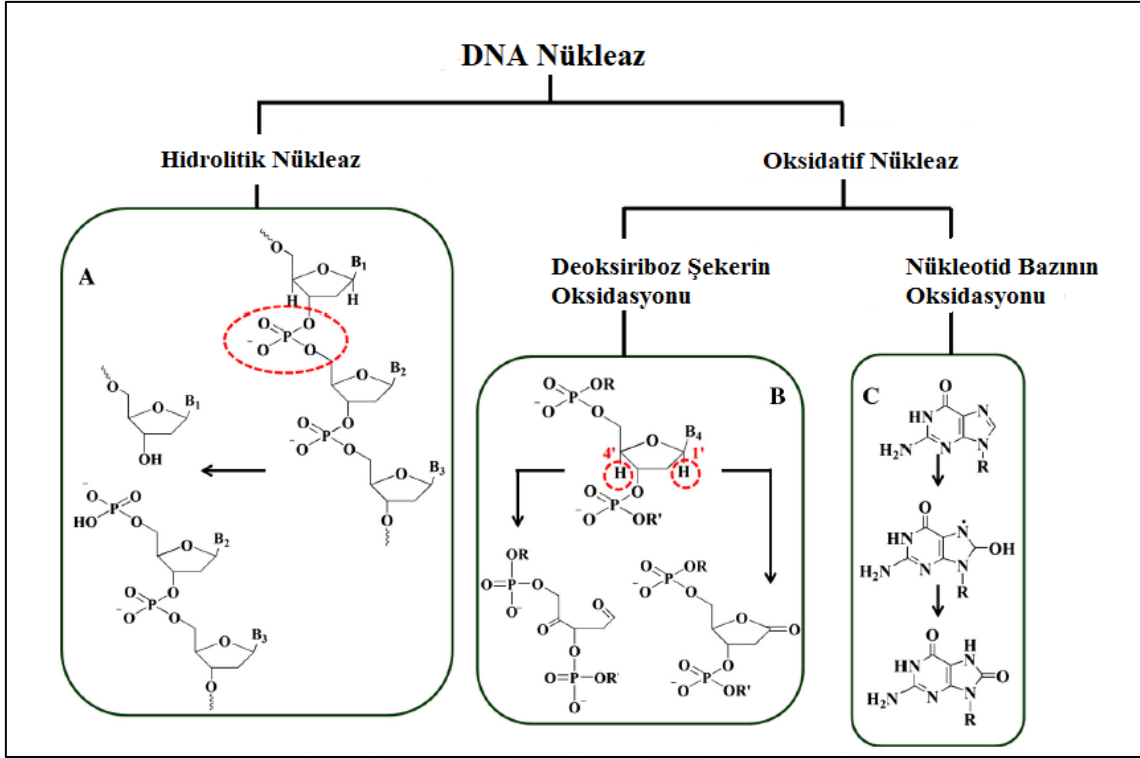
DNA zincirinin kesimi hayatın devamlılığı için gerekli enzimatik reaksiyonlar olarak kabul edilmektedir. Örneğin topoizomeraaz enzimi, DNA zincirini keserek replikasyonda veya transkripsiyonda oluşan topolojik problemleri ortadan kaldırmaktadır (123). Ayrıca yabancı DNA'yı keserek virüs enfeksiyonlarına karşı hücreyi koruyan restriksiyon enzimlerinin var olması ve DNA'nın bozularak hücreyi apoptoza sürüklemesi DNA kesiminin önemini gösteren başka örneklerdir (124, 125). Birçok antikanser ilacının, DNA hasarı yaratarak apoptozu tetiklediği ve hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir. Bu nedenle antikanser ilaçların etki mekanizması incelenirken, DNA nükleaz özelliklerinin belirlenmesi oldukça önem arz etmektedir (126, 127). Genel olarak, DNA'nın kesimi hidrolitik, oksidatif ve fotonükleaz olmak üzere 3 farklı şekilde incelenmektedir (Şekil 10).

Hidrolitik nükleaz su varlığında fosfodiester bağlarının koparak DNA fragmentlerinin olduğu bir yöntem olarak tanımlanmaktadır. DNA'nın omurgası

fosfodiester bağlarıyla oluştuğundan dolayı DNA'nın hidrolizi oldukça önemli ve kararlılığı nedeniyle zor bir reaksiyondur. Bu yöntemin genel olarak mekanizması Lewis asidi olarak davranan metal iyonunun hidroliz reaksiyonudur. Lewis asidi fosfat grubunu nükleofilik atağa doğru aktive edebilir. Bu durum alkolün ayrılan grup özelliğini artırır. Bu yöntem ile oluşturulan fragmentler, yeniden bir araya getirilip DNA'nın bütünlüğü sağlanabilir (115).

DNA'nın oksidatif nükleaz etkinliği nükleobazın oksidasyonu veya şeker hidrojeninin çıkarılmasıyla deoksiribozun oksidasyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Oksidatif nükleazı başlatmak için genellikle H_2O_2 gibi yardımcı bileşenlere gerek duyulmaktadır. Oksidatif nükleaz hem karbohidrat hem de nükleik baz seviyesinde meydana gelmektedir. Bu yöntemde çeşitli yardımcı bileşenlerle oluşan reaktif oksijen türlerin etkisiyle deoksiriboz ve dört nükleobaz zarar görmektedir. Oksidatif nükleaz hidrojen çıkarılması, eklenmesi ve elektron transferi olmak üzere 3 farklı mekanizma üzerinden gerçekleşmektedir.

DNA'nın fotonükleaz aktivitesi oksidatif nükleaz etkinliğine oldukça benzerlik gösterirken, ikisini birbirinden ayıran temel özellik fotonükleaz aktivitesinde ışık kullanılmasıdır. Görünür ya da UV ışın kullanılarak aktifleştirilen nükleazlar biyomedikal alanda birçok proste kullanılabilmektedir. Bununla birlikte fotoduyarlayıcı özelliğe sahip olan bileşikler PDT'te antikanser ilaç olarak kullanılmaktadır. Fotonükleaz aktivitesinin mekanizması incelendiğinde, fotokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan radikallerin deoksiriboz şekerinde bulunan hidrojenin çıkarması, fotoduyarlayıcı bileşiğin nükleobaza elektron transferi, fotoduyarlayıcı bileşiklerin singlet oksijen üretmesi ve son olarak baz eklentisinin oluşması olduğu belirlenmiştir (115, 128).

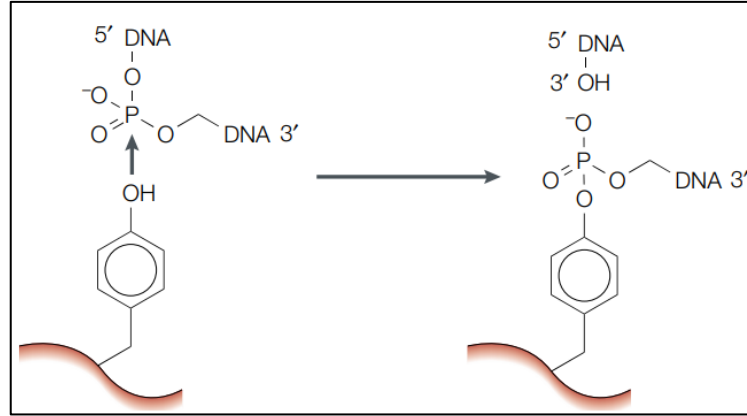


Şekil 10. DNA'nın nükleaz mekanizması (Ali'den, 11).

2.7. Topoizomeraz Enzimleri

Topoizomerazlar, hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyonu gibi topolojik özelliklerden sorumlu olan enzimlerdir (129). Topoizomerazlar, topoizomeraz I (EC 5.99.1.2.) ve topoizomeraz II (EC 5.99.1.3.) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Topoizomeraz I enzimi DNA çift zincirinin bir tanesinde kırık oluşturarak, topoizomeraz II enzimi ise çift zincirin ikisinde de kırık oluşturarak etki göstermektedir. Topoizomeraz I enzimi hem nükleaz hem de ligaz aktivitesi göstermektedir. Zincir kırığı esnasında kırılan fosfodiester bağların enerjisi depolanıp zincir birleştirildiğinde bu enerji kullanılmaktadır. Bu nedenle ATP gereksinimi bulunmamaktadır. Topoizomeraz II enziminde ise çift zincirin ligaz aktivitesi esnasında ATP'ye ihtiyaç duyulmaktadır (13).

Topoizomeraz enzimlerinin aktif bölgelerinde bulunan tirozin aminoasidi DNA uçlarından birine transesterifikasyon reaksiyonu ile kovalent bağ yaparak fosfat bağı koparır (Şekil 11). Daha sonra ilk reaksiyonun tam tersi bir reaksiyon gerçekleşerek protein ve DNA arasındaki fosfotirozin bağı kırılır ve ligasyon işlemi gerçekleşir (130-132).

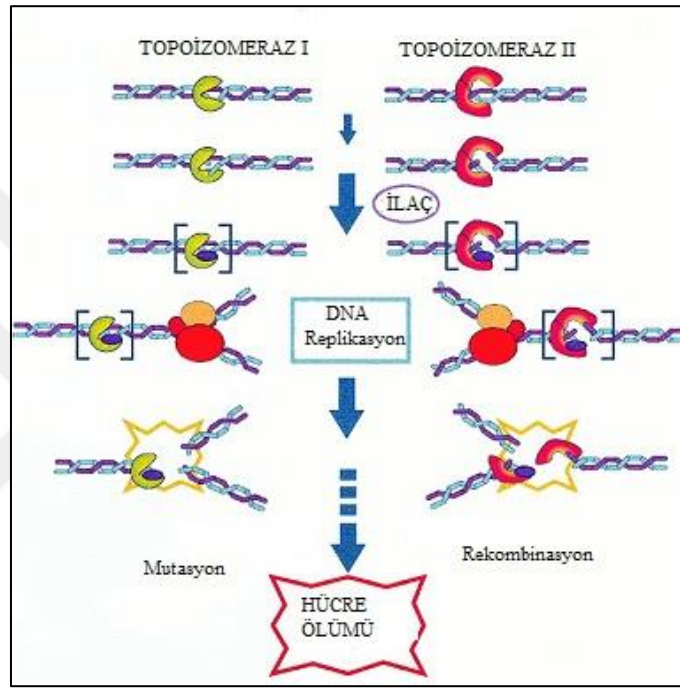


Şekil 11. Topoizomeraz enzimlerinin DNA kırığı oluşum mekanizması (Wang'dan, 131)

Topoizomeraz enzimlerinin DNA'nın hücre içerisindeki yapısının korunması açısından oldukça önemli görevleri bulunmaktadır. Bu enzimler olmadan DNA replikasyonunun gerçekleşmesi mümkün değildir. Birçok çalışma hızla çoğalan hücrelerin yüksek seviyede topoizomeraz ekspresyonuna sahip olduğunu göstermiştir. Kanser hücrelerinde hızlı çoğalma nedeniyle topoizomeraz enzimlerinin ekspresyonunun arttığı, bu enzimlerin kontrolsüz hücre bölünmesinde önemli rollerinin olduğu yapılan çalışmalarda görülmektedir. Bu nedenle topoizomeraz enzimlerinin inhibisyonu son yıllarda antikanser ilaçların ana hedefleri haline gelmiştir (133). Sağlıklı hücrelerde topoizomeraz II enzimi hücre döngüsünün S/G2/M fazında eksprese edilirken, malign hücrelerde ekspresyonun daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar topoizomeraz ve transkripsiyon faktörü olarak görev yapan p53 proteininin birbiriyle bağlantılı olduğunu göstermektedir. Topoizomeraz I enziminin inhibisyonunda oluşan topoizomeraz-inhibitör kompleksi hücrede p53 düzeyinin artmasına sebep olmaktadır (134).

Topoizomeraz inhibitörleri iki sınıfa ayrılır: topoizomeraz zehirleri ve katalitik inhibitörler (Şekil 12). Topoizomeraz zehirleri, DNA zincirleri üzerinde kırıklar oluşturarak hücre içerisinde zehir etkisi yaratmaktadır. Bu inhibitörler DNA-topoizomeraz kompleksinin oluşturduğu kırıkların tekrar birleşmesine engel olmaktadır. Hücrelerde hasarlı DNA'nın birikmesine bağlı olarak programlı hücre ölümü gerçekleşmektedir. Katalitik inhibitörler ise DNA ya da topoizomeraz enzimlerine bağlanarak ya enzimin katalitik döngüsünü etkilemekte ve süper kıvrılmaların, düğümlerin çözülmesini önleyerek mitotik ve mayotik başarısızlıklara neden olmaktadır (135). Klinikte çeşitli kanser

türlerinde kamptotesin, irinotekan, topotekan, doksorubisin ve etopozit gibi topoizomera z inhibitörleri kullanılmaktadır. Ancak bu inhibitörler karaciğer hasarı, alopesi, ateş, titreme, gastrointestinal sorunlar, kardiyotoksisite, immunsistemin baskılanması gibi ciddi yan etkilere sahiptirler. Topoizomera z enzimlerinin çoğalma proseslerinde önemli rol oynaması ve mevcut klinikte kullanılan ilaçların ciddi yan etkilere sahip olması bilim insanlarını alternatif arayışlara sürüklemektedir (16).



Şekil 12. Topoizomera z I ve II enzimlerinin inhibisyonu (Barut'tan, 50)

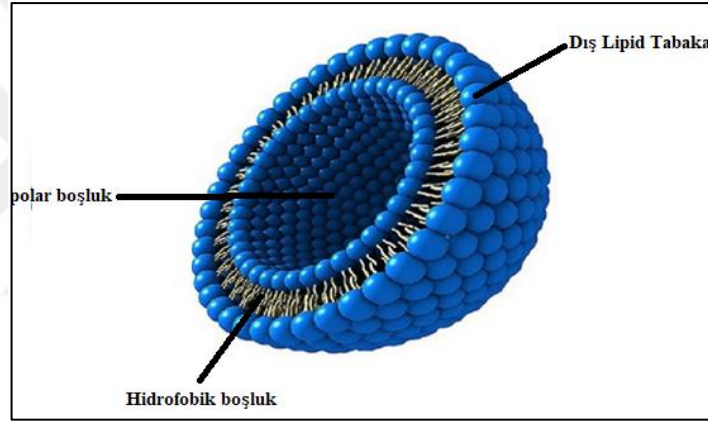
2.8. İlaç Taşıyıcı Sistemler

PDT etkinliğini arttırabilmek amacıyla fotoduyarlaştırıcı maddelerin tümöre selektif olması gerekmektedir (10). Bu nedenle fotoduyarlaştırıcının selektif doku veya hücre içerisinde birikmesi için lipozom, nanopartikül, mikroküre ve albümin gibi çeşitli taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır (17). Bu taşıyıcı sistemlerin, ilaçların emiliminin arttırılması, kanserli hücrelere selektif olması, biyolojik yarı ömrünün uzatılması, düşük dozlarda terapötik etki göstermesi, stabilitesinin artması, biyoyumlu olması, yan etkileri azaltması, düşük toksisite göstermesi gibi önemli avantajları bulunmaktadır (18, 19).

İlaç taşıyıcı sistemler tıpta teşhis, tedavi ve koruyucu amaçlarla kullanılmaktadır. Başlıca kanser, bakteri, viral ve mantar enfeksiyonlarının tedavisinde, gen tedavisi, virüs ve aşılarda vücuda verilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (136).

2.8.1. Lipozomlar

Lipozomlar tek ya da iç içe birçok tabakadan oluşmuş, yaklaşık olarak 0.02-3.5 µm boyutlarında olan kolloidal taşıyıcı sistemlerdir (Şekil 13). Lipozomlar, biyolojik membranlara benzer şekilde, iç kısımda hidrofilik dış kısımda ise hidrofobik boşluklar içermektedir. Suda çözünür maddeleri hidrofilik kısımda, lipofilik maddeleri ise hidrofobik kısımda hapsederek taşıyıcı görevi görmektedir. Lipozomlar biyoparçalanabilir ve biyogeçimli lipidlerden oluşmaktadır (137).



Şekil 13. Lipozom yapısı

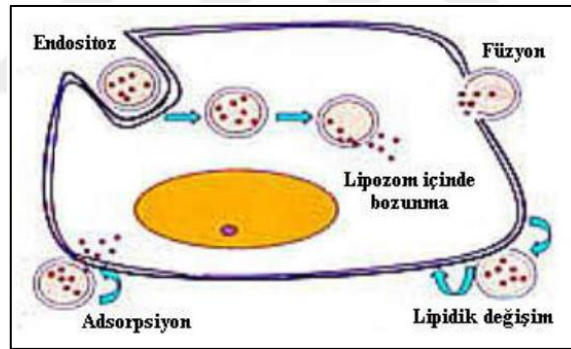
Bu taşıyıcı sistemin esas bileşeni fosfolipitlerdir. Lipozomların hazırlanmasında doğal ve sentetik fosfolipitler kullanılmaktadır. Bu fosfolipitler; dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), yumurta veya soya fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilserin (PS) ve sfingomiyelinlerdir (137). Ayrıca fosfolipitlerden oluşan yapının dayanıklılığını arttırmak için yapıya bazı maddeler eklenmektedir. Örneğin kolesterol tabakanın geçirgenliğinin azaltılmasında etkilidir. Doymamış yağ asitlerinin bozulmaması için tokoferol gibi maddelerin ilavesi gerçekleştirilebilir. Hidrofilik uzun zincirli polimer sayesinde lipozomun plazmada kalma süresi arttırılabilmektedir (138, 139).

Lipozomlar sahip oldukları boyutlara, tabakalara ve elde ediliş şekillerine göre çok tabakalı, büyük tek tabakalı, küçük tek tabakalı ve ters faz tekniği ile hazırlanan lipozomlar olmak üzere 4 ana sınıfta incelenmektedir (138).

Lipozomların kimyasal ve fiziksel özellikleri *in vitro* ve *in vivo* davranışlarını oldukça etkilemektedir. Bu nedenle de hazırlanan lipozomların karakterizasyonu oldukça önem arz etmektedir. Lipozomun büyüklüğü, pH duyarlılığı, ısı duyarlılığı, yüzey yükü, membran akışkanlığı, lipidlerin çeşidi gibi özellikler fizikokimyasal özellikleridir. Lipozomların karakterizasyonunda partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, pH, mikroskopik görüntüleme ve enkapsülasyon etkinliği incelenmektedir.

Şekil 14'te de görüldüğü gibi lipozomlar hücre içerisine endositoz, füzyon, lipid değişimi ve adsorbsiyon olmak üzere 4 farklı mekanizma üzerinden girmektedir (140).

- a) Endositoz: Hücre yüzeyine temasta bulunan lipozomların fagositoz yoluyla hücre içerisine alınması olayıdır.
- b) Füzyon: Hücre membranı ile lipozomun lipid tabakasının birleşmesidir.
- c) Lipid değişimi: Hücre membranı ve lipozom yapısındaki lipidlerin yer değiştirmesidir.
- d) Adsorbsiyon: Lipozomun hücre yüzeyine tutunması olayıdır.



Şekil 14. Lipozomlar ile hücrelerin etkileşim mekanizmaları (Yücel'den, 140)

2.8.2. Nanopartiküller

Nanopartiküller, boyutları 10-1000 nm arasında değişen partikül büyüklüğüne sahip doğal ya da sentetik polimerlerle hazırlanmış etkin madde taşıyıcı sistemlerdir (141). Nanopartiküller, ilaçları, yağları, vitaminleri, proteinleri içeren formülasyonların hazırlanmasında kullanılmaktadır. Polimerik nanopartiküller, etkin maddeyi korumak ve etrafındaki ortamdan izole etmek için enkapsüle etmektedir. Nanopartiküller hazırlanma yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılmaktadır. Nanopartiküllerin en büyük avantajları, küçük boyutlara sahip olması ve partiküllerin hazırlanmasında

biyobozunur materyaller kullanılmasıdır. Böylece nanopartiküllerin hedef bölgede daha fazla birikmesi sağlanırken, biyobozunur materyaller sayesinde de uzun süre kontrollü madde salınımı gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca nanopartiküller ilaçların stabilitesinin artmasını sağlamaktadır (140).

Nanopartiküllerin hazırlanmasında doğal (jelatin, kitosan, aljinat, albümin) ve sentetik (polilaktik asit (PLA), polilaktik ko-glikolik asit (PLGA), polianhidritler) polimerler kullanılmaktadır. Kullanılan polimer ilacı çözündürmek, stabilize etmek, hedefleme, doku penetrasyonunu artırma gibi amaçlar için geliştirilmektedir. Polimerik nanopartiküller hazırlanırken yüzeyindeki kimyasal gruplar arasındaki etkileşimlerin yanı sıra immünolojik etkileşimleri azaltmak amacıyla non-iyonik surfaktanlar kullanılmaktadır (142-144).

Nanopartiküller misel polimerizasyonu, emülsiyon polimerizasyonu, emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi, nanopresipitasyon tekniği, yüzeylerarası polimerizasyon, aktif maddenin nanopartiküllerle adsorpsiyonu, nanoçöktürme, iyonik jelasyon, su/yağ emülsiyonunda ısı denatürasyonu ve çapraz bağlanma gibi birçok farklı yöntem ile hazırlanmaktadır. Bu nanopartikül hazırlama yöntemlerinde farklı polimerler kullanılmaktadır (136, 145).

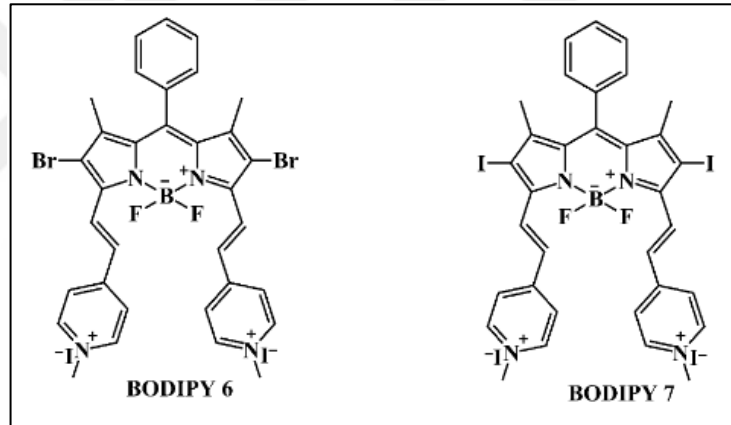
Nanopartiküller, hücreye fagositoz yoluyla alınıp hücre içerisindeki lizozomal enzimler tarafından parçalanmaktadır. Biyobozunur materyallerden oluşan nanopartiküller, vücutta hidrolize uğrayarak laktik asit, glikolik asit gibi biyolojik olarak parçalanabilir metabolitlere dönüşmektedir (146, 147).

Polimerik nanopartikül hazırlanmasında PLGA oldukça fazla kullanılmaktadır. PLGA ile hazırlanan partiküller kontrollü ilaç salınımı sağlamaktadır. PLGA'nın yaygın kullanılmasının sebeplerinden bir diğeri ise biyolojik olarak parçalanabilir olmasıdır. Bunun yanı sıra biyoyararlanımı artırır, gastrointestinal geçiş sırasında ilacı korurlar. Nanopartikül hazırlanması esnasında yüzey aktif maddeler emülgatör olarak işlev görmektedir. PLGA nanopartikül sentezinde en çok polivinil alkol (PVA) emülgatör olarak kullanılmaktadır (140).

2.9. Literatür Özeti

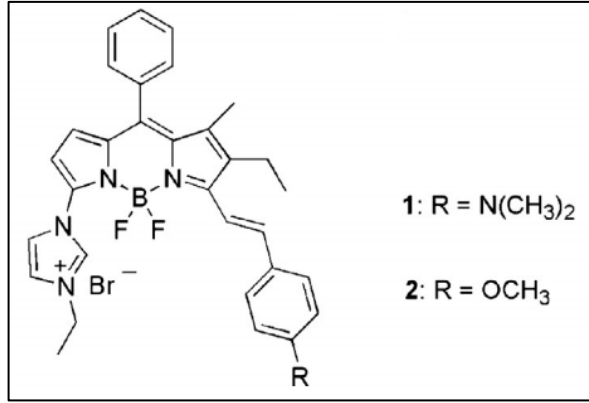
BODIPY ve türevleri kolay sentezlenebilme, yüksek singlet oksijen verimine sahip olabilme, yüksek fotokararlılık, yüksek fototoksosite karanlıkta düşük toksisite gibi özelliklerinden dolayı son yıllarda yeni bir PDT ajanı olarak ortaya çıkmıştır (148).

2012 yılında Wang ve arkadaşları piridinyum grubu içeren iki adet BODIPY bileşiğinin sentezini gerçekleştirip, singlet oksijen kuantum verimini, DNA bağlanma ve nükleaz etkinliğini spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemlerle incelemiştir (Şekil 15). PBS tamponu içerisinde 6 ve 7 numaralı bileşiklerin sırasıyla 0.10 ve 0.22 değerlerinde singlet oksijen kuantum verimine sahip olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak bileşiklerin DNA ile kovalent olmayan bağlarla etkileştiği, ışık varlığında ürettiği reaktif oksijen türler ile de DNA hasarı yarattığı tespit edilmiştir (149).



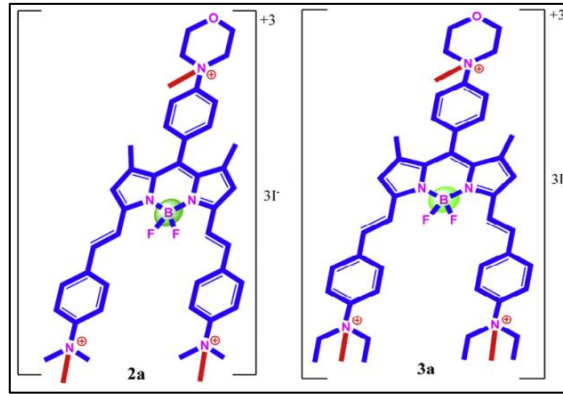
Şekil 15. Piridinyum grubu içeren 6 ve 7 numaralı BODIPY bileşikleri (Wang'dan, 149)

2013 yılında Zhao ve arkadaşları imidazolyum grubu içeren iki adet BODIPY bileşiğini sentezleyip, görüntüleme ajanı olarak kullanıp kullanılamayacağını belirleyebilmek amacıyla DNA bağlanma çalışmaları gerçekleştirmiştir (Şekil 16). DNA ilavesi sonrasında bileşiklerin absorbansında azalma ve maksimum absorbans gösterdikleri dalga boyunda kırmızıya kaymalar gözlenmiştir. Bu sonuçlar, 1 ve 2 numaralı bileşiğin DNA ile interkalasyon türünde bir etkileşim gerçekleştirdiği ve floresans özelliklerinden dolayı DNA probu olarak kullanılabilme potansiyelleri ortaya konulmuştur (150).



Şekil 16. İmidazolyum grubu içeren 1 ve 2 numaralı BODIPY bileşiği (Zhao'dan, 150)

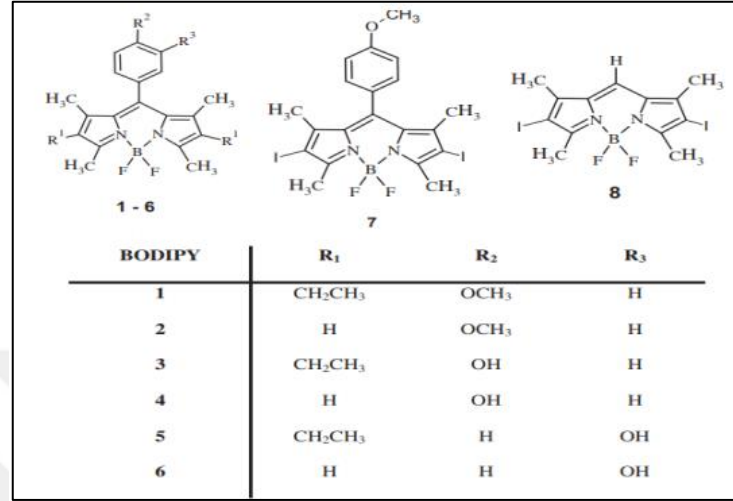
2018 yılında Bıyıklıoğlu ve arkadaşları dimetilamino ve dietilamino grubu içeren iki adet BODIPY bileşiğinin DNA bağlanma ve nükleaz etkinliklerini absorpsiyon spektroskopisi, viskozite ve elektroforetik yöntemler kullanılarak incelemiştir (Şekil 17). Bu çalışmanın sonucunda 2a ve 3a bileşiklerinin DNA'ya $3.58 \pm 0.08 \times 10^5$ ve $1.27 \pm 0.10 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ değerleriyle kuvvetli bir şekilde bağlandığı tespit edilmiştir. Ayrıca bileşiklerin $650 \pm 20 \text{ nm}$ ışık ile uyarılması sonucunda üretilen reaktif oksijen türlerle oldukça önemli fotonükleaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (151)



Şekil 17. BODIPY 2a ve 3a bileşikleri (Bıyıklıoğlu'dan, 151)

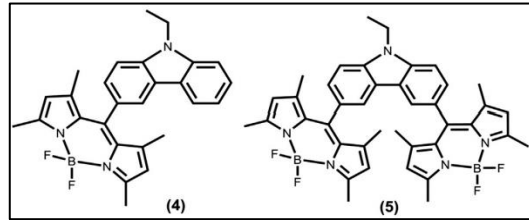
2012 yılında Banfi ve arkadaşları tarafından sekiz adet BODIPY bileşiğinin fotokimyasal analizleri gerçekleştirilip, HCT-116 hücre hattına karşı fototoksik etkileri incelenmiştir (Şekil 18). Bu çalışmanın sonunda bileşiklerin yeşil LED ışık kaynağı (33 J/cm^2) ile uyarıldığında HCT-116 kanser hücre hattına karşı yüksek fototoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bileşiklerin hücre ölüm mekanizması analizleri

gerçekleştirildiğinde, hücrelerin apoptoz ile öldüğü tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda kullanılan bileşiklerin klinikte kullanılabilme potansiyellerinin var olduğu belirtilmiştir (152).



Şekil 18. BODIPY 1-8 bileşikleri (Banfı'den, 152)

2015 yılında Şengül ve arkadaşları mezo pozisyonunda karbazol grubu içeren iki adet BODIPY bileşiğinin sentezini gerçekleştirmiştir (Şekil 19). Bileşiklerin fotofiziksel özellikleri floresans spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Daha sonra bileşiklerin HT-29 kanser hücre hattı üzerine etkileri MTT yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda floresan özelliğe sahip olan bileşiklerden 5 numaralı bileşiğin 8.30 ng/mL, 4 numaralı bileşiğin ise 21.70 ng/mL IC₅₀ değerine sahip olduğu belirlenmiştir (153).



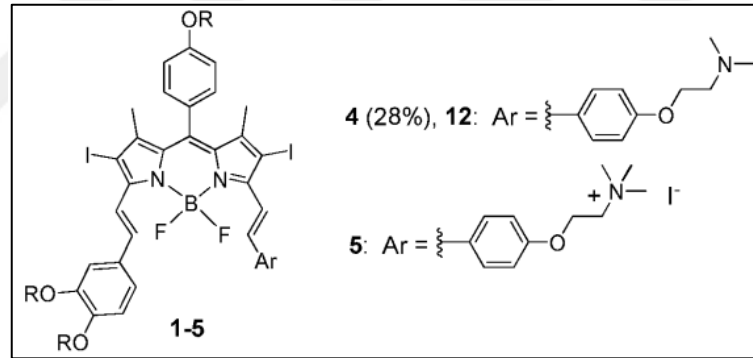
Şekil 19. BODIPY 4 ve 5 bileşikleri (Şengül'den, 153)

2016 yılında Shivran ve arkadaşları üç adet suda çözünebilen glukoz türevli BODIPY bileşiğinin A549 hücre hattında PDT etkinliklerini incelemiştir. İncelenen bileşikler arasında en yüksek aktiviteye sahip olan 4 numaralı bileşiğin hücre ölüm

mekanizması ayrıntılı olarak incelenmiştir. Ayrıca, bileşiğin hücre içerisindeki yeri konfokal mikroskop yardımıyla belirlenmiştir (154) .

2017 yılında Gontijo ve arkadaşları kinon türevli BODIPY bileşiklerinin HCT-116 hücre hattına karşı etkinliklerini MTT yöntemi kullanılarak incelemiştir. Ayrıca bileşiklerin görüntüleme ajanı olma potansiyelleri konfokal mikroskop kullanılarak incelenmiştir. Çalışma sonunda bileşiklerin kanserli hücrelerin lizozomunda biriktiği tespit edilirken, antikanser potansiyelleri de ortaya konulmuştur (155).

He ve arkadaşları simetrik olmayan distiril BODIPY bileşiklerinin 15 nM'dan daha düşük IC₅₀ değerlerine sahip olduklarını ve bundan dolayı oldukça yüksek fototoksik aktivite gösterdiklerini ortaya koymuşlardır (Şekil 20). Bileşiklerin hücre içerisindeki yeri floresans mikroskop yardımıyla belirlenmiştir. 4 numaralı bileşiğin lizozom ve mitokondride yer aldığı tespit edilirken, 5 numaralı bileşiğin ise hücre membranında biriktiği gözlenmiştir (156).



Şekil 20. BODIPY 4 ve 5 numaralı bileşikler (He'den, 156)

2016 yılında Shi ve arkadaşları hyaluronik asit türevli diiyodostiril BODIPY içeren nanopartikül sentezi gerçekleştirmiştir. Daha sonra HCT-116 hücre hattıyla *in vivo* kanser modeli oluşturulup nanopartikülün PDT etkinliği incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda hazırlanan nanopartikülün tümör büyümesini engellediği tespit edilmiştir. Formülize edilen hal ile etkin madde kıyaslandığında formülize edilen halin çok daha etkili olduğu görülmüştür (157).

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada fotoduyarlayıcı özelliklerinin var olduğu literatürce belirtilen BODIPY bileşiklerinin seçilmesinin PDT'de alternatif ajan üretilmesi açısından oldukça kıymetli olduğu düşünülmektedir. Bu tez çalışması kapsamında

sentezlenen piridinyum ve dimetilamino grupları içeren dört farklı suda çözünebilen BODIPY bileşiğinin kolorektal kanseri tedavisinde kullanılmak üzere uygun PDT ajanı olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda bileşiklerin PDT potansiyellerini ortaya koymak için suda çözünebilen BODIPY bileşiklerinin fotokimyasal özellikleri, singlet oksijen kuantum verimi ve fotobozunma yüzdeleri incelenmiştir. Daha sonra suda çözünebilen BODIPY bileşiklerinin DNA bağlanma modları, UV-Vis spektrofotometri, viskozimetri ve agaroz jel elektroforez yöntemleri ile belirlenmiştir. Ayrıca, suda çözünebilen BODIPY türevli bileşiklerin plasmid pBR322 DNA nükleaz ve topoizomerez I/II inhibisyon özellikleri agaroz jel elektroforez yöntemi ile incelenmiştir. Bununla birlikte bileşiklerin topoizomerez I/II inhibisyonuna ait moleküler kenetleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. BODIPY bileşiklerin HCT-116 kolorektal kanser hücre hattı üzerindeki olası sitotoksik/fototoksik etkileri MTT hücre canlılık testi incelenmiştir. HCT-116 kolorektal kanser hücrelerine karşı yüksek fototoksik etki gösteren BODIPY bileşiklerinin hücre ölüm mekanizmasını belirlemek amacıyla faz kontrast mikroskop ve akış sitometresi kullanılmıştır. Çalışmanın son kısmında yüksek fototoksik etki gösteren bileşikler nanotaşıyıcı sistemlerle formüle edilerek elde edilen formülasyonların HCT-116 kolorektal kanser hücre hattında *in vitro* sitotoksik ve fototoksik etkileri MTT yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Marka/Model
Akış sitometre	BD Accuri C6
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
CO ₂ inkübatörü	Nüve EC160
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	Thermo Scientific 88400V
Elektroforez güç kaynağı	BioRad Power Pac™ Basic
Faz kontrast mikroskop	Leica DM1
Hassas analitik terazi	Ohaus PA 2140
Isıtıcı	Wisd Hotplate MSH-20A
Jel görüntüleme sistemi	Bio Rad Universal Hood Imager Gel
Laminar akış kabini	Mikrotest Class II A2
Magnetik karıştırıcı	Dragon MS-H-Pro
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific Multiskan Go
Otomatik pipetler	Socorex
pH metre	Ohaus Starter 300
Santrifüj	Nüve MF800R
Su banyolu çalkalayıcı	Memmert WNB 7-45
Soğutmalı santrifüj	Sigma 3-30K
Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	FEI, Tecnai™ G2 Spirit TWIN/BioTWIN
UV-Vis spektrofotometre	Perkin Elmer Lambda-25
Viskozimetre	Fungi Lab Alpha L
Vorteks	Visemix WM-10 Wisd
Yatay DNA elektroforezi	Biorad Wide Mini-Sub Cell GT System
Zeta potansiyeli	Malvern Zetasizer ZS90, UK

3.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler Tablo 3 ve 4'te verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

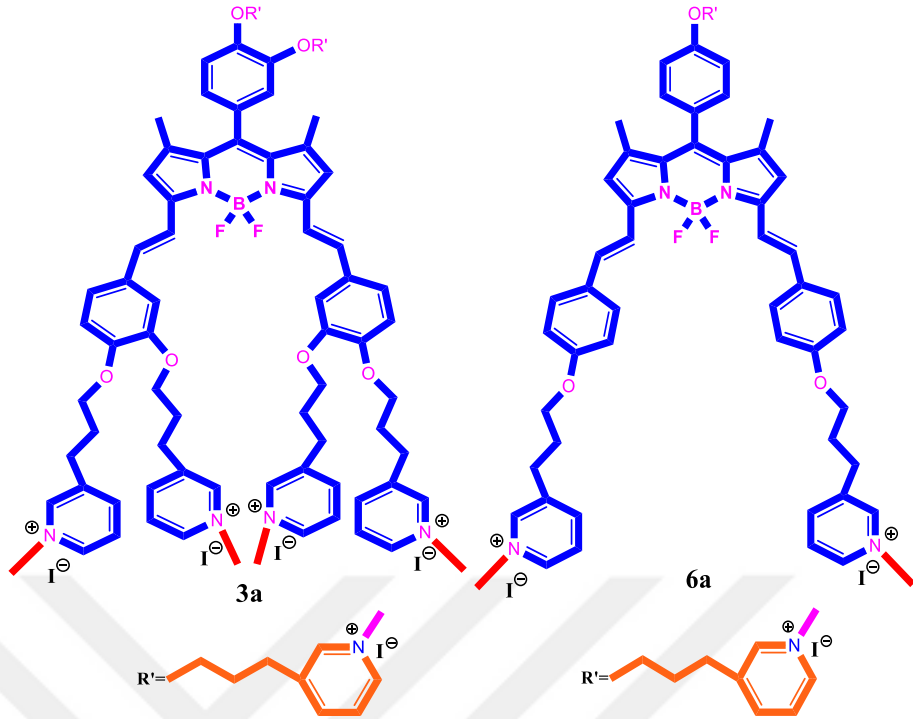
Kimyasal Adı	Marka, Kodu
1,3-Difenilisobenzofuran (DPBF)	Sigma, 105481
α,α' -(Antrasen-9,10-diil)bimetilmalonat (ADMA)	Sigma, 75068
Calf thymus-DNA (CT-DNA)	Sigma, D1501-1
Trisma baz	Sigma, 93362
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma, S7653
Etidyum bromür (EB)	Sigma, E7637
Agaroz	Sigma, A9539
Asetik asit	Sigma, A6283
Etilendiamin tetraasetik asit disodyum (EDTA- Na_2)	Sigma, E5134
β -Merkaptoetanol (ME)	Sigma, M3148
Bromofenol mavisi	Sigma, B0126
Ksilen siyanol	Sigma, X4126
Gliserol	Sigma, G5516
pBR322 plasmid DNA	Thermo Scientific, SD0041
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Sigma, 216763
Askorbik asit (AA)	Sigma, A5960
Topoizomeraz I enzimi	Topogen, TG2005H
Topoizomeraz II enzimi	Topogen, TG2000H-1
Potasyum klorür (KCl)	Sigma, P9333
Magnezyum klorür (MgCl_2)	Sigma, M8266
Ditiyoeritol (DTT)	Sigma, 43815
Spermidin	Sigma, S0266
Sığır serum albümin (BSA)	Sigma, A2153
Adenozin trifosfat (ATP)	Sigma, A2383
Dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC)	Sigma, P0763
Kolesterol	Sigma, C8667

Tablo 4. Çalışmada kullanılan kimyasal madde ve malzemeler (Devamı)

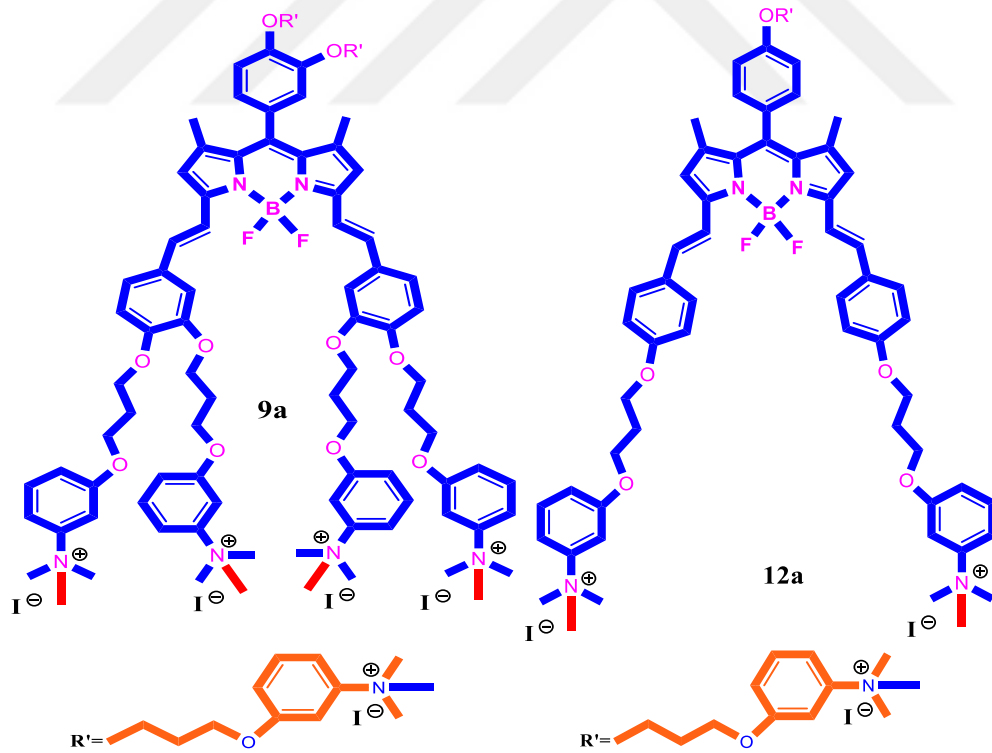
Kimyasal Adı	Marka, Kodu
Kloroform	Isolab, 910.057
Metanol	Isolab, 947.043
Poli(d,l-laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA)	Sigma, P2191
Polivinil alkol (PVA)	Sigma, 341584
Diklorometan	Isolab, 914.014
Aseton	Isolab, 901.026
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma, L3771
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, 472301
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Sigma, D6421
Fetal bovine serum	ATCC 30-2020
Tripsin/EDTA	Multicell, 3R5-542-EL
Streptomisin/Penisilin	Multicell, 420-201-EL
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difenil tetrazolyum bromür (MTT)	Serva, 2039502
Annexin V-FITC apoptosis detection kit	BD Pharmingen 556547

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Bileşikler

Bu çalışma kapsamında kullanılan suda çözünebilen piridinyum ve dimetilamino grubu içeren distiril BODIPY türevli bileşikler Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Anorganik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zekeriya BIYIKLIOĞLU ve araştırma grubu tarafından sentezlenip, çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. İncelenen piridinyum ve dimetilamino grubu içeren distiril BODIPY türevli bileşiklerin kimyasal yapıları ve kısa kodları Şekil 21 ve 22'de verilmiştir.



Şekil 21. Çalışmada kullanılan BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiği



Şekil 22. Çalışmada kullanılan BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiği

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH 7.2) tamponu (TBS)

151.43 mg trisma baz, 725 mg NaCl tartılmıştır. Saf su ile çözülüp hacmi 225 mL'ye tamamlandıktan sonra, seyreltik HCl ile pH 7.2'ye ayarlanıp, saf su ile hacmi 250 mL'ye tamamlanmıştır.

CT-DNA çözeltisi

Bir miktar katı CT-DNA alınarak 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl (pH 7.2) tamponu içerisinde 3 gün boyunca 4 °C'de yavaşça karıştırılarak hazırlanmıştır. CT-DNA stok çözeltisinin konsantrasyonu, çözeltinin 260 nm'de molar absorblama katsayısı (ϵ_{260}) 6600 M⁻¹cm⁻¹ olarak alınarak absorbens ölçümü yapıp, Lambert-Beer kanunundan konsantrasyonu belirlenmiştir. Bununla birlikte CT-DNA'nın protein safsızlığından uzak olduğunu belirlemek için 280 nm'de absorbens ölçümü yapılarak 260 ve 280 nm'lerdeki absorbens değerlerinin 1.8-1.9:1 oranı aralığında olmasına dikkat edilmiştir. CT-DNA stok çözeltisi +4 °C'de saklanarak bir hafta içinde tüketilmiştir.

1 mM EB çözeltisi

Yarışmalı EB bağlanma çalışmaları için 1 mM EB çözeltisi hazırlanmıştır. 5 mg EB tartılıp, saf su ile çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

5 mg/mL EB çözeltisi

50 mg EB tartılıp, saf su ile çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlanarak 5 mg/mL konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır.

Yürütme tamponu (10X TAE) (pH 8)

24.20 g trisma baz, 5.60 mL asetik asit, 10 mL 0.5 M EDTA son hacim 500 mL olacak şekilde saf su içerisinde çözülüp, 4 °C'de saklanmıştır.

%0.8'lik agaroz jel

800 mg agaroz tartılıp, 100 mL TAE (1X) çözeltisi ilave edildikten sonra, ısıtıcı yardımıyla kaynatılarak çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra soğutulan çözeltiye 7 µL EB (5 mg/mL) ilave edilerek agaroz jel tankına dökülüp soğuması beklenmiştir.

Agaroz jel yükleme boyası

1 g SDS (%10), 20 mg bromofenol mavisi (%0.2), 20 mg ksilen siyanol (%0.2) ve 3 mL gliserol (%30) içerecek şekilde saf su ile hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

50 mM Tris-HCl (pH 7) tamponu

605.70 mg trisma baz tartılmıştır. Saf su ile çözülüp hacmi 75 mL'ye tamamlandıktan sonra seyreltik HCl ile pH 7'ye ayarlanıp, saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

0.4 M H₂O₂ çözeltisi

Stok H₂O₂ çözeltisinden 312.74 µL alınarak, saf su ile hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

2.5 mM AA çözeltisi

8.8 mg AA tartılıp, saf su ile hacmi 20 mL'ye tamamlanmıştır.

0.4 M ME çözeltisi

Stok ME çözeltisinden 279.72 µL alınarak, saf su ile hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır.

Topoizomerez I enzim inhibisyon tamponu (pH 8.0)

424 mg trisma baz (35 mM), 536.40 mg KCl (72 mM), 101.60 mg MgCl₂ (5 mM), 77.12 mg DTT (5 mM), 29.05 mg spermidin (2 mM), 100 mg BSA (%0.1) içeren çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Topoizomerez II enzim inhibisyon tamponu (pH 8.0)

424 mg trisma baz (35 mM), 536.40 mg KCl (72 mM), 101.60 mg MgCl₂ (5 mM), 77.12 mg DTT (5 mM), 29.05 mg spermidin (2 mM), 100 mg BSA (%0.1) ve 55.11 mg ATP (1 mM) içeren çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

0.01 M fosfat tampon çözeltisi (PBS) (10X)

10 adet PBS tableti balon jolenin içerisine konuldu, saf su ile hacmi 900 mL'ye tamamlandıktan sonra pH 7.4'e ayarlanıp saf su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Otoklavlanan çözelti, +4 °C'de saklanmıştır.

Trypsin-EDTA çözeltisi

200 mg tripsin, 40 mg EDTA tartıldı, PBS çözelti ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 0.22 µm çapındaki steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Antibiyotik çözeltisi

1 mL streptomisin (10 mg/mL)/penisilin (10.000 U) alınıp saf su ile hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 0.22 µm çapındaki steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Hücre stoklama besiyeri

Besiyeri içeriği 400 µL FBS, 100 µL gliserin ve 5 µL antibiyotik çözeltisi olacak şekilde oluşturulmuştur.

HCT-116 hücreleri için besiyeri

Besiyeri içeriği 10 mL FBS, 1 mL antibiyotik çözeltisi ve 89 mL DMEM çözeltisi olacak şekilde oluşturulmuştur.

MTT çözeltisi

500 mg MTT tartılıp, üzerine 100 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ilave edilmiştir. Çözelti +4°C'de karanlıkta saklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Fotokimyasal Ölçümler

Suda çözünebilen piridinyum ve dimetilamino grubu içeren distiril BODIPY türevli bileşiklerin (BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a) PDT'de fotoduyarlastırıcı olarak kullanılabilirliklerini belirlemek amacıyla fotokimyasal ölçümleri kapsamında singlet oksijen kuantum verimleri ve fotobozunma yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.2.1.1. Singlet Oksijen Kuantum Verimi (Φ_{Δ})

Singlet oksijen kuantum verimi (Φ_{Δ}) belirlemek amacıyla BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a ve standart olarak kullanılan MB bileşiklerinin her birine karanlık ortamda singlet oksijen söndürücü bileşikler olan 1,3-difenilisobenzofuran (DPBF) (DMSO için) ve α,α' -(antrasen-9,10-diil)bimetilmalonat (ADMA) (TBS için) bileşikleri ilave edilmiştir. Daha sonra değişik zaman aralıklarında 650±20 nm filtre

kullanılarak 15 mW/cm^2 ışığa maruz bırakılıp UV-Vis spektrofotometre cihazı yardımıyla DPBF bileşiğine ait 417 nm ve ADMA bileşiğine ait 380 nm'deki absorpsiyon bantlarının değişimi incelenmiştir. Çözeltilerin UV-Vis ölçümleri kısa aralıklarla yapılarak DPBF ve ADMA'nın maksimum absorbans verdiği dalga boylarındaki azalma miktarından, konsantrasyonundaki azalma takip edilmiş olup, singlet oksijen kuantum verimi aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir (158).

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{\text{Std}} \frac{R \cdot I_{\text{abs}}^{\text{Std}}}{R^{\text{Std}} \cdot I_{\text{abs}}}$$

(Eşitlik 1)

Bu formülde;

- Φ_{Δ} : Bileşiklerin singlet oksijen kuantum verimi.
 $\Phi_{\Delta}^{\text{Std}}$: Standart bileşiğin singlet oksijen kuantum verimi (DMSO içerisinde MB: 0.57, TBS içerisinde MB: 0.52).
R : DPBF ve ADMA'nın bileşik varlığında absorbans değişimi.
 R^{Std} : DPBF ve ADMA'nın standart bileşik varlığında absorbans değişimi.
 I_{abs} : Bileşiğin absorpladığı ışık miktarı.
 $I_{\text{abs}}^{\text{Std}}$: Standart bileşiğin absorpladığı ışık miktarı.

3.2.1.2. Fotobozunma Çalışması

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin fotobozunma çalışması bileşiklerin çözeltileri ışığa (beyaz, 17.5 mW/cm^2 , 60 dakika) maruz bırakıldıktan sonra UV-Vis spektrumları alınarak spektrumlarındaki absorbans değerleri takip edilmiştir. Bileşiklerin fotobozunma yüzdeleri aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (159).

$$\text{Fotobozunma Yüzdesi \%} = (A_1 - A_2) / A_1 \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2})$$

- A_1 : Bileşiklerin ışık uygulamadan önceki absorbans değeri.
 A_2 : Bileşiklerin ışık uyguladıktan sonraki absorbans değeri.

3.2.2. DNA Bağlanma Deneyleri

DNA, yeni antikanser ajanlar geliştirilmesinde birincil molekül hedeflerden biri olduğundan dolayı ajanlar ile DNA'nın etkileşiminin belirlenmesi etki mekanizması açısından oldukça önemlidir. Bu tez çalışması kapsamında bileşiklerin CT-DNA ile bağlanma modlarının belirlenmesi amacıyla UV-Vis absorpsiyon, yarışmalı EB bağlanma, viskozimetri ve elektroforez yöntemleri kullanılmıştır.

3.2.2.1. UV-Vis Absorpsiyon Bağlanma Çalışması

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin 10 mM stok çözeltileri saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Bileşiklerin ara ve çalışma çözeltileri TBS kullanılarak seyreltilmiştir. İlk olarak her bir bileşiğin sabit konsantrasyonda UV-Vis absorpsiyon spektrumu kaydedilmiştir. Daha sonra ilk CT-DNA (2.5 μ M) ilavesi gerçekleştirilip, oda sıcaklığında 10 dakikalık inkübasyona bırakılıp, inkübasyon süresi sonrasında spektrumlar yeniden kaydedilmiştir. Bu işleme CT-DNA konsantrasyonu aşamalı olarak artırılarak devam edilmiştir. Bu işlem sırasında kör çözelti üzerine de eşit miktarda CT-DNA ilave edilerek CT-DNA'nın absorbansı elimine edilmiştir. Bileşiklerin, CT-DNA bağlanma sabiti (K_b) değerleri Wolfe-Shimmer denklemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak EB kullanılmıştır.

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Yukarıdaki denklemden yararlanılarak DNA konsantrasyonuna ([DNA]) karşı ([DNA]/($\epsilon_a - \epsilon_f$)) değerleri grafiğe geçirilmiştir. Grafikten elde edilen doğrunun eğimi $1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$ 'yi, kesim noktası ise $1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$ olarak bulunmuştur. Bu iki değer birbirine oranlanarak K_b değerleri hesaplanmıştır (151).

[DNA] : DNA konsantrasyonu

K_b : Bileşiğin DNA'ya bağlanma sabiti

ϵ_a : Bileşiğin absorbansının bileşiğin konsantrasyonuna oranı.

ϵ_f : Serbest haldeki bileşiğin sönüm katsayısı.

ϵ_b : Tam bağlı bileşiğin sönüm katsayısı.

3.2.2.2. Yarışmalı EB Bağlanma Çalışması

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin bağlanma modlarının belirlenmesini ileri düzeyde ortaya koymak amacıyla interkalatör olarak bilinen EB kullanılarak yarışmalı bağlanma çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada TBS içerisinde EB'ün (75 µM) konsantrasyonu sabit tutularak absorpsiyon spektrumu alınmıştır. Ardından 1:1 oranında CT-DNA (75 µM) ilavesi gerçekleştirildi. Daha sonra, BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin artan konsantrasyonları EB-(CT-DNA) kompleksine ilave edilip, oda sıcaklığında 10 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonrasında spektrumlar yeniden kaydedilip absorbanslarındaki değişim incelenmiştir (160).

3.2.2.3. Viskozite Çalışması

CT-DNA'nın viskozimetri ölçümleri, optik fotofiziksel problemler olmaksızın CT-DNA'nın bağlanma modunun belirlenmesinde yardımcı olan en önemli testlerden birisidir. BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin CT-DNA ile etkileştikten sonraki viskozitesindeki değişikliği belirlemek amacıyla ALPHA L Fungi Lab rotational viskozimetre cihazı (18 mL spindle, 100 rpm) kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak TBS kullanılmıştır. Daha sonra CT-DNA'nın (100 µM) viskozitesi ölçülmüş olup, ardından bileşiklerin artan konsantrasyonları (25, 50, 75 ve 100 µM) ilave edilip, viskozite sonuçları belirlenmiştir. Bu veriler $((\eta/\eta_0)^{1/3})/([bileşik]/[DNA])$ cinsinden grafiğe aktarılmış ve oluşan grafik sonucunda bileşiklerin etkileşim türü belirlenmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak EB kullanılmıştır (161).

η : Bileşiklerin varlığında viskozite.

η_0 : DNA'nın viskozitesi.

3.2.2.4. Elektroforez Bağlanma Çalışması

CT-DNA'nın elektroforez çalışmaları, CT-DNA'nın bileşikleri EB'e tercih edip etmediğini belirlemek amacıyla kullanılan bir metottür. Bu çalışmada kuyu içerikleri CT-DNA (250 µM) ve BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin artan konsantrasyonları (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 250 ve 500 µM) olacak şekilde hazırlanıp, 37 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Sonra, bu karışım TAE tampon içerisinde agaroz jele yükleme tamponuyla birlikte yüklenip, 100 V, 400 mA uygulanarak 30 dakika jelde

yürütülmüştür. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenmiştir (162).

3.2.3. DNA Nükleaz Çalışmaları

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin DNA nükleaz çalışmaları süpersarmal pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemiyle belirlenmiştir. pBR322 plazmid DNA'nın, moleküllerin nükleaz aktivitesinin belirlenmesinde oldukça yaygın kullanılan bir DNA türü olduğu bilinmektedir. Süpersarmal plazmid DNA elektroforeze maruz bırakıldığında, süpersarmal formun (Sc) en hızlı göç ettiği bilinmektedir. Maddelerle ya da ışıkla etkileşim sonrası tek bir zincirde kırılma meydana geldiğinde kırık form (Nc) oluşur ve bu formun göç etmesi en uzundur. Çift zincirde kırılma meydana gelirse çizgisel form (Lc) oluşur. Oluşan form, Sc ve Nc'nin arasında olacak şekilde göç eder (163). Bu tez çalışması kapsamında BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA nükleaz aktivitesi ışık ve oksidatif ajanların varlığında ve yokluğunda incelenmiştir.

3.2.3.1. Bileşiklerin Hidrolitik Nükleaz Aktivitesi

Bileşiklerin hidrolitik nükleaz aktivitesinin belirlenmesinde konsantrasyona bağlı olarak hidrolitik koşullarda denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada agaroz jel kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içeriğine 1 µL 250 ng pBR322 plazmid DNA, 7 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)) ve 2 µL bileşiklerin artan konsantrasyonları (3.125 µM-50 µM) ilave edilip, 37 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonrasında, oluşturulan bu karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE'nin ilavesinden sonra 100 V, 400 mA akım uygulanarak 90 dakika jelde yürütülmüştür. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak MB kullanılmıştır. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (50).

3.2.3.2. Bileşiklerin Fotonükleaz Aktivitesi

Bileşiklerin PDT'de kullanılabilme potansiyellerini belirlemek amacıyla beyaz ışık varlığında süpersarmal pBR322 plazmid DNA'nın fotonükleaz aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmada agaroz jel kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içeriğine 1 µL 250 ng pBR322 plazmid DNA, 7 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)) ve 2 µL bileşiklerin artan konsantrasyonları (3.125 µM-50 µM) ilave edilmiştir. Oluşturulan

karışım 30 dakika süreyle ışığa (beyaz, 17.5 mW/cm²) maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda karışım 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE’nin ilavesinden sonra 100 V, 400 mA akım uygulanarak 90 dakika jelde yürütülmüştür. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak MB kullanılmıştır. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (50).

3.2.3.3. Bileşiklerin Oksidatif Nükleaz Aktivitesi

Bileşiklerin nükleaz etkinlikleri çeşitli ajanların varlığına bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Bu çalışma kapsamında yardımcı ajanlar (H₂O₂ (0.4 M), AA (2.5 mM) ve ME (0.4 M)) kullanılarak oksidatif nükleaz aktiviteleri incelenmiştir. Bu çalışmada agaroz jel kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içeriğine 1 µL 250 ng pBR322 plasmid DNA, 5 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)), 2 µL yardımcı ajan ve 2 µL bileşiklerin artan konsantrasyonları (1.56 µM-6.25 µM) ilave edilip, karışım 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonrasında, karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE’nin ilavesinden sonra 100 V, 400 mA akım uygulanarak 90 dakika jelde yürütülmüştür. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak MB kullanılmıştır. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (50).

3.2.3.4. Bileşiklerin Oksidatif Fotonükleaz Aktivitesi

Bu çalışmada agaroz jel kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturuldu. Kuyu içeriğine 1 µL 250 ng pBR322 plasmid DNA, 5 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)), 2 µL yardımcı ajan ve 2 µL bileşiklerin artan konsantrasyonları (1.56 µM-6.25 µM) ilave edilmiştir. Oluşturulan karışım 30 dakika süreyle ışığa (beyaz, 17.5 mW/cm²) maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda karışım 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonrasında, karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE’nin ilavesinden sonra 100 V, 400 mA akım uygulanarak 90 dakika jelde yürütülmüştür. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak MB kullanılmıştır. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (50).

3.2.4. Topoizomeraz Enzim İnhibisyonları

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin topoizomeraz I ve II enzim inhibisyon etkisi süpersarmal pBR322 plasmid DNA relaksasyon yöntemiyle agaroz jel elektroforez kullanılarak ölçülmüştür. Bileşiklerin topoizomeraz I ve II enzimleriyle etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla moleküler modelleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. Topoizomeraz I Enzim İnhibisyonu

Bu çalışmada kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içeriğine 1 µL 250 ng pBR322 plasmid DNA, 2 µL topoizomeraz I enzimi (1 U), 5 µL topoizomeraz I tamponu ve 2 µL bileşiklerin artan konsantrasyonları (12.5 µM-50 µM) ilave edilip, karışım 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonrasında, karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE’nin ilavesinden sonra 45 V, 400 mA akım uygulanarak 180 dakika jelde yürütülmüştür. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile bileşiklerin inhibisyon etkileri hesaplanmıştır (162).

3.2.4.2. Topoizomeraz II Enzim İnhibisyonu

Bu çalışmada kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içeriğine 1 µL 250 ng pBR322 plasmid DNA, 2 µL topoizomeraz II enzimi (1 U), 5 µL topoizomeraz II tamponu ve 2 µL bileşiklerin artan konsantrasyonları (12.5 µM-50 µM) ilave edilip, karışım 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonrasında, karışım jel yükleme boyası yardımıyla agaroz jele yüklenmiştir. Yürütme tamponu TAE’nin ilavesinden sonra 45 V, 400 mA akım uygulanarak 180 dakika jelde yürütülmüştür. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile bileşiklerin inhibisyon etkileri hesaplanmıştır (162).

3.2.4.3. Topoizomeraz I ve II Enzimi Moleküler Modelleme Çalışması

Ligand modelleri Maestro programında LigPrep ve MacroModel (2018-4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018) yazılımları ile OPLS_2005 kuvvet alanı ve konjüge gradyan algoritması kullanılarak hazırlanıp optimize edilmiştir (164). İnsan DNA-topoizomeraz I ve II komplekslerine ait uygun kristal yapılar (PDB kodu sırasıyla 1K4T ve 3QX3 RCSB protein veri bankasından indirilerek (www.rcsb.org) Maestro Protein Hazırlama Sihirbazı (2018-4, Schrödinger, LLC, NY, 2018) ile kenetleme için

hazırlanmıştır (165-168). Bu kapsamda Epik, Prime ve PropKa yazılımları (2018-4, Schrödinger, LLC, NY, 2018) ile DNA-enzim komplekslerinde yer alan istenmeyen ligand, solvan ve iyonlar uzaklaştırılmış, eksik atomlar ve hidrojenler eklenmiş, bağ seviyeleri ayarlanmış, kısmi yükler atanmış, hidrojen bağları ve oryantasyonları belirlenmiştir. Enzimlerin ligand ile kenetlenen bölgelerinin grid haritaları oluşturulup; bunun için enzimlerin aktif bölgelerinde yer alan ligandların merkezi koordinatları alınarak arama alanı 36 Å³'lük bir hacimle sınırlandırılmıştır. Moleküler kenetleme için Glide programı (2018-4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018) ekstra kesinlikte kullanılmıştır (169-171). Ligandlar hedef makromoleküllere esnek olarak 50'şer defa kenetlenip, kenetleme sonrası minimizasyon uygulanarak seçilen bağlanma biçimlerinin kenetleme skorları kaydedilmiş ve uygun konformerler görsel inceleme sonucu belirlenmiştir. Kullanılan yöntemlerin doğruluğunu test etmek üzere 1K4T ve 3QX3 yapılarının aktif bölgelerinde yer alan, sırasıyla, topotekan ve etopozit bu bölgelere tekrar kenetlenmiş, elde edilen konformerler kristal yapılarıdaki orijinal konformerlerle karşılaştırılıp orijinal kristal konformerlere çok yakın sonuçlar elde edildiği görülmüştür (sırasıyla 0.56 ve 0.35 Å).

3.2.5. Hücre Kültürü

Çalışma kapsamında kullanılan HCT-116 (ATCC®CCL-247TM) hücre hattı Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Hücreler -196 °C'de sıvı azot tankı içerisinde saklanmıştır. Hücre kültürü çalışmaları Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. Hücre Dizisinin Açılması, Pasajlanması, Sayılması ve Saklanması

-196 °C'de kriyovial içerisinde saklanan hücrelerin 37 °C'lik su banyosunda hızlıca çözünmeleri sağlanmıştır. 1 mL hücre 15 mL'lik falkona alınıp, besiyeri ilave edilerek hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hücre süspansiyonları 100 rcf'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre pelletine 1 mL taze besiyeri eklenerek yavaşça pipetaj yapıldı ve hücre çökeleklerinin süspanse olması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonu T-25 flaklarda 10 mL besiyer içerisine ekilerek 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübatörde çoğaltılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler faz kontrast mikroskop ile kontrol edilerek flask yüzeyinin %70-80'lik kısmının kaplandığı tespit edilince pasajlama yapılmıştır.

Hücre pasajlama işleminde öncelikle flasklardaki besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Tripsin aktivitesini ve hücrel atıkları azaltan serum artığının uzaklaştırılması için flasklar PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra flasklara tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilip, inkübatörde 5 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında flasklara besiyere ilave edilip, hücre süspansiyonu 100 rcf'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant kısımları 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırılmıştır. Bu hücre süspansiyonundan 10 µL alınıp, steril ependorf içerisinde 10 µL tripan blue ile karıştırılmıştır. Karışım lam üzerine Neubauer hematositometre lamına aktarılıp mikroskop yardımıyla canlı hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayımı yapılan hücreler flasklara tekrar ekilip, inkübe edilerek kültüre edilmiştir.

Hücre kültüründe meydana gelebilecek kontaminasyonlardan sakınmak amacıyla hücreler, belli aralıklarla dondurularak saklanmıştır. Sayımı yapılan yaklaşık 10^6 hücre/mL olan hücre pelleti üzerine 1 mL besiyeri ilave edilmiştir. Hazırlanan hücre stokları kriyovial içerisine ilave edilerek önce -20 °C'de 1 saat, daha sonra -80 °C'de 24 saat bekletildikten sonra sıvı azot tankına kaldırılmıştır (172).

3.2.5.2. MTT Hücre Canlılık Testi

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin 10 mM stok çözeltisi saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra 6 farklı konsantrasyona (0.5-100 µM) seyreltme gerçekleştirilmiştir. Maruziyet besiyerleri çözücü oranı %0.01'i geçmeyecek şekilde oluşturulmuştur. Çalışmada negatif kontrol grubu için sadece besiyeri içeren hücreler, çözücü kontrol grubu için %0.01 oranında çözücü ve pozitif kontrol grubu için de %1 SDS kullanılmıştır.

Hücre kültürü pasajının ardından sayımı gerçekleştirilerek 96 kuyucuklu mikrolaka içerisine her kuyucuk için 1×10^5 hücre/100 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Mikrolaka 24 saat 37°C'de ve %5 CO₂ inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlanmıştır. Böylece pasaj sırasında tripsin enziminin hücre membran proteinleri ve büyüme faktör reseptörleri üzerinde oluşturduğu zararlar ortadan kaldırılmıştır. Bu süre sonrasında önce kuyu içerikleri vakum yardımıyla çekilerek atılıp, sonra bileşiklerin farklı konsantrasyonları içeren maruziyet besiyerleri ilave edilmiş ve 24, 48 ve 72 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Bu süreler sonunda besiyerleri tekrar atılmıştır. 0.5 mg/mL MTT olacak şekilde hazırlanan besiyerinden her kuyucuk başına 100 µL konulmuştur. Plaka inkübatöre alınarak 2 saat beklenmiştir. Bu süre sonrasında hücrelerin

yüzeyinde bulunan besiyeri atılıp, 100 µL DMSO ilave edilmiştir. Plaka 10 dakika çalkalayıcıda bekletilip, MTT'nin indirgenmesi sonucu oluşan mor renkli formazan mikroparka okuyucu spektrofotometre ile 570/690 nm'de ölçülmüştür. Deneyler her konsantrasyon için altı tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (173).

3.2.5.3. Işık Maruziyeti

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin *in vitro* PDT etkinliğini belirlemek amacıyla yaklaşık 5 cm uzaklıktan beyaz ışık kullanılarak ışık maruziyetleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda bileşiklerin farklı konsantrasyonlarını içeren maruziyet besiyerleri plakalara ilave edilip, 2 saat 37°C'de ve %5 CO₂ inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında plakalar ışık maruziyetine (beyaz, 17.5 mW/cm², 60 dakika) bırakıldıktan sonra MTT testi gerçekleştirilmiştir (154).

3.2.5.4. Anneksin V-FITC/PI Apoptoz Testi

Yüksek fototoksik aktivite gösteren BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin hücre ölüm mekanizmasının aydınlatılabilmesi amacıyla Anneksin V-FITC/PI boyama kiti kullanılarak apoptoz testi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda ilk olarak 6 kuyucuklu plakalara 1×10⁶ hücre/2 mL olacak şekilde hücreler dağıtılıp, 37°C'de ve %5 CO₂ inkübatörde 24 saat süre inkübe edilmiştir. Bu süre sonrasında ortamdaki süpernatant uzaklaştırılıp, tampon çözeltisi ile kuyucuklar yıkanmıştır. Yeniden besiyeri ilave edildikten sonra BODIPY-3a (10 ve 50 µM) ve BODIPY-6a (5 ve 10 µM) bileşikleri ortama ilave edilmiştir. Işık varlığında gerçekleştirilen denemelerde 60 dakika ışık maruziyeti uygulandıktan sonra 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonrasında kuyucuklar tampon ile yıkanıp, tripsinize edilmiştir. Hücre süspansiyonu 100 rcf'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra tampon çözelti ile yıkanıp tekrar santrifüj edilmiştir. Oluşan hücre pelleti ticari olarak alınan kit protoküle göre hücre süspansiyonları Anneksin V bağlama tamponu yardımıyla hazırlanmıştır. Ependorf içerisine önce 100 µL hücre süspansiyonu (1×10⁶ hücre) sonra üzerine 5 µL Anneksin V-FITC ve 5 µL propidyum iyodür (PI) çözeltileri eklenip, 15 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her tüpe 400 µL Anneksin bağlama tamponu ilave edilip, BD Accuri B6 akış sitometre cihazında analiz gerçekleştirilmiştir (174).

3.2.6. Bileşiklerin Nanotaşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Bu çalışma kapsamında BODIPY-6a ve BODIPY-12a bileşikleri içeren ve içermeyen lipozom ve polimerik nanopartikül formülasyonları hazırlanıp, karakterize edilmiştir. Daha sonra BODIPY-6a ve BODIPY-12a bileşiklerinin *in vitro* sitotoksosite ve fototoksosite analizleri MTT hücre canlılık testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.1. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem

Lipozomların yapımında, fosfolipit olarak DPPC ve stabilite artırıcı olarak kolesterol kullanılmıştır. Etanol enjeksiyon yöntemi modifiye edilerek formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (175). Formülasyonda yer alan maddeler ve kullanım oranları Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5. Lipozomal formülasyonda yer alan maddeler ve kullanım oranları

Formülasyon Kodu	LpBODIPY-6a	LpBODIPY-12a
Kolesterol	6 mg	6 mg
DPPC	30 mg	30 mg
Etkin madde	0.5 mg	0.5 mg
Etanol	1 mL	1 mL
DMSO	50 µL	50 µL
Saf su	4.2 mL	4.2 mL

DPPC ve kolesterol belirtilen miktarlarda cam flakona alındıktan sonra üzerine etanol eklenmiş ve vorteks ile çözündürülmüştür. Aynı bir cam flakonda etkin madde DMSO ile sonike edilerek çözündürülmüştür. Etanol çözeltisi etkin madde çözeltisine eklenip, vorteks ile karıştırılmıştır. Lipidleri ve etkin maddeyi içeren bu çözelti, saf su üzerine 210 µL/dk hızında cam enjektör ile ilave edilmiştir. İğne ucu 26 G değerindedir. Enjeksiyon işlemleri manyetik karıştırıcı üzerinde, 500 rpm hızında ve DPPC'nin cam geçiş sıcaklığının üzerindeki bir sıcaklık olan 50°C'de gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon işlemi bittikten sonra sistem 10 dakika daha aynı koşullarda karıştırılmaya devam edilmiştir. Elde edilen lipozom süspansiyonun organik çözücüsü 100 rpm hız, 40°C ve 30 dakika boyunca düşük basınç altında uçurulmuştur. Ardından 20.000 rpm ve 15°C'de 40 dakika santrifüj edilerek üstteki berrak kısım ayrılıp, etkin madde miktar tayini yapılmıştır.

Çöken kısımdan lipozomlar elde edilmiştir. Daha sonra çeşitli konsantrasyonları hazırlanarak MTT testi yardımıyla sitotoksitesi ve fototoksitesi belirlenmiştir.

3.2.6.2. Polimerik Nanopartikül İlaç Taşıyıcı Sistem

Polimerik nanopartiküllerin yapımında, polimer olarak PLGA ve sürfaktan olarak PVA-Tween 80 kullanılmıştır. Nanoçöktürme yöntemi modifiye edilerek formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (176,177). Formülasyonda yer alan maddeler ve kullanım oranları Tablo 6’da özetlenmiştir.

Tablo 6. Polimerik nanopartikül formülasyonda yer alan maddeler ve kullanım oranları

Formülasyon Kodu	NpBODIPY-6a	NpBODIPY-12a
PLGA	25 mg	25 mg
Etkin madde	0.5 mg	0.5 mg
DMSO	1 mL	1 mL
PVA	%0.5 (a/h)	%0.5 (a/h)
Tween 80	%1 (a/h)	%1 (a/h)
Saf su	10 mL	10 mL

Etkin madde cam flakona alındıktan sonra üzerine DMSO eklenip, sonike edilerek çözündürülmüştür. Bu çözelti üzerine PLGA eklenip, vorteks ile çözündürülmüştür. Polimeri ve etkin maddeyi içeren çözelti, %0.5 PVA ve %1 Tween 80 içeren saf su üzerine 100 µL/dk hızında cam enjektör ile enjekte edilmiştir. İğne ucu 26 G değerindedir. Enjeksiyon işlemleri manyetik karıştırıcı üzerinde, 250 rpm hızında ve 50°C’de gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon işlemi bittikten sonra sistem 5 dakika daha sıcaklık kapatılarak karıştırılmaya devam edilmiştir. Elde edilen nanopartikül süspansiyonu organik çözücüyü uçurmak amacıyla 100 rpm hız, 35°C ve 60 dakika boyunca rotary evaporatörde tutulmuştur. Ardından 20.000 rpm ve 15°C’de 40 dakika santrifüj edilerek üstteki berrak kısım ayrılıp, etkin madde miktarı tayini yapılmıştır. Çöken kısımdan polimerik nanopartiküller elde edilmiştir. Daha sonra çeşitli konsantrasyonları hazırlanarak MTT testi yardımıyla sitotoksitesi ve fototoksitesi belirlenmiştir.

3.2.6.3. Formülasyonların Karakterizasyonu

Enkapsülasyon Etkinliğinin (EE) Tayini

Formülasyonların üretimi sırasında elde edilen süpernatantlardaki etkin maddelerin miktarı UV-Vis spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Bu çalışma için etkin maddelerin sudaki dispersiyonları kullanılarak maddelerin en iyi çözündüğü çözücü olan DMSO ile 0.5-25 µM konsantrasyon aralığında bir dizi kalibrasyon numunesi hazırlanıp, Q bandı absorbans değerleri ile kalibrasyon doğruları elde edilmiştir. Süpernatantlar ise 1:1 h/h oranında DMSO ile seyreltildikten sonra ölçümleri yapıp, aşağıda belirtilen formül kullanılarak lipozom ve nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarları tespit edilmiştir.

$$EE(\%) = \frac{\text{Formülasyona eklenen etkin madde miktarı} - \text{Süpernatanttaki etkin madde miktarı}}{\text{Formülasyona eklenen etkin madde miktarı}} \times 100 \text{ (Eşitlik 4)}$$

Partikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyeli Tayini

Formülasyonların üretimi sırasında elde edilen çökeltiler üzerine 1 mL distile su eklenip, vortekslenmiştir. Lipozom ve nanopartikül süspansiyonlarından 120 µL alınıp, üzerine 880 µL saf su eklenerek hazırlanan numuneler, sırasıyla dinamik ışık saçılımı (DLS) ve elektroforetik ışık saçılımı (ELS) teknolojilerinin kullanıldığı partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli cihazında (Malvern Zetasizer Nanoseries ZS, İngiltere) ölçülmüştür.

Yüzey Özelliklerinin Tayini

Formülasyonların üretimi sırasında elde edilen çökeltiler üzerine 1 mL saf su eklenip, vortekslenmiştir. Lipozom ve nanopartikül süspansiyonlarından 10 µL alınıp, üzerine 990 µL saf su eklenerek hazırlanan numunelerin morfolojik özellikleri, TEM cihazı yardımıyla görüntülenmiştir. Görüntüleme işlemleri ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

pH Ölçümü

Stok süspansiyon halindeki nanosistemlerin pH değeri, Ohaus pH metre probunun direkt olarak süspansiyona daldırılması ile ölçülmüştür.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Deneyler altı tekrarlı gerçekleştirilip sonuçlar Microsoft Excel Windows 10 ve GraphPad Prism 5.0 programları kullanılarak hesaplandı. İstatistiksel analizler için two-way ANOVA testi, gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konulması içinde Bonferroni posttests analizleri kullanıldı.



4. BULGULAR

4.1. Fotokimyasal Ölçümler

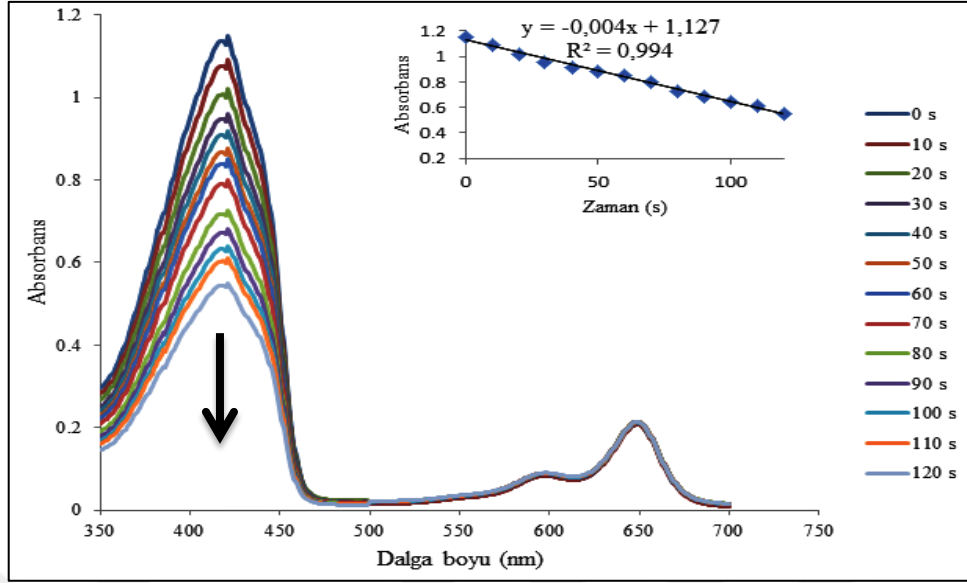
4.1.1. Singlet Oksijen Kuantum Verimi (Φ_{Δ})

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin DMSO ve TBS içerisindeki singlet oksijen kuantum verimleri hesaplanıp, sonuçlar Tablo 7’de verilmiştir. DMSO içerisindeki çözeltilere singlet oksijen söndürücü olarak DPBF ilave edilip, ışığa maruz bırakılıp UV-Vis spektrumları alınmış ve DPBF bileşiğine ait 417 nm’deki absorpsiyonun değişimi incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak MB kullanılmıştır. BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin DMSO içerisindeki singlet oksijen kuantum verimleri sırasıyla 0.62, 0.46, 0.16 ve 0.27 olarak bulunmuştur. BODIPY-6a bileşiğinin DMSO içerisindeki singlet oksijen kuantum veriminin hesaplanmasına ait spektrum Şekil 23’te verilmiştir.

TBS içerisindeki çözeltilere singlet oksijen söndürücü olarak ADMA ilave edilip, ışığa maruz bırakılıp UV-Vis spektrumları alınmış ve ADMA bileşiğine ait 380 nm’deki absorpsiyonun değişimi incelenmiştir. BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin TBS içerisindeki singlet oksijen kuantum verimleri sırasıyla 0.30, 0.21, 0.07 ve 0.13 olarak bulunmuştur.

Tablo 7. Bileşiklerin singlet oksijen kuantum verimi sonuçları

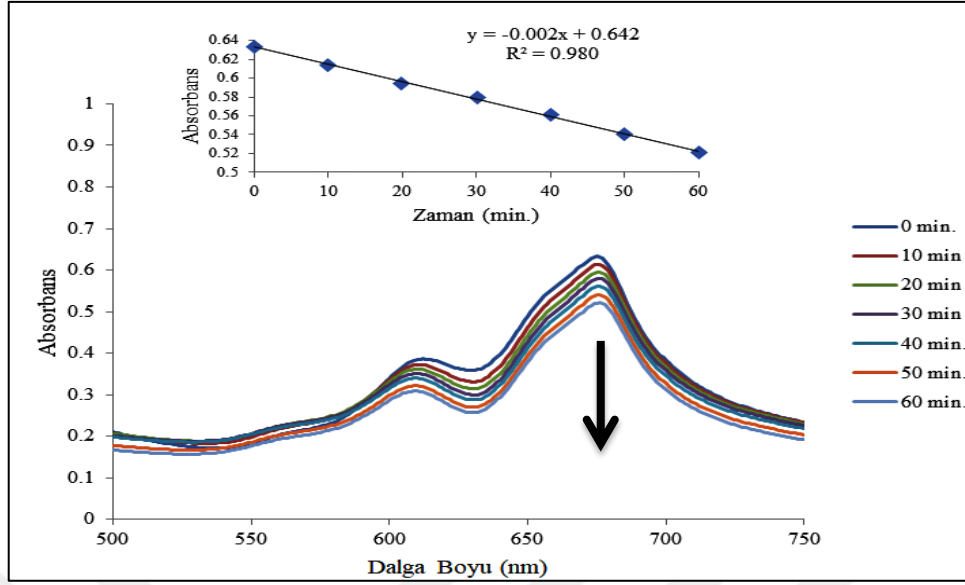
Bileşik	Φ_{Δ}	Bileşik	Φ_{Δ}
BODIPY-3a (DMSO)	0.62	BODIPY-3a (TBS)	0.30
BODIPY-6a (DMSO)	0.46	BODIPY-6a (TBS)	0.21
BODIPY-9a (DMSO)	0.16	BODIPY-9a (TBS)	0.07
BODIPY-12a (DMSO)	0.27	BODIPY-12a (TBS)	0.13
MB (DMSO)	0.57	MB (TBS)	0.52



Şekil 23. BODIPY-6a bileşiğinin DMSO içerisindeki singlet oksijen kuantum verimi ölçümleri sırasındaki UV-Vis spektrum değişimleri

4.1.2. Fotobozunma Çalışması

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin fotobozunma çalışması bileşiklerin TBS içerisindeki çözeltileri ışığa (beyaz, 17.5 mW/cm²) maruz bırakıldıktan sonra 10, 20, 30, 40, 50 ve 60. dakikalarda UV-Vis spektrumlarındaki absorbans değerleri takip edilmiştir. 60 dakika sonucunda BODIPY-3a, BODIPY-6a (Şekil 24), BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin sırasıyla %81.32, %82.29, %77.15 ve %79.54 oranlarında bozunmadan ortamda kaldığı belirlenmiştir.



Şekil 24. BODIPY-6a bileşiğinin TBS içerisindeki fotokararlılık ölçümleri sırasında UV-Vis spektrum değişimleri

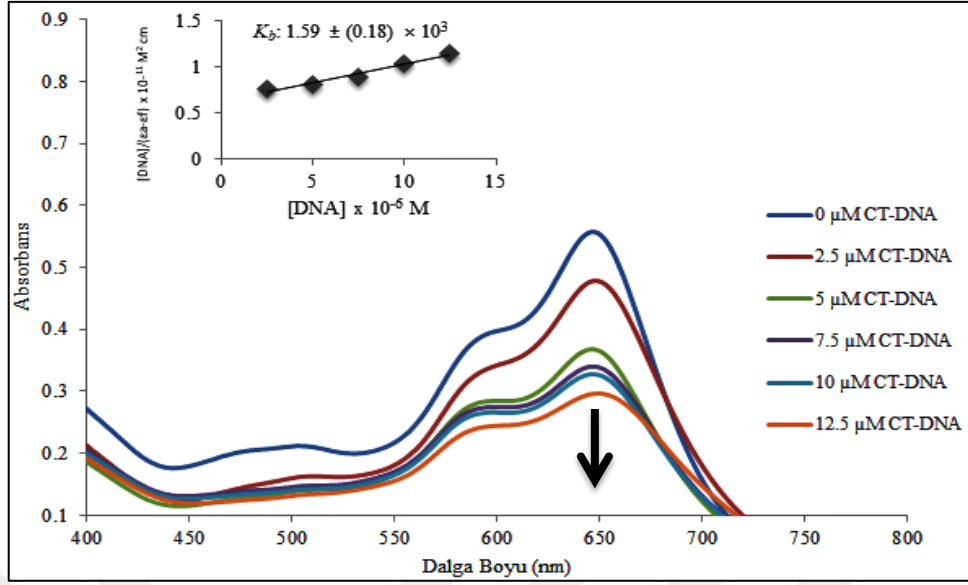
4.2. DNA Bağlanma Deneyleri

4.2.1. UV-Vis Absorpsiyon Bağlanma Çalışması

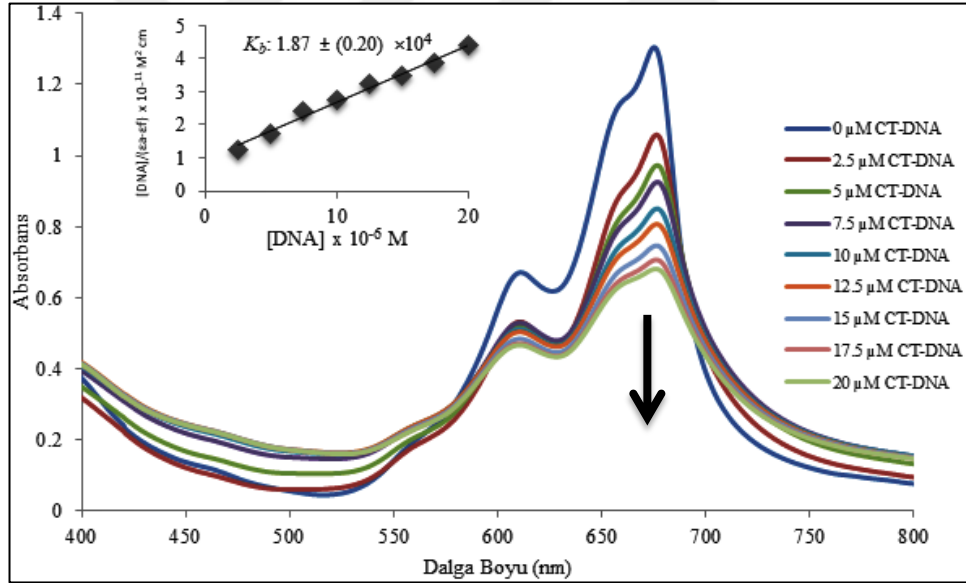
Bu çalışmada bileşiklerin tampon içerisindeki çözeltisi üzerine artan konsantrasyonlarda CT-DNA ilave edilip absorpsiyon spektrumlarındaki değişiklikler gözlenmiştir. Bileşiklerin CT-DNA bağlanma özellikleri Tablo 8 ve Şekil 25-28’te verilmiştir. Pozitif kontrol olarak EB kullanılmıştır.

Tablo 8. Bileşiklerin CT-DNA ile bağlanma dataları

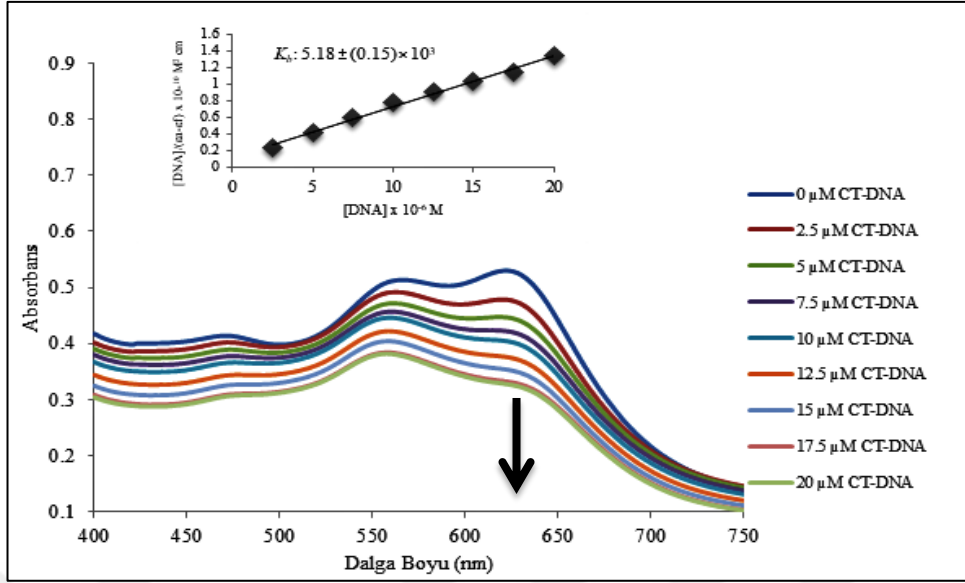
Bileşikler	λ (nm)	Absorbans Değişim	Kırmızı Kayma (nm)	K_b (M^{-1})	%H
BODIPY-3a	647	Hipokromizm	2	$1.59 \pm (0.18) \times 10^3$	%46.71 $\pm$ 2.15
BODIPY-6a	675	Hipokromizm	2	$1.87 \pm (0.20) \times 10^4$	%47.80 $\pm$ 2.40
BODIPY-9a	621	Hipokromizm	0	$5.18 \pm (0.15) \times 10^3$	%38.07 $\pm$ 1.80
BODIPY-12a	674	Hipokromizm	0	$2.88 \pm (0.05) \times 10^3$	%33.11 $\pm$ 0.90
EB	484	Hipokromizm	0	$1.93 \pm (0.07) \times 10^5$	%52.23 $\pm$ 1.50



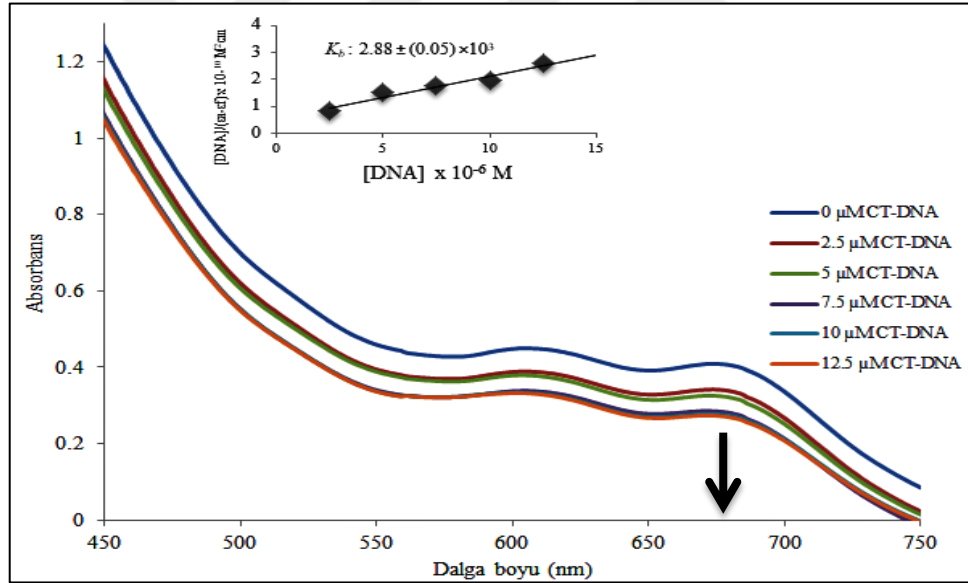
Şekil 25. CT-DNA yokluğunda ve varlığında BODIPY-3a bileşiğinin UV-Vis absorpsiyon spektrumu



Şekil 26. CT-DNA yokluğunda ve varlığında BODIPY-6a bileşiğinin UV-Vis absorpsiyon spektrumu



Şekil 27. CT-DNA yokluğunda ve varlığında BODIPY-9a bileşiğinin UV-Vis absorpsiyon spektrumu



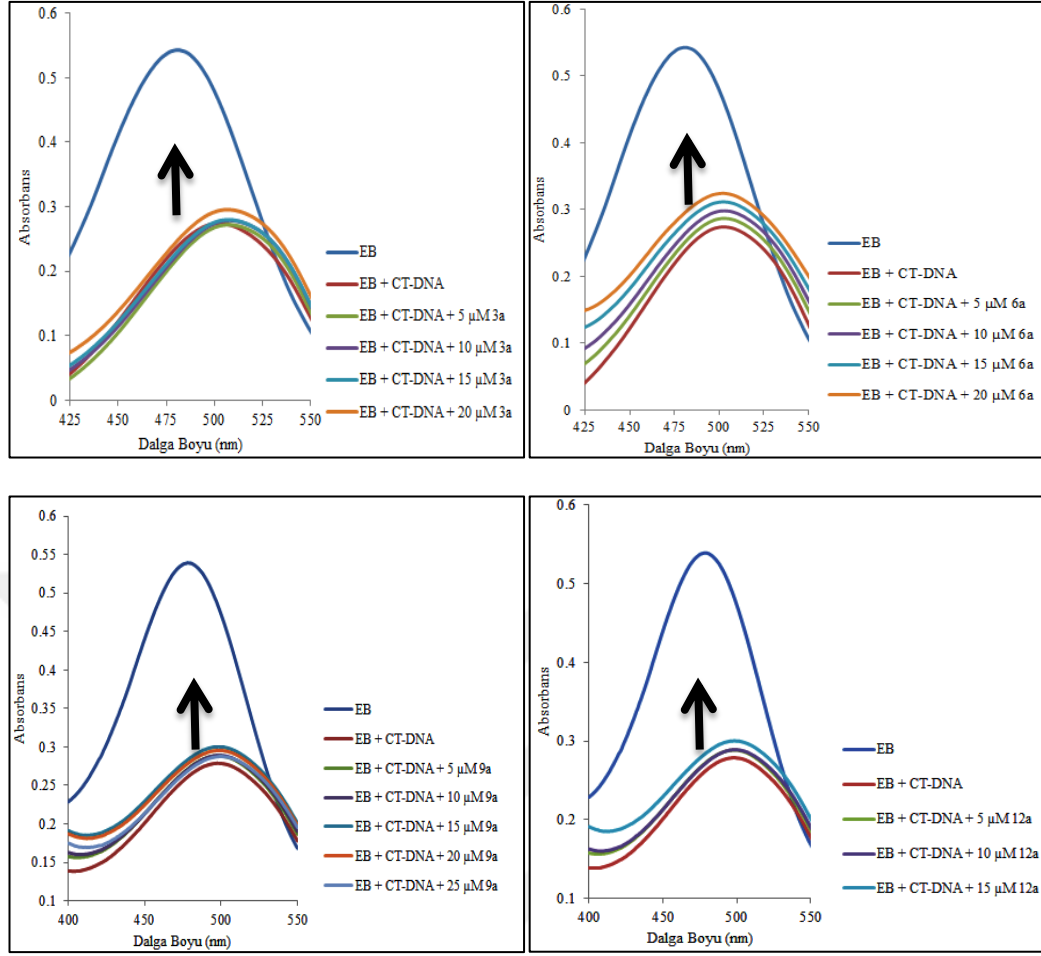
Şekil 28. CT-DNA yokluğunda ve varlığında BODIPY-12a bileşiğinin UV-Vis absorpsiyon spektrumu

Şekil 25'te de görüldüğü gibi BODIPY-3a bileşiğinin UV-Vis spektrumunda 647 nm'de maksimum absorbans gösterdiği belirlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda CT-DNA ilavesi sonucunda hipokromizm ($\%46.71 \pm 2.15$) ve 2 nm kırmızıya kayma (λ_{max} 647 $\rightarrow$ 649) gözlenmiştir. BODIPY-3a bileşiğinin K_b sabiti $1.59 \pm (0.18) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. BODIPY-6a bileşiğinin UV-Vis spektrumunda 675 nm'de maksimum absorbans gösterdiği belirlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda CT-DNA ilavesi sonucunda

hipokromizm (47.80 ± 2.40) ve 2 nm kırmızıya kayma (λ_{max} 675 $\rightarrow$ 677) gözlenmiştir. BODIPY-6a bileşiğinin K_b sabiti $1.87 \pm (0.20) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 26). BODIPY-9a bileşiğinin UV-Vis spektrumunda 621 nm’de maksimum absorbans gösterdiği belirlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda CT-DNA ilavesi sonucunda hipokromizm (38.07 ± 1.80) gözlenmiştir. BODIPY-9a bileşiğinin K_b sabiti $5.18 \pm (0.15) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 27). BODIPY-12a bileşiğinin UV-Vis spektrumunda 674 nm’de maksimum absorbans gösterdiği belirlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda CT-DNA ilavesi sonucunda hipokromizm (33.11 ± 0.90) gözlenmiştir. BODIPY-12a bileşiğinin K_b sabiti $2.88 \pm (0.05) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 28). İnterkalatif ajan olduğu bilinen EB bileşiğinin 52.23 ± 1.50 oranında hipokromizm gerçekleştirdiği ve ayrıca K_b sabitinin $1.93 \pm (0.07) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olduğu belirlenmiştir.

4.2.2. Yarışmalı EB Bağlanma Çalışması

Yarışmalı bağlanma çalışmaları interkalatif ajan olan EB kullanılarak bileşiklerin CT-DNA ile interkalasyon yapıp yapmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmektedir. Bileşiklerin yarışmalı EB bağlanma spektrumları Şekil 29’da verilmiştir. Bu çalışmada EB bileşiğinin (75 μM) absorpsiyon spektrumu ölçülmüş olup, maksimum absorbans verdiği dalga boyu 481 nm olarak belirlenmiştir. Daha sonra CT-DNA (75 μM) ilave edilerek EB-(CT-DNA) kompleksi oluşturulmuştur. Bu kompleks oluştuktan sonra $\pi-\pi^*$ geçiş enerjisinin düşmesi nedeniyle absorbansta azalması ve 26 nm kırmızıya kayma gözlenmiştir. Bu durum EB’ün CT-DNA’ya interkalasyon türüyle bir bağlanma gerçekleştirdiğini göstermiştir. Şekil 29’da, EB-(CT-DNA) kompleksine bileşiklerin artan konsantrasyonlarının ilavesine rağmen absorbanlarında dikkate değer artışların olmadığı görülmüştür.



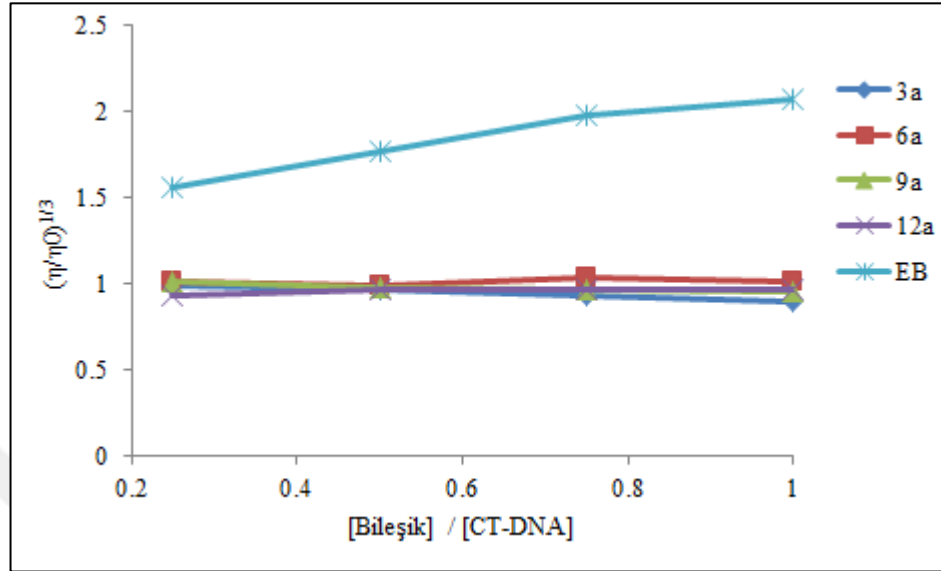
Şekil 29. Bileşiklerin yarışmalı EB bağlanma deneyi çalışmaları

4.2.3. Viskozite Çalışması

Viskozite çalışması optik fotofiziksel proplar olmadan kullanılan bir teknik olup CT-DNA ile bileşiklerin bağlanma modunun belirlenmesi ve desteklenmesi amacıyla tercih edilen önemli yöntemlerden biridir. CT-DNA'nın bileşikler varlığında viskozite çalışmasının sonuçları Şekil 30'da verilmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak EB kullanılmıştır. Klasik interkalatif ajanlar nükleobazların arasına girerek CT-DNA'nın uzamasını sağlar ve viskozitesinin artmasına sebep olur. İnterkatif olmayan ajanlar ise CT-DNA'nın bükülmesini ya da kıvrılmasını sağlar ve bu durum viskozitenin değişmemesine ya da azalmasına neden olur.

Şekil 30'da da görüldüğü gibi, bileşiklerin artan konsantrasyonlarının ilavesiyle CT-DNA viskozitesinin değişmediği belirlenmiştir. İnterkatif ajan olarak bilinen EB'ün artan konsantrasyonlarının ilavesiyle CT-DNA viskozitesinin arttığı belirlenmiştir.

Viskozite çalışması sonucunda, BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin CT-DNA ile kovalent olmayan etkileşimler gerçekleştirdikleri belirlenmiştir.

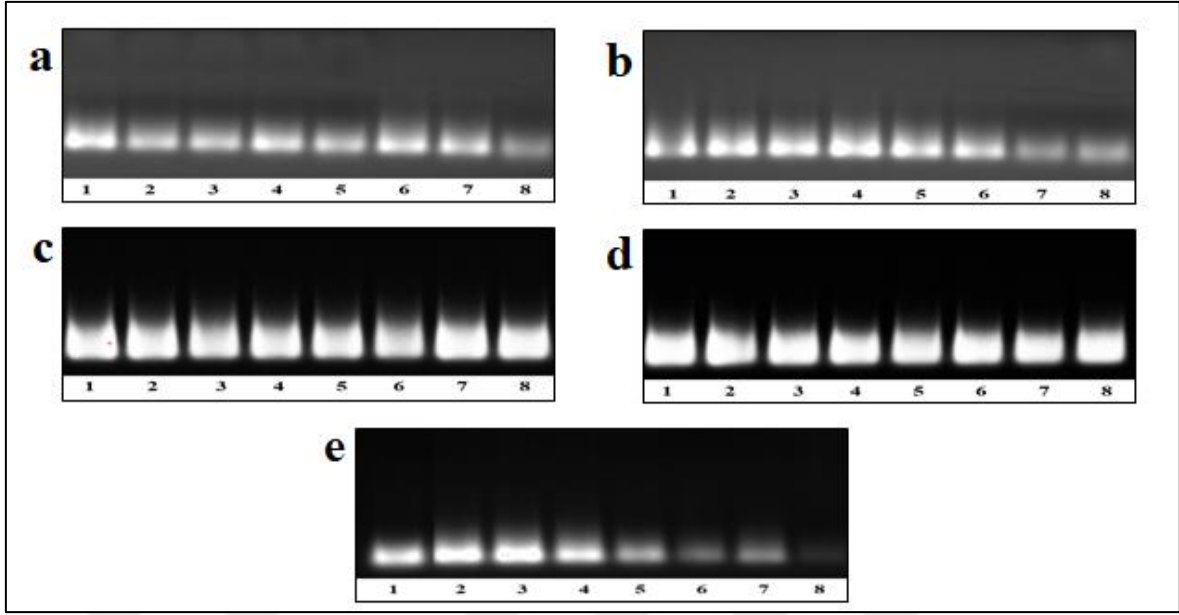


Şekil 30. Bileşiklerin varlığında CT-DNA'nın viskozitesi

4.2.4. Elektroforez Bağlanma Çalışması

Bu çalışmada, bileşiklerin CT-DNA ile etkileşimleri agaroz jel elektroforezi kullanılarak incelenmiştir. CT-DNA (250 μ M) konsantrasyonu sabit tutularak bileşiklerin artan konsantrasyonları (6.25-500 μ M) ilave edilmiş ve CT-DNA'nın jel üzerindeki yoğunluğu incelenmiştir ($r = [\text{bileşik}]/[\text{CT-DNA}]$). Çalışmanın sonuçları Şekil 31'de verilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak EB kullanılmıştır.

BODIPY-3a bileşiğinin r değerleri incelendiğinde, r değerinin 2 olduğu kuyucukta CT-DNA yoğunluğunun (Şekil 31(a), bant 8) azaldığı görülmektedir. BODIPY-6a bileşiğinde, r değerinin 1 olduğu kuyucukta ise CT-DNA yoğunluğunun azaldığı görülmektedir (Şekil 31(b), bant 7). BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinde ise bantlarda dikkate değer bir değişiklik gözlenmemiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan EB incelendiğinde ise r değerinin 0.2 olduğu bantta CT-DNA yoğunluğunun azalmaya başladığı gözlenmektedir. Bunun sebebinin EB bileşiğinin CT-DNA ile kuvvetli bir etkileşim gerçekleştirip CT-DNA'nın görünürlüğünü azaltması olduğu düşünülmektedir.



Şekil 31. Bileşiklerin elektroforez bağlanma çalışması. **(a)** BODIPY-3a, **(b)** BODIPY-6a, **(c)** BODIPY-9a, **(d)** BODIPY-12a ve **(e)** EB. (1: $r=0$, 2: $r=0.025$, 3: $r=0.05$, 4: $r=0.1$, 5: $r=0.2$, 6: $r=0.4$, 7: $r=1$, 8: $r=2$)

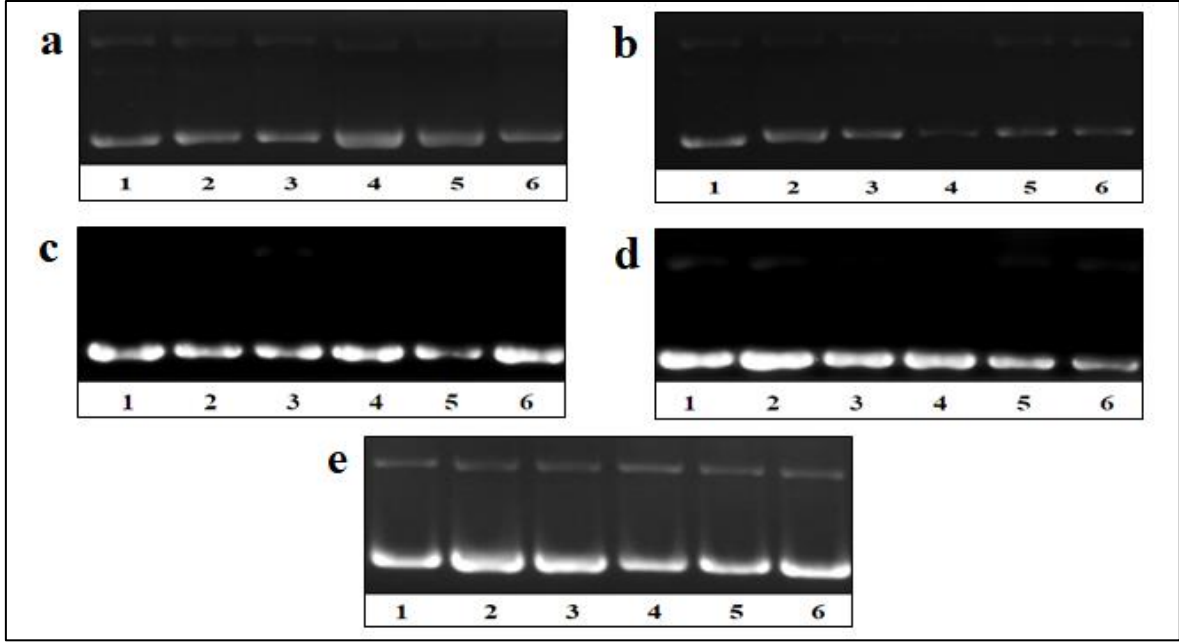
4.3. Bileşiklerin Nükleaz Aktivitesi

Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA nükleaz aktivitelerini belirlemek amacıyla agaroz jel elektroforez tekniği kullanılmıştır. Uygun şartların sağlanmasıyla gerçekleştirilen nükleaz reaksiyonları sonrasında elde edilen ürünler BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile analiz edilmiştir.

4.3.1. Bileşiklerin Hidrolitik Nükleaz Aktivitesi

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA'nın fosfodiester bağlarını hidrolizi yoluyla kesebilme etkinliğini değerlendirmek için hidrolitik nükleaz denemesi yapılmıştır. Bileşiklerin hidrolitik nükleaz aktivitesinin sonuçları Şekil 32'de verilmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak MB kullanılmıştır. BODIPY-3a bileşiği için 3.125, 6.25, 12.5 ve 25 μM 'da dikkate değer nükleaz aktiviteleri gözlenmezken, 50 μM 'da Sc'nin bant yoğunluğunun %78.50'e düştüğü, Nc'nin bant yoğunluğunun ise %21.50'ye arttığı gözlenmiştir (Şekil 32(a), bant 6). BODIPY-6a bileşiğinde ise 3.125, 6.25 ve 12.5 μM 'da nükleaz aktivitesi gözlenmezken, 25 ve 50 μM 'da Sc'nin bant yoğunluğu %78.70 ve %78.30'a azalırken, Nc'nin bant yoğunluğunun ise %21.30 ve %21.70'e yükseldiği görülmüştür (Şekil 32(b),

bant 5-6). BODIPY-9a, BODIPY-12a ve pozitif kontrol olarak kullanılan MB bileşiklerinin varlığında ise çalışılan tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole göre dikkate değer nükleaz aktiviteleri gözlenmemiştir. 60 dakikalık inkübasyon sonucunda çalışmada kullanılan BODIPY bileşiklerinin karanlıkta dikkate değer DNA hasarı yaratmadıkları gözlenmiştir.



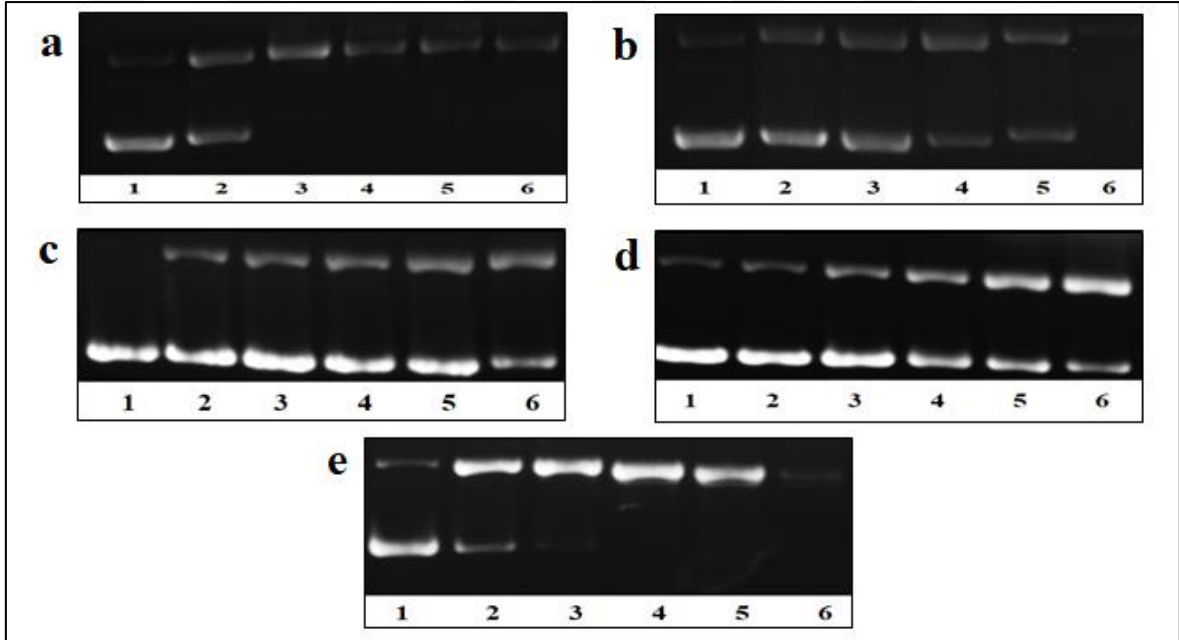
Şekil 32. Bileşiklerin süpersarmal pBR322 plazmid DNA hidrolitik nükleaz aktivitesi (60 dakika 37°C). **(a)** BODIPY-3a, **(b)** BODIPY-6a, **(c)** BODIPY-9a, **(d)** BODIPY-12a ve **(e)** MB. Bant 1: DNA kontrol; bant 2-6: DNA+ Bileşik (3.125 μ M - 6.25 μ M - 12.5 μ M - 25 μ M - 50 μ M)

4.3.2. Bileşiklerin Fotonükleaz Aktivitesi

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin süpersarmal pBR322 plazmid DNA'nın ışık varlığındaki nükleaz etkisini belirlemek amacıyla fotonükleaz denemesi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 33'de verilmiştir.

3.125 μ M BODIPY-3a bileşiğinin varlığında Sc'nin bant yoğunluğunun %58.50'ye azaldığı, Nc'nin bant yoğunluğunun ise %41.50'ye yükseldiği görülmüştür. 6.25, 12.5, 25 ve 50 μ M'da ise Nc'nin bant yoğunluğunun arttığı ve küçük fragmentlerin oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 33(a)). BODIPY-6a bileşiğinde ise; 3.125 μ M'da Sc'nin bant yoğunluğunun %76.80'ye azaldığı, Nc'nin bant yoğunluğunun ise %23.20'ye yükseldiği görülmüştür. 50 μ M'da ise Sc'nin bant yoğunluğunun tamamen kaybolduğu görülürken,

küçük fragmentler oluştuğu düşünülmektedir (Şekil 33(b)). BODIPY-9a bileşiği varlığında konsantrasyona bağlı olarak Sc'nin bant yoğunluğunun azaldığı, Nc'nin bant yoğunluğunun ise arttığı gözlenmiştir. 6.25, 12.5, 25 ve 50 μM 'da Sc'nin oranları sırasıyla %79.80, %72.70, %67.80 ve %49.60 olarak bulunmuştur (Şekil 33(c)). 25 ve 50 μM BODIPY-12a bileşiğinin varlığında ise Nc'nin bant yoğunluğu oranları %49.50 ve %63.60 olarak belirlenmiştir (Şekil 33(d)). Pozitif kontrol olarak kullanılan MB bileşiğinin varlığında ise konsantrasyona bağlı olarak Sc bant yoğunluğunun azalıp, Nc bant yoğunluğunun arttığı görülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda bileşiklerin ışık varlığında oldukça önemli derecede DNA hasarı yarattıkları belirlenmiş olup, PDT'de kullanılma potansiyellerinin var olduğu kanıtlanmıştır.



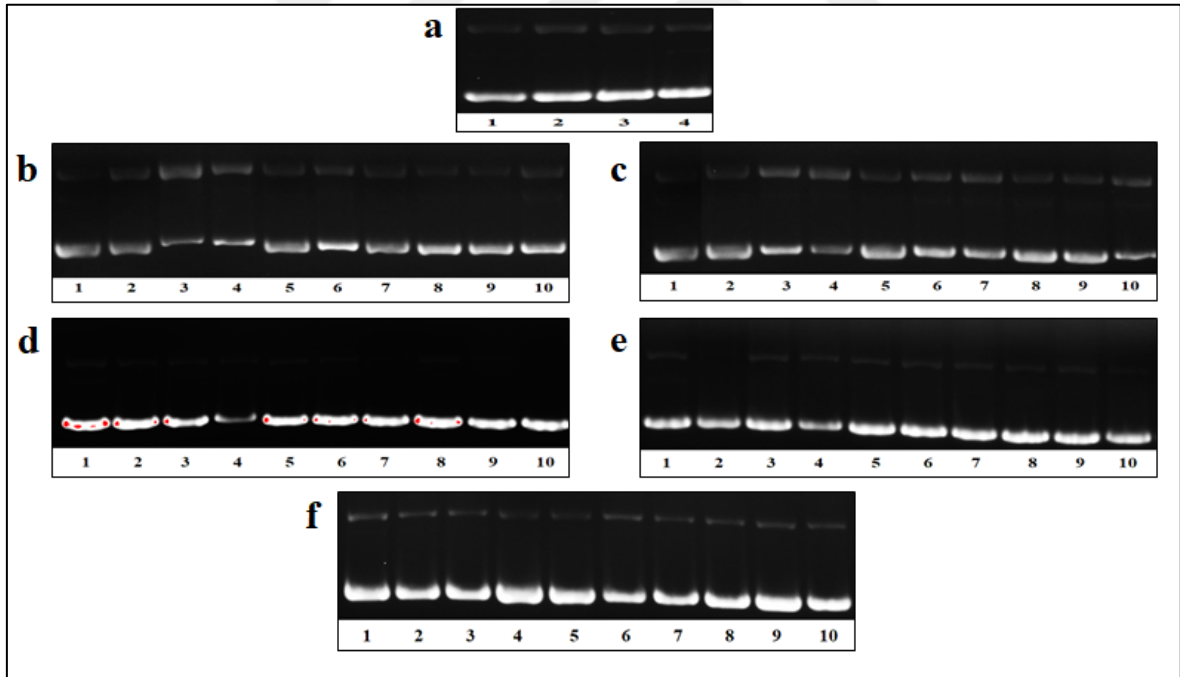
Şekil 33. Bileşiklerin ışık varlığında süpersarmal pBR322 plazmid DNA fotonükleaz aktivitesi (30 dakika ışık uyarması). **(a)** BODIPY-3a, **(b)** BODIPY-6a, **(c)** BODIPY-9a, **(d)** BODIPY-12a ve **(e)** MB. Bant 1: DNA kontrol; bant 2-6: DNA+ Bileşik (3.125 μM - 6.25 μM - 12.5 μM - 25 μM - 50 μM)

4.3.3. Bileşiklerin Oksidatif Nükleaz Aktivitesi

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin hidrolitik ve fotonükleaz aktivitelerinin belirlenmesinin ardından oksidatif nükleaz etkilerinin incelenmesi amacıyla nükleaz reaksiyonları H_2O_2 , AA, ME ajanların ilavesiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların sonucu Şekil 34'de verilmiştir. Bu ajanların nükleaz

aktivatör niteliğinde etkilerinin olup olmadığı Şekil 34(a)'da gösterilen jel görüntülerinin incelenmesiyle ortaya konulmuştur. Bu üç ajan, DNA'ya tek başlarına ilave edildiklerinde herhangi bir nükleaz aktivitesi göstermez iken, bileşiklerle birlikte ilave edildiklerinde düşük aktivatör özellik göstermişlerdir.

Ortamda H_2O_2 varlığında BODIPY-3a bileşiği oksidatif nükleaz aktivitesi gösterirken, AA ve ME varlığında aktivite göstermemiştir (Şekil 34(b)). Ortamda H_2O_2 varlığında BODIPY-6a bileşiği oksidatif nükleaz aktivitesi göstermiştir. 3.125 ve 6.25 μM 'da %27.70 ve %38.30 oranlarında Nc gözlenmiştir. AA varlığında ise 1.56, 3.125 ve 6.25 μM 'da Sc'nin bant yoğunluğu %89.20, %83.20 ve %77.50 oranlarında gözlenmiştir. ME varlığında ise 1.56, 3.125 ve 6.25 μM 'da Nc'nin bant yoğunluğunun yüzdesi %9.60, %11.40 ve %26.30 oranlarında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 34(c)). BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin ajanlar varlığında dikkate değer oksidatif nükleaz aktivitesine sahip olmadığı Şekil 34(d) ve (e)'de gösterilmiştir.

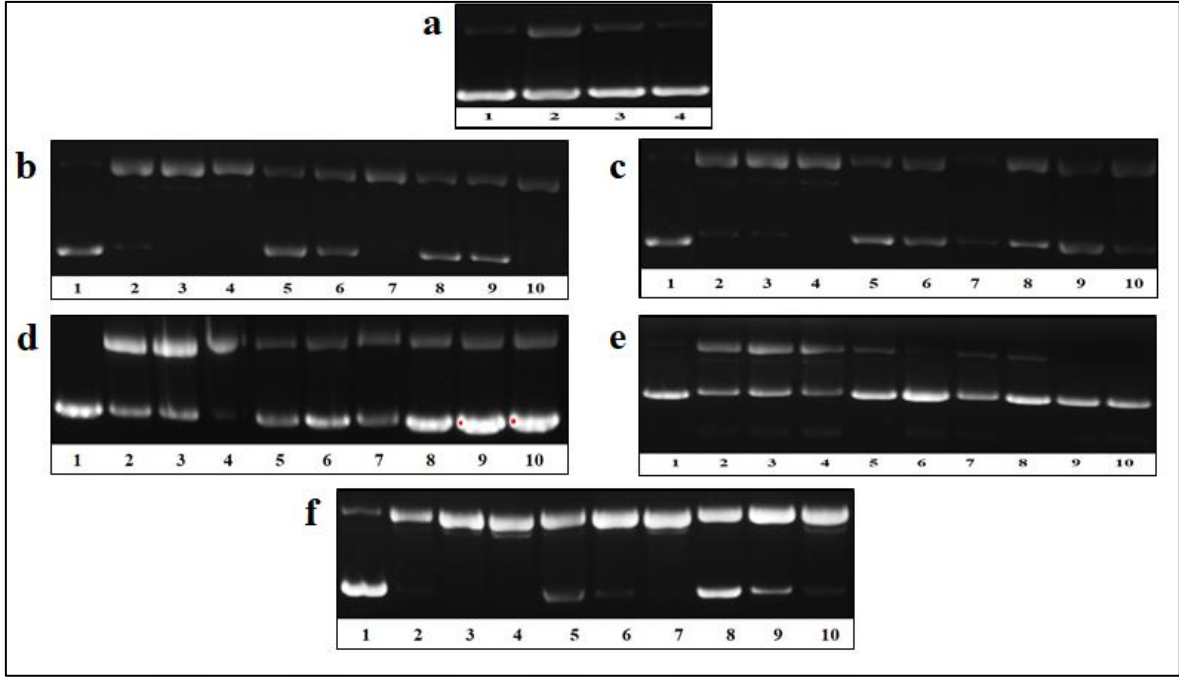


Şekil 34. Bileşiklerin karanlıkta oksidatif nükleaz aktivitesi. **(a)** negatif kontrol, **(b)** BODIPY-3a, **(c)** BODIPY-6a, **(d)** BODIPY-9a, **(e)** BODIPY-12a ve **(f)** MB. Bant 1: DNA kontrol; bant 2-4: DNA + H_2O_2 (0.4 M) + Bileşik (1.56 μM - 3.125 μM - 6.25 μM); bant 5-7: DNA + AA (0.25 mM) + Bileşik (1.56 μM - 3.125 μM - 6.25 μM); bant 8-10: DNA + ME (0.4 M) + Bileşik (1.56 μM - 3.125 μM - 6.25 μM)

4.3.4. Bileşiklerin Oksidatif Fotonükleaz Aktivitesi

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin oksidatif ajanlar varlığında ışık uyarılmasıyla birlikte fotonükleaz aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları Şekil 35’de verilmiştir. Bu ajanların aktivatör niteliğinde etkilerinin olup olmadığı Şekil 35(a)’da gösterilen jel görüntülerinin incelenmesiyle ortaya konulmuştur. Negatif kontrol olarak değerlendirildiğinde H_2O_2 varlığında Nc’nin bant yoğunluğunun %26.30 oranında arttığı belirlenirken, AA ve ME varlığında ise herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Oksidatif ajanlar varlığında bileşikler oldukça yüksek fotonükleaz aktivitesi göstermiştir.

Ortamda H_2O_2 varlığında 1.56, 3.125 ve 6.25 μM BODIPY-3a bileşiğinin %91.60, %95.70 ve %97.00 oranlarında Nc oluşturduğu gözlenmiştir. Ayrıca 3.125 ve 6.25 μM ’da %4.30 ve %3.00 oranlarında Lc gözlenmiştir. AA varlığında ise 1.56, 3.125 ve 6.25 μM ’da Nc %27.80, %48.20 ve %100 oranlarında artmıştır. ME varlığında ise 1.56, 3.125 ve 6.25 μM ’da Nc’nin bant yoğunluğunun %34.40, %37.70 ve %100 oranlarında olduğu görülmüştür (Şekil 35(b)). 1.56, 3.125 ve 6.25 μM BODIPY-6a bileşiğinin, H_2O_2 varlığında %84.20, %91.30 ve %93.00 oranlarında Nc oluşturduğu gözlenmiştir. AA ve ME varlığında da konsantrasyona bağlı olarak Nc’nin bant yoğunluğunda artma gözlenirken, Sc’nin bant yoğunluğunda ise azalma gözlenmiştir (Şekil 35(c)). 3.125 ve 6.25 μM BODIPY-9a bileşiğinin, H_2O_2 varlığında %70.50 ve %100 oranlarında Nc oluşturduğu gözlenmiştir. AA varlığında ise 6.25 μM ’da Sc oranı %59.60 azalırken, Nc oranı ise %40.40 olarak bulunmuştur. ME varlığında DNA üzerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 35(d)). BODIPY-12a bileşiğinin, H_2O_2 varlığında Sc’nin bant yoğunluğunu azaltıp, Nc’nin yoğunluğunu arttırdığı gözlenmiştir. Buna ek olarak görüntülerde küçük fragmentlerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 35(e)).

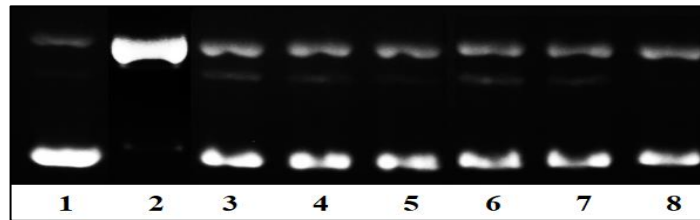


Şekil 35. Bileşiklerin oksidatif fotonükleaz aktivitesi. **(a)** negatif kontrol, **(b)** BODIPY-3a, **(c)** BODIPY-6a, **(d)** BODIPY-9a, **(e)** BODIPY-12a ve **(f)** MB. Bant 1: DNA kontrol; bant 2-4: DNA + H₂O₂ (0.4 M) + Bileşik (1.56 μM - 3.125 μM- 6.25 μM); bant 5-7: DNA + AA (0.25 mM) + Bileşik (1.56 μM - 3.125 μM- 6.25 μM); bant 8-10: DNA + ME (0.4 M) + Bileşik (1.56 μM - 3.125 μM- 6.25 μM)

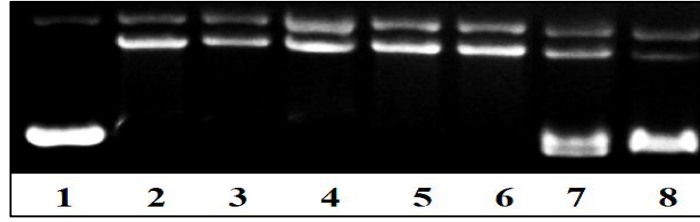
4.4. Topoizomeraz Enzim İnhibisyonları

4.4.1. Topoizomeraz I Enzim İnhibisyonu

Bileşiklerin topoizomeraz I enzimine karşı etkileri pBR322 plasmid DNA'nın relaksasyon yöntemine göre belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları Şekil 36 ve 37'de verilmiştir.



Şekil 36. BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin topoizomeraz I inhibisyonu. Bant 1: DNA kontrol; bant 2: DNA + 1 U topoizomeraz I; bant 3-5: DNA + 1 U topoizomeraz I + (BODIPY-3a (12.5, 25, 50 μM)); bant 6-8: DNA + 1 U topoizomeraz I + (BODIPY-6a (12.5, 25, 50 μM))

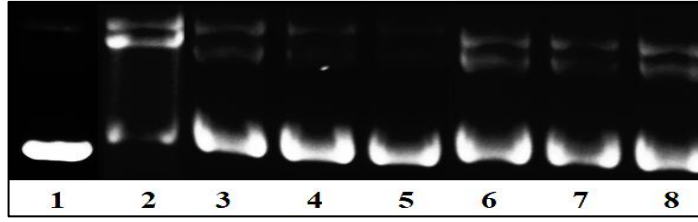


Şekil 37. BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin topoizomeraz I inhibisyonu. Bant 1: DNA kontrol; bant 2: DNA + 1 U topoizomeraz I; bant 3-5: DNA + 1 U topoizomeraz I + (BODIPY-9a (12.5, 25, 50 μ M)); bant 6-8: DNA + 1 U topoizomeraz I + (BODIPY-12a (12.5, 25, 50 μ M))

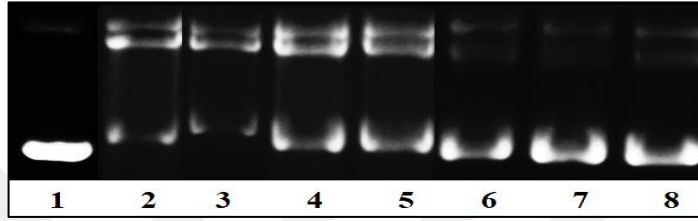
1 U topoizomeraz I enzimi ve pBR322 plasmid DNA'nın 37°C'de 60 dakika inkübasyonu sonucu Sc'nin bant yoğunluğunun oldukça azaldığı, Nc ve Lc'nin bant yoğunluğunun arttığı tespit edilmiştir (Şekil 36-37, bant 2). BODIPY-3a'nın artan konsantrasyonlarının ilavesi sonrasında Sc'nin bant yoğunluğunun sırasıyla %64.20, %66.00 ve %69.50 oranlarına çıktığı görülmüştür. Sc'nin bant yoğunluğunun artması, enzimin inhibe olmasının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, 50 μ M BODIPY-6a bileşiğinin varlığında Lc formunun tamamen kaybolduğu tespit edilirken, Sc'nin yoğunluğu artmıştır. Sc'nin bant yoğunluğunun artışına göre, BODIPY-3a topoizomeraz I enzimini 12.5, 25 ve 50 μ M konsantrasyonlarda %89.10, %89.40 ve %89.93, BODIPY-6a ise %88.55, %88.60 ve %89.03 oranlarında inhibe etmiştir. BODIPY-9a bileşiği 12.5, 25 ve 50 μ M konsantrasyonlarda topoizomeraz I inhibisyonu göstermediği tespit edilmiştir. BODIPY-12a bileşiğinde ise 12.5 μ M konsantrasyonda topoizomeraz I inhibisyon etkisi gözlenmezken, 25 ve 50 μ M konsantrasyonda Nc ve Lc'nin bant yoğunluğunda azalma, Sc'nin bant yoğunluğunda artış tespit edilmiştir. 25 ve 50 μ M BODIPY-12a bileşiği varlığında Sc'nin bant yoğunluğu sırasıyla %71.30 ve %82.70 olarak tespit edilmiştir.

4.4.2. Topoizomeraz II Enzim İnhibisyonu

Bileşiklerin topoizomeraz II enzimine karşı etkileri pBR322 plasmid DNA'nın relaksasyon yöntemine göre belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları Şekil 38 ve 39'da verilmiştir.



Şekil 38. BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin topoizomeraz II inhibisyonu. Bant 1: DNA kontrol; bant 2: DNA + 1 U topoizomeraz II; bant 3-5: DNA + 1 U topoizomeraz II + (BODIPY-3a (12.5, 25, 50 μ M)); bant 6-8: DNA + 1 U topoizomeraz II + (BODIPY-6a (12.5, 25, 50 μ M))



Şekil 39. BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin topoizomeraz II inhibisyonu. Bant 1: DNA kontrol; bant 2: DNA + 1 U topoizomeraz II; bant 3-5: DNA + 1 U topoizomeraz II + (BODIPY-9a (12.5, 25, 50 μ M)); bant 6-8: DNA + 1 U topoizomeraz II + (BODIPY-12a (12.5, 25, 50 μ M))

1 U topoizomeraz II enzimi ve pBR322 plasmid DNA'nın 37°C'de 60 dakika inkübasyonu sonucu Sc'nin bant yoğunluğu %33.80'e azalırken, Nc ve Lc'nin bant yoğunluğunun sırasıyla %22.60 ve %43.60 olduğu belirlenmiştir (Şekil 38-39, bant 2). BODIPY-3a'nın artan konsantrasyonlarının ilavesi sonrasında Sc'nin bant yoğunluğunun sırasıyla %77.50, %81.80 ve %87.70 oranlarına çıktığı görülmüştür. Ayrıca, 50 μ M BODIPY-6a bileşiğinin varlığında Sc'nin bant yoğunluğu %77.20 olarak tespit edilmiştir. Sc'nin bant yoğunluğunun artışına göre, BODIPY-3a topoizomeraz II enzimini 12.5, 25 ve 50 μ M konsantrasyonlarda %56.39, %58.68 ve %61.46, BODIPY-6a ise %54.57, %54.64 ve %56.22 oranlarında inhibe ettiği belirlenmiştir. 12.5 μ M BODIPY-9a topoizomeraz II inhibisyonu göstermezken, 50 μ M konsantrasyonda Sc'nin bant yoğunluğunun %74.40'a yükseldiği tespit edilmiştir. BODIPY-12a bileşiğinde ise artan konsantrasyona bağlı olarak Sc'nin bant yoğunluğunda artış, Nc ve Lc'nin bant yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir. 25 μ M BODIPY-12a bileşiği varlığında Sc'nin bant yoğunluğu %83.00 olarak tespit edilmiştir.

4.4.3. Topoizomeraz I ve II Enzimi Moleküler Kenetleme Çalışması

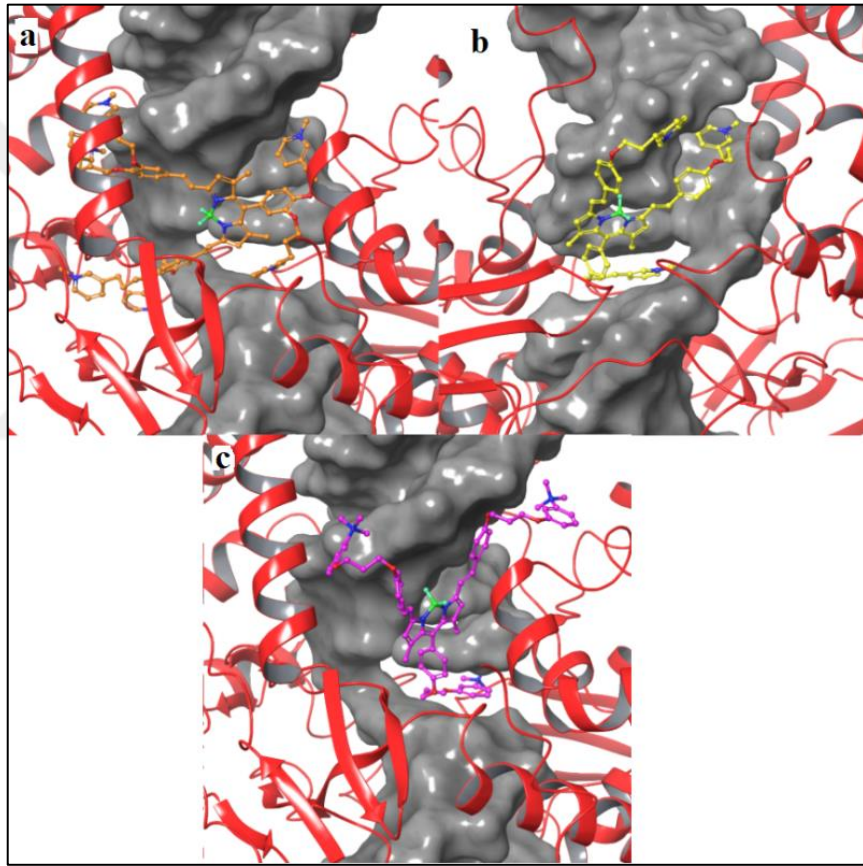
Bileşiklerin topoizomeraz enzimleri ile etkileşimlerini moleküler düzeyde belirlemek amacıyla moleküler kenetleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Moleküler kenetleme çalışmalarına dahil edilen BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşikleri arasından BODIPY-9a için topoizomeraz I-DNA kompleksinde bağlanma pozunu elde edilememiştir. BODIPY-3a ve BODIPY-6a'nın bu komplekse oldukça güçlü, BODIPY-12a'nın ise daha zayıf bağlandığı gözlenmiştir (Tablo 9). Topotekanın kenetleme skoru (-10.25 kcal/mol) göz önüne alındığında BODIPY-3a ve BODIPY-6a'nın komplekse olan afinitesi umut vericidir.

Tablo 9. Bileşiklerinin kenetleme skorları (kcal/mol)

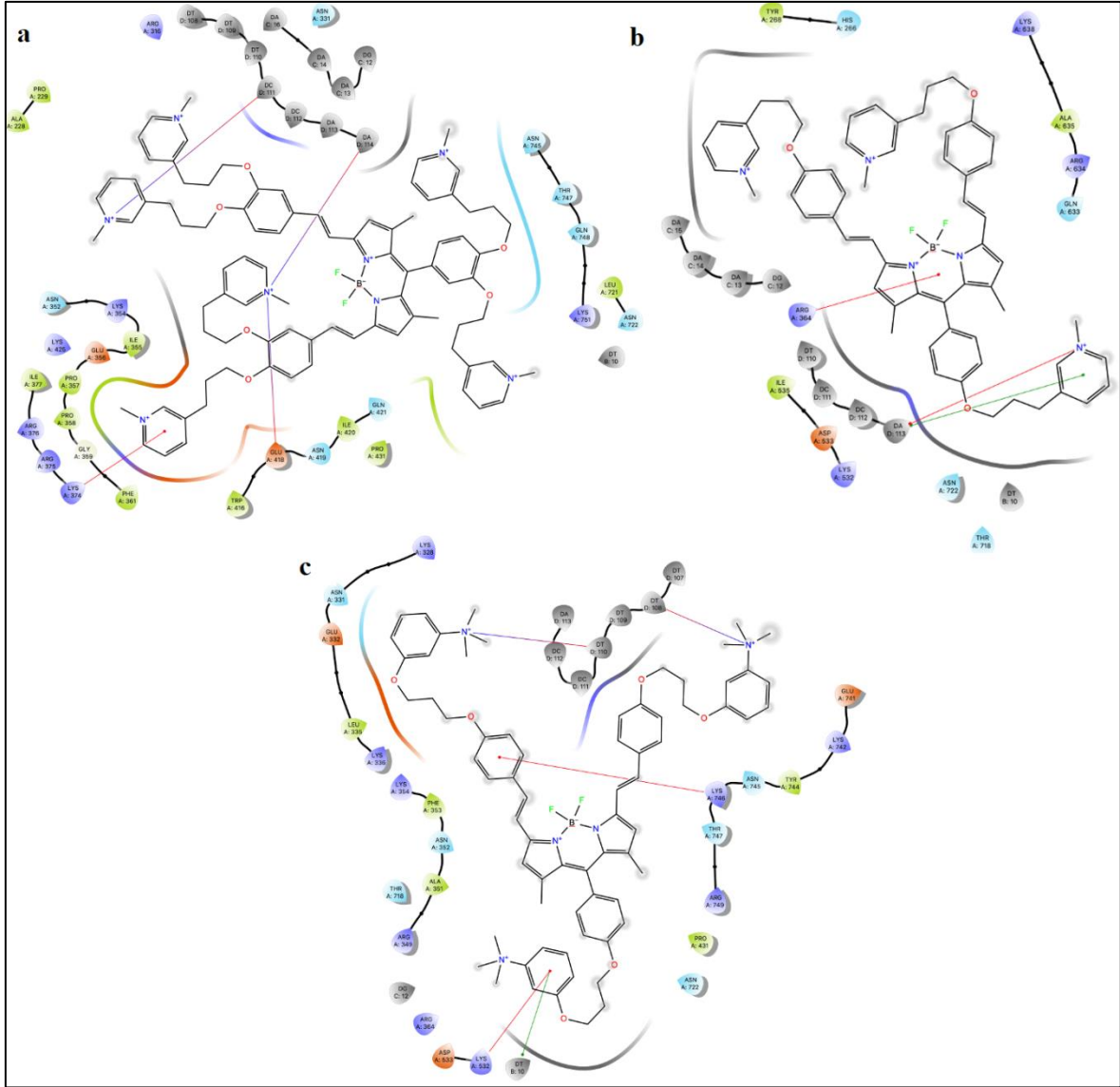
Bileşik	DNA-Topoizomeraz I	DNA-Topoizomeraz II
BODIPY-3a	-8,14	-12,44
BODIPY-6a	-8,24	-6,83
BODIPY-9a	-	-7,50
BODIPY-12a	-5,27	-8,58
Topotekan	-10,25	-
Etopozit	-	-12,01

Bileşiklerin bağlanma biçimleri bazı önemli ortak özellikler ortaya koymaktadır. Bileşiklerin merkezinde yer alan BODIPY iskeleti katalitik bölgeye yakın, DNA majör oluşunun merkezine konumlanmış, bu trisiklik halkaya bağlı arilalkil sübstitüsyonları majör ve minör oluklara, DNA-topoizomeraz ara yüzlerine ve topotekanın da interkalasyon yaptığı baz çifti arasına bağlanmıştır (Şekil 40). Bileşiklerin bu uzun arilalkil grupları ile DNA'yı sarmalaması ve parçalanmanın gerçekleştiği alanda iki baz çiftinin arasına sokulması, DNA-enzim kompleksini stabilize ettiği düşünülmektedir. BODIPY-3a'nın π -katyon etkileşmesi kurduğu Lys374, BODIPY-6a'nın π -katyon etkileşmesi kurduğu Arg364, BODIPY-12a'nın π -katyon etkileşmesi kurduğu Lys532 yukarıda DNA ile önemli etkileşmelerde bulunduğu bahsedilen rezidülerdendir (Şekil 41). Lys532 ayrıca bağlanmış haldeki topotekan ile de hidrojen bağı kurmaktadır (165). Bileşiklerin, dipirolol[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin halkasının 8 numaralı konumundan bağlı olan sübstituentleri katalitik bölgedeki baz çiftleri arasına bağlanan kısımlarıdır. Bu kısımlar +1 ve -1 baz çiftleri ile

elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler göstermektedir. Mevcut topoizomereaz I-DNA kompleksi kristal yapılarından en iyi çözünürlüğe sahip olan 1K4T yapısında yer alan topotekanın enzim aktif bölgesindeki iki baz çiftinin arasına sokularak aşağı akış (-1) baz çiftini enzim aktif bölgesinden ötelediği ve iki fosfat arasındaki mesafeyi açtığı görülmektedir (165). Bu kristal yapının ligand içermeyen versiyonunda (PDB kodu 1K4S) DNA çift sarmalı enzim aktif bölgesinde Thr718, Lys532, Lys374 ve Arg364 ile hidrojen bağı kurmaktadır (165). Topotekanın komplekse bağlanmasıyla bu hidrojen bağı korunduğu gibi Arg362 ve Gly363 ile hidrojen bağı kurulmuştur.



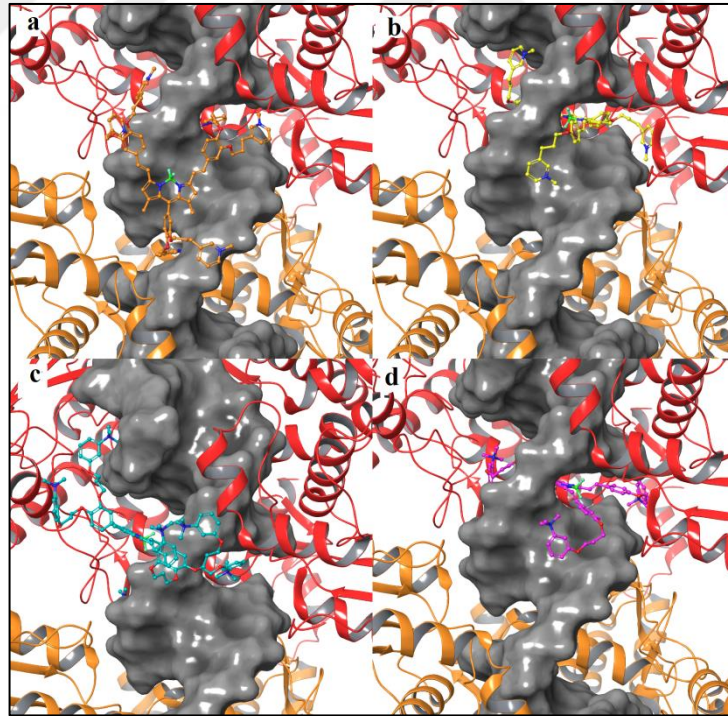
Şekil 40. DNA-topoizomerez I kompleksine bağlanma biçimleri. **(a)** BODIPY-3a (turuncu), **(b)** BODIPY-6a (sarı) ve **(c)** BODIPY-12a (mor). Ligandlar çubuk-küre, protein renkli kurdele, DNA gri moleküler yüzey olarak gösterilmiştir.



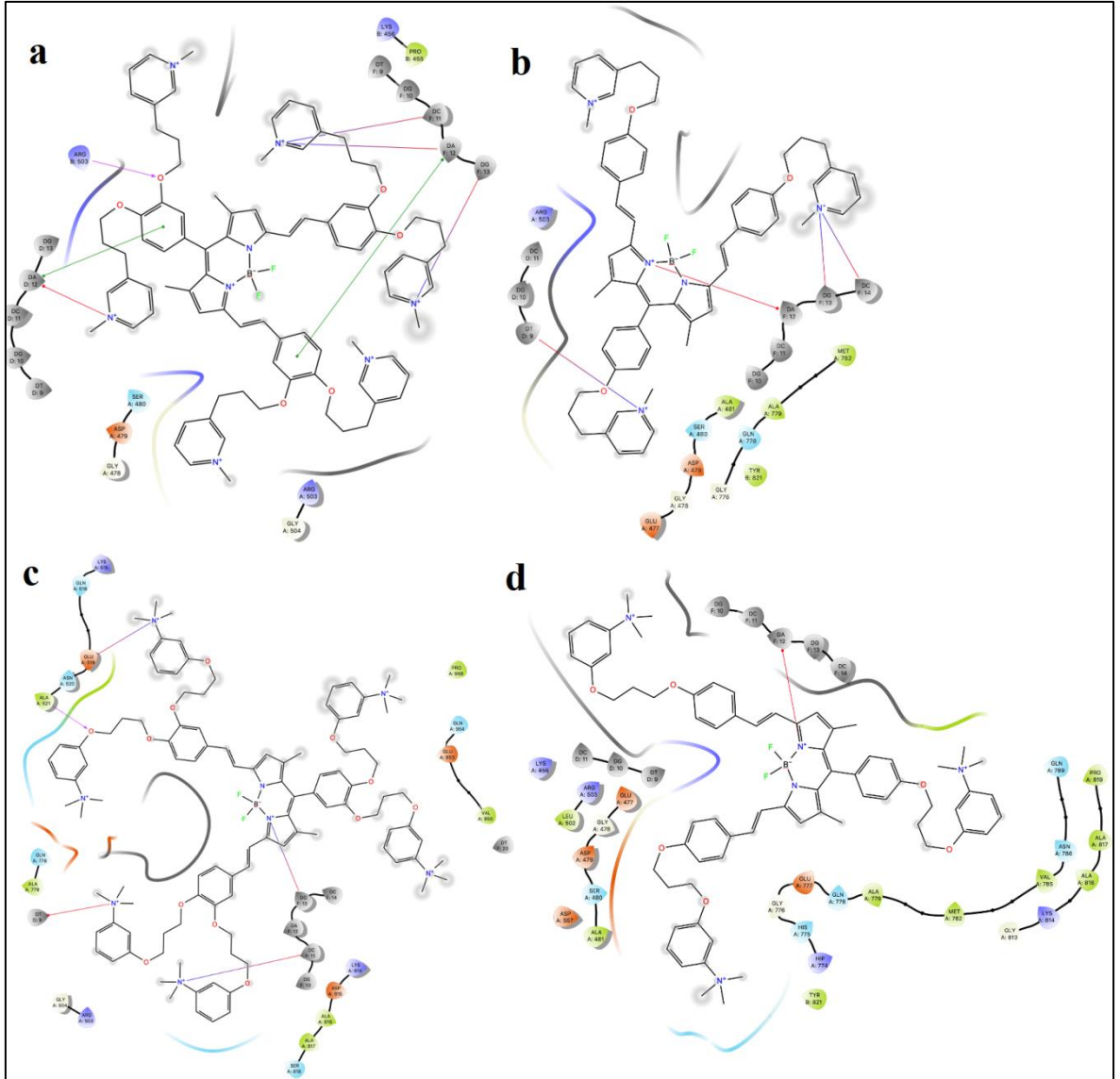
Şekil 41. DNA-topoiomeraz I kompleksi ile iki boyutlu etkileşme diyagramları. **(a)** BODIPY-3a, **(b)** BODIPY-6a ve **(c)** BODIPY-12a. Mor: hidrojen bağı, yeşil: π - π istiflenme, kırmızı: π -katyon etkileşmesi, mavi/kırmızı: tuz köprüsü

Bileşiklerimizin DNA-topoizomeraz II kompleksine bağlanma biçimleri birbirinden farklılıklar göstermektedir. Örneğin BODIPY-3a'nın üçlü halkası DNA molekülünün majör oluşunda iki katalitik bölgenin arasında konumlanırken, üçlü halkanın 8 numaralı konumunda yer alan sübstituent interkalasyon bölgelerinden birine, 5 numaralı konumdaki sübstituent ise diğerine bağlanarak iki aktif bölgeyi birden işgal etmiştir. Üçlü halkaya 3 numaralı konumdan bağlanan sübstituent DNA minör oluk ve enzimle etkileşmektedir (Şekil 42). Tüm bu etkileşmeler sonucu BODIPY-3a bileşiğinin afinitesi etopozitten daha yüksek hesap edilmiştir (Tablo 9). Diğer bileşikler katalitik bölgelerden sadece birini işgal

etmekte, DNA majör ve minör olukla ve enzimle etkileşmeler görülmektedir. BODIPY-6a ve BODIPY-12a'da katalitik bölgeyle etkileşen kısım üçlü halka, BODIPY-9a'da ise bu halkaya 3 numaralı konumdan bağlı süstitüenttir. BODIPY-3a bileşğinin hidrojen bağı kurduğı Arg503 ile π - π / π -katyon etkileşmeleri yaptığı G13 nükelotidi kristal yapıda etopozitin etkileştiğı rezidülerdendir (166) (Şekil 43). G13 nükleotidindeki guanin bazı BODIPY-6a ve BODIPY-9a bileşğiiyle de kilit etkileşmeler göstermektedir. BODIPY-6a ve BODIPY-9a'da gözlenen önemli bir etkileşme de T9 nükleotidi ile kurulan π -katyon etkileşmesidir. BODIPY-3a ve BODIPY-12a bu nükleotitlerle hidrofobik temas halindedir. Bu rezidü DNA-enzim kompleksini oluşturan Tyr821-fosfat kovalent bağıının fosfat tarafını taşıyan ve dolayısıyla DNA'nın geri onarılmasında kilit rol oynayan nükleotittir. Bu nükleotitle etkileşmelerin parçalanma kompleksini stabilize ettiğı düşünölmektedir. Çalışma kapsamındaki bileşiklerin DNA-topoizomeraz I ve DNA-topoizomeraz II kompleksine güçlü bir şekilde bağılandığı moleküler kenetleme çalışmaları ile tahmin edilmiştir.



Şekil 42. DNA-topoizomeraz II kompleksine bağlanma biçimleri. (a) BODIPY-3a (turuncu), (b) BODIPY-6a (sarı), (c) BODIPY-9a (turkuaz) ve (d) BODIPY-12a'nın (mor). Ligandlar çubuk-küre, protein renkli kurdele, DNA gri moleküler yüzey olarak gösterilmiştir.



Şekil 43. DNA-topoiomeraz II kompleksi ile iki boyutlu etkileşme diyagramları. **(a)** BODIPY-3a, **(b)** BODIPY-6a, **(c)** BODIPY-9a ve **(d)** BODIPY-12a. Mor: hidrojen bağı, yeşil: π - π istiflenme, kırmızı: π -kasyon etkileşmesi, mavi/kırmızı: tuz köprüsü

4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.5.1. *In vitro* Sitotoksite / Fototoksiste Çalışmaları

BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin HCT-116 hücre hattına karşı sitotoksik ve fototoksik etkileri MTT hücre canlılık testi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmaların sonuçları Tablo 10-15 ve Şekil 44-47’de verilmiştir.

Tablo 10. Bileşiklerin 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları

%Canlılık	100 µM	50 µM	10 µM	5 µM	1 µM	0.5 µM
BODIPY-3a	90±2.50	100±11.10	96±7.10	96±10.40	100±7.60	100±4.50
BODIPY-6a	57±4.30	67±2.30	88±6.20	91±4.00	100±4.80	100±4.40
BODIPY-9a	100±4.60	100±2.70	100±1.30	100±2.00	100±2.20	100±2.90
BODIPY-12a	81±4.80	100±6.40	100±5.00	100±5.50	100±4.80	100±4.20

Tablo 11. Bileşiklerin ışık varlığında 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları

%Canlılık	100 µM	50 µM	10 µM	5 µM	1 µM	0.5 µM
BODIPY-3a	66±0.50	85±1.90	99±5.10	100±6.00	100±6.30	100±2.90
BODIPY-6a	0	6±3.20	10±1.00	25±2.00	97±6.70	100±7.00
BODIPY-9a	85±2.90	100±4.90	98±7.10	99±5.30	98±1.80	100±5.40
BODIPY-12a	81±3.00	88±3.10	100±7.00	100±8.20	100±0.30	100±5.80

Tablo 12. Bileşiklerin 48 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları

%Canlılık	100 µM	50 µM	10 µM	5 µM	1 µM	0.5 µM
BODIPY-3a	46±2.86	74±3.01	96±3.18	100±5.52	100±5.17	100±1.94
BODIPY-6a	0	0	52±5.45	83±4.25	97±1.60	100±2.93
BODIPY-9a	26±2.16	39±2.66	76±3.53	98±4.53	99±4.53	100±2.17
BODIPY-12a	31±1.91	56±1.21	91±7.47	100±4.81	100±7.30	100±5.48

Tablo 13. Bileşiklerin ışık varlığında 48 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları

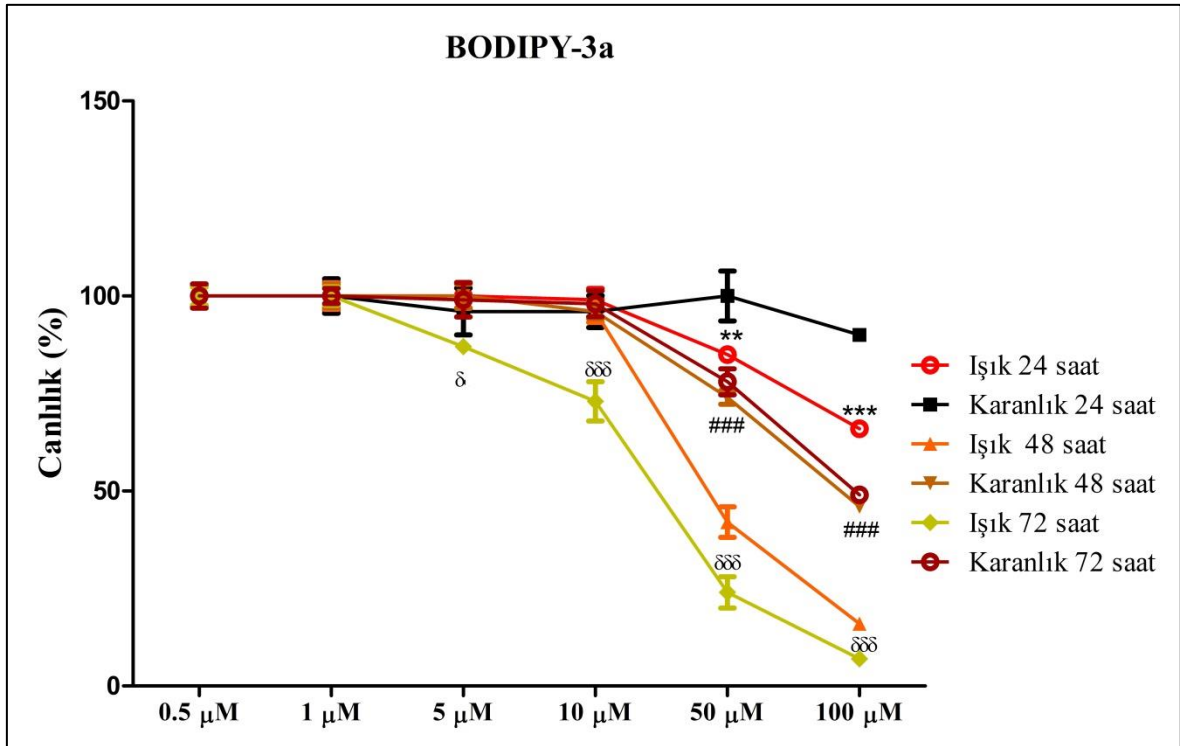
%Canlılık	100 µM	50 µM	10 µM	5 µM	1 µM	0.5 µM
BODIPY-3a	16±1.54	42±6.78	96±4.82	100±5.26	100±5.90	100±5.36
BODIPY-6a	0	0	2±0.20	3±0.27	33±7.52	91±9.85
BODIPY-9a	26±4.73	45±2.26	98±2.22	100±9.29	99±6.77	100±4.73
BODIPY-12a	28±1.00	44±1.47	80±4.87	95±2.99	97±3.80	98±8.23

Tablo 14. Bileşiklerin 72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları

%Canlılık	100 µM	50 µM	10 µM	5 µM	1 µM	0.5 µM
BODIPY-3a	49±2.01	78±5.79	98±5.75	99±7.57	100±3.40	100±5.42
BODIPY-6a	0	0	43±2.75	75±3.52	100±4.37	100±6.48
BODIPY-9a	26±2.22	54±3.89	89±4.74	94±3.12	100±5.71	100±2.40
BODIPY-12a	30±2.04	54±4.28	85±1.44	88±4.94	100±1.94	100±5.72

Tablo 15. Bileşiklerin ışık varlığında 72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları

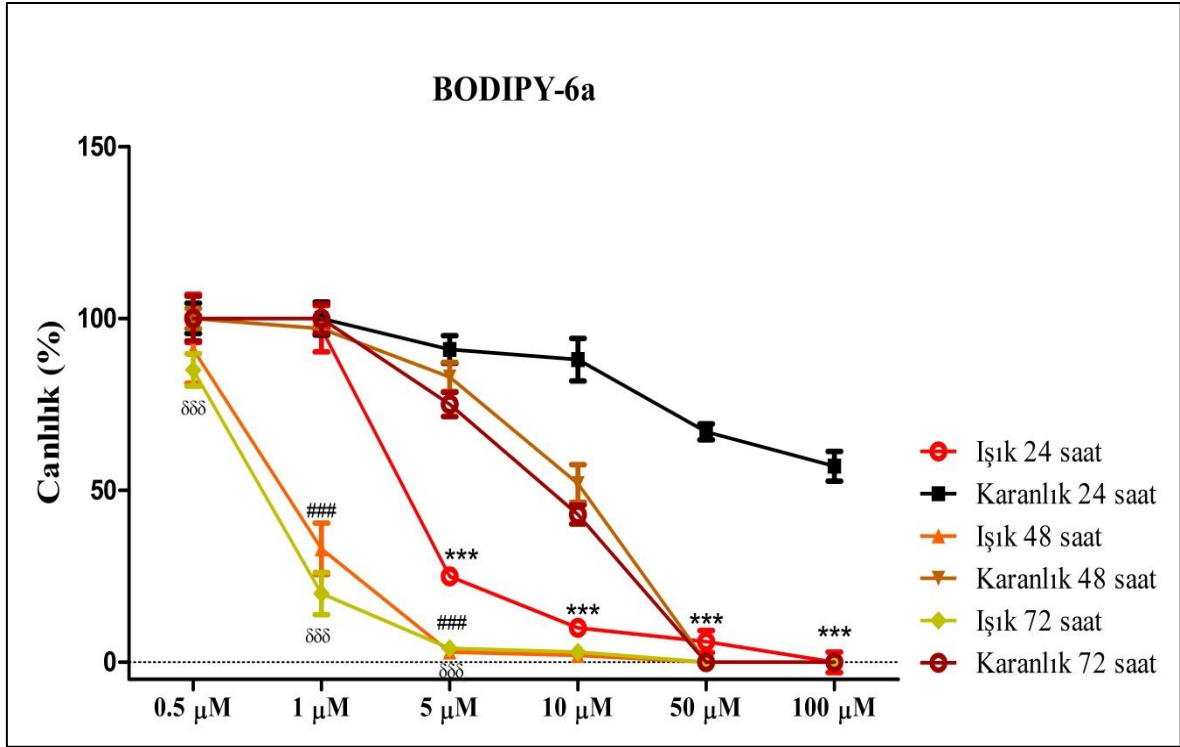
%Canlılık	100 μ M	50 μ M	10 μ M	5 μ M	1 μ M	0.5 μ M
BODIPY-3a	7 $\pm$ 1.00	24 $\pm$ 6.97	73 $\pm$ 8.77	87 $\pm$ 2.92	100 $\pm$ 4.10	100 $\pm$ 4.04
BODIPY-6a	0	0	3 $\pm$ 0.20	4 $\pm$ 0.28	20 $\pm$ 6.15	85 $\pm$ 4.75
BODIPY-9a	13 $\pm$ 3.47	16 $\pm$ 3.62	89 $\pm$ 9.43	100 $\pm$ 4.08	100 $\pm$ 2.50	100 $\pm$ 4.04
BODIPY-12a	16 $\pm$ 1.51	49 $\pm$ 4.93	63 $\pm$ 6.66	72 $\pm$ 2.04	86 $\pm$ 4.22	92 $\pm$ 2.99



Şekil 44. BODIPY-3a bileşiğinin karanlıkta ve ışık varlığında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ışık 24 saat ile karanlık 24 saatin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında; ### $p < 0.001$ ışık 48 saat ile ışık 24 saatin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında; $\delta\delta$ $p < 0.05$, $\delta\delta\delta$ $p < 0.001$ ışık 72 saat ile ışık 24 saatin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında.

Hücrelerin, karanlıkta 100 μ M BODIPY-3a bileşiği ile 24 saat inkübasyonu sonucunda %90 $\pm$ 2.50, ışık varlığında %66 $\pm$ 0.50 oranlarında canlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. 24 saat inkübasyon ardından ışık varlığında 50 ve 100 μ M'da hücre canlılığı karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0.001$, $p < 0.01$). 48 saat inkübasyon sonucunda ise karanlıkta 50 ve 100 μ M BODIPY-3a bileşiği varlığında

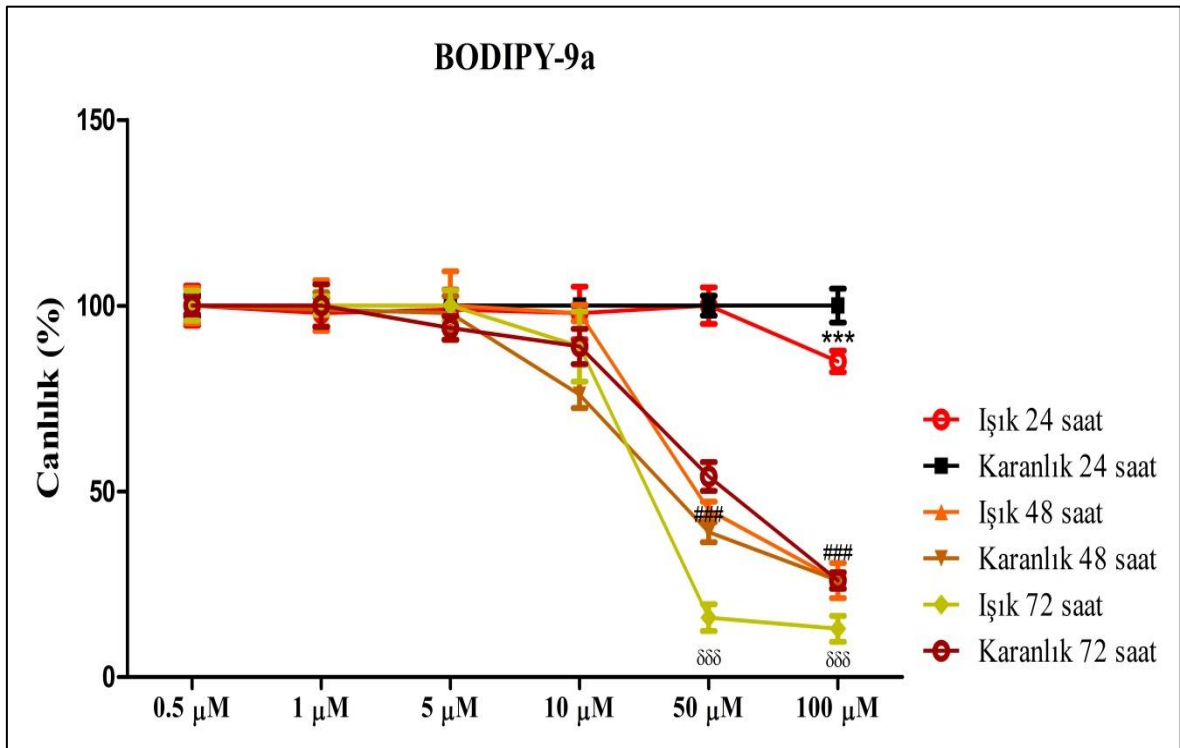
hücrelerin sırasıyla 74 ± 3.01 ve 46 ± 2.86 , ışık maruziyeti sonrasında ise 42 ± 6.78 ve 16 ± 1.54 oranlarında canlılığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Işık maruziyetinin ardından 72 saat sonrasında ise 5, 10, 50 ve 100 μM BODIPY-3a bileşiği varlığında hücrelerin sırasıyla 87 ± 5.75 , 73 ± 8.77 , 24 ± 6.97 ve 7 ± 1.00 oranlarında canlılığa sahip olduğu görülmüştür (Şekil 44).



Şekil 45. BODIPY-6a bileşiğinin karanlıkta ve ışık varlığında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları. *** $p < 0.001$ ışık 24 saat ile karanlık 24 saatin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında; ### $p < 0.001$ ışık 48 saat ile ışık 24 saatin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında; δδδ $p < 0.001$ ışık 72 saat ile ışık 24 saatin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında.

Hücrelerin, karanlıkta 10, 50 ve 100 μM BODIPY-6a bileşiği ile 24 saat inkübasyon sonucunda 88 ± 6.20 , 67 ± 2.30 ve 57 ± 4.30 oranlarında canlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Işık maruziyeti sonrasında ise 5 ve 10 μM 'da hücrelerin canlılığı 25 ± 2.00 ve 10 ± 1.00 oranlarında bulunmuştur. 24 saat inkübasyon ardından ışık maruziyeti sonrasında 5, 10, 50 ve 100 μM 'da hücre canlılığı karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0.001$). 48 saat inkübasyon sonucunda ise karanlıkta 50 ve 100 μM BODIPY-6a bileşiği varlığında hücrelerin tamamen öldüğü, 5 ve 10 μM 'da sırasıyla 83 ± 4.25 ve 52 ± 5.45 oranlarında canlılık olduğu belirlenmiştir. Işık maruziyeti

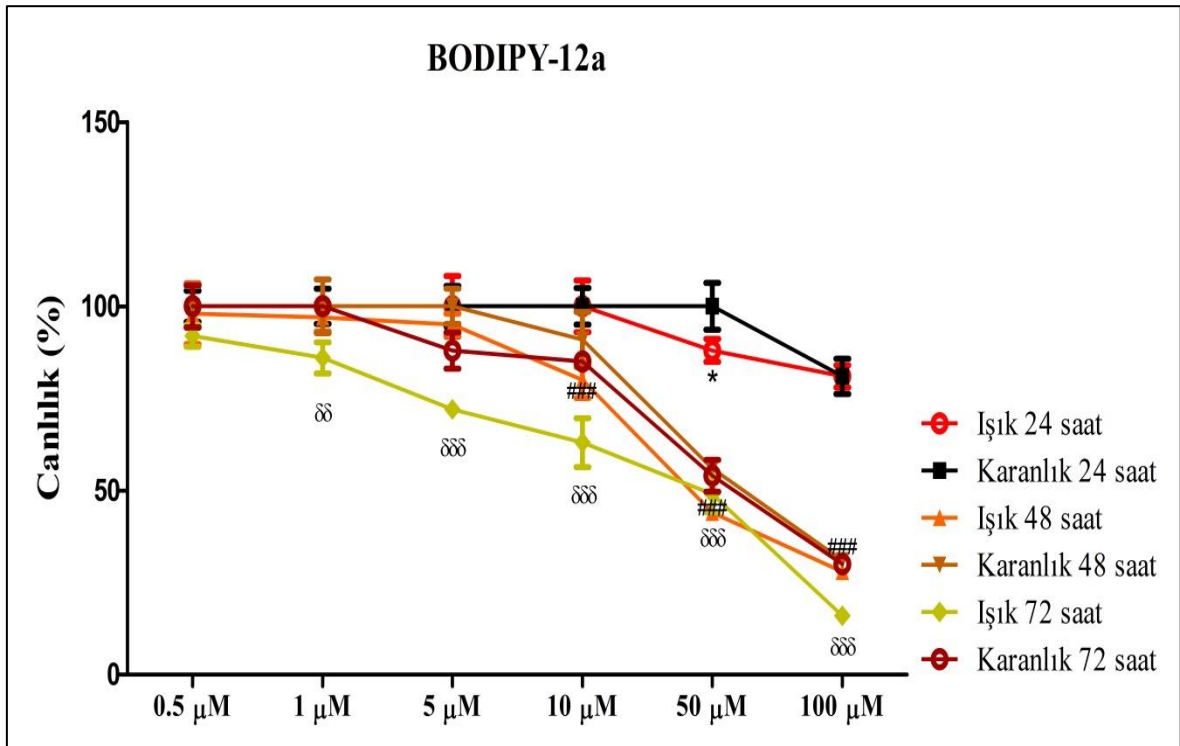
sonrasında ise 1, 5 ve 10 μM 'da hücre canlılığı sırasıyla 33 ± 7.52 , 3 ± 0.27 ve 2 ± 0.20 oranlarında bulunmuştur. Işık maruziyeti varlığında 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında 1 ve 5 μM 'da karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0.001$). 72 saat sonrasında ise karanlıkta 10 μM 'da 43 ± 2.75 , ışık maruziyeti sonrasında ise 1 μM 'da 20 ± 6.15 oranlarında hücre canlılığı tespit edilmiştir (Şekil 45). 72 saat inkübasyon sonucunda 1 μM 'da karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Bu sonuçlar BODIPY-6a bileşiğinin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak oldukça etkili fototoksik aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur.



Şekil 46. BODIPY-9a bileşiğinin karanlıkta ve ışık varlığında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları. *** $p < 0.001$ ışık 24 saat ile karanlık 24 saatin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında; ### $p < 0.001$ ışık 48 saat ile ışık 24 saatin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında; δδδ $p < 0.001$ ışık 72 saat ile ışık 24 saatin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında.

Hücrelerin, karanlıkta çalışılan tüm konsantrasyonlarda BODIPY-9a bileşiği ile 24 saat inkübasyon sonucunda dikkate değer hücre ölümü gözlenmemiştir. Işık varlığında ise 100 μM 'da hücrelerin canlılığının 85 ± 2.90 oranında olduğu tespit edilmiştir. 48 saat inkübasyon sonucunda ise karanlıkta 50 ve 100 μM BODIPY-9a bileşiği varlığında 39 ± 2.66 ve 26 ± 2.16 oranlarında canlılık bulunmuştur. Işık maruziyeti sonrasında ise

aynı konsantrasyonlarda hücre canlılığı sırasıyla 45 ± 2.26 ve 26 ± 4.73 oranlarında bulunmuştur. 48 saat inkübasyon sonrasında ışık varlığında hücre canlılığı karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 72 saat sonrasında ise karanlıkta $100 \mu\text{M}$ 'da 26 ± 2.22 , ışık maruziyetinden sonra ise 13 ± 3.47 oranlarında hücre canlılığı tespit edilmiştir (Şekil 46). 72 saat sonrası tespit edilen ışık varlığında hücre canlılığı karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0.01$).

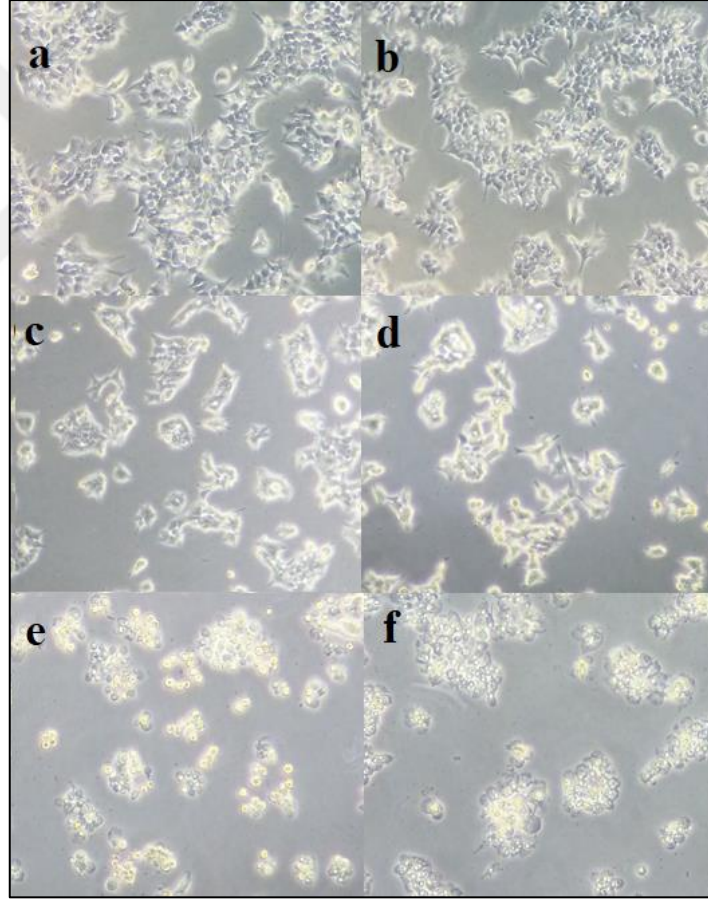


Şekil 47. BODIPY-12a bileşiğinin karanlıkta ve ışık varlığında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları. * $p < 0.05$ ışık 24 saat ile karanlık 24 saatin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında; ### $p < 0.001$ ışık 48 saat ile ışık 24 saatin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında; δδ $p < 0.01$, δδδ $p < 0.001$ ışık 72 saat ile ışık 24 saatin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında.

Hücrelerin, karanlıkta $100 \mu\text{M}$ 'da BODIPY-12a bileşiği ile 24 saat inkübasyon sonucunda 81 ± 4.80 oranında hücre canlılığı tespit edilmiştir. Işık maruziyeti sonrasında ise $100 \mu\text{M}$ 'da hücrelerin canlılığının 81 ± 3.00 oranında olduğu tespit edilmiştir. Bu iki sonuç arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. 48 saat inkübasyon sonucunda ise karanlıkta 50 ve $100 \mu\text{M}$ BODIPY-12a bileşiği varlığında 56 ± 1.21 ve 31 ± 1.91 oranlarında canlılık bulunmuştur. Işık maruziyeti sonrasında ise aynı konsantrasyonlarda hücre canlılığı sırasıyla 44 ± 1.47 ve 28 ± 1.00 oranlarında

bulunmuştur. 48 saat inkübasyon sonrasında ışık varlığında hücre canlılığı açısından 100 μM 'da karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamışken, 50 μM 'da istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p < 0.05$). 72 saat sonrasında ise karanlıkta 10 μM 'da $\%85 \pm 1.44$, ışık maruziyetinden sonra ise $\%63 \pm 6.66$ oranlarında hücre canlılığı tespit edilmiştir (Şekil 47).

Hücrelerin BODIPY-3a ve BODIPY-6a varlığında ışık maruziyeti sonrasında hücre morfolojisi faz kontrast mikroskop yardımıyla görüntülenmiş ve sonuçlar Resim 1'de verilmiştir. Resim 1'de de görüldüğü gibi hücreler bileşik varlığında ışık maruziyeti sonrasında kontrol grubuna göre büzülerek morfolojik değişikliklere uğramıştır. Bu durum hücre ölümünü ve apoptozu işaret etmektedir.



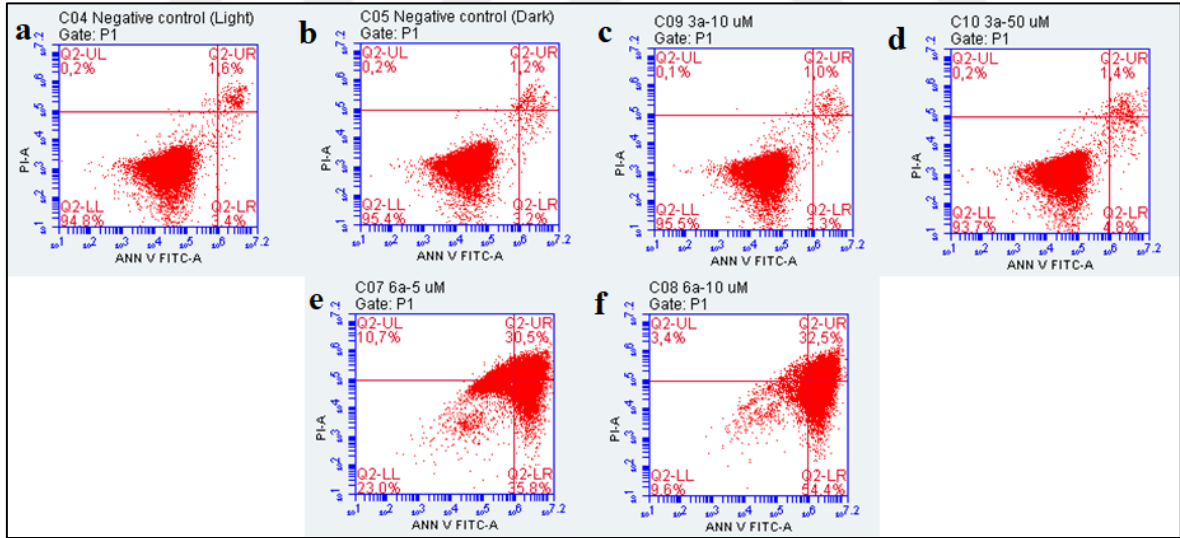
Resim 1. HCT-116 hücre hattında görülen morfolojik değişiklikler. (a) ışık varlığında (24 saat), (b) ışık yokluğunda (24 saat), (c) BODIPY-3a (10 μM), (d) BODIPY-3a (50 μM), (e) BODIPY-6a (5 μM) ve (f) BODIPY-6a (10 μM).

4.5.2. Anneksin V-FITC/PI Apoptoz Testi

Işık maruziyeti (beyaz, 17.5 mW/cm², 60 dakika) sonrasında BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşikleriyle 24 saat muamele edilen HCT-116 hücre serisindeki apoptotik etkinlik Anneksin V-FITC/PI kiti kullanılarak akış sitometresinde incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 16 ve Şekil 48’de verilmiştir.

Tablo 16. BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin Anneksin V-FITC/PI analizi sonuçları

	Canlılık	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz
Negatif Kontrol (Işık)	94.80	3.40	1.60	0.20
Negatif Kontrol (Karanlık)	95.40	3.20	1.20	0.20
BODIPY-3a (10 µM)	95.50	3.30	1.00	0.10
BODIPY-3a (50 µM)	93.70	4.80	1.40	0.20
BODIPY-6a (5 µM)	23.00	35.80	30.50	10.70
BODIPY-6a (10 µM)	9.60	54.40	32.50	3.40



Şekil 48. BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin Anneksin V-FITC/PI analizi. (a) negatif kontrol (ışık), (b) negatif kontrol (karanlık), (c) BODIPY-3a (10 µM); (d) BODIPY-3a (50 µM), (e) BODIPY-6a (5 µM) ve (f) BODIPY-6a (10 µM).

10 ve 50 µM BODIPY-3a bileşiğinin Anneksin V-FITC/PI analizi sonuçları MTT hücre canlılık testi ile uyumluluk göstermiş olup, çalışılan konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı hücre ölümü gözlenmemiştir. Sadece ışık maruziyeti sonrasında da hücre

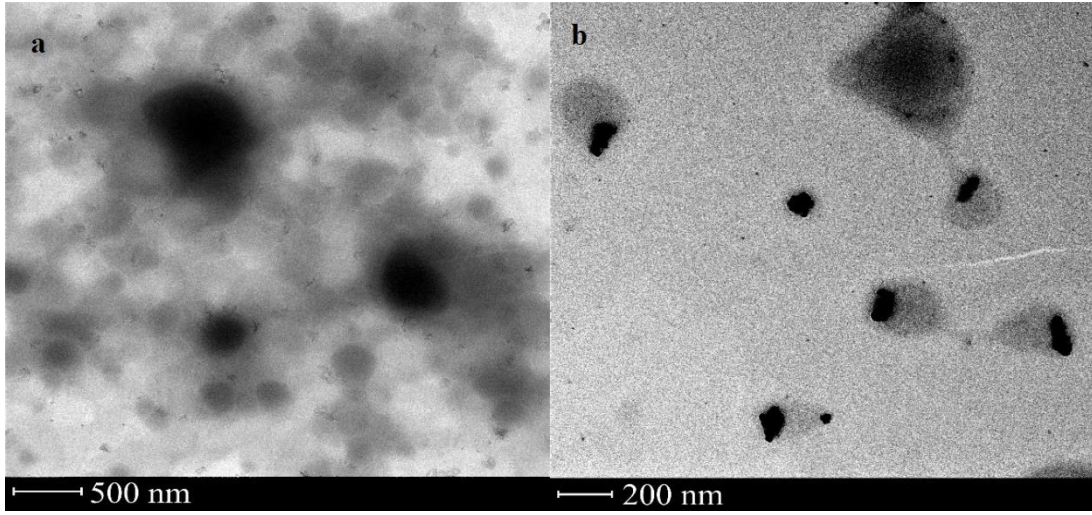
ölümü üzerine etkiye rastlanmamıştır. BODIPY-6a bileşiğinin Anneksin V-FITC/PI analizi sonucu ışık varlığında bileşiklerin konsantrasyona bağlı olarak HCT-116 hücrelerini apoptoza sürüklediği görülmüştür. 5 ve 10 μM 'da sırasıyla %66.30 ve %86.90 oranlarında apoptotik hücrelerin varlığı tespit edilmiştir. Işık maruziyeti sonrasında BODIPY-6a bileşiği varlığında canlı HCT-116 hücrelerinin miktarının azaldığı, nekrotik veya geç apoptotik ile erken apoptotik hücre sayısının arttığı görülmüştür (Şekil 48).

4.6. Bileşiklerin Nanotaşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

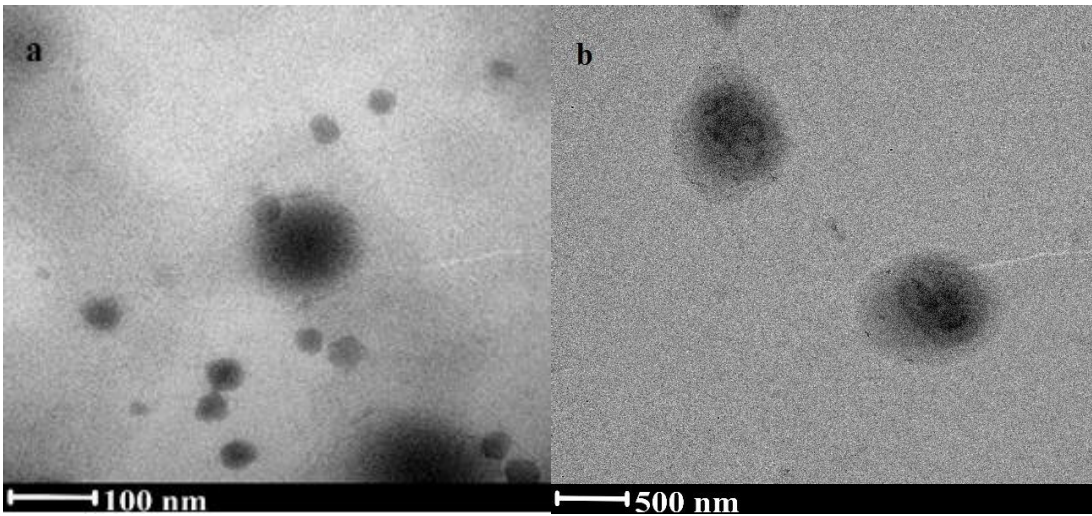
Bu çalışma kapsamında BODIPY-6a ve BODIPY-12a bileşiklerinin nanotaşıyıcı sistemlerinin hazırlanması ve karakterizasyonu çalışmaları Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. BODIPY-6a ve BODIPY-12a bileşiklerinin lipozom ve nanopartikül formülasyonlarına ait karakterizasyon sonuçları Tablo 17'de verilmiştir. Formülasyonların TEM görüntüleri Resim 2-3'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre BODIPY-6a bileşiğinin formülasyonlara enkapsülasyon etkinliği sırasıyla 70.33 ± 5.70 ve 59.15 ± 9.56 olarak belirlenmiştir. Formülasyonların partikül boyutu 219.7 ± 1.0 ve 206.0 ± 2.8 nm olarak belirlenmiştir. Formülasyonların polidispersite indeksi 0.196 ± 0.003 ve 0.216 ± 0.008 olarak bulunmuştur. Ayrıca zeta potansiyelleri $+8.42 \pm 0.25$ ve -20.70 ± 0.14 mV olarak hesaplanmıştır. Formülasyonların pH'sı 7.10 ve 7.20 olarak bulunmuştur. BODIPY-12a bileşiğinin formülasyonlara enkapsülasyon etkinliği sırasıyla 49.29 ± 9.30 ve 90.55 ± 0.65 olarak belirlenmiştir. Formülasyonların partikül boyutu 216.7 ± 1.0 ve 818.7 ± 8.7 nm olarak belirlenmiştir. Formülasyonların polidispersite indeksi 0.211 ± 0.004 ve 0.529 ± 0.011 olarak bulunmuştur. Ayrıca zeta potansiyelleri $+7.89 \pm 0.85$ ve -13.43 ± 0.26 mV olarak hesaplanmıştır. Formülasyonların pH'sı 6.90 ve 7.10 olarak bulunmuştur.

Tablo 17. Formülasyonların karakterizasyon çalışması sonuçları

Formülasyon	Formülasyon Karakterizasyon Çalışma Sonuçları				
	pH	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite indeksi	Zeta Potansiyeli (mV)
LpBODIPY-6a	7.10	70.33±5.70	219.7±1.0	0.196±0.003	+8.42±0.25
LpBODIPY-12a	6.90	49.29±9.30	216.7±1.0	0.211±0.004	+7.89±0.85
NpBODIPY-6a	7.20	59.15±9.56	206.0±2.8	0.216±0.008	-20.70±0.14
NpBODIPY-12a	7.10	90.55±0.65	818.7±8.7	0.529±0.011	-13.43±0.26



Resim 2. BODIPY-6a bileşiğinin lipozom (a) ve nanopartikül (b) TEM görüntüleri.



Resim 3. BODIPY-12a bileşiğinin lipozom (a) ve nanopartikül (b) TEM görüntüleri.

4.6.1. Formülasyonların *in vitro* Sitotoksitesi / Fototoksitesi

Çalışmamız kapsamında formülasyonları geliştirilen LpBODIPY-6a, NpBODIPY-6a, LpBODIPY-12a ve NpBODIPY-12a bileşiklerinin HCT-116 hücre hattına karşı *in vitro* sitotoksik ve fototoksik etkileri MTT hücre canlılık testi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmaların sonuçları Tablo 18-19 ve Şekil 49-50’te verilmiştir.

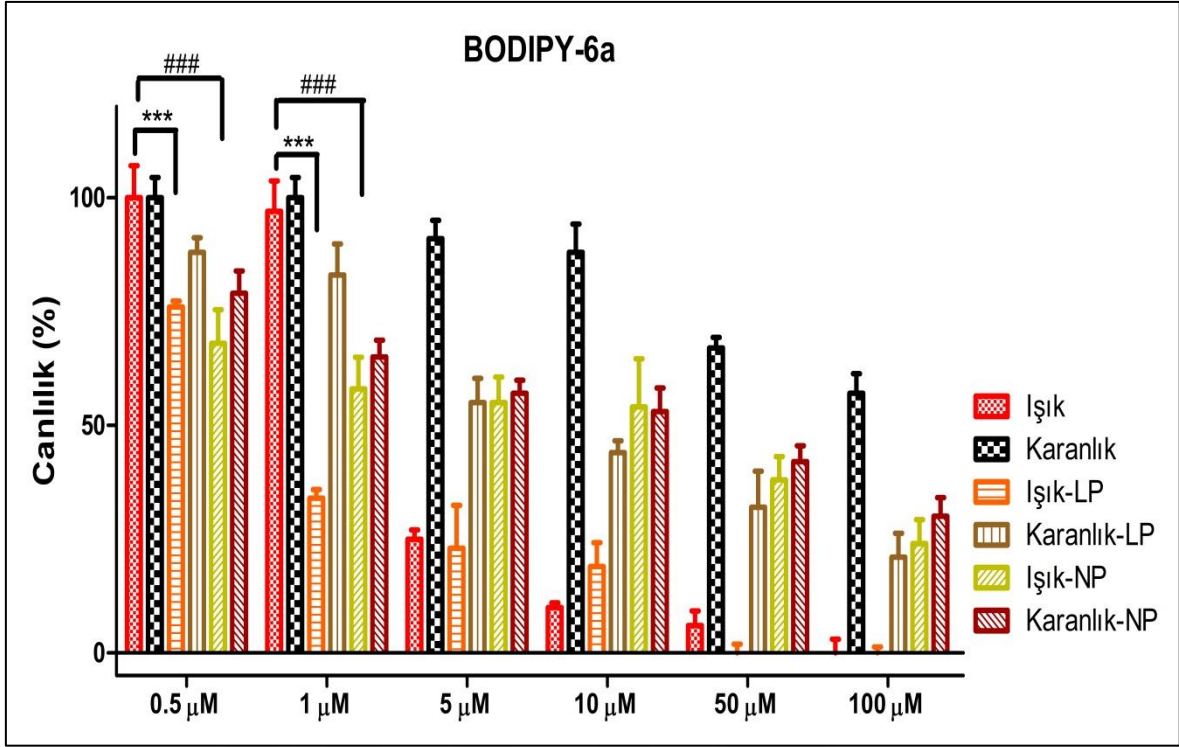
Tablo 18. Formülasyonların 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları

%Canlılık	100 μ M	50 μ M	10 μ M	5 μ M	1 μ M	0.5 μ M
LpBODIPY-6a	21 $\pm$ 5.30	32 $\pm$ 7.90	44 $\pm$ 2.60	55 $\pm$ 5.30	83 $\pm$ 6.80	88 $\pm$ 3.20
LpBODIPY-12a	58 $\pm$ 8.30	78 $\pm$ 8.90	90 $\pm$ 9.90	98 $\pm$ 13.00	94 $\pm$ 2.90	95 $\pm$ 0.70
NpBODIPY-6a	30 $\pm$ 4.10	42 $\pm$ 3.50	53 $\pm$ 5.20	57 $\pm$ 2.90	65 $\pm$ 3.70	79 $\pm$ 4.90
NpBODIPY-12a	45 $\pm$ 3.10	49 $\pm$ 4.90	45 $\pm$ 2.60	57 $\pm$ 3.20	81 $\pm$ 7.00	87 $\pm$ 6.30

Table 19. Formülasyonların ışık varlığında 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları

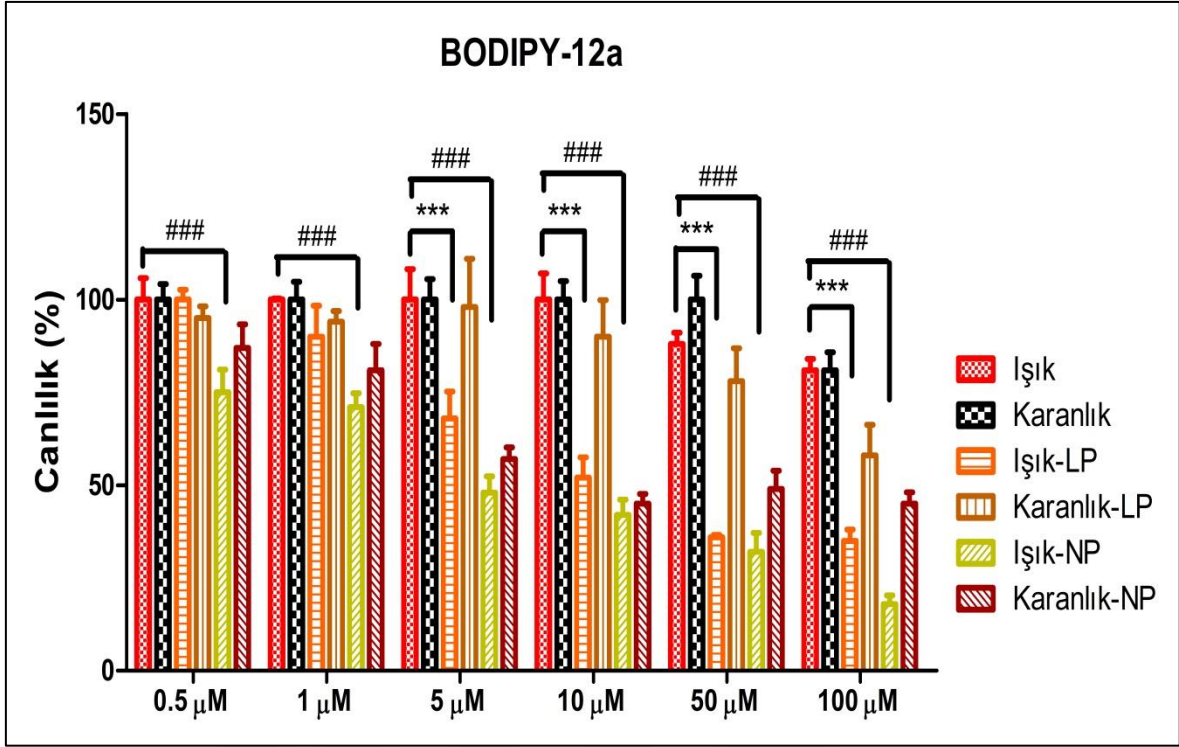
%Canlılık	100 μ M	50 μ M	10 μ M	5 μ M	1 μ M	0.5 μ M
LpBODIPY-6a	0	0	19 $\pm$ 5.20	23 $\pm$ 9.40	34 $\pm$ 1.90	76 $\pm$ 1.30
LpBODIPY-12a	35 $\pm$ 3.00	36 $\pm$ 0.60	52 $\pm$ 5.50	68 $\pm$ 7.20	90 $\pm$ 8.30	100 $\pm$ 2.60
NpBODIPY-6a	24 $\pm$ 5.30	38 $\pm$ 5.10	54 $\pm$ 10.60	55 $\pm$ 5.60	58 $\pm$ 6.90	68 $\pm$ 7.40
NpBODIPY-12a	18 $\pm$ 2.30	32 $\pm$ 5.10	42 $\pm$ 4.10	48 $\pm$ 4.40	71 $\pm$ 3.80	75 $\pm$ 6.10

Hücrelerin, karanlıkta 5, 10, 50 ve 100 μ M LpBODIPY-6a bileşiği ile 24 saat inkübasyon sonucunda %55 $\pm$ 5.30, %44 $\pm$ 2.60, %32 $\pm$ 7.90 ve %21 $\pm$ 5.30 oranlarında canlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Işık maruziyeti sonrasında 10 μ M’da hücrelerin canlılığı %19 $\pm$ 5.20 oranında bulunurken, 50 ve 100 μ M’da tamamen hücre ölümü gerçekleşmiştir. 24 saat inkübasyon ardından ışık maruziyeti sonrasında 1, 5, 10, 50 ve 100 μ M’da karanlığa göre hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0.001$). Karanlıkta 5 ve 10 μ M NpBODIPY-6a bileşiği ile 24 saat inkübasyon sonucunda %57 $\pm$ 2.90 ve %53 $\pm$ 5.20 oranlarında hücrelerin canlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Işık maruziyeti sonrasında ise aynı konsantrasyonlarda hücre canlılığı %55 $\pm$ 5.60 ve %54 $\pm$ 10.60 oranlarında bulunmuştur. Işık maruziyeti sonrası hücre canlılığındaki azalış karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 49).



Şekil 49. Formüle edilen ve edilmeyen BODIPY-6a bileşiğinin karanlıkta ve ışık varlığında 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları. *** $p < 0.05$ Işık ile Işık-Lp'nin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında; ### $p < 0.001$ Işık ile Işık-Np'nin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında.

Hücrelerin, karanlıkta 5, 10, 50 ve 100 μM LpBODIPY-12a bileşiği ile 24 saat inkübasyon sonucunda 98 ± 13.00 , 90 ± 9.90 , 78 ± 8.90 ve 58 ± 8.30 oranlarında canlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Işık maruziyeti sonrasında ise aynı konsantrasyonlarda 68 ± 7.20 , 52 ± 5.50 , 36 ± 0.60 ve 35 ± 3.00 oranlarında hücre canlılığı tespit edilmiştir. 24 saat inkübasyon ardından ışık maruziyeti sonrası 5, 10, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı azalış görülmüştür ($p < 0.001$). Karanlıkta 50 ve 100 μM NpBODIPY-12a bileşiği ile 24 saat inkübasyon sonucunda 49 ± 4.90 ve 45 ± 3.10 oranlarında hücrelerin canlılığa sahip olduğu belirlenmiştir. Işık maruziyeti sonrasında ise aynı konsantrasyonlarda hücre canlılığı 32 ± 5.10 ve 18 ± 2.30 olarak bulunmuştur. Işık maruziyeti sonrası hücre canlılığı açısından azalış karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$, $p < 0.001$) (Şekil 50).



Şekil 50. Formüle edilen ve edilmeyen BODIPY-12a bileşiğinin karanlıkta ve ışık varlığında 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin % canlılık oranları. *** $p < 0.05$ Işık ile Işık-Lp'nin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında; ### $p < 0.001$ Işık ile Işık-Np'nin aynı konsantrasyonları kıyaslandığında.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kolorektal kanserin, kanser türleri arasında en yaygın üçüncü ve onkolojik hastalıklarda ölüm oranının ikinci sırada olduğu bilinmektedir. Bu hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçların ciddi gastrointestinal sorunlar, hematolojik, nöronal, dermatolojik ve kardiyak yan etkilere sahip olduğu düşünüldüğünde, bu hastalık karşısında yeni stratejiler ve moleküller geliştirmek bilim insanlarının öncelikleri arasında yer almaktadır (1). Bu alternatif tedavi stratejilerinden biri olan PDT fotoduyarlastırıcı, oksijen ve ışık varlığında selektif olarak tümör dokusunu yok etmesi ve düşük yan etki profiline sahip olması nedeniyle son yıllarda ilgi çekici bir alan olmaya başlamıştır (8).

Yüksek floresans özelliklerinden dolayı görüntüleme ajanı olarak kullanılan BODIPY ve türevleri son yıllarda yüksek absorpsiyon katsayısı, yüksek saflıkta sentezlenebilme, singlet oksijen verimine sahip olabilme, toksik olmayan çözücülerde çözünebilme, hücre içine kolay alınım, karanlıkta düşük toksisite gibi özelliklerinden dolayı da PDT’de kullanılan fotoduyarlastırıcı olarak kullanılmaya başlanmıştır (10). Özellikle suda çözünebilir fotoduyarlastırıcı bileşiklerin vücut içerisinde biyodağılımı ve biyoyumluluğu arttırdığından dolayı biyomedikal uygulamalarda kullanılması oldukça kıymetlidir.

Bu çalışma kapsamında kullanılan BODIPY bileşiklerinin PDT için uygun fotoduyarlastırıcı bileşikler olup olmadığını belirlemek amacıyla ilk olarak fotokimyasal çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Singlet oksijen kuantum verimi değerlerinin iyi bir fotoduyarlastırıcıyı tanımlamak için göz önünde bulundurulmuş en önemli parametrelerden biri olduğu bilinmektedir (178). Bu nedenle BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin DMSO ve TBS içerisindeki singlet oksijen kuantum verimleri singlet oksijen söndürücü olan DPBF (DMSO için) ve ADMA (TBS için) kullanılarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak MB kullanılmıştır. DPBF’nin absorpsiyon değişimi zaman ile lineer korelasyon göstermiştir. DPBF’nin singlet oksijen söndürücü etkisi kullanılarak BODIPY-3a bileşiğinin DMSO içerisindeki singlet oksijen kuantum verimi 0.62 olarak belirlenmiştir. Bu sonucun pozitif kontrol olarak kullanılan MB’den daha yüksek bir değer olduğu görülmektedir. BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin DMSO içerisindeki singlet oksijen kuantum verimleri sırasıyla 0.46, 0.16 ve 0.27 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar piridinyum grubu içeren bileşiklerin daha yüksek singlet oksijen kuantum verimine sahip olduğunu göstermiştir. BODIPY-3a bileşiğinin

yapısal olarak 6 adet piridinyum grubu bulundurmasının, yapının konjugasyonunu artırdığı ve bu nedenle de yüksek singlet oksijen kuantum verimine sahip olduğu düşünülmektedir. ADMA'nın singlet oksijen söndürücü etkisi kullanılarak BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin TBS içerisindeki singlet oksijen kuantum verimleri 0.30, 0.21, 0.07 ve 0.13 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar DMSO'da çözünen bileşiklerin suda çözünen bileşiklere göre yaklaşık 2 kat daha fazla singlet oksijen kuantum verimine sahip olduğunu göstermektedir. Bunun nedenlerinden birisinin kullanılan çözücünün dielektrik sabiti ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Polarite arttıkça sistemler arası geçiş halinde meydana gelen değişikliklerden dolayı singlet oksijen oluşumu azalmaktadır (179,180). Ayrıca suda çözünen bileşiklerin agregasyon göstermeleri singlet oksijen kuantum verimlerini düşürebilmektedir (158). Wang ve arkadaşlarının sentezledikleri 3 ve 5 numaralı pozisyonlardan bağlı suda çözünür piridinyum grubu içeren iki adet BODIPY bileşiğinin singlet oksijen kuantum verimleri 0.10 ve 0.22 olarak bulunmuştur (149). Caruso ve arkadaşlarının sentezledikleri 8 numaralı pozisyondan bağlı piridin grubu içeren iki adet BODIPY bileşiğinin singlet oksijen kuantum verimleri 0.83 ve 0.02, aynı pozisyondan bağlı piridinyum grubu içeren 2 adet katyonik BODIPY bileşiğinin singlet oksijen kuantum verimleri ise 0.09 ve 0.18 olarak bulunmuştur (178). Agazi ve arkadaşlarının sentezledikleri 8 numaralı pozisyondan bağlı trimetilamino grubu içeren 2 adet katyonik BODIPY bileşiğinin singlet oksijen kuantum verimleri 0.07 ve 0.03 olarak hesaplanmıştır (181). Literatür sonuçlarıyla kıyaslandığında BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin yüksek singlet oksijen kuantum verimine sahip olmasının, süstitüent gruplardaki piridinyum gruplarının konjugasyonu arttırdığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Fotobozunma, fotoduyarlastırıcı maddelerin ışık altında bozunduğu bir süreçtir. Fotoduyarlastırıcıların fotokararlılığını belirlemek, PDT gibi fotokatalitik reaksiyonlar için oldukça önemlidir (182). İdeal bir fotoduyarlastırıcı bileşiğin, tedavi süresince kanserli dokuda bozunmadan kalması gerekmektedir. Bu çalışma kapsamında suda çözünür BODIPY bileşikleri 60 dakika süreyle beyaz ışığa maruz bırakılmıştır. Her 10 dakikada UV-Vis spektrumları alınmış ve absorbanlarındaki değişim gözlenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında uygulanan şartlar sağlanarak bileşiklerin bozunmaya uğrayıp uğramadıklarının tespiti gerçekleştirilmiştir. Işık maruziyeti sonrasında absorban değişimi dikkate alınarak gerçekleştirilen hesaplama sonucunda BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin sırasıyla %81.32, %82.29, %77.15 ve %79.54

oranlarında bozunmadan ortamda kaldığı belirlenmiştir. Sonuçlar mono stiril bileşiklerin distiril bileşiklerden daha yüksek fotokararlılığa sahip olduğunu göstermiştir. Banfi ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada 50 W yeşil led ışık kullanarak 4,7-dimetoksi-nafta grubu içeren üç adet bileşiğin 60 dakika sonunda fotobozunma yüzdeleri ~ %60, %50 ve %65 olarak hesaplanmıştır (159). Bu bileşiklerle kıyaslandığında çalışmamızda kullandığımız piridinyum ve dimetilamino grubu içeren BODIPY bileşiklerinin fotokararlılığının daha yüksek olduğunu görmekteyiz.

DNA, canlı organizmalarda genetik bilginin depolandığı biyomoleküldür. Gen mutasyonlarında, onarım mekanizması bozukluklarında, kontrolsüz hücre çoğalmasında önemli rol oynamaktadır (11). DNA’da gerçekleşen geri dönüşümsüz değişiklikler kanserin oluşumunda oldukça etkilidir. Bu sebeple, DNA antikanser ilaç tasarımı, DNA ile bileşiklerin etkileşiminin belirlenmesi oldukça önemlidir (12). Bileşikler DNA’ya kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimler ile bağlanmaktadır. Kovalent bağlanmada bileşikler DNA’nın bazıları ile geri dönüşümsüz etkileşime uğrarken, kovalent olmayan bağlanmada ise elektrostatik, interkalasyon, kısmi interkalasyon ve oluğa bağlanma gibi etkileşimler meydana gelmektedir. Elektrostatik etkileşimler bileşiklerin pozitif yükü ile DNA’nın eksi yüklü olan fosfat grupları arasında gerçekleşmektedir. İnterkalasyon türü etkileşimde ise bileşikler DNA bazlarının arasına yerleşerek DNA’nın kararlılığını değiştirmektedir. Oluğa bağlanmada ise bileşikler van der Waals, hidrofobik veya hidrojen bağları yardımıyla DNA’nın dış yüzeyine bağlanır. Kısmi interkalasyon durumunda ise bileşiklerin ana iskeletlerinin oluğa bağlanıp yan grupların interkalasyon türünde etkileşim yaptığı bilinmektedir (133,161,183). Bu çalışma kapsamında BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin CT-DNA ile bağlanma modlarının belirlenmesi için UV-Vis absorpsiyon, yarışmalı EB bağlanma, viskozimetri ve elektroforez yöntemleri kullanılmıştır. TBS içerisindeki BODIPY-3a, BODIPY-6a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin absorpsiyon spektrumlarında artan CT-DNA ilavesiyle meydana gelen değişiklikler incelendiğinde hipokromizm gerçekleştiği belirlenmiştir. Bileşiklerin K_b sabitleri sırasıyla $1.59 \pm (0.18) \times 10^3$, $1.87 \pm (0.20) \times 10^4$, $5.18 \pm (0.15) \times 10^3$ ve $2.88 \pm (0.05) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bileşikler içerisinde en yüksek K_b değerinin BODIPY-6a bileşiğine ait olduğu tespit edilmiştir. Deney şartlarında pozitif kontrol olarak kullanılan EB bileşiği 52.23 ± 1.50 oranında hipokromizm, $1.93 \pm (0.07) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ K_b değeri göstermiştir. EB bileşiğinin çalışmada kullanılan tüm bileşiklerden daha kuvvetli şekilde CT-DNA etkileşimi gösterdiği belirlenmiştir.

Yarışmalı bağlanma çalışmasında interkalatif ajan olarak bilinen EB bileşiği kullanılarak BODIPY bileşiklerin CT-DNA ile etkileşimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada ilk olarak EB bileşiğinin absorpsiyon spektrumu ölçülmüştür. Daha sonra EB bileşiğine 1:1 oranında CT-DNA ilave edildiğinde (EB-(CT-DNA)) kompleksi oluşup, $\pi-\pi^*$ geçiş enerjisinin düşmesi nedeniyle hipokromizm ve kırmızıya kayma gözlenmiştir. Daha sonra bu kompleks üzerine BODIPY bileşiklerinin farklı konsantrasyonları ilave edilip spektrumundaki değişimler gözlenmiştir. Bileşiklerin ilavesinin ardından Şekil 29'da da görüldüğü gibi oluşan komplekslerin absorbanlarında dikkate değer artışlar tespit edilememiştir. Bu durum bileşiklerin CT-DNA ile interkalasyon türünde etkileşim yapmadıklarını kanıtlamaktadır. Eğer kullanılan bileşikler güçlü bir interkalatif ajan olsaydı EB bileşiğinin yerini alır bu durumda da absorbanlarında ciddi bir artış gözlenmesi beklenirdi.

Bileşikler ile CT-DNA'nın bağlanma modunun belirlenmesinde kullandığımız yöntemlerden biri de viskozite çalışmasıdır. İnterkalatif ajanların DNA'nın bazıları arasına girmesi DNA'nın uzamasını sağlayarak viskozitesini arttırdığı bilinmektedir (184). Bununla birlikte interkalatif olmayan ajanların varlığında ise CT-DNA'nın kırılması ve bükülmesi sağlanarak viskozitesinin azalmasına sebep olmaktadır (185). Bu çalışmamızda bileşiklerin artan konsantrasyonları CT-DNA çözeltisi üzerine ilave edilmiş ve CT-DNA'nın viskozitesinin değişmediği belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan EB bileşiğinin artan konsantrasyonları ilave edildiğinde ise CT-DNA'nın viskozitesinin arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, bileşiklerin CT-DNA ile kovalent olmayan etkileşimler gerçekleştirdiğini kanıtlamaktadır.

Son olarak agaroz jel elektroforez tekniği kullanılarak BODIPY bileşiklerinin CT-DNA ile bağlanma modu incelenmiştir. Bu çalışmada CT-DNA konsantrasyonu sabit tutulup, bileşiklerin artan konsantrasyonları ilave edilmiş ve CT-DNA'nın agaroz jel üzerindeki yoğunluğu incelenmiştir. Bileşikler CT-DNA ile kuvvetli etkileşim gerçekleştirdiklerinde, CT-DNA'yı doygunluğa ulaştırıp elektroforez jeli üzerindeki görünürlüğünü azaltır (186,187). Sonuçlar incelendiğinde BODIPY-6a bileşiğinin CT-DNA'nın görünürlüğünü azalttığı belirlenmiştir. Bu durum bileşiklerin CT-DNA bağlanma sabiti değerleri ile uyum göstermektedir.

Tüm gerçekleştirilen bağlanma çalışmaları sonucunda bileşiklerin K_b sabitlerinin 10^5 mertebesinde küçük olması, dalga boyunda yüksek kırmızıya kayma gözlenmemesi,

yarışmalı EB bağlanma deneyinde absorbanslarındaki düşük artış, CT-DNA viskozitesinin artmaması nedeniyle bileşiklerin CT-DNA'ya bağlanmasının kovalent olmayan etkileşimlerle gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Zhao ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmada imidazolyum grubu içeren iki BODIPY bileşiğinin yüksek hipokromizm ve kırmızıya kayma göstermesinden dolayı bileşiklerin CT-DNA ile interkalasyon türünde bir etkileşim gerçekleştirdiklerini ortaya koymuştur (150). Wang ve arkadaşları ise UV-Vis absorpsiyon spektrofotometre ve viskozimetre ile gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda piridinyum grubu içeren BODIPY bileşiğinin CT-DNA ile interkalasyon türünde etkileştiklerini ortaya koymuşlardır (149). Bu çalışmada kullanılan bileşiklerin yapılarının büyük olması nedeniyle, interkalatif olmayan bir etkileşim gösterdikleri düşünülmektedir.

DNA zincirinin kesimi DNA'nın modifikasyonunu başarmak ve kanser gelişimini önlemek için önemli yöntemlerden biridir. DNA üzerinde yaratılacak hasar ile replikasyonu ve transkripsiyonu önleyerek hücre apoptoza veya nekroza sürüklenip kanserli hücrelerin kontrolsüz çoğalmasının önlenebileceği düşünülmektedir (11). DNA'nın nükleaz aktivitesi 3 farklı mekanizma üzerinden gerçekleşebilmektedir. Bunlar, fosfodiester bağlarının hidroliziyle gerçekleşen hidrolitik kesim, deoksiribozun veya bazın oksidasyonu ile gerçekleşen oksidatif kesim ve son olarak ışık varlığında oksidasyon ile gerçekleşen fotokesimdir (115).

Bileşiklerin nükleaz aktivitesini belirlemek için agaroz jel elektroforez yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır (188, 189). Bu yöntem, bir elektriksel alanda, çözünmüş durumdaki biyomoleküllerin elektrik yüklerinin, kütlelerine oranıyla belirlenen hızda göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Elektrik alandaki moleküler göç, genellikle molekülün büyüklüğünden, şeklinden ve kimyasal yapısından etkilenmektedir. DNA negatif yüklü olduğundan elektrik alana yerleştirildiğinde anoda doğru göç etmektedir. Bu göçe elektrik alanın gücü, agaroz jel ve tamponun yoğunluğu ve DNA'nın büyüklüğü etki etmektedir. Bu çalışma kapsamında BODIPY bileşiklerinin nükleaz aktivitesini belirlemek için süpersarmal pBR322 plazmid DNA kullanılmıştır. Süpersarmal pBR322 plazmid DNA elektroforeze maruz bırakıldığında, Sc'nin en hızlı göç ettiği bilinmektedir. Maddelerle ya da ışıkla etkileşim sonrası tek bir zincirde hasar meydana geldiğinde Nc oluşur ve bu formun göç etmesi en uzundur. Çift zincirde hasar meydana gelirse Lc oluşur. Oluşan form, Sc ve Nc'nin arasında olacak şekilde göç eder (189).

Bu çalışma kapsamında bileşiklerin PDT’de kullanılabilirliğini belirlemek için ışık varlığında ve yokluğunda DNA nükleaz etkileri incelenmiştir. 60 dakikalık inkübasyon sonrasında bileşiklerde dikkate değer hidrolitik nükleaz aktivitesi gözlenmemiştir. Işık varlığında (beyaz, 17.5 mW/cm², 30 dakika) ise bileşiklerin oldukça etkili nükleaz aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Bileşiklerin konsantrasyona bağlı şekilde DNA üzerinde hasar yarattıkları tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan bileşikler arasında en yüksek fotonükleaz aktiviteyi BODIPY-3a bileşiği göstermiştir. Bileşikler arasında en düşük fotonükleaz aktiviteye ise BODIPY-9a bileşiğinin sahip olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar singlet oksijen kuantum verimi ile fotonükleaz aktivitesi arasında paralellik olduğunu göstermiştir. Bileşiklerin oksidatif nükleaz etkilerinin incelenmesi amacıyla H₂O₂, AA ve ME ajanları kullanılmıştır. Karanlıkta aktivatör bileşiklerin nükleaz aktivite yaratmadığı belirlenmiştir. BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin H₂O₂ varlığında oksidatif nükleaz aktivite gösterdiği belirlenirken, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin dikkate değer aktiviteler göstermediği tespit edilmiştir. Işık varlığında gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda bileşiklerin oldukça yüksek oksidatif fotonükleaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bileşiklerin en iyi oksidatif fotonükleaz etkinliği ise, H₂O₂ aktivatörü varlığında gözlenmiştir. Elde edilen oksidatif fotonükleaz sonuçlarının, bileşiklerin singlet oksijen kuantum verimleriyle uyumlu olduğu görülmüştür. Işıkla uyarılan bileşikler tarafından üretilen singlet oksijenler, aktivatör ajanların radikal oluşturmaya ve bunun sonucunda da bileşiklerin daha etkili fotonükleaz aktivite göstermelerine neden olmaktadır. Wang ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada piridinyum grubu içeren iki adet BODIPY bileşiğinin singlet oksijen ve hidroksil radikali üreterek DNA fotonükleaz aktivitesi gösterdiğini, sonuçların DNA bağlanma ve singlet oksijen kuantum verimleriyle ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (149). Daha önce grubumuzun gerçekleştirdiği çalışmada ise suda çözünür morfolin dimetilamino ve dietilamino grupları içeren BODIPY bileşiklerinin etkili DNA fotonükleaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (151).

Topoizomeraz enzimleri, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda DNA’nın gevşemesini ve kıvrılmasını sağlayarak DNA replikasyonunda, transkripsiyonunda ve kromatinin yeniden modellenmesinde etkilidir (13). Kanseri hücrelerinde topoizomeraz enzimlerinin ekspresyonunun arttığı, bu enzimlerin kontrolsüz hücre bölünmesinde önemli rollerinin olduğu yapılan çalışmalarda görülmektedir. Klinikte çeşitli kanser türlerinde kullanılan topoizomeraz inhibitörleri ciddi yan etkilere sahiptirler. Topoizomeraz

enzimlerinin çoğalma proseslerinde önemli rol oynaması ve mevcut klinikte kullanılan ilaçların ciddi yan etkilere sahip olması bilim insanlarını alternatif arayışlara sürüklemektedir. Weijer ve arkadaşları yayınladıkları çalışmada fotoduyarlastırıcı akriflavin maddesinin topoizomerez I ve II inhibitörü etkisinin, PDT'deki terapötik etkinliğini arttırdığını göstermişlerdir (190). Montazerabadi ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışmada ise meme ve prostat kanserleri tedavisinde kullanılan ve topoizomerez II inhibitörü olduğu bilinen mitoksantron isimli fotoduyarlastırıcı bileşiğin MCF-7 hücre hattında etkili *in vitro* PDT etkisi gösterdiği ortaya konulmuştur (191). Literatürdeki bu bilgiler doğrultusunda PDT'de kullanılabilen ajanların topoizomerez inhibitör etkilerinin var olmasının PDT'nin etkinliğini arttıracığı düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında BODIPY bileşiklerinin topoizomerez I ve II inhibisyon etkileri agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak incelenmiştir. İlk olarak DNA kontrolü incelendiğinde süpersarmal formda olduğu görülmekteyken, topoizomerez I ve II enzimleri ilave edildiğinde DNA'nın kırık ve lineer forma dönüştüğü tespit edilmiştir. Bileşiklerin ilave edilmesinin ardından kırık ve lineer formun bant yoğunluğunun azaldığı, süpersarmal formun ise arttığı belirlenmiştir. Süpersarmal formun bant yoğunluğundaki değişime göre BODIPY-3a bileşiğinin en yüksek topoizomerez I ve II inhibitör etkisine sahip olduğu görülmüştür.

DNA çift sarmalında oluşan düğümleri, sarmallardan birini kırarak çözen ve böylelikle düğümden kaynaklı gerilimi rahatlatarak DNA'yı tekrar onaran 765 amino asitli insan topoizomerez I enzimi azot terminali, merkez, bağlayıcı ve karbon terminali olmak üzere dört bölgeden oluşur. Aktif bölge rezidülerinin neredeyse tamamı merkez bölgede bulunur (192). Bugüne kadar tanımlanan insan DNA-topoizomerez I kompleksi kristal yapılarında enzimin kovalent bağlandığı DNA çift sarmalını tamamen çevrelediği ve aktif bölge rezidülerinin kesilecek fosfat gruplarının üzerinde yer aldığı gösterilmiştir. DNA sarmallarından birinin kırılması topoizomerez I aktif bölgesinde yer alan Tyr723 rezidüsü ile buna yakın bir DNA fosfodiester bağı arasında oluşan transesterifikasyon ile gerçekleşir ve böylelikle kovalent 3'-fosfotirozil geçiş kompleksi oluşur. Topoizomerez I zehirleri olarak da adlandırılan kamptotesin ve topotekan gibi yarışmasız topoizomerez inhibitörü antikanser bileşikler bir baz çifti gibi davranarak bu geçiş kompleksine DNA sarmalının kırıldığı yerden iki baz çiftinin arasına sokularak bağlanır (interkalasyon). Normalde DNA üzerindeki gerilimin ortadan kalkmasıyla hızlı bir şekilde sarmal tekrar bağlanır ve geçiş

kompleksi ayrılır; ancak topoizomerez zehirleri geçiş kompleksini daha da kararlı hale getirerek sarmalın tekrar bağlanması ve DNA'nın enzimden ayrılmasını önler (193,194).

Mevcut topoizomereaz I-DNA kompleksi kristal yapılarından en iyi çözünürlüğe sahip olan 1K4T yapısında yer alan topotekanın enzim aktif bölgesindeki iki baz çiftinin arasına sokularak aşağı akış (-1) baz çiftini enzim aktif bölgesinden ötelediği ve iki fosfat arasındaki mesafeyi açtığı görülmektedir (165). Bu kristal yapının ligand içermeyen versiyonunda (PDB kodu 1K4S) DNA çift sarmalı enzimin aktif bölgesinde Thr718, Lys532, Lys374 ve Arg364 ile hidrojen bağı kurmaktadır (165). Topotekanın komplekse bağlanmasıyla bu hidrojen bağları korunduğu gibi Arg362 ve Gly363 ile hidrojen bağları kurulmuştur.

BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin topoizomerez I-DNA kompleksine oldukça güçlü, BODIPY-12a bileşiğinin ise daha zayıf bağlandığı belirlenmiştir. BODIPY bileşiklerinin arasından BODIPY-9a için bu komplekse bağlanma pozu elde edilememiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan topotekanın kenetleme skoru göz önüne alındığında BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerinin komplekse olan afinitesinin umut verici olduğu belirlenmiştir. Bileşiklerin merkezinde yer alan BODIPY iskeleti katalitik bölgeye yakın, DNA majör oluşunun merkezine konumlanmış, bu trisiklik halkaya bağlı arilalkil sübstitüsyonları majör ve minör oluklara, DNA-topizomerez ara yüzlerine ve topotekanın da interkalasyon yaptığı baz çifti arasına bağlanmıştır. Bileşiklerin bu uzun arilalkil grupları ile DNA'yı sarmalamasının ve parçalanmanın gerçekleştiği alanda iki baz çiftinin arasına sokulmasının, DNA-topoizomerez I enzim kompleksini kararlı kıldığı düşünülmektedir.

Topoizomerez II enzimi topoizomerez I'den farklı olarak simetrik iki kısımdan oluşur ve DNA sarmallarının ikisini de fosfodiester bağından kırarak parçalanmış DNA-enzim kovalent kompleksi oluşturur (195, 196). Dolayısıyla topoizomerez II enzimi simetrik iki katalitik bölgeye sahiptir. Topoizomerez I'de olduğu gibi gerilimin rahatlamasıyla kırılan DNA hızlıca geri onarılmalıdır. Bu sebeple parçalanma kompleksinin stabilize edilmesi bu süreci engelleyerek hücre ölümüne yol açar (16). Çalışmada kullanılan 3QX3 kodlu yapıda bulunan iki etopozit molekülü bu aktif bölgelere bağlanmıştır. 1K4T yapısında olduğu gibi, inhibitör bileşiğin aglikon kısmı iki baz çifti arasına sokularak parçalanmış zincirdeki fosfatları birbirinden uzaklaştırmış, aglikona bağlı aromatik halka ve glikozidik grup DNA majör ve minör oluklarına bağlanmıştır.

İnterkalasyon ile -1 nükleotidin OH grubu ile enzime kovalent bağlanan fosfat grubu arasındaki mesafe açılarak DNA'nın onarılmasını zorlaştırmıştır. Bu esnada etopozit ile DNA ve enzim arasında yoğun etkileşimler gözlenmiştir (166).

Bileşiklerimizin DNA-topoizomerez II kompleksine bağlanma biçimleri birbirinden farklılıklar göstermiştir. BODIPY-3a bileşiğinin üçlü halkası DNA molekülünün majör oluğunda iki katalitik bölgenin arasında konumlanırken üçlü halkanın 8 numaralı konumunda yer alan sübstitüent interkalasyon bölgelerinden birine, 5 numaralı konumdaki sübstitüent ise diğerine bağlanarak iki aktif bölgeyi birden işgal etmiştir. Üçlü halkaya 3 numaralı konumdan bağlanan sübstitüent DNA minör oluk ve enzimle etkileştiği belirlenmiştir. Tüm bu etkileşimler sonucu BODIPY-3a bileşiğinin afinitesinin pozitif kontrol olarak kullanılan etopozitten daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer bileşiklerin katalitik bölgelerden sadece birini işgal ettiği, DNA majör ve minör olukla ve enzimle etkileşimler görüldüğü tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamındaki bileşiklerin DNA-topoizomerez I ve DNA-topoizomerez II komplekslerine güçlü bir şekilde bağlandığı moleküler kenetleme çalışmaları ile tahmin edilmiştir. Enzimlerin aktif bölgelerinde hem DNA hem de enzime ait önemli rezidülerle etkileşen bileşiklerin bu geçiş komplekslerini stabilize ederek DNA hasarı ve hücre ölümüne yol açabilecekleri düşünülmektedir. Bileşiklerin merkezinde yer alan BODIPY çekirdeği ve bu üçlü halkaya bağlı uzun sübstitüentler, sahip oldukları yüklü ve lipofilik gruplarla hem DNA sarmallarının parçalandığı bölgelere interkalasyon hem DNA majör ve minör oluklarıyla etkileşme hem de enzimlerin aktivitesinde önemli rezidülerle etkileşme yoluyla çok yönlü bağlanma biçimi sergilemektedir. BODIPY-3a bileşiği her iki komplekse karşı gösterdiği güçlü afiniteyle ön plana çıkmaktadır. Bu durum elektroforez çalışmalarının sonuçlarını desteklemektedir.

Bileşiklerin HCT-116 hücre hattına karşı *in vitro* sitotoksik ve fototoksik etkileri MTT yöntemi kullanılarak incelenmiştir. MTT kimyasalı canlı hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenebilen bir kimyasaldır. Oluşan renk 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek bulunan değerler yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir (197). İdeal bir fotoduyarlaştırıcı karanlıkta düşük, ışık maruziyetinde ise yüksek toksisite göstermesi gerekmektedir. Bu çalışma kapsamında BODIPY bileşiklerinin hücrelerle 24, 48 ve 72 saat muamelesinden sonra karanlıkta ve ışık maruziyetinde (beyaz, 17.5 mW/cm²,

60 dakika) sitotoksiteleri incelenmiştir. Karanlıkta 50 μ M'da BODIPY-3a, BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin canlılık oranlarının %100 olduğu tespit edilmiştir. 50 ve 100 μ M BODIPY-6a bileşiğinin varlığında ise hücrelerin canlılık oranları 67 ± 2.30 ve 57 ± 4.30 olarak belirlenmiştir. Bu durumda 24 saat inkübasyon sonrasında karanlıkta en yüksek sitotoksik aktiviteye sahip bileşiğin BODIPY-6a olduğu tespit edilmiştir. BODIPY-6a bileşiğinin diğer bileşiklerden yüksek sitotoksik etki göstermesinin nedeninin piridinyum gruplarının varlığı olduğu düşünülmektedir. Işık maruziyetinde BODIPY-6a bileşiği en yüksek fototoksik aktiviteye sahip olan bileşik olmuştur. BODIPY-3a bileşiği yüksek singlet oksijen kuantum verimine sahip olmasına rağmen düşük fototoksik etki göstermiştir. Bunun nedeninin ise, bileşiğin büyük yapısından dolayı hücre membranını kolayca geçemeyeceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. 48 ve 72 saatlik veriler incelendiğinde bileşiklerin hücre canlılık oranlarının zamana ve konsantrasyona bağlı olarak azaldığını görmekteyiz. Bunun nedeninin bileşiklerin topoizomeraaz etkisi göstererek hücre replikasyonunu önlediği ve bu durumun hücre ölümüne sebebiyet verdiği düşünülmektedir. BODIPY-9a ve BODIPY-12a bileşiklerinin düşük sitotoksik ve fototoksik etki göstermelerinin nedeninin TBS içerisindeki agregasyondan dolayı düşük singlet oksijen kuantum verimi olduğu düşünülmektedir. Banfi ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada sekiz adet BODIPY bileşiği sentezlenip HCT-116 hücre hattına karşı ışık kaynağı (yeşil led, 120 dakika, 33 J/cm²) ile uyarılıp fotoduyarlastırıcı olma potansiyelleri incelenmiştir. Bu bileşiklerin IC₅₀ değerleri 1.00 ± 0.25 ile 1100 ± 100 nM arasında belirlenmiştir. Bileşiklerin birbirinden farklı IC₅₀ değerine sahip olmalarının nedeni süstitüe gruplarının singlet oksijen kuantum verimini etkilediği şeklinde açıklanmıştır (152). He ve arkadaşları ise simetrik olmayan stiril BODIPY türevlerinin HT-29 kolorektal kanser hattına karşı ışık maruziyetinde ($\lambda > 610$ nm, 40 mW/cm², 48 J/cm²) yüksek fototoksik aktivite gösterdiği ve bu yüksek aktiviteye stiril substitüentlerinin neden olduğu belirtilmiştir (156). Çalışmalar arasındaki farkın ışık kaynaklarından ve kullanılan ışık dozlarından dolayı meydana gelmekte olduğu düşünülmektedir.

Hücre ölümü, apoptoz ve nekroz gibi farklı mekanizmalar yoluyla ortaya çıkabilmektedir. Apoptoz, programlanmış hücre ölümüdür. Bu mekanizmanın temeli daha önce zarar görmüş hücrelerin, zarar görmeyen hücreleri hasarlayarak yok etmesi prensibine dayanmaktadır. Apoptoz için sinyal alındıktan sonra DNA parçalanması, fosfatidilserin moleküllerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkması gibi biyokimyasal olaylar ve

kromatin yoğunlaşması, hücre küçülmesi ve büzülmesi gibi morfolojik değişimler gözlenmektedir (51). Nekroz ise, inflamasyonun neden olduğu hücre membranı hasarından dolayı hücrenin hızlıca ve aniden ölmesidir. Kanser tedavisinde başarı için hücre ölüm mekanizmasının doğru değerlendirilmesi çok önemlidir (198). Apoptoz ve nekrozun değerlendirilmesinde floresan mikroskop, faz kontrast mikroskop, Anneksin V, TUNEL, M30, kaspas-3, agaroz gel elektroforez ve western blotlama gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında faz kontrast mikroskop ve Anneksin V yöntemi kullanılarak hücre ölümü mekanizması hakkında bilgi sahibi olunmaya çalışılmıştır. Hücrelerin BODIPY-6a bileşiği varlığında ışık maruziyeti sonrasında kontrol grubuna göre küçülmesi ve büzülmesi hücre ölümünü ve apoptozu işaret etmektedir. Bu durumu desteklemek amacıyla BODIPY-3a ve BODIPY-6a bileşiklerine Anneksin V-FITC/PI apoptoz testi uygulanmıştır. Normal hücrelerin hücre membranının iç kısmında fosfatidilserin bulunmaktadır. Hücre apoptoza giderse hücre membranının iç kısmında bulunan fosfatidilserin hücre zarının dış yüzeyine çıkmaktadır. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olup, floresan bir madde (FITC/PI) ile işaretlenerek apoptotik hücreleri görünür hale getirmektedir. Bu boyaların varlığında hücre yüzeyindeki fosfatilserine bağlanma oranları akış sitometresi cihazıyla ölçülmektedir. Anneksin V analizinde hücrelerin yaptığı ışımlar sonucunda dört farklı bölge elde edilmektedir. Canlı hücreler (FITC-,PI-), nekrotik hücreler (FITC-,PI+), geç apoptoz veya nekrotik hücreler (FITC+,PI+) ve erken apoptoz (FITC+,PI-) ışımlarıyla birbirinden ayırt edilmektedir (199). BODIPY-3a bileşiğinin Anneksin V-FITC/PI analizi sonuçları MTT hücre canlılık testi ile uyumluluk göstermiş olup, çalışılan konsantrasyonlarda kontrole göre anlamlı hücre ölümü gözlenmemiştir. BODIPY-6a bileşiğinin Anneksin V-FITC/PI analizi sonucu ışık maruziyeti sonrasında bileşiklerin konsantrasyona bağlı olarak HCT-116 hücrelerinin apoptoza sürüklendiğini göstermektedir. 5 ve 10 μ M'da sırasıyla apoptotik hücrelerin varlığı tespit edilmiştir.

PDT etkinliğini arttırabilmek amacıyla fotoduyarlaştırıcı maddelerin tümöre selektif olması gerekmektedir (11). Bu nedenle fotoduyarlaştırıcı bileşiklerin doku veya hücre içerisinde birikmesi için çeşitli taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır. Lipozomlar, ilaç emiliminin arttırılması, biyolojik yarı ömrün uzatılması veya metabolizmasının azaltılmasıyla bir ilacın terapötik indeksini arttırmak amacıyla tercih edilmektedir. Kheirloom ve Ferrara BODIPY-kolesterol ester bileşiğinin lipozomal formülasyonunu gerçekleştirmişlerdir (200). Yalagala ve arkadaşları yayınladıkları çalışma ile BODIPY

türevli bileşiklerin lipozomal formülasyonunu gerçekleştirmiştir ve bu formülasyon hücre görünürlüğünü arttırmıştır (201). İlaçların taşınma hızının ve selektifliğinin artırılması için kullanılan yöntemlerden biri de nanoteknolojik formülasyonlardır. Farmasötik bilimlerde nanopartiküllerin kullanılması ilaçların toksisitesini ve yan etkisini azaltmakta olup, hastaların yaşam kalitesini arttırmaktadır. Kanseri hücrelerine selektif ilaç taşınması, toksisiteyi azaltmasıyla sürdürülebilir terapötik etkisi, daha güvenli ve biyoyumlu olması nanopartikül formülasyonunun avantajları arasında sayılabilmektedir. Zhang ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada adamantan türevli BODIPY bileşiğinin nanopartikül formülasyonu gerçekleştirilmiş ve meme kanseri hücre hattında etkili sonuçlar elde edilmiştir (202). Bu çalışma kapsamında lipozomal ve polimerik nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemleri kullanarak BODIPY türevli bileşiklerin hücre içerisine daha yüksek verimle taşınması hedeflenmiştir.

Bu çalışma kapsamında BODIPY-6a ve BODIPY-12a bileşiklerinin nanotaşıyıcı sistemlerinin hazırlanması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. BODIPY-6a bileşiğinin lipozom ve nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu 219.7 ± 1.0 ve 206.0 ± 2.8 nm olarak belirlenmiştir. BODIPY-12a bileşiğinin formülasyonların partikül boyutu 216.7 ± 1.0 ve 818.7 ± 8.7 nm olarak belirlenmiştir. Daha sonra bu bileşiklerin 24 saat inkübasyon sonrasında *in vitro* sitotoksik ve fototoksik aktiviteleri MTT hücre canlılık testi kullanılarak incelenmiştir.

Hücrelerin, ışık maruziyeti sonrasında LpBODIPY-6a bileşiğinin 24 saat inkübasyon ardından 1, 5, 10, 50 ve 100 μM 'da karanlığa göre hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p < 0.001$). Işık maruziyeti sonrasında NpBODIPY-6a bileşiğinin 24 saat inkübasyon sonucunda hücre canlılığındaki azalış karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Işık maruziyeti sonrasında LpBODIPY-6a bileşiği ile BODIPY-6a kıyaslandığında ise 0.5 ve 1 μM 'da hücre canlılığında anlamlı azalış görülmüştür ($p < 0.001$), diğer konsantrasyonlarda ise hücre canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Işık maruziyeti sonrasında NpBODIPY-6a bileşiği ile BODIPY-6a kıyaslandığında da 0.5 ve 1 μM 'da hücre canlılığında anlamlı azalış görülmüştür ($p < 0.001$), ancak 5, 10, 50 ve 100 μM 'da BODIPY-6a bileşiğinin daha yüksek etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Hücrelerin, ışık maruziyeti sonrasında LpBODIPY-12a bileşiğinin 24 saat inkübasyon ardından 5, 10, 50 ve 100 μM 'da karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı

azalış görülmüştür ($p < 0.001$). Işık maruziyeti sonrasında NpBODIPY-12a bileşiğinin 24 saat inkübasyon sonucunda hücre canlılığı açısından azalış karanlığa göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$, $p < 0.001$). Işık maruziyeti sonrasında LpBODIPY-12a bileşiği ile BODIPY-12a kıyaslandığında ise 0.5 ve 1 μM 'da hücre canlılığında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir, diğer konsantrasyonlarda ise hücre canlılığında anlamlı azalış görülmüştür ($p < 0.001$). Işık maruziyeti NpBODIPY-12a bileşiği ile BODIPY-12a kıyaslandığında da çalışılan tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığında anlamlı azalış görülmüştür ($p < 0.001$). Bu sonuçlar bileşiklerin geliştirilen formülasyonlar ardından hücre içerisine daha yüksek verimle girdiklerini göstermektedir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen tüm çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre kullanılan BODIPY bileşiklerinin PDT'de kullanılma potansiyellerinin olduğu düşünülmektedir. Çalışmanın devamında özellikle de en yüksek etkiyi gösteren BODIPY-6a bileşiğinin antikanser etkisine aracılık ettiği düşünülen hücresel/moleküler yolların daha ayrıntılı çalışılmasının yanı sıra kanser modeli oluşturulup *in vivo* etkilerinin incelenmesi önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Dünya Sağlık Örgütü (2019). Available from: <http://www.who.int/cancer/en/>. Son erişim tarihi 23.08.2019.
2. Amerikan Kanser Derneği (2019). Available from: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics.html>. Son erişim tarihi 23.08.2019.
3. Marley AR, Nan H (2016). Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet* 7(3): 105-114.
4. Treanor D, Quirke P (2007). Pathology of colorectal cancer. *Clin Oncol* 19: 769-776.
5. Ponz de Leon M (2000). Pathogenesis of colorectal cancer. *Diges Liver Dis* 32: 807-821.
6. Tunçer S (2007). Yeni sentezlenen ışığa duyarlı maddeler (fotosensitayzırlar) kullanılarak uygulanan fotodinamik terapinin serviks epitelyal karsinoma ve mezotelyoma hücrelerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Gebze.
7. Chandran SP, Natarajan SB, Chandraseharan S, Shahimi MSBM (2017). Nano drug delivery strategy of 5-fluorouracil for treatment of colorectal cancer. *J Can Res Prac* 4: 45-48.
8. Li X, Zheng B, Peng X, Li S, Ying J, Zhao Y, Huang J, Yoon J (2019). Phthalocyanines as medicinal photosensitizer: Development in the last five years. *Coordin Chem Rev* 379: 147-160.
9. Banerjee SM, MacRobert AJ, Mosse CA, Periera B, Bown SG, Keshtgar MRS (2017). Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. *Breast* 31: 105-113.
10. Turksoy A, Yıldız D, Akkaya EU (2019). Photosensitization and controlled photosensitization with BODIPY dyes. *Coordin Chem Rev* 379: 47-64.
11. Ali A, Bhattacharya S (2014). DNA binders in clinical trials and chemotherapy. *Bioorg Med Chem* 22: 4506-4521.
12. Pradeepa SM, Bhojya Naik HS, Kumar BV, Priyadarsini KI, Barik A, Jayakumar S (2015). Synthesis and characterization of cobalt(II), nickel(II) and copper(II)-based potential photosensitizer: Evaluation of their DNA binding profile, cleavage and photocytotoxicity. *Inorg Chim Acta* 428: 138-146.
13. Hande KR (2008). Topoisomerase II inhibitors. *Update Cancer Therap* 3: 13-26.

14. Li M, Liu Y (2016). Topoisomerase I in human disease pathogenesis and treatments. *Genom Proteom Bioinf* 14: 166-171.
15. Gilbert DC, Chalmers AJ, El-Khamisy SF (2012). Topoisomerase I inhibition in colorectal cancer: biomarkers and therapeutic targets. *Br J Cancer* 106: 18-24.
16. Nitiss JL (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 9(5): 338-350.
17. Garcia AM, de Alwis Weerasekera H, Pitre SP, McNeill B, Lissi E, Edwards AM, Alarcon EI (2016). Photodynamic performance of zinc phthalocyanine in HeLa cells: A comparison between DPCC liposomes and BSA as delivery systems. *J Photochem Photobiol B* 163: 385-390.
18. Škorpilová L, Rimpelová S, Jurásek M, Buděšínský M, Lokajová J, Effenberg R, Slepíčka P, Ruml T, Kmoníčková E, Drašar PB, Wimmer Z (2017). BODIPY-based fluorescent liposomes with sesquiterpene lactone trilobolide. *Beilstein J Org Chem* 13: 1316-1324.
19. De Jong WH, Borm PJA (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int J Nanomed* 3(2): 133-149.
20. Amerikan Kanser Derneği (2019). Available from: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/economic-impact-of-cancer.html> . Son erişim tarihi 23.08.2019.
21. Haggard FA, Boushey RP (2009) Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Sur* 22(4): 191-197.
22. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı (2017). Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014-RAPOR_uzuuun.pdf. Son erişim tarihi: 23.08.2019.
23. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlader N, Horner MJ, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Altekruse SF, Lewis DR, Clegg L, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK (2008). SEER Cancer Statistics Review 1975-2005. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/ Son erişim tarihi: 23.08.2019.
24. Fairley TL, Cardinez CJ, Martin J, Alley L, Friedman C, Edwards B, Jamison P (2006). Colorectal cancer in U.S. adults younger than 50 years of age, 1998-2001. *Cancer* 107: 1153-1161.

25. Pepeler MS (2011). Kolorektal kanserlerde vitamin D reseptör ekspresyonunun kolorektal kanserlerde evre ile ilişkisi ve prognoz üzerine etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıklar Anabilim Dalı, Ankara.
26. Rosai J. (2004). Gastrointestinal tract. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Dokuzuncu Baskı, Sayfa: 776-855.
27. Büyükdoğan M (2009). Kolorektal kanserde genetik ve etyolojik faktörler. Selçuk Tıp Derg 25(3): 171-180.
28. Tariq K, Ghias K (2016) Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. Cancer Biol Med 13(1) 120-128.
29. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppart JM (1990). Identification of chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science 247: 49-56.
30. Gürbüzgüzel M, (2008). Kolorektal karsinomlarda p16 ekspresyonu ve prognostik parametrelerle karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü, İstanbul.
31. Fenoglio- Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Listrom MB, Rilke FO. (1999). Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. In: Gastrointestinal pathology an atlas and text. İkinci Baskı. Lippincott-Raven Publishers; Sayfa: 909-1068.
32. Kumar V, Abbas AK, Fausto N (2005). The gastrointestinal tract. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Yedinci Baskı. Philadelphia: Elsevier Saunders Company; Sayfa: 857-869.
33. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD (1994). Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. Science 263(5153): 1625-1629.
34. Willett WC (2005). Diet and cancer: an evolving Picture. JAMA 293(2): 233-234.
35. Larsson SC, Wolk A (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. Int J Cancer 119(11): 2657-2664.
36. Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE (2008). Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. Nutr Cancer 60(2): 131-144.
37. Kabat GC, Miller AB, Jain M, Rohan TE (2007). A cohort study of dietary iron and heme iron intake and risk of colorectal cancer in women. Br J Cancer 297(1): 118-122.

38. Sinha R (2002). An epidemiologic approach to studying heterocyclic amines. *Mutat Res* 507: 197-204.
39. Janout V, Kollarova H (2001). Epidemiology of colorectal cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacku Olomouc Czech Repub* 145: 5-10.
40. Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB (2008). Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology* 134(2): 388-395.
41. Poschl G, Seitz HK (2004). Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol* 39(3): 155-165.
42. Cirstoiu-Hapca A, Buchegger F, Bossy L, Kosinski M, Gurny R, Delie F (2009). Nanomedicines for active targeting: physico-chemical characterization of paclitaxelloaded anti-HER2 immuno nanoparticles and in vitro functional studies on target cells. *Eur J Pharm Sci* 38: 230-237.
43. Shan D, Bing H, Hong MA (2012). Traditional Chinese medicinal syndromes and treatment in colorectal cancer. *J Cancer Ther* 3: 888-897.
44. Stephen C (2002). New treatments for advanced and metastatic colorectal cancer: clinical applications. *Aust Prescr* 25: 111-113.
45. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R (2000). Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18: 136-147.
46. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355: 1041-1047.
47. Arias JL, Ruiz MA, Lopez-Viata M, Delgado AV (2008). Poly(alkyl cyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: a comparative study. *Colloids Surf B Biointerfaces* 62: 64-70.
48. Ehrsson H, Wallin I, Yachnin J (2002). Pharmacokinetics of oxaliplatin in humans. *Med Oncol* 19(4): 261-265.
49. Rejhov A, Opatov A, Cumov A, Sliva D, Vodicka P (2018). Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *Eur J Med Chem* 144: 582-594.
50. Barut B (2016). Suda çözünür Ti (IV) ftalosiyenin bileşiklerinin DNA bağlanma, DNA kesim, antioksidan, antimikrobiyal aktivitelerinin ve topoizomeras I inhibisyonunun incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.

51. Oniszczyk A, Wojtunik-Kulesza KA, Oniszczyk T, Kasprzaka K (2016). The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomed Pharmacother* 83: 912-929.
52. Reddy S, Kotha R, Tatapudi R, Gudapati S, Madhavai S, Kiran S (2012). Photodynamic therapy in oral diseases. *Int J Biol Med Res* 3: 1875-1883.
53. Prime J (1900). In: Des accidents toxiques produit par l'Eosinate se sodium. İkinci Baskı. Paris.
54. Von Tappeiner H, Jesionek A (1903). Therapeutische versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Muench Med Wochenschr* 47: 2042-2044.
55. Tappeiner H, Jodlbauer A (1904). Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Infusorien. *Dtsch Arch Klin Med* 80: 427-487.
56. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A (1978). Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 38: 2628-2635.
57. Lovell JF, Liu TWB, Chen J, Zheng G (2010). Activatable photosensitizers for imaging and therapy. *Chem Rev* 110: 2839-2857.
58. Cerman E, Çekiç O (2015). Clinical use of photodynamic therapy in ocular tumors. *Surv Ophthalmol* 60: 557-574.
59. Benov L (2015). Photodynamic therapy: current status and future directions. *Med Princ Pract* 24: 14-28.
60. Jurczynszyn K, Ziółkowski P, Gerber H, Osiecka BJ (2007). Potentiality of photodynamic therapy in dentistry literature review. *Dent Med Probl* 44: 255-258.
61. Bozzini G, Colin P, Betrouni N, Nevoux P, Ouzzane A, Puech P (2012). Photodynamic therapy in urology: what can we do now and where are we heading?. *Photodiagn Photodyn Ther* 9: 261-273.
62. Cotter TG (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 9: 501-507.
63. Silva JN, Filipe P, Morlière P, Mazière JC, Freitas JP, Gomes MM (2008). Photodynamic therapy: dermatology and ophthalmology as main fields of current applications in clinic. *Biomed Mater Eng* 18: 319-327.
64. Konopka K, Goslinski T (2007). Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 86: 694-707.

65. Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies RM (2010). Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 26: 118-132.
66. Zhang J, Jiang C, Longo J, Azevedo R, Zhang H, Muehlmann L (2018). An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B* 8(2): 137-146.
67. Bacellar IOL, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS (2015). Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci* 16: 20523-20559.
68. Juzeniene A, Moan J (2007). The history of PDT in Norway Part one: identification of basic mechanisms of general PDT. *Photodiagn Photodyn Ther* 4: 3-11.
69. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagn Photodyn Ther* 2: 1-23.
70. Nowak-Stepniowska A, Pergol P, Padzik-Graczyk A (2013). Photodynamic therapy for diagnosis and cancer treatment mechanisms and usage. *Post Bioch* 59: 53-63.
71. Shah J, Park S, Aglyamov S, Larson T, Ma L, Sokolov K (2008). Photoacoustic imaging and temperature measurement for photothermal cancer therapy. *J Biomed Opt* 13: 34-24.
72. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M (1998). Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 90: 889-905.
73. Solban N, Rizvi I, Hasan T (2006). Targeted photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 38: 522-531.
74. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 380-387.
75. Inguscio V, Panzarini E, Dini L (2012). Autophagy contributes to the death/survival balance in cancer photodynamic therapy. *Cells* 1: 464-491.
76. Kubiak M, Łysenko L, Gerber H, Nowak R (2016). Cell reactions and immune responses to photodynamic therapy in oncology. *Postepy Hig Med Dosw* 70: 735-742.
77. Chiaviello A, Postiglione I, Palumbo G (2011). Targets and mechanisms of photodynamic therapy in lung cancer cells: a brief overview. *Cancers* 3: 1014-1041.
78. Chen B, Pogue BW, Luna JM, Hardman RL, Hoopes PJ, Hasan T (2006). Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: Effects, mechanism, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 12: 917-923.

79. Allison RR, Moghissi K (2013). Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanism. Clin Endosc 46: 24-29.
80. Akbulut S (2018). Pankreas kanseri tedavisinde photolon güdümlü fotodinamik terapinin uygulaması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.
81. Herrera-Ornelas L, Petrelli NJ, Mittelman A, Dougherty TJ, Boyle DG (1986). Photodynamic therapy in patients with colorectal cancer. Cancer 57: 677-684.
82. Mlkvy P, Cavarga I, Mateasik A, Chorvat D (2010). Colorectal adenomas—combination therapies using ALA PDT: A pilot study. In: 8th international symposium on photodynamic therapy and photodiagnosis in clinical practice Roma, 6-9 Ekim 2010.
83. Mlkvy P, Messmann H, Debinski H, Regula J, Conio M, MacRobert A (1995). Photodynamic therapy for polyps in familial adenomatous polyposis—a pilot study. Eur J Cancer 31A: 1160-1165.
84. Lustig RA, Vogl TJ, Fromm D, Cuenca R, Alex Hsi R, D'Cruz AK (2003). A multicenter Phase I safety study of intratumoral photoactivation of talaporfin sodium in patients with refractory solid tumors. Cancer 98: 1767-1771.
85. Hahn SM, Putt ME, Metz J, Shin DB, Rickter E, Menon C (2006). Photofrin uptake in the tumor and normal tissues of patients receiving intraperitoneal photodynamic therapy. Clin Cancer Res 12: 5464-5470.
86. Safety and efficiency of photodynamic therapy for rectal cancer (PDT-R-01). Phase II clinical trial <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01872104>.
87. Li M, Tian R, Fan J, Du J, Long S, Peng X (2017). A lysosome-targeted BODIPY as potential NIR photosensitizer for photodynamic therapy. Dyes Pigm 147: 99-105.
88. Kawczyk-Krupka A, Bugaj A, Latos W, Zaremba K, Wawrzyniec K, Sieroń A (2015). Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment: The state of the art in clinical trials. Photodiagnosis Photodyn Ther 12: 545-553.
89. Patrice T, Foultier MT, Yactayo S, Adam F, Galmiche JP, Douet MC (1990). Endoscopic photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative for primary treatment of gastrointestinal neoplasms in inoperable patients. Digest Dis Sci 35: 545-552.
90. Nakamura T, Fukui H, Ishii Y, Ejiri K, Ejiri M (2003). Photodynamic therapy with polypectomy for rectal cancer. Gastrointest Endosc 57: 266-2669.

91. Krasner N (1989). Laser therapy in the management of benign and malignant tumours in the colon and rectum. *Int J Colorect Dis* 4: 2-5.
92. Welbourn H, Duthie G, Powell J, Moghissi K (2014). Can photodynamic therapy be the preferred treatment option for anal intraepithelial neoplasia? Initial results of a pilot study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 11: 20-21.
93. Loh CS, Bliss P, Bown SG, Krasner N (1994). Photodynamic therapy for villous adenomas of the colon and rectum. *Endoscopy* 26: 243-246.
94. Hamdan KA, Tait IS, Nadeau V, Padgett M, Carey F, Steele RJ (2003). Treatment of grade III anal intraepithelial neoplasia with photodynamic therapy. Report of a case. *Dis Colon Rectum* 11: 1555-1159.
95. Mlkvy P, Messmann H, Regula J, Conio M, Pauer M, Millson CE (1998). Photodynamic therapy for gastrointestinal tumours using three photosensitizers ALA induced PPIX, Photofrin and MTHPC. A pilot study. *Neoplasma* 45: 157-161.
96. Fromm D, Kessel D, Webber J (1996). Feasibility of photodynamic therapy using endogenous photosensitization for colon cancer. *Arch Surg* 131:667-669.
97. van der Snoek EM, den Hollander JC, Aans JB, Sterenborg HJ, van der Ende ME, Robinson DJ (2012). Photodynamic therapy with systemic meta-tetrahydroxyphenylchlorin in the treatment of anal intraepithelial neoplasia, grade 3. *Lasers Surg Med* 44: 637-644.
98. A multicenter Phase I safety and tolerability study of the oncolux system for intratumoral delivery of non-coherent light for the photoactivation of LS 11 in patients with refractory solid tumors. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00028405>.
99. van Duijnhoven FH, Rovers JP, Engelmann K, Krajina Z, Purkiss SF, Zoetmulder FA (2005). Photodynamic therapy with 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin for colorectal liver metastases is safe and feasible: results from a Phase I study. *Ann Surg Oncol* 12: 808-816.
100. Taber SW, Fingar VH, Coots CT, Wieman TJ (1998). Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: a Phase I clinical study. *Clin Cancer Res* 4: 2741-2746.
101. Kashtan H, Papa MZ, Wilson BC, Deutch AA, Stern HS (1991). Use of photodynamic therapy in the palliation of massive advanced rectal cancer. Phase I/II study. *Dis Colon Rectum* 34: 600-605.

102. A phase I/II study of neoadjuvant photodynamic immunomodulation for colon cancer. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01522677>.
103. Photodynamic therapy with talaporfin sodium (LS11) in treating patients with refractory colorectal liver metastases. Phase II clinical trial. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00068068>.
104. Study of the LitxTM system combined with chemotherapy in patients with colorectal liver metastases. Phase II clinical trial. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00083785>.
105. Allison RR, Sheng C, Cuenca R, Bagnato VS, Austerlitz C, Sibata CH (2010). Photodynamic therapy for anal cancer. Photodiagnosis Photodyn Ther 7: 115-119.
106. European Patent Office (2019). Available from: <https://worldwide.espacenet.com/search>. Son Erişim Tarihi: 23.08.2019.
107. Scopus (2019). Available from: <https://www.scopus.com/results/>. Son erişim tarihi 23.08.2019.
108. Umezawa K, Nakamura Y, Makino H, Citterio D, Suzuki K (2008). Bright, color-tunable fluorescent dyes in the visible–near-infrared region. J Am Chem Soc 130: 1550-1551.
109. Erten-El S, Deniz Yilmaz M, Icli B, Dede Y, Icli S, Akkaya EU (2008). A panchromatic boradiazaindacene (BODIPY) sensitizer for dye-sensitized solar cells. Org Lett 101: 53299-53302.
110. Coskun A, Akkaya EU (2005). Ion sensing coupled to resonance energy transfer: A highly selective and sensitive ratiometric fluorescent chemosensor for Ag(I) by a modular approach. J Am Chem Soc 127: 10464-10465.
111. Singh-Rachford TN, Haefele A, Ziesel R, Castellano FN (2008). Boron dipyrromethene chromophores: next generation triplet acceptors/annihilators for low power upconversion schemes. J Am Chem Soc 130: 16164-16165.
112. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2014). Biyokimya. Yedinci Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara; Sayfa: 109-117.
113. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA (2011). Genetik Kavramlar. Sekizinci baskı, Palme Yayıncılık, Ankara; Sayfa: 67-67.
114. Clausen-Schaumann H, Rief M, Tolkdorf C, Gaub H (2000). Mechanical stability of single DNA molecules. Biophysical Journal 78: 1997-2007.
115. Gowda S, Mathew B, Sudhamani CN Naik HSB (2014). Mechanism of DNA binding and cleavage. Biomed Biotechnol 2(1): 1-9.

116. Palchaudhuri R, Hergenrother PJ (2007). DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr Opin Biotech* 18(6): 497-503.
117. Göçmen E (2014). Bazı tek ve çift dişli tersiyer fosfin ligantları içeren yeni gümüş(I) sakkarinat komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu, yapıları, DNA bağlanma ve biyolojik aktivite çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Bursa.
118. Blackburn GM, Gait MJ (1996). DNA and RNA structure: nucleic Acids in Chemistry and Biology. Üçüncü Baskı. England: Oxford University Press, Sayfa: 28-39.
119. Bischoff G, Hoffmann S (2002) DNA-Binding of drugs used in medicinal therapies. *Curr Med Chem* 9(3): 321-348.
120. Yıldız U (2012). Bazı metal komplekslerinin DNA ile etkileşimlerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Zonguldak.
121. Frederick CA, Williams LD, Ughetto G, Van der Marel GA, Van Boom JH, Rich A, Wang AHJ (1990). Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry* 29(10): 2538-2549.
122. Chen Z, Wang Z, Chen J, Chen X, Wu J, Wu Y, Liang J (2013). Resonance light scattering technique as a new tool to determine the binding mode of anticancer drug oridonin to DNA. *Eur J Med Chem* 66: 380-387.
123. Fukui K, Tanaka K (1996). The acridine ring selectively intercalated into a DNA helix at various types of abasic sites: Double strand formation and photophysical properties. *Nucleic Acids Res* 24: 3962-3967.
124. Wang JC (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 430-440.
125. Bickle TA, Krüger DH (1993). Biology of DNA restriction. *Microbiol Rev* 57: 434-450.
126. Chen J, Stubbe J (2005). Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5: 102-112.
127. Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 40: 7770-776.
128. Fernandez MJ, Grant KB, Herraiz F, Yang X, Lorente A (2001). DNA photocleavage by dicationic bisintercalants. *Tetrahedron Lett* 42: 5701-5704.

129. Liang X, Wu Q, Luan S, Yin Z, He C, Yin L, Zou Y, Yuan Z, Li L, Song X, He M, Lv C, Zhang W (2019). A comprehensive review of topoisomerase inhibitors as anticancer agents in the past decade. *Eur J Med Chem* 171: 129-168.
130. Kuşkuç M (2017). Eliptisin türevlerinin insan DNA topoizomeraaz enzimleri üzerindeki etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir.
131. Wang J C (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective. *Nature* 3: 430-440.
132. Schoeffler AJ, Berger JM (2008). DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Quart Rev Biophys* 41(1): 41-101.
133. Barut B, Sofuoğlu A, Bıyıklıoğlu Z, Özel A (2016) The water soluble peripherally tetra-substituted zinc(II), manganese(III) and copper(II) phthalocyanines as new potential anticancer agents. *Dalton Trans* 45: 14301-14310.
134. Şen M (2015). Bazı sentetik bileşiklerin topoizomeraaz enzim aktivitesi üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Eskişehir.
135. Tırinoğlu Ç (2016). Bortezomib'in etoposid ve kamptotesin ile birlikte ökaryotik DNA topoizomeraaz enzimleri üzerine *in vitro* inhibisyon etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Aksaray.
136. Yücel Ç (2010). Doksisiklinin lipozom ve nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi ve hücre kültüründen geçişlerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara.
137. Temizel E (2011). Hidrofilik ve hidrofobik gruplar bağlı porfirinlerin sentezlenmesi ve lipozom içerisine yerleştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fatih Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
138. Aytekin AA (2018). Antiinflamatuvar etkili propolis yüklü lipozomal formülasyonların hazırlanması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, İzmir.
139. Gürsoy-Zırh A (2014) Kontrollü Salım Sistemleri: Lipozomlar. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını; Sayfa: 103-116.

140. Yücel Ç (2015). Embriyonik kök hücre ve insülin taşıyan lipozom, nanopartikül ve kohleat formülasyonlarının geliştirilerek etkinliğinin incelenmesi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara.
141. Avecedo R (2009). Intranasal administration of proteoliposome-derived cochleates from *Vibrio cholerae* O1 induce mucosal and systemic immune responses in mice. *Methods* 49: 309-315.
142. Schöll I, Boltz-Nitulescu G, Jensen-Jarolim E (2005). Review of novel particulate antigen delivery systems with special focus on treatment of type I allergy. *J Contr Rel* 104: 1-27.
143. Panyam J, Labhasetwar V (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 329-347.
144. Faraji AH, Wipf P (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* 17: 2950-2962.
145. Vauthier C, Bouchemal K (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharma Res* 26(5): 1025-1058.
146. Panyam J. (2003). Polymer degradation and *in vitro* release of a model protein from poly (D,L-lactide-co-glycolide) nano and microparticles. *J Contr Rel* 92: 173-187.
147. Blanco MD, Alonso MJ (1997). Development and characterisation of protein-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanospheres. *Eur J Pharm Sci* 43: 287-294.
148. Kankaew A, Lim S, Lee H, Kiew L, Chung L, Burgess K (2013). BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* 42: 77-88.
149. Wang J, Hou Y, Lei W, Zhou Q, Li C, Zhang B, Wang X (2012). DNA photocleavage by a cationic BODIPY dye through both singlet oxygen and hydroxyl radical: New insight into the photodynamic therapy mechanism of BODIPY. *Chem Phys Chem* 13: 2739-2747.
150. Zhao C, Zhang Y, Wang X, Cao J (2013). Development of BODIPY-based fluorescent DNA intercalating probes. *J Photochem Photobiol B* 264: 41-47.
151. Bıyıklıoğlu Z, Barut B, Özel A (2018). Synthesis, DNA/BSA binding and DNA photocleavage properties of water soluble BODIPY dyes. *Dyes Pigm* 148: 417-428.
152. Banfi S, Caruso E, Zaza S, Mancini M, Gariboldi MB, Monti E (2012). Synthesis and photodynamic activity of a panel of BODIPY dyes. *J Photochem Photobiol B* 114: 52-60.

153. Şengül İF, Okutan E, Kandemir H, Astarıcı E, Cosut B (2015) Carbazole substituted BODIPY dyes: Synthesis, photophysical properties and antitumor activity. *Dyes Pigm* 123: 32-38.
154. Shivran N, Tyagi M, Mula S, Gupta P, Saha B, Patro BS, Chattopadhyay S (2016). Syntheses and photodynamic activity of some glucose-conjugated BODIPY dyes. *Eur J Med Chem* 122: 352-365.
155. Gonjito T, De Freitas R, Emery F, Pedrosa L, Neto J, Cavalcanti B, Pessoa C, King A, Moliner F, Vendrell M, Junior E (2017). On the synthesis of quinone-based BODIPY hybrids: New insights on antitumor activity and mechanism of action in cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 27: 4446-4456.
156. He H, Lo P, Yeung S, Fong W, Ng DKP (2011). Preparation of unsymmetrical distyryl BODIPY derivatives and effects of the styryl substituents on their *in vitro* photodynamic properties. *Chem Commun* 47: 4748–4750.
157. Shi H, Sun W, Liu C, Gu G, Ma B, Si W, Fu N, Zhang Q, Huang W, Dong X (2016). Tumor-targeting, enzyme-activated nanoparticles for simultaneous cancer diagnosis and photodynamic therapy. *J Mat Chem B* 4: 113-120.
158. Çakır D, Çakır V, Biyiklioglu Z, Durmuş M, Kantekin H (2013). New water soluble cationic zinc phthalocyanines as potential for photodynamic therapy of cancer. *J Organomet Chem* 745: 423-431.
159. Banfi S, Nasini G, Zaza S, Caruso E (2013). Synthesis and photo-physical properties of a series of BODIPY dyes. *Tetrahedron* 69: 4845-4856.
160. Kocak A, Yilmaz H, Faiz O, Andaç O (2016). Experimental and theoretical studies on Cu(II) complex of N,N'-disalicylidene-2,3-diaminopyridine ligand reveal indirect evidence for DNA intercalation. *Polyhedron* 104: 106-115.
161. Zampakou M, Balala S, Perdih F, Kalogiannis S, Turelc I, Psomas G (2015). Structure, antimicrobial activity, albumin- and DNA-binding of manganese(II)–sparfloxacinato complexes. *RSC Advances* 5: 11861-11872.
162. Baş H, Barut B, Biyiklioglu Z, Özel A (2019). Synthesis, DNA interaction, topoisomerase I, II inhibitory and cytotoxic effects of water soluble silicon (IV) phthalocyanine and naphthalocyanines bearing 1-acetylpiperazine units. *Dyes Pigm* 160: 136-144.

163. Fu X, Zhang J, Liu D, Gan Q, Gao H, Mao Z, Le X (2015). Cu (II)-dipeptide complexes of 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole: Synthesis, DNA oxidative damage, antioxidant and *in vitro* antitumor activity. *J Inorg Biochem* 143: 77-87.
164. Banks L, Beard HS, Cao Y, Cho AE, Damm W, Farid R, Felts AK, Halgren TA (2005). Integrated modeling program, applied chemical theory (IMPACT). *J Comput Chem* 26: 1752-1780.
165. Staker BL, Hjerrild K, Feese MD, Behnke CA, Burgin AB Jr, Stewart L (2002). The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(24): 15387-15392.
166. Wu CC1, Li TK, Farh L, Lin LY, Lin TS, Yu YJ, Yen TJ, Chiang CW, Chan NL (2011). Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science* 333(6041): 459-462.
167. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne P.E (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-242.
168. Sastry GM, Adzhigirey M, Day T, Annabhimoju R, Sherman W (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J Comput Aid Mol Des* 27: 221-234.
169. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shaw DE, Shelley M, Perry JK, Francis P, Shenkin PS (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem* 47: 1739-1749.
170. Halgren TA, Murphy RB, Friesner RA, Beard HS, Frye LL, Pollard WT, Banks JL (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J Med Chem* 47: 1750-1759.
171. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, Sanschagrin PC, Mainz DT (2006). Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem* 49: 6177-6196.
172. Abudayyak M (2015). Bazı metal bazlı nanomateriyallerin toksik etki potansiyellerinin araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
173. Abudayyak M, Güzel E, Özhan G (2017). Nickel oxide nanoparticles are highly toxic to SH-SY5Y neuronal cells. *Neurochem Int* 108: 7-14.

174. Li M, Li X, Cao Z, Wu Y, Chen J, Gao J, Wang Z, Guo W, Gu X (2018). Mitochondria-targeting BODIPY-loaded micelles as novel class of photosensitizer for photodynamic therapy. *Eur J Med Chem* 157: 599-609.
175. de Lima RG, Tedesco AC, da Silva RS, Lawrence MJ (2017). Ultradeformable liposome loaded with zinc phthalocyanine and [Ru (NH.NHq)(tpy)NO]³⁺ for photodynamic therapy by topical application. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 19: 184-193.
176. Niu X, Zou W, Liu C, Zhang N, Fu C (2009). Modified nanoprecipitation method to fabricate DNA-loaded PLGA nanoparticles. *Drug Dev Ind Pharm* 35: 1375-1383.
177. Halder KK, Mandal B, Debnath MC, Bera H, Ghosh LK, Gupta BK (2008). Chloramphenicol-incorporated poly lactide-co-glycolide (PLGA) nanoparticles: Formulation, characterization, technetium-99m labeling and biodistribution studies. *J Drug Target* 16: 311-320.
178. Caruso E, Banfi S, Barbieri P, Leva B, Orlandi VT (2012). Synthesis and antibacterial activity of novel cationic BODIPY photosensitizers. *J Photochem Photobiol B* 114: 44-51.
179. Hu W, Zhang X, Lu X, Lan S, Tian D, Li T, Wang L, Zhao S, Feng M, Zhang J (2018). Modifying the meso-phenyl with electron donating amino groups strongly enhances BODIPY's ability as good singlet oxygen photosensitizer. *Dyes Pigm* 149: 306-314.
180. Hu W, Zhang X, Lu X, Lan S, Tian D, Li T, Wang L, Zhao S, Feng M, Zhang J (2018). Attaching electron donating groups on the meso-phenyl and meso-naphthyl make aryl substituted BODIPYs act as good photosensitizer for singlet oxygen formation. *J Lumin* 194: 185-192.
181. Agazzi LM, Ballatore MB, Reynoso E, Quiroga ED, Durantini EN (2017). Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of two cationic BODIPY derivatives with applications in the photoinactivation of microorganisms. *Eur J Med Chem* 126: 110-121.
182. Yanık H, Göksel M, Yeşilot S, Durmuş M (2016). Novel phthalocyanine-BODIPY conjugates and their photophysical and photochemical properties. *Tetrahedron Lett* 57: 2922-2926.

183. Inamdar PR, Sheela A (2016). Spectroscopic investigations on partial intercalative binding behaviour of terpyridine based copper(II) complexes with DNA. *J Photochem Photobiol* 159: 133-141.
184. Jia D, Zheng J, Fan Y, Yu J, Wu X, Wang B, Yang X, Huang Y (2019). Ferrocene appended naphthalimide derivatives: Synthesis, DNA binding, and *in vitro* cytotoxic activity. *J Organomet Chem* 888: 16-23.
185. Thomas R, Sukumaran S, Sudarsanakumar S (2019). Photophysical and thermodynamic evaluation on the *in vitro* and *in silico* binding profile of Camptothecin with DNA. *Biophys Chem* 246: 40-49.
186. Bağda E, Yabaş E, Bağda E (2017). Analytical approaches for clarification of DNA-double decker phthalocyanine binding mechanism: As an alternative anticancer chemotherapeutic. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 172: 199-204.
187. Yabaş E, Bağda E, Bağda E (2015). The water soluble ball-type phthalocyanine as new potential anticancer drugs. *Dyes Pigm* 120: 220-227.
188. Özel A, Demirbaş Ü, Barut B, Kantekin H (2019). The novel water soluble peripherally and non-peripherally tetra piperidine substituted phthalocyanines: Synthesis, characterization, DNA cleavage properties. *J Mol Struct* 1186: 325-332.
189. Barut B, Demirbaş Ü, Özel A, Kantekin H (2017). Novel water soluble morpholine substituted Zn(II) phthalocyanine: Synthesis, characterization, DNA/BSA binding, DNA photocleavage and topoisomerase I inhibition. *Int J Biol Macromol* 105(1): 499-508.
190. Weijer R, Broekgaarden M, Krekorian M, Alles L, van Wijk A, Mackaaij C, Verheij J, van der Wal A, van Gullik TM, Storm G, Heger M (2015). Inhibition of hypoxia inducible factor 1 and topoisomerase with acriflavine sensitizes perihilar cholangiocarcinomas to photodynamic therapy. *Oncotarget* 7(3): 3341-3356.
191. Montazerabadi A, Sazgarnia A, Bahreyni-Toosi MH, Ahmadi A, Shakeri-Zadeh A, Aledavood A (2012). Mitoxantrone as a prospective photosensitizer for photodynamic therapy of breast cancer. *Photodiagnos Photodyn Ther* 9: 46-51.
192. Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WGJ, Champoux JJ (1998). A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*, 279: 1534-1541.
193. Pommier Y. (1998). Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors. *Biochimie* 80(3): 255-270.

194. Champoux JJ (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70: 369-413.
195. Collins TRL, Hammes GG, Hsieh T (2009). Analysis of the eukaryotic topoisomerase II DNA gate: a single-molecule FRET and structural perspective. *Nucleic Acids Res* 37 (2009) 712-720.
196. Schoeffler AJ, Berger JM (2008). DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q Rev Biophys* 41: 41-101.
197. Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 16: 55-63.
198. Rello-Varona S, Herrero-Martín D, Lagares-Tena L, López-Alemaný R, Mulet-Margalef N, Huertas-Martínez J, García-Monclús S, García del Muro X, Muñoz-Pinedo, C, Martínez Tirado O (2015). The importance of being dead: cell death mechanisms assessment in anti-sarcoma therapy. *Front Oncol* 5: 1-12.
199. Güleş Ö, Eren Ü (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *YYÜ Veteriner Fak Derg* 2: 73-78.
200. Kheirrolomoom A, Ferrara KW (2007). Cholesterol transport from liposomal delivery vehicles. *Biomaterials* 28(29): 4311-4320.
201. Yalagala, RS, Mazinani SA, Maddalena LA, Stuart JA, Yang F, Ya H (2016). Microwave-assisted syntheses of BODIPY–sugar conjugates through click chemistry and conjugate assembly into liposomes. *Carbohydr Res* 424: 15-20.
202. Zhang Q, Cai Y, Wang XJ, Xu JL, Ye Z, Wang S, Seeberger PH, Yin J (2016). Targeted photodynamic killing of breast cancer cells employing heptamannosylated β -cyclodextrin-mediated nanoparticle formation of an adamantane-functionalized BODIPY photosensitizer. *Appl Mater Interfaces* 8(49): 33405-33411.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : BARUT, Burak
Uyruğu : T.C
Doğum tarihi ve yeri : 01.10.1988 – TRABZON
Medeni hali : Evli
Telefon : 0462 377 88 50
E-Posta : burakbarut@ktu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı	-
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı	2016
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı	2016
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2013
Lise	Tevfik Serdar Anadolu Lisesi	2006

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1. Araştırma Görevlisi	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2014-

YABANCI DİL
İngilizce

UZMANLIK ALANI
Biyokimya

YAYINLAR

1. Barut B, Çoban Ö, Yalçın CÖ, Baş H, Sarı S, Bıyıklıoğlu Z, Demirbaş Ü, Özel A (2020). Synthesis, DNA interaction, *in vitro/in silico* topoisomerase II inhibition and photodynamic therapy activities of two cationic BODIPY derivatives. Dyes Pigm 174: 108072.
2. Barut B, Bıyıklıoğlu Z, Yalçın CÖ, Abudayyak M (2020). Non-aggregated axially disubstituted silicon phthalocyanines: Synthesis, DNA cleavage and *in vitro* cytotoxic/phototoxic anticancer activities against SH-SY5Y cell line. Dyes Pigm 172: 107794.
3. Yalazan H, Barut B, Ertem B, Yalçın CÖ, Ünver Y, Özel A, Ömeroğlu İ, Durmuş M, Kantekin H (2020). DNA interaction and anticancer properties of new peripheral phthalocyanines carrying tosylated 4-morpholinoaniline units. Polyhedron 177: 114319.
4. Arroo R, Sarı S, Barut B, Özel A, Ruparelia K, Şöhretoğlu D (2020). Flavones as tyrosinase inhibitors: kinetic studies *in vitro* and *in silico*. Phytochem Anal doi: 10.1002/pca.2897
5. Barut B, Yalçın CÖ, Sarı S, Çoban Ö, Keleş T, Bıyıklıoğlu Z, Abudayyak M, Demirbaş Ü, Özel A (2019). Novel water soluble BODIPY compounds: Synthesis, photochemical, DNA interaction, topoisomerases inhibition and photodynamic activity properties. Eur J Med Chem 183: 111685.
6. Sarı S, Barut B, Özel A, Şöhretoğlu D (2019). Tyrosinase inhibitory effects of *Vinca major* and its secondary metabolites: Enzyme kinetics and *in silico* inhibition model of the metabolites validated by pharmacophore modelling. Bioorg Chem 92: 103259.

7. Yalazan H, Barut B, Sarkı G, Ertem B, Ünver Y, Özel A, Kantekin H (2019). Syntheses, structural characterization, DNA-cleavage and antioxidant features of the new tetra-substituted organo-soluble non-peripherally CoII, CuII, ZnII and MgII phthalocyanines. *J Coord Chem* 72: 2409-2421.
8. Baş H, Barut B, Bıyıklıoğlu Z, Özel A (2019). Synthesis, DNA interaction, topoisomerase I, II inhibitory and cytotoxic effects of water soluble silicon (IV) phthalocyanine and naphthalocyanines bearing 1-acetylpiperazine units. *Dyes Pigm* 160: 136-144.
9. Sari S, Barut B, Özel A, Kuruüzüm Uz A, Şöhretoğlu D (2019). Tyrosinase and α -glucosidase potential of compounds isolated from *Quercus coccifera* bark: *In vitro* and *in silico* perspectives. *Bioorg Chem* 86: 296-304.
10. Demirbaş Ü, Barut B, Özel A, Kantekin H (2019). Synthesis, characterization and investigation of cholinesterase inhibitory properties of novel peripherally tetra substituted metal-free and metallo-phthalocyanines. *J Mol Struct* 1187: 8-13.
11. Özel A, Demirbaş Ü, Barut B, Kantekin H (2019). The novel water soluble peripherally and non-peripherally tetra piperidine substituted phthalocyanines: Synthesis, characterization, DNA cleavage properties. *J Mol Struct* 1186: 325-332.
12. Barut EN, Engin S, Barut B, Kaya C, Kerimoğlu G, Özel A, Duman M (2019). Uroprotective effect of ambroxol in cyclophosphamide-induced cystitis in mice. *Int Urol Nephrol* 51: 803-810.
13. Demirbaş Ü, Barut B, Yalçın İ, Değirmencioğlu İ, Yıldırım S, Özel A (2019). Synthesis, characterization and investigation of cholinesterase inhibitory properties of novel phthalocyanines. *J Heterocycl Chem* 56: 1553-1559.
14. Engin S, Barut EN, Barut B, Duman M, Kaya C, Kerimoğlu G, Özel A (2019). Uroprotective effect of pantoprazole against cyclophosphamide-induced cystitis in mice. *Support Care Cancer* 27: 4273-4281.
15. Renda G, Özel A, Akyüz Turumtay E, Barut B, Korkmaz B, Çol Ayvaz M, Demir A (2019). Comparison of phenolic profiles and antioxidant activity of three *Ornithogalum* L. species. *Turk J Biochem* 44(3): 299-306.
16. Keleş T, Barut B, Özel A, Bıyıklıoğlu Z (2019). Synthesis of water soluble silicon phthalocyanine, naphthalocyanine bearing pyridine groups and investigation of their DNA interaction, topoisomerase inhibition, cytotoxic effects and cell cycle arrest properties. *Dyes Pigm* 164: 372-383.

17. Demirbaş Ü, Barut B, Özel A, Çelik F, Kantekin H, Sancak K (2019). Synthesis, characterization and DNA interaction properties of the novel peripherally tetra 4-(3-methyl-4-(3-morpholinopropyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-1-yl) substituted water soluble Zn(II) and Cu(II) phthalocyanines. J Mol Struct 1177: 571-578.
18. Barut B, Barut EN, Engin S, Özel A, Sezen FS (2019). Investigation of antioxidant, α -glucosidase inhibitory, anti-inflammatory and DNA protective properties of *Vaccinium arctostaphylos* L.. Turk J Pharm Sci 16: 175-183.
19. Sellitepe HE, Doğan İS, Eroğlu G, Barut B, Özel A (2019). Synthesis, characterization and investigation of cholinesterase enzyme inhibition and antioxidant activities of some 4-aryl-1,4-dihydropyridine derivatives. J Res Pharm 66: 608-616.
20. Durmuş M, Barut B, Özel A, Sellitepe HE, Doğan İS (2019). Aril(alkil)azol türevlerinin sentezi ve biyolojik aktiviteleri. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 12: 60-71.
21. Renda G, Özel A, Barut B, Korkmaz B, Yaylı N (2019). The volatile chemical compositions of the essential oil/SPME and enzyme inhibitory and radical scavenging activities of solvent extracts and the essential oils from *Coronilla orientalis* Miller and *C. varia* L. grows in Turkey. Iran J Pharm Res 18: 1831-1842.
22. Renda G, Özel A, Barut B, Korkmaz B, Soral M, Kandemir Ü, Liptaj T (2018). Bioassay guided isolation of active compounds from *Alchemilla barbatiflora* Juz.. Rec Nat Prod 12: 76-85.
23. Arslan T, Keleş T, Barut B, Özel A, Bıyıklıoğlu Z (2018). Synthesis of novel monostyryl and distyryl boron dipyrromethenes bearing 4-((2-hydroxyethyl)(methyl)amino group as cholinesterase and tyrosinase inhibitors. Inorganica Chim Acta 471: 121-125.
24. Bıyıklıoğlu Z, Barut B, Özel A, (2018). Synthesis, DNA/BSA binding and DNA photocleavage properties of water soluble BODIPY dyes. Dyes Pigm 148: 417-428.
25. Çelik F, Ünver Y, Barut B, Özel A, Sancak K (2018). Synthesis, characterization and biological activities of new symmetric bis-1,2,3-triazoles with click chemistry. Med Chem Res 14: 230-241.
26. Şöhretoğlu D, Sari S, Soral M, Barut B, Özel A, Liptaj T (2018). Potential of *Potentilla inclinata* and its polyphenolic compounds in α -glucosidase inhibition: Kinetics and interaction mechanism merged with docking simulations. Int J Biol Macromol 108: 81-87.

27. Şöhretoğlu D, Sari S, Barut B, Özel A (2018). Tyrosinase inhibition by some flavonoids: Inhibitory activity, mechanism by *in vitro* and *in silico* studies. *Bioorg Chem* 81: 168-174.
28. Şöhretoğlu D, Sari S, Barut B, Özel A (2018). Tyrosinase inhibition by a rare neolignan: inhibition kinetics and mechanistic insights through *in vitro* and *in silico* studies. *Comput Biol Chem* 76: 61-68.
29. Yaylı N, Fandakli S, Korkmaz B, Barut B, Renda G, Erik İ (2018). Biological evaluation (antimicrobial, antioxidant, and enzyme inhibitions), total phenolic content and volatile chemical compositions of *Caucasalia macrophylla* (M. Bieb.) B. Nord. (Asteraceae). *J Essent Oil Bear Pl* 5: 1359-1373.
30. Şöhretoğlu D, Sari S, Barut B, Özel A (2018). Discovery of potent α -glucosidase inhibitor flavonols: Insights into mechanism of action through inhibition kinetics and docking simulations. *Bioorg Chem* 79: 257-264.
31. Renda G, Sari S, Barut B, Soral M, Liptaj T, Korkmaz B, Özel A, Erik İ, Şöhretoğlu D (2018). α -Glucosidase inhibitory effects of polyphenols from *Geranium asphodeloides*: Inhibition kinetics and mechanistic insights through *in vitro* and *in silico* studies. *Bioorg Chem* 81: 545-552.
32. Renda G, Özel A, Barut B, Korkmaz B, Yaylı N (2018) *In vitro* protective and enzyme inhibitory effects of *Crataegus microphylla* extracts against oxidative damage. *Turk J Pharm Sci* 15: 77-84.
33. Gümüş MK, Doğan İS, Barut B, Özel A, Kahveci B (2017). Synthesis, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and tyrosinase inhibition, and antioxidant studies of 2-[2-(substituted-benzyl)-4(7)-phenyl-1H-benzimidazol-1-yl]acetohydrazides and methyl 2-[2-(substituted-benzyl)-4(7)-phenyl-1H-benzimidazol-1-yl]acetates. *Bulg Chem Commun* 49: 107-114.
34. Barut EN, Barut B, Engin S, Yıldırım S, Yaşar A, Türkiş S, Özel A, Sezen FS (2017). Antioxidant capacity, anti-acetylcholinesterase activity and inhibitory effect on lipid peroxidation in mice brain homogenate of *Achillea millefolium*. *Turk J Biochem* 4: 493-502.
35. Kahriman N, Haşımoğlu Z, Serdaroğlu V, Beriş FŞ, Barut B, Yaylı N (2017). Synthesis of novel pyrazolines, their boron–fluorine complexes, and investigation of antibacterial, antioxidant, and enzyme inhibition activities. *Arch Pharm* 350: 1-12.

36. Demirbaş Ü, Akyüz D, Bayrak R, Barut B, Koca A, Kantekin H, Değirmencioğlu İ (2017). Synthesis, characterization and investigation of electrochemical and spectroelectrochemical properties of peripherally and non-peripherally tetra 2-methyl-5-benzothiazole substituted nickel(II), copper(II) and cobalt(II) phthalocyanines. *Synth Met* 231: 112-119.
37. Barut B, Demirbaş Ü, Şenocak A, Özel A, Kantekin H (2017). Water soluble axially morpholine disubstituted silicon phthalocyanines: Synthesis, characterisation, DNA/BSA binding, DNA photocleavage properties. *Synth Met* 229: 22-32.
38. Keleş T, Barut B, Bıyıklıoğlu Z, Özel A (2017). A comparative study on DNA/BSA binding, DNA photocleavage and antioxidant activities of water soluble peripherally and non-peripherally tetra-3-pyridin-3-ylpropoxy-substituted Mn(III), Cu(II) phthalocyanines. *Dyes Pigm* 139: 575-586.
39. Demirbaş Ü, Pişkin M, Akçay HT, Barut B, Durmuş M, Kantekin H (2017). Synthesis, characterisation, photophysical and photochemical properties of free-base tetra-(5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenoxy)phthalocyanine and respective zinc(II) and lead(II) complexes. *Synth Met* 223: 166-171.
40. Demirbaş Ü, Göl C, Barut B, Bayrak R, Durmuş M, Kantekin H, Değirmencioğlu İ (2017). Peripherally and non-peripherally tetra-benzothiazole substituted metal-free zinc (II) and lead (II) phthalocyanines: Synthesis, characterization, and investigation of photophysical and photochemical properties. *J Mol Struct* 1130: 677-687.
41. Demirbaş Ü, Akyüz D, Akçay HT, Barut B, Koca A, Kantekin H (2017). Synthesis, characterization and investigation of electrochemical and spectroelectrochemical properties of non-peripherally tetra-5-methyl-1,3,4-thiadiazole substituted copper(II) iron(II) and oxo-titanium (IV) phthalocyanines. *J Mol Struct* 1144: 112-119.
42. Barut B, Demirbaş Ü, Özel A, Kantekin H (2017). Novel water soluble morpholine substituted Zn(II) phthalocyanine: Synthesis, characterization, DNA/BSA binding, DNA photocleavage and topoisomerase I inhibition. *Int J Biol Macromol* 105: 499-508.
43. Şöhretoğlu D, Sari S, Özel A, Barut B (2017). α -Glucosidase inhibitory effect of *Potentilla astracanica* and some isoflavones: Inhibition kinetics and mechanistic insights through *in vitro* and *in silico* studies", *Int J Biol Macromol* 105: 1062-1070.

44. Barut B, Sofuoğlu A, Bıyıklıoğlu Z, Özel A (2016). The water soluble peripherally tetra-substituted zinc(II), manganese(III) and copper(II) phthalocyanines as new potential anticancer agents. *Dalton Trans* 45: 14301-14310.
45. Doğan İS, Özel A, Birinci Z, Barut B, Sellitepe HE, Kahveci B (2016). Synthesis of some novel 2-Substitutedbenzyl-(4)7-phenyl-1H-benzo[d]imidazoles in mild conditions as potent anti-tyrosinase and antioxidant agents. *Arch Pharm* 349: 881-888.
46. Özel A, Barut B, Demirbaş Ü, Bıyıklıoğlu Z (2016) Investigation of DNA binding, DNA photocleavage, topoisomerase I inhibition and antioxidant activities of water soluble titanium(IV) phthalocyanine compounds. *J Photochem Photobiol B* 157: 32-38.
47. Demirbaş Ü, Uslu Kobak RZ, Barut B, Bayrak R, Koca A, Kantekin H, Synthesis and electrochemical characterization of tetra-(5-chloro-2- (2,4-dichlorophenoxy)phenol) substituted Ni(II), Fe(II) and Cu(II) metallophthalocyanines. *Synth Met* 215: 7-13.
48. Demirbaş Ü, Akyüz D, Barut B, Koca A, Kantekin H (2016). Electrochemical and spectroelectrochemical properties of thiadiazole substituted metallo-phthalocyanines. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 153: 71-78.
49. Demirbaş Ü, Pişkin M, Barut B, Bayrak R, Kantekin H, Durmuş M (2016). Metal-free, zinc(II) and lead(II) phthalocyanines functioning with 3-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-2-yl)-4-hydroxyphenethyl methacrylate groups: Synthesis and investigation of photophysical and photochemical properties. *Synth Met* 220: 276-285.
50. Ünver Y, Çelik F, Düğdü E, Barut B, Sancak K (2016). Synthesis of New Bis-Triazole Compounds Including Schiff Bases and Enzyme Inhibition and Antioxidant Activities. *Jacob J Med Chem* 1: 1-7.

BİLDİRİLER

1. Barut B, Yalçın CÖ, Sari S, Çoban Ö, Keleş T, Biyıklıoğlu Z, Abudayyak M, Demirbaş Ü, Özel A (2019). Photodynamic activity properties of novel BODIPY compound against colorectal cancer cell line. 27th Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF) Congress and 30th National Biochemistry Congress (NBC) of TBS, Antalya, 27 Ekim - 31 Aralık 2019, 35-35.

2. Barut B, Özel A, Yalçın CÖ, Keleş T, Biyiklioğlu Z, Abudayyak M, Demirbaş Ü. (2019). Anticancer properties of novel BODIPY compound bearing pyridine groups. 27th Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF) Congress and 30th National Biochemistry Congress (NBC) of TBS, Antalya, 27-31 Ekim 2019, 74-74.
3. Çoban Ö, Barut B, Yalçın CÖ, Özel A, Biyiklioğlu Z (2019). Evaluation of the anticancer activities of liposomal zinc(II) phthalocyanine bearing ferrocene groups and erlotinib on A549 cancer cell line. 8th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, İzmir, 14-16 Ekim 2019, 62-62.
4. Ertem B, Yalazan H, Barut B, Ünver Y, Özel A, Kantekin H (2019). Investigation of DNA cleavage and antioxidant properties of the new tetra-substituted organo-soluble non-peripherally metallophthalocyanines. Eurasian Congress on Molecular Biotechnology, Trabzon 19-21 Eylül 2019, 99-100.
5. Baş H, Barut B, Özel A, Biyiklioğlu Z (2018). Cytotoxic effects of silicon phthalocyanine, naphthalocyanine bearing acetyl piperazine groups and their water soluble derivatives. 1. Euroasia Biochemical Approaches & Technologies Congress, Antalya 27-30 Ekim 2018, 74.
6. Keleş T, Barut B, Biyiklioğlu Z, Özel A (2018) Water soluble silicon naphthalocyanine and its DNA binding, photocleavage, topoisomerase inhibition properties. 1.Euroasia Biochemical Approaches & Technologies Congress, Antalya 27-30 Ekim 2018, 75.
7. Barut B, Özel A, Keleş T, Biyiklioğlu Z (2018). Investigation of anticancer potential of silicon (iv) phthalocyanine and naphthalocyanine. TBS International Biochemistry Congress 2018 29th National Biochemistry Congress, Muğla 26-30 Ekim 2018, 51.
8. Özel A, Sarı S, Barut B, Şöhretoğlu D (2018). *In vitro* and *in silico* investigation of the inhibitory effects of some flavonoids on tyrosinase. TBS International Biochemistry Congress 2018 29th National Biochemistry Congress, Muğla 26-30 Ekim 2018, 67.
9. Özel A, Barut B, Biyiklioğlu Z, (2018). Cytotoxic effects of silicon phthalocyanine, naphthalocyanine and their water soluble derivatives. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara 26-29 Haziran 2018, 334.
10. Biyiklioğlu Z, Özel A, Barut B, Baş H (2018). Non-aggregated and water soluble silicon naphthalocyanine bearing acetyl piperazine units: Synthesis, DNA interaction and topoisomerase inhibition. 4th Organic Chemistry Congress, Antalya 4-7 Ekim 2018, 340.

11. Şöhretoğlu D, Sarı S, Barut B, Özel A (2018). Discovery of potent alpha-glucosidase inhibitor flavonoids: Insights into mechanism of action through inhibition kinetics and docking simulations. Young Scientist's Meeting on Advances in Phytochemical Analysis (Trends in Natural Products Research) , Liverpool 2-5 Temmuz 2018, 113.
12. Barut B, Yazıcı Bektaş N, Yeşil Y (2018). Potential therapeutic usage in neurodegenerative diseases of *Cephalaria procera fisch. & avé-lall.* in Turkey", 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara 26-29 Haziran 2018, 175.
13. Şöhretoğlu D, Sarı S, Barut B, Özel A (2018) Tyrosinase inhibition by a Rare Neolignan: An *in vitro* and *in silico* study. Internation Symposium on Medicinal Chemistry, Ljubljana 6-10 Eylül 2018, 338.
14. Sezen FS, Barut EN, Barut B, Doğu AH (2018). Kooperatifçilik ilkeleri ve uygulamaları dersinin eczacılık eğitimine katkısı. II. Ulusal Eczacılık Eğitimi ve Akreditasyon Kongresi, Eskişehir 10-11 Mayıs 2018, 30.
15. Bıyıklıoğlu Z, Baş H, Özel A, Barut B (2018). Water soluble silicon phthalocyanine bearing piperazine units and investigation of its DNA binding, DNA photocleavage, topoisomerase I,II inhibition. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Ankara 26-27 Nisan 2018, 709.
16. Bıyıklıoğlu Z, Keleş T, Barut B, Özel A (2018). The synthesis of water soluble silicon phthalocyanine and investigation of its DNA binding, DNA photocleavage, topoisomerase I,II inhibition. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Ankara 26-27 Nisan 2018, 707.
17. Korkmaz B, Fandakli S, Barut B, Yıldırım S, Şener SÖ, Öztürk E, Yaylı N (2018). Biological activities, phenolic, volatile and essential oil composition of *Campanula latifolia l. subsp. Latifolia*. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara 26-29 Haziran 2018, 35.
18. Barut B, Demirbaş Ü, Özel A, Kantekin H (2017). Synthesis, DNA/BSA binding, DNA photocleavage properties and topoisomerase I inhibition of morpholine substituted Zn(II) phthalocyanine. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, 26-29 Nisan 2017, 210.

19. Sofuoğlu A, Bıyıklıoğlu Z, Barut B, Özel A (2017). Water soluble silicon phthalocyanines, naphthalocyanines and investigations of their DNA binding, DNA photocleavage, topoisomerase I inhibition. Ancon-International Congress on Chemistry and Materials Science, Ankara, 5-7 Ekim 2017, 39.
20. Barut B, Özel A, Bıyıklıoğlu Z (2017). "DNA/Protein binding and DNA photocleavage properties of the water soluble BODIPY compounds. International Biochemistry Congress-28.Ulusal Biyokimya Kongresi, Erzurum 19-23 Eylül 2017, 40.
21. Durmuş M, Doğan İS, Barut B, Sellitepe HE, Özel A (2017). 1-(2,4-Diklorofenil)-2-(1H-1,2,4-Triazol-1-il)Etil alkol ve bu alkol bileşiğinin ester türevlerinin sentezlenmesi ve biyolojik aktivite çalışmalarının yapılması. 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon 17-20 Ekim 2017, 163.
22. Barut EN, Engin S, Barut B, Özel A, Sezen FS (2017). Antioxidant, anti-inflammatory and DNA-damage protection activities of *Vaccinium arctostaphylos* fruit extracts. International Biochemistry Congress-28.Ulusal Biyokimya Kongresi, Erzurum 19-23 Eylül 2017, 32.
23. Kahrıman N, Ünver Y, Peker K, Barut B (2017). Synthesis of novel chalcone derivatives and investigation of their enzyme inhibition/antioxidant activities. 3rd International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies, Bakü, 10-13 Eylül 2017, 243.
24. Özel A, Barut B, Demirbaş Ü, Kantekin H (2017). Synthesis and DNA interaction properties of novel water soluble Zn(II) and Cu(II) phthalocyanines. 3rd International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development - DRD 2017, Erzurum 5-7 Ekim 2017, 153.
25. Sellitepe HE, Barut B, Doğan İS, Eroğlu G, Özel A (2017) Synthesis and investigation of antioxidant activities and cholinesterase inhibition effects of some 4-Aryl-1,4-dihydropyridine derivatives. 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), Ankara 11-13 Ekim 2017, 10.
26. Barut B, Bıyıklıoğlu Z, Özel A, Keleş T (2017). The water soluble pyridine substituted Mn(III) and Cu(II) phthalocyanines: DNA/BSA binding, DNA photocleavage and antioxidant activities", IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul 26-29 Nisan 2017, 212.

27. Demirbaş Ü, Barut B, Kantekin H, Durmuş M, Değirmencioğlu İ (2017). Synthesis, photophysical and photochemical properties of non-peripherally tetra-substituted metal-free and metallo phthalocyanines. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul 26-29 Nisan 2017, 155.
28. Demirbaş Ü, Barut B, Özel A, Kantekin H (2017). DNA binding and photocleavage studies of water soluble silicon phthalocyanines. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul 26-29 Nisan 2017, 214.
29. Özel A, Bıyıklıoğlu Z, Arslan T, Barut B, Keleş T (2017). Investigation of cholinesterase inhibition of novel BODIPY compounds. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul 26-29 Nisan 2017, 213.
30. Demirbaş Ü, Barut B, Özel A, Değirmencioğlu İ (2017). Acetylcholine/butyrylcholinesterase inhibition properties of metal-free and metallo phthalocyanines containing thiophene groups. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul 26-29 Nisan 2017, 211.
31. Gümüş MK, Doğan İS, Barut B, Özel A, Kahveci B (2017). Green synthesis of some novel bioactive benzimidazole derivatives. 3rd International Conference on New Trends in Chemistry, Helsinki 28-30 Nisan 2017, 124-125.
32. Barut EN, Barut B, Engin S, Özel A, Sezen FS (2016). *In vitro* antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of *Achillea millefolium*. 41st FEBS Congress, Aydın 3-8 Eylül 2016, 268.
33. Barut B, Özel A, Sofuoğlu A, Biyıklıoğlu Z (2016). DNA binding, photocleavage and topoisomerase I inhibition of novel water soluble phthalocyanine compounds. 41st FEBS Congress, Aydın 3-8 Eylül 2016, 156.
34. Özel A, Renda G, Barut B, Yaylı B, Yaylı N (2016). The prevention DNA oxidative damage inhibition of acetylcholinesterase, tyrosinase, α -glucosidase and antioxidant activities of leaf, stem bark and fruit extracts from *Crataegus microphylla*. 41st FEBS Congress, Aydın 3-8 Eylül 2016, 371.
35. Fandakli S, Ulaş N, Barut B, Yaşar A, Kahriman N, Özel A (2016). *Senecio macrophyllus* M. Bieb bitkisinin GC-FID ve GC-MS analizi, uçucu yağ, metanol ve sulu ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon 31 Ağustos - 5 Eylül 2016, 183.

36. Fandakli S, Barut B, Yayli B, Renda G, Özel A, Yayli N (2016). *Sambucus ebulus* L.'nin antioksidan aktivitesinin ve tirozinaz enzim inhibisyonunun incelenmesi. XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon 31 Ağustos - 5 Eylül 2016, 178.
37. Fandakli S, Yayli B, Barut B, Özel A, Renda G, Yayli N (2016). *Rhododendron caucasicum* Pallas bitkisine ait metanol ekstresinin antioksidan aktivitesinin ve α -glukozidaz enzim inhibisyonunun incelenmesi. XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon 31 Ağustos - 5 Eylül 2016, 170.
38. Barut B, Yayli B, Renda G, Özel A (2016). *Coronilla orientalis* Miller ve *Coronilla varia* L. bitkilerinin enzim inhibisyonlarının ve DPPH radikal süpürücü etkilerinin incelenmesi", XXII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon 31 Ağustos - 5 Eylül 2016, 116.
39. Peker K, Kahriman N, Serdaroğlu V, Barut B (2016). Yeni kalkon/azakalkon N-glikozitlerin sentezi ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. III. Ulusal Organik Kimya Kongresi, Trabzon 5-8 Eylül 2016, 106.
40. Yalazan H, Sarki G, Barut B, Kantekin H (2016). Yeni metalli ftalosiyanınların sentezi, DNA fotokesim ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi", III. Ulusal Organik Kimya Kongresi, Trabzon 5-8 Eylül 2016, 60.
41. Fandakli S, Kahriman N, Serdaroğlu V, Barut B (2016). Metoksi sübtitüe kalkon N-glikozitlerin sentezi ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi", III. Ulusal Organik Kimya Kongresi, Trabzon 5-8 Eylül 2016, 108.
42. Renda G, Kandemir Ü, Liptaj T, Soral M, Yayli B, Barut B, Özel A (2016). Secondary metabolites from *Alchemilla barbatiflora* Juz.. Trends in Natural Product Research: A Young Scientist Meeting of PSE and IUNG, Pulawy, 30 Mayıs - 2 Haziran 2016, 84.
43. Barut EN, Engin S, Barut B, Abudayyak M, Duman M, Özel A (2016). Ambroxol improves cyclophosphamide-induced oxidative damage and contractility in mice urinary bladder. 7th European Congress of Pharmacology, İstanbul 26-30 Haziran 2016, 349.
44. Kahriman N, Serdaroğlu V, Korkmaz B, Barut B (2016). Sytnthesis and enzyme inhibitory activities of novel azachalcone N-glucoside compounds. 4th International BAU Drug Design Congress, İstanbul 13-15 Ekim 2016, 92.

45. Renda G, Özel A, Yayli B, Barut B, Çol Ayvaz M, Akyüz Turumtay E (2015). Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of three *Ornithogalum L.* species. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, 9-12 Haziran, 340.
46. Barut B, Yıldırım S, Özel A, Yaşar A (2015) Phenolic compounds and antioxidant activities of *Lichen Pertusaria sp.* 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, 9-12 Haziran 2015, 206.
47. Barut B, Özel A, Demirbaş Ü, Bıyıklıoğlu Z (2015). Titanyum(IV) ftalosiyanın bileşiklerinin DNA etkileşimleri ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Antalya, 3-6 Kasım 2015, 256.
48. Barut B, Sevgi S, Renda G, Özel A, Yalçın F N (2015). Cholinesterase and tyrosinase inhibitory activities of two *Astragalus L.* species from Turkey. Gazi Pharma Symposium, Antalya, 12-15 Kasım 2015, 114.

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. Prof.Dr. Nazmi ÖZER Bilim Ödülü (1.lık), Türk Biyokimya Derneği, Ekim 2019.
2. Yayın Teşvik Ödülü, TÜBİTAK, Haziran 2019.
3. Yayın Teşvik Ödülü, TÜBİTAK, Haziran 2019.
4. Yayın Teşvik Ödülü, TÜBİTAK, Haziran 2019.
5. Yayın Teşvik Ödülü, TÜBİTAK, Haziran 2019.
6. 2018 Yılı Genç Bilim ve Sanat İnsanı Ödülü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Mayıs 2019.
7. Kimyagerler Derneği 2. Araştırma Teşvik Ödülü, Kimyagerler Derneği, Mart 2018.
8. Prof.Dr. Nazmi ÖZER Bilim Ödülü (2.lık), Türk Biyokimya Derneği, Ekim 2018
9. Prof.Dr. Nazmi ÖZER Bilim Ödülü (3.lük), Türk Biyokimya Derneği, Ekim 2018.
10. Yayın Teşvik Ödülü, TÜBİTAK, Mart 2018.
11. Yayın Teşvik Ödülü, TÜBİTAK, Aralık 2018.
12. Yayın Teşvik Ödülü, TÜBİTAK, Temmuz 2018.
13. Yayın Teşvik Ödülü, TÜBİTAK, Mart 2018.
14. Yayın Teşvik Ödülü, TÜBİTAK, Eylül 2018.
15. Yayın Teşvik Ödülü, TÜBİTAK, Eylül 2018.
16. Yayın Teşvik Ödülü, TÜBİTAK, Ocak 2018.

17. Gönül Külahçıoğlu Kanser Araştırmaları Kongre Katılım Bursu, Türk Biyokimya Derneği, Eylül 2017
18. Prof.Dr. Nazmi ÖZER Bilim Ödülü (2.lık), Türk Biyokimya Derneği, Eylül 2017
19. Uluslararası Biyokimya Kongresi En İyi Poster Bildiri Ödülü, Uluslararası Biyokimya Kongresi 2017, Eylül 2017
20. 2016 Yılı Genç Bilim ve Sanat İnsanı Ödülü, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Mayıs 2017
21. Yayın Teşvik Ödülü, TÜBİTAK, Mayıs 2017
22. Gönül Külahçıoğlu Kanser Araştırmaları Kongre Katılım Bursu, Türk Biyokimya Derneği, Eylül 2016
23. 2228-B Yüksek Lisans Öğrencileri için Doktora Burs Programı, TÜBİTAK BİDEB, Nisan 2016
24. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Birinciliği, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Haziran 2013
25. Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Birinciliği, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Haziran 2013