T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR

FOTODUYARLI BİYOMALZEMELERLE UYGULANAN FOTODİNAMİK TERAPİ'NİN EPİGENETİK MEKANİZMALARA ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Mustafa YILDIZ

EDİRNE – 2022

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR

FOTODUYARLI BİYOMALZEMELERLE UYGULANAN FOTODİNAMİK TERAPİ'NİN EPİGENETİK MEKANİZMALARA ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Mustafa YILDIZ

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2021/142, TÜBİTAK 2211-C ve ÖYP

Tez No:

EDİRNE – 2022

TEŞEKKÜR

Tezimde desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı danışman hocam Prof. Dr. Tevfik Gülyaşar'a, Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Tammam Sipahi ve Doç. Dr. Metin Budak'a ve Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ali Yılmaz'a Doktora eğitimim boyunca birlikte olmaktan mutluluk duyduğum tüm arkadaşlarıma, teşekkür ederim. Projeme maddi destek sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Komisyonu üyelerine, Tez çalışmam boyunca, beni "TÜBİTAK-BİDEB 2211-Yurtiçi Doktora Burs Programı" kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a ve Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim. Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan en büyük destekçim eşim Betül Yıldız'a, yetişmemde büyük emekleri olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ ve AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

FOTODİNAMİK TERAPİ TARİHİ 3

FOTODİNAMİK TERAPİ 9

FOTODUYARLI AJANLAR 12

DOKU ile IŞIK ETKİLEŞİMİ 25

FDT'DE FOTOKİMYASAL SÜREÇLER 32

AMİNOLEVULİNİK ASİT 44

FTALOSİYANİNLER 52

EPİGENETİK 55

GEREÇ ve YÖNTEMLER 88

BULGULAR 125

TARTIŞMA 168

SONUÇLAR 180

ÖZET 184

SUMMARY 186

KAYNAKLAR 188

ŞEKİLLER LİSTESİ 243

ÖZGEÇMİŞ 251

EKLER .....

SİMGELER ve KISALTMALAR

2-OG : 2-oksoglutarat

5-caC : 5-karboksil sitozin

5-fC : 5-formil sitozin

5-hmC : 5-hidroksimetil sitozin

ALA : Aminolevulinik asit

ALAS : Aminolevulinik asit Sentaz

Apaf-1 : Apoptoz Aktive Edici Faktör-1

ARE : Antioksidan Response Element

Bad : Bcl-2-associated death promoter

Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer

Bax : Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 : B Hücreli Lenfoma Protein-2

Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large

BH : Bcl-2 homoloji

Bid : BH3 interacting-domain

Bim : Bcl2-interacting mediator

BR : Bilirubin

CED : C. elegans ölüm geni

Casp : Kaspaz geni

Cyt c : Sitokrom-c

Diablo : Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI

DLG : Asp-Leu-Gly

DNMT : DNA metiltransferaz

EMEM : Eagle's Minimal Essential Medium

ER : Endoplazmik Retikulum

ETGE : Glu-Thr-Gly-Glu

FBS : Fetal Bovine Serum

FD : Fotoduyarlı Ajan

FDT : Fotodinamik Terapi

FTT : Fototermal etkileşimler

GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HAT : Histon Asetil Transferaz

Hb : Hemoglobin

HbO_2 : Oksihemoglobin

HDAC : Histon Deasetilaz

HO-1 : Hem Oksijenaz-1

HPPH : 2-(1-Hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a

HSP : Isı şoku protein

IAP : Apoptoz inhibitör protein

IC : Internal Conversion

IC50 : Half Maximal İnhibitor Konsantrasyonu

ISC : Intersystem Crossing

Keap1 : Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1

LLLT : Düşük seviyeli lazer tedavisi

^{m}C : Metil sitozin

MOMP : Mitokondriyal dış zar geçirgenliği

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid

Neh : Nrf2-ECH homology

NIR : Yakın kızılötesi

NOXA : Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1

Nrf2 : Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2

p53 : Protein 53

PBM : Fotobiyomodülasyon

Pc : Ftalosiyanin

PpIX : Protoporfirin IX

ROT : Reaktif Oksijen Türleri

RT-PCR : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Sipcs : Silisyum ftalosiyanin

Smac : Second mitochondria-derived activator of caspase

SOD : Süperoksit dismutaz

TET : Ten-Eleven Translocation

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein

Znpcs : Çinko ftalosiyanin

β-aktin : Beta-aktin

Φ : Kuantum verimi

GİRİŞ ve AMAÇ

Işık uzun zamandır tıbbi amaçlar için kullanılmış ve kullanılmaya devam etmektedir. Bu enerji kaynağının, fotoduyarlı bir ilacın ve moleküler oksijenin etkisini birleştirerek, yeni bir terapötik tedavi yöntemi olan, fotodinamik terapi (FDT) geliştirilmiştir. Dermatoloji, üroloji, oftalmoloji, pnömoloji, kardiyoloji, diş hekimliği ve immünoloji gibi birçok tıbbi alanda kullanılmaktadır (1). Ayrıca, FDT antimikrobiyal ve antiviral tedavilerin yanı sıra çeşitli bulaşıcı hastalıkların tedavisi, su sterilizasyonu ve kan ürünlerindeki patojenlerin inaktivasyonunda faydalı olduğu bulunmuştur. Ancak FDT adı altında yeni bir tıp alanı son zamanlarda ortaya çıkmıştır. Olumlu terapötik sonuçlar bildirilmiş olmasına rağmen, şimdiye kadar sadece birkaç fotoduyarlı ajan(fd) klinik onay almıştır ve bunlar dokuya nüfuz eden yakın kızılötesi bölgede zayıf absorbans, cildin ışığa duyarlılığı, düşük seçicilik gibi bir takım eksikliklere sahiptir (2). FDT için fotoduyarlılaştırıcılar dört nesilde kategorize edilebilir: (1) ışık ile ROT üretebilen, (2) derin dokuda uygulama için optimize edilmiş spektral ve fotokimyasal özelliklere sahip, (3) hedeflemeye sahip doku veya tümörde seçici birikimlerini artıran ve (4) ROT'un fotoduyarlılaşmasının seçici olarak yalnızca hedef kanser hücrelerinde etkinleştirildiği fotoduyarlılaştırıcılardır (3,4).

Canlılarda tüm moleküler yapılar ve olaylar DNA molekülündeki gen adı verilen özel diziler tarafından gerçekleştirilir. Fakat bu genlerinde yönetilmeleri, kontrol edilmeleri gerekir. Böylece en uygun zamanda biyolojik süreçlere katılabilirler.

Genler aktif şekilde transkripsiyon faktörleri adı verilen özel protein ve genler tarafından kontrol edilir. Fakat gen ifadesini belirleyen, nesilden nesile ve hücreden hücreye aktarılabilen farklı bir mekanizma daha mevcuttur. Buna epigenetik kod adı verilmektedir (5).

Bu tezde, FDT ile oluşturulan oksidatif strese maruz kalan hücre hattında, indüklenen oksidatif stresin rolüne ve kanser hücresinin buna vereceği yanıtta genetik ve epigenetik değişikliklerle olası bağlantısına ve kanser hücrelerinin gelişimine veya yok edilmesi üzerine olan etkilerine odaklanmaktadır. Bu tezin yanıtlayacağı ana sorular: “Oksidatif stresten korunma ya da detoksifikasyon mekanizmalarının hücre ile fotodinamik terapi sırasında oluşan oksidatif stres toleransı epigenetik mekanizmalarla mı yönetiliyor? Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler kanser sürecinde deregüle edilir ve heterojen genetik ve epigenetik modifikasyonlar yoluyla ekspresyonları değişir. Tüm bu değişiklikler, hücre döngüsü ve apoptoz gibi redoks dengesinde geçici değişikliklerin meydana gelebileceği çeşitli hücresel süreçler üzerinde etkilerini gösterir. Keap1/Nrf2 protein-protein etkileşiminin bozulması ve bunun ekspresyon seviyelerindeki dengesizliği ve sonucunda hücresel detoksifiye edici proteinlerin yukarı regülasyonu ile sonuçlanması beklenen bir hipotezdi. Ancak, oksidatif stres altında Nrf2-Keap1 etkileşimi pozitif yönlü olarak antioksidan ve detoksifiye edici genlerin yukarı regüle edilmesi doz ve ışıma bağımlılığı bağlamında nasıl değişecek sorusuna bir cevap verilmiş olundu. Nrf2 burada doz ve ışıma bağımlılığında her dozda ve her bir stresör için bağımlılığı ve biyouyumlulukları nasıl olacak? Porfirin inhibitörü olan HO-1 geni yine porfirin türevi olan aminolevulinik asit(porfirin sentezin ilk aşamasında olan bir madde), Zn ve Si pc’lerde birbirine benzer bir etki mi gösterecek hangisinin etkinliği diğerinde daha etkin bu da katabilözer olan HO-1 ekspresyonuna bakarak maddelerin karşılatırılması yapılmıştır. Nrf2'nin epigenetik düzenlemesinin, oksidatif stres veya ilaç metabolizması ile ilgili hastalıkların tedavisinde olası bir terapötik hedef olabilir mi? ALA ve Pc türevli stresörler oksidatif strese verilen yanıtın oluşturduğu mekanizmayı anlamaya katkı sunarak yeni türevli maddelerin geliştirilmesine katkı sunmaktadır. Hepatosellüler karsinom’da Keap1 ve Nrf2'nin epigenetik düzenleyici mekanizmaları üzerine araştırmalar henüz başlangıç aşamasındadır ve bu alanda daha fazla araştırmaların yapılması gereksinim vardır.

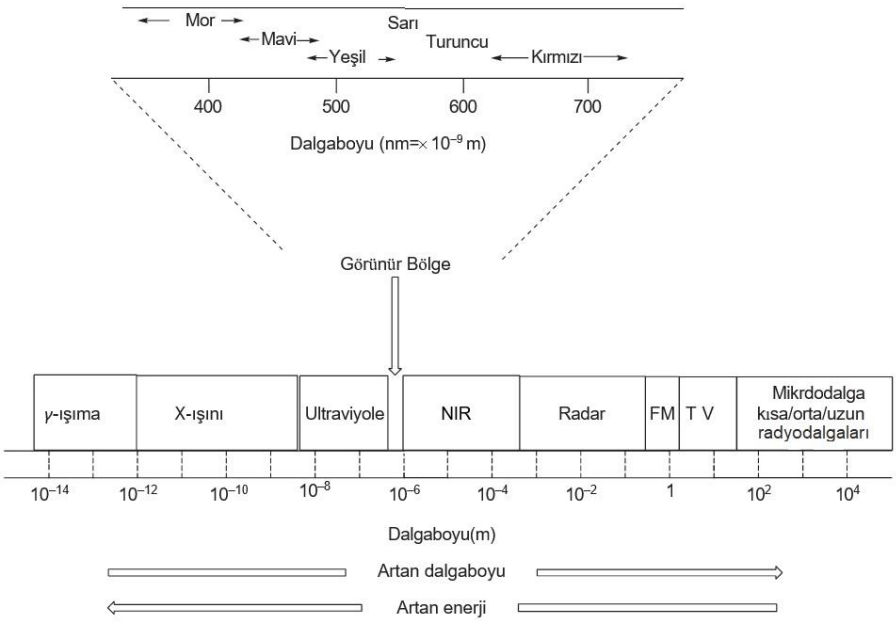
GENEL BİLGİLER

FOTODİNAMİK TERAPİ TARİHİ

Işık yüzyıllardır çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır. Işık bir enerji şeklidir. Bazı kimyasal bileşiklerin molekülleri, görünür ışığın absorbe etme ve daha sonra absorbe ettikleri enerjinin çoğunu bir oksijen molekülüne aktarma yeteneğine sahiptir. Işık, çok daha geniş bir elektromanyetik spektrumun bir bölümünü temsil eder (6). UV (200-400 nm), VIS (400-700 nm), NIR "I" (755-940 nm), NIR "II" (940-1300 nm), MIR (1,3-3 μm) ve Uzak IR (3 μm ve ötesi) olarak ayrılabilir. Işığın normalde dalgalar ve fotonlar olarak var olduğu düşünülür (ışığın ikili doğası). Uzayda yayılırken ışığın dalga özelliği, davranışını tanımlamak için en kullanışlıdır, oysa atomlar arasındaki etkileşimleri ve atomlar arasındaki enerji transferini karakterize ederken, ışığın parçacık özelliği bu etkileşimleri daha açıklayıcıdır (7). Tek bir fotonun enerjisi şu şekilde $E=\frac{hc}{\lambda}$ tanımlanır.

Işık, bir ortamda olduğu kadar, boşlukta da sinüzodial olarak yayılan elektrik ve manyetik alanlardan oluşan elektromanyetik bir alandır. Bununla birlikte kuantum mekaniği ışığı, fotonlar veya kuantum olarak adlandırılan enerji paketleri olarak tanımlar (8). Şekil 1'de elektromanyetik spektrum, dalga boyları ve dalga sayıları (cm^{-1} olarak) ile karakterize edilen optik dalgaların farklı spektral bölgelerini açıklar. Dalga boyları genellikle ilişkili renkleri kullanılarak adlandırılır ve mavi (400-470 nm), yeşil (470-550 nm), kırmızı (630-700 nm) ve NIR (700-1200 nm) ışıklarını içerir.

Genel olarak, kaynağın dalga boyu ne kadar uzun olursa, dokulara penetrasyon o kadar derin olur (9).

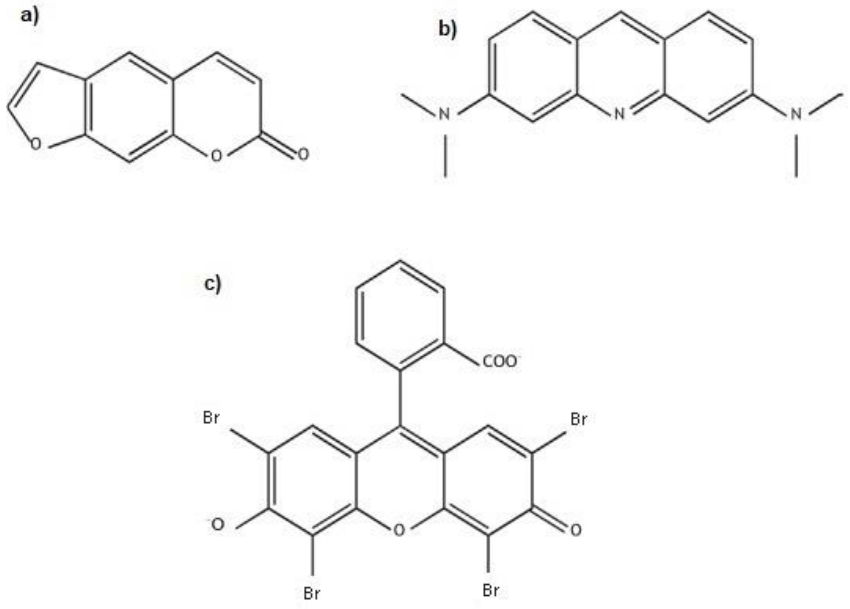


Şekil 1. Elektromanyetik spektrum (10)

Işığın tedavi edici etkisi psoralen varlığında vitiligo lezyonlarının tedavisinde yaklaşık 3000 yıl önce keşfedildi (11). Psoralen tarafından fotokimyasal olarak üretilen reaktif oksijen türleri(ROT)'nin hücresel membranlara zarar verdiği, mitokondrinin disfonksiyonuna neden olduğu ve keratinositlerin ve lenfositlerin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (12). Psoralen fotoduyarlılığı, tümör nekroz faktörü (TNF)-alfa ve vasküler endotelyal büyüme faktörünün ekspresyonu azaltmak dahil olmak üzere, multi sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin ekspresyonunlarında da değişikliğe yol açar (13). Eski Mısır, Hint ve Çin uygarlıkları ışığı sedef hastalığı, raşitizm, vitiligo ve cilt kanseri gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullandılar (14,15). 100 yıldan daha uzun süredir araştırmacılar, ışık ve belirli kimyasalların bir kombinasyonunun hücre ölümüne neden olabileceğini gözlemlediler. Polonyalı Sniadecki 1822'de raşitizmden korunmak için güneşe maruz kalmanın önemini belgelemiştir (16). 1900'de Alman tıp öğrencisi Oscar Raab *paramecium* mikroorganizmasını ışık ve akridin varlığında yok edilebildiğini buldu (17). J. Prime,

oral eosin ile tedavi edilen epilepsi hastalarının, güneşe maruz kalan bölgelerinde dermatit geliştiğini buldu (18).

1903'te Danimarkalı Niels Finsen, lupus vulgaris (cilt tüberkülozu) tedavisinde karbon ark kaynağından sağlanan ışığın kullanımı konusundaki çalışmaları nedeniyle Nobel Ödülü'ne layık görüldü ve modern fototerapinin kurucusu olarak kabul edildi (19). Bu çalışmadan birkaç yıl sonra, von Tappeiner ve Jesionek cilt tümörlerine eosin (Şekil 2) ve güneş ışığını beraber uygulayarak tedavi ettiler (20). von Tappeiner ve Jesionek 1907 yılında ışığa duyarlı olan reaksiyonlarda oksijenin önemini ve bilimsel literatüre giren fotodinamik aktivite kavramını ortaya koydular (21).



Şekil 2. FDT'de 1900'lerde kullanılan fd'ler A- psoralen; B- akridin; C- eosin

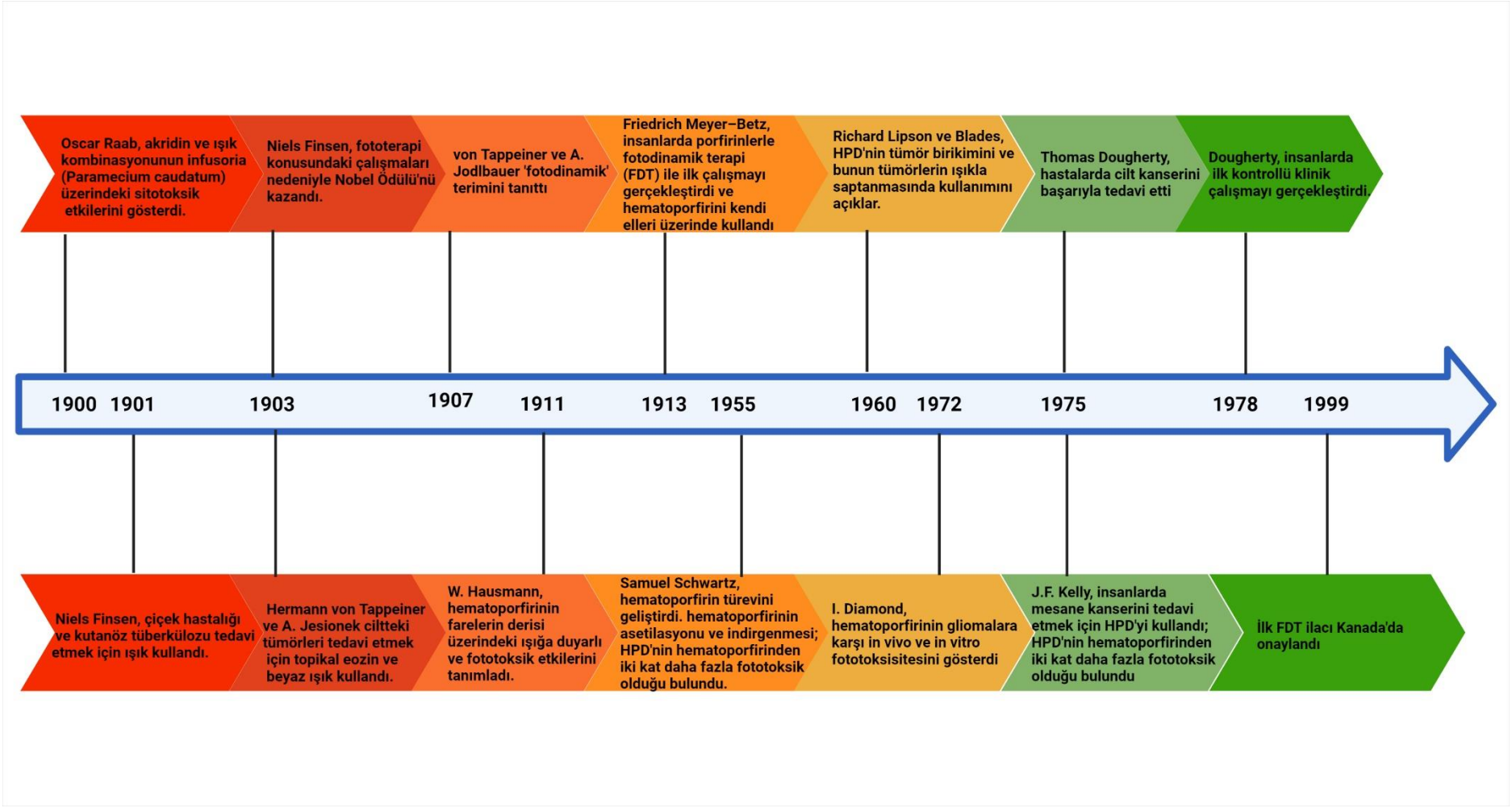
1948'de Figge, dışarıdan verilen porfirinlerin murin tümörlerinde seçici olarak biriktiğini gösteren bir dizi çalışma ortaya koydu (22). 1950'lerde İngiltere, Essex'teki Richard Cremer, gözlemci bir hemşireyi dinledikten sonra, yeni doğan bebeklerde sarılık hastalığının tedavisi olarak fototerapiyi tanıttı (23). 1950'lerde Ronchese tümör dokusundaki endojen floresan molekülleri aktive ederek dokunun sınırlarını daha doğru bir şekilde tanımlamaya çalıştı (24). Ancak FDT araştırmasının mevcut dönemi, 1960 yılında, cerrahi hastalardaki neoplastik dokuların, Samuel Schwartz tarafından hazırlanan bir porfirin karışımının uygulanmasından sonra, ultraviyole ışık

altında floresan ışık yaydığını bildiren Mayo Clinic'teki Lipson ve Baldes tarafından başlatılmıştır (25-27).

Lipson, memenin nükseden karsinomunun ortadan kaldırılması için Hematoporfirin(HpD) kullandı ve kullanılan HpD aracılı FDT'nin neoplastik doku ölümüne yol açtığına dair önemli kanıtlar bulundu (26,28,29). Fotodinamik terapi ile tedavide, ışığın kullanımı 1960'da lazerlerin icadıyla birlikte büyük bir destek aldı. Tıpta lazer uygulamaları, lazerlerin oldukça dikkate değer bazı özelliklerinden yararlanıldı, yani yüksek yönlülük, tek renklilik, parlaklık ve kısa süreli pulslu ışık üretme yeteneğinden yararlanıldı. Yüksek yönlülüğü nedeniyle bir lazer ışını bir mikrometrenin onda biri gibi çok küçük noktasal boyutlara odaklanabilir (30,31).

1972'de bir makale, hematoporfirinlerin tıbbi açıdan kanser hücrelerini seçici olarak yok edilmesine yönelik potansiyel maddeler olarak kullanılabileceği ortaya konuldu (32). 1972'de San Francisco'daki California Üniversitesi'nden Ivan Diamond, glioma hücrelerinin yok edilmesi için HpD ve ışığın beraber kullanımını gösteren ilk *in vivo* uygulama çalışmasını yayınladı (33). HpD ve ışık ile tedavi edilen implant edilmiş glioma tümörlerinde, 20 gün boyunca tümör büyümesinin durması ve hacimlerini büyük ölçüde azalttığı gözlendi. Üç yıl sonra, farelerde kanser tedavisi için hematoporfirin türevleri kullanıldığı rapor edildi. Dougherty'nin, Roswell Park Kanser Enstitüsü'ndeki grubunda hematoporfirinin murin tümörlerini yok etme kabiliyeti olduğu gösterildi (34). Işık kaynağı olarak, 1000 watt'lık bir ksenon lamba ile 620 nm'nin altındaki ve 640 nm'nin üzerindeki dalga boylarının dahil edilmemesi için filtrelendi ve iki dışbükey mercek yardımıyla odaklandı. 1978'e gelindiğinde, Dougherty'nin grubu ışığa duyarlı materyal olarak HpD'yi kullanmaya başlamış ve çeşitli bölgelerde tümörleri olan hastaların başarılı tedavisini rapor etmiştir (35). Bunu tekrarlayan meme karsinomunun başarılı tedavisini gösteren bir rapor izledi (36). Başlangıçta kanser tedavisine kullanılan bu yöntem, şimdi kanser teşhisi ve vasküler kaynaklı çeşitli hastalıkların tedavisi için de kullanılmaktadır. FDT, 1975'ten beri kansere odaklanmış olsa da, son on yılda FDT'nin mikrobiyal enfeksiyonların tedavisi için birçok olumlu özelliğe sahip olduğu bildirildi. FDT, gram pozitif ve gram negatif bakterilerin önemli ölçüde etkisizleştirilmesini sağlamış ve bakterilerin (çoklu) ilaca direnci sorununun üstesinden gelmek ve viral, mantar ve parazit gibi enfeksiyonları tedavi etmek için umut verici bir yöntemdir (37-39). 1980'lerde, topikal uygulama veya intravenöz olarak fd'nin eksojen uygulamalarının başarısı, araştırmacılara endojen fd

üretimi konusunda araştırma yapmaya teşvik etmiştir. Bu fikirde, işlevsiz hem biyosentezinin bir sonucu olan bir dizi kalıtsal ve akut hastalık olan porfirilerden esinlenilmiştir (Şekil 3) (40).

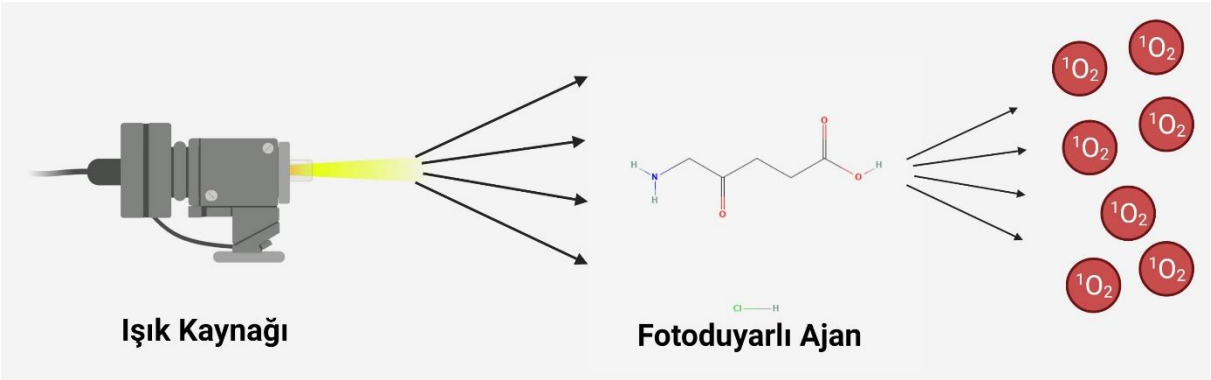


Şekil 3. Fotodinamik Terapi'nin tarihi

FOTODİNAMİK TERAPİ

Hem biyosentezi, biyolojik porfirinler ve türevlerinde ortak olan küçük bir yapı taşı olan 5-aminolevulinik asit (5-ALA) ile başlar. 5-ALA'dan hem biyosentezi, merkezi bir demir atomunun dahil edilmesiyle konakçının ışığa duyarlılığından kaçan bir süreçtir (41). 2001 yılında Foscan markalı fd, baş ve boyun kanserlerinin tedavisi için Avrupa Tıp Ajansı tarafından yükümlülüklerle onaylandı (42). 2003 yılında Photofrin, Barrett's özofagusu ile ilişkili yüksek dereceli displazi tedavisi için onaylandı (43). Bazı modifiye edilmiş porfirinler, malignitelerin tedavisi için Rusya ve Çin'de halihazırda onaylanmıştır (44). 2-(1-Hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a (HPPH), şu anda Photochlor® adı altında üretilmekte olan bir klorofil-a türevi klorin fd'dir (45). 2008 itibariyle, Photochlor® FDT için umut verici bir fd olarak kabul edildi ve baş ve boyun kanserlerinin yanı sıra özofagus karsinomunun tedavisi için Faz II klinik denemelerinden geçirildi. HPPH, 665 nm dalgaboyundaki ışıkla uyarılabilir. Lobel ve ark. tarafından yapılan bir çalışma, HPPH'ın, Photofrin®'den %30 daha büyük tümör yok etme gücüne sahip olduğunu ortaya koydu (46,47).

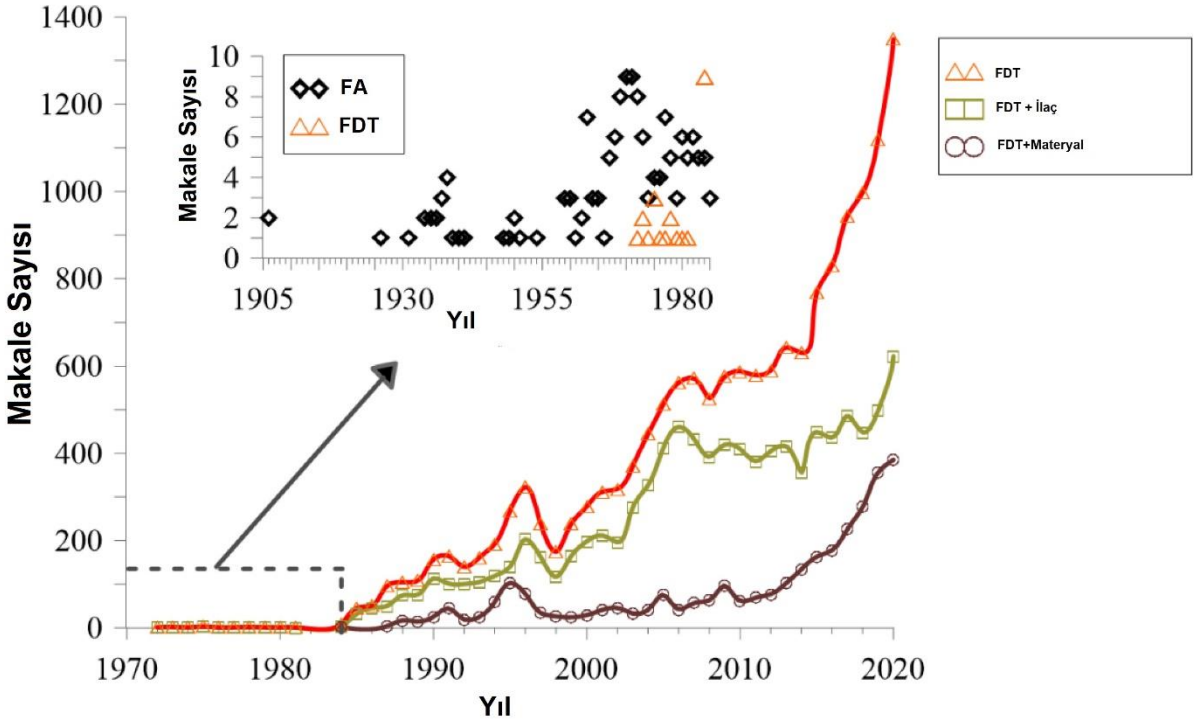
Fototerapi, ışığın tek başına tedavi amaçlı kullanılması olarak tanımlanabilir. Fotodinamik terapi, üç temel bileşeni içeren bir fototerapi şeklidir: bir fotoduyarlı madde, bir ışık kaynağı ve dokudaki oksijendir (Şekil 4). Bu bileşenler bir araya geldiklerinde, hedeflenen hücreler için toksik hale gelirler (48). Kullanılan ışık kaynağının dalga boyunun, fotoduyarlı ajan, reaktif oksijen türlerini (ROT) üretebilecek uygun uyarılma enerjisine sahip olması gerekir.



Şekil 4. Fotodinamik Terapi'nin temel bileşenleri

ROT'un ortaya çıkması, FDT ile uygulama sırasında iki tip reaksiyon yoluyla üretilir. Tip I reaksiyonda, doğrudan fd'den elektron/hidrojen transferini, iyon üretmeyi veya serbest radikal oluşturmak için bir substrat molekülünden elektron/hidrojen alınmasını içerir. Tip II reaksiyonda, singlet oksijen olarak bilinen elektronik olarak uyarılmış ve oldukça reaktif bir oksijen üretilir (49,50). FDT klinik olarak çok çeşitli onkolojik ve onkolojik olmayan tıbbi durumları tedavi etmek için kullanılır (51) ve hem minimal invazif hem de minimal toksik bir tedavi olarak kabul edilmektedir (52). FDT sistemik bir tedavi yöntemi olmayıp, tedavi yalnızca ışığın uygulandığı yerde gerçekleşir. Bu nedenle, lokalize hastalık tedavi edilirken hastanın sistemik tedavi görmesi gerekmez ve yan etkilerden de maksimum seviyede az etkilenilir.

Fotoduyarlı ajan, kanser hücrelerinde seçici olarak birikir ve onu çevreleyen normal dokular korunur. FDT, cerrahinin mümkün olmadığı durumlarda da kullanılabilir. Bir hastanın bir organında veya bir organın cerrahi olarak çıkarılamayan bir bölümünde (örneğin; akciğerin üst bronşlarında) kanser varsa, FDT ile bölge tedavi edilebilir. Üstelik maliyeti düşük bir işlemdir ve radyasyon tedavisinden farklı olarak, FDT tekrar tekrar kullanılabilir. Bu nedenle, uzun vadeli bir yönetimdir. Bu nedenle, tam tedavi mümkün olmasa bile, kanserin uzun süreli yönetimi için en iyi tedavi araçlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır (53). Hem fotoduyarlılaştırıcının hem de oksijenin uyarılmış halleri çok kısa yarı ömre sahiptir. Sonuç olarak, etkili olabilmek için her ikisinin de biyolojik olarak, önemli hücresel yapılara yakın olması gerekir. Fotodinamik terapi alanı, 1900'deki mütevazı başlangıcından beri gelişen bir alan olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 5). 1990'dan bu yana FDT ile ilgili yayınlardaki hızlı artışı görülmektedir. Bugüne kadar, FDT nanoteknolojik tekniklerle (örneğin, kuantum dotlar, fullerenler) ve antikor teknolojileri ile oftalmolojik, onkolojik, nörolojik, dermatolojik ve gastroenterolojik hastalıkları, enfeksiyonları ve aterosklerotik plakları tedavi etmek için aktif olarak araştırılmaktadır (53-56).



Şekil 5. Scopus veritabanında, arama sonuçlarında yıllık makale sayısı (57)

Fotodinamik Terapi'nin Temeli

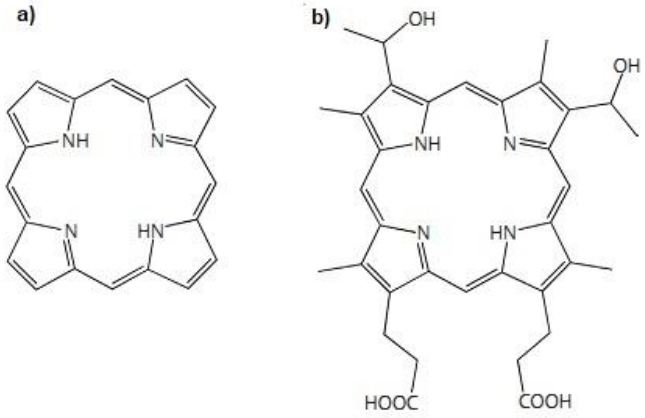
Fotodinamik terapi tedavisi, tümör dokusunda seçici olarak biriken bir fd'nin uygulanması ve ardından uygun dalga boyundaki ışığa maruz bırakılmasından oluşur (genellikle kırmızı spektral bölgede, λ≥600 nm dalga boyundaki kırmızı ışık dokuların daha derinlerine nüfuz eder). Şimdiye kadar en kapsamlı şekilde incelenen foto duyarlılaştırıcılar, on dokuzuncu yüzyılın ortalarında tanımlanan porfirinlerdir. Bu bileşikler, genellikle metalik olan bir yan zincir ile birlikte döngüsel bir konfigürasyonda metin(−CH=) köprüleriyle bağlanan dört pirol halkalı bir porfirin yapısı içerir. Porfirin yapılı demir hem'i oluşturur. Işıkla uyarılan fd'den gelen enerji, singlet oksijen ($^1O_2$) ve diğer reaktif oksijen türlerini (ROT) üretmek için $^3O_2$'ye aktarılır. Işıma ile üretilen bu sitotoksik ürünler, kanser hücrelerinin hasar görmesine ve ölümüne neden olabilecek bir dizi biyokimyasal olayı başlatır. HpD, Photofrin veya diğer fotoduyarlı ajanlar içeren dokuların ışınlanması, fazla enerjiyi floresan ışıma yoluyla atabilen uyarılmış bir durumun oluşumuna yol açar. FDT'de *in vivo* metodla tümör yok etmek için üç yol vardır. İlk olarak, FDT tümörlerin beslendiği damarlara zarar verir. Tümörlü hücrelerin en büyük canlılığının altında yatan şey bu hücreleri besleyen kan damarları ile gelen destekleyici besinlerdir. Vasküler olarak oksijen ve

besin ihtiyacını karşılayan tümör hücrelerine, uygulanan FDT sonucunda bu hücrelerin büyük oranda ortadan kalktığı rapor edilmiştir (50). İkinci olarak FDT'de ROT'u, eğer ışıma sırasında bölge için yeterli konsantrasyonda fd olması durumunda, üretebilir. *İn vivo* çalışmalar gösterir ki FDT doğrudan fotohasar ile tümörlü hücreleri ortadan kaldırabilir. Son olarak, bazı çalışmalarda FDT immün modifikasyon gerçekleştirebilirken, ya doğal katil hücreler ya da makrofajlar aracılığıyla immün sistemi stimüle eder ya da immün sistemi baskılayarak bu modülasyona neden olur. FDT ile indüklenen immun modülasyonun oluşturduğu etkilerin, çok önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (58).

FOTODUYARLI AJANLAR

Fotoduyarlılaştırıcılar'dan klinik FDT için onay alan ilk ışığa fd Photofrin'di, ancak bazı dezavantajlara sahipti. Photofrin, tümör dokusunda birikmesine rağmen, hedef doku ve sağlıklı doku oranları açısından genel olarak zayıf bir seçiciliği sahipti (59,60). Birinci nesil fd'nin sahip olduğu maksimum absorpsiyon dalga boyu 630 nm'dir ve nispeten kısadır. Bu kısa dalga boyu, lazer ışığı fd'yi etkinleştirdiğinde zayıf doku penetrasyonuna yol açar. Zayıf doku penetrasyonu nedeniyle, derinlerde oluşan tümörlere ışığın ulaşmasını önler. Fotoreaksiyonun gerçekleşmesi ve sırayla tümör dokusunu yok etmesi için gerekli olan uzun dalga boyları tercih edilir (61). Özellikle uzun süreli hastanın ışığa duyarlılığı nedeniyle, ikinci ve üçüncü nesil fotoduyarlılaştırıcılara ihtiyaç duyuldu. İkinci nesil fotoduyarlılaştırıcılar genellikle tek maddelerdir ve gelişmiş seçicilik ve aktiviteye sahiptir. İkinci nesil fd'lerin singlet oksijen üretmede daha etkili olduğu gösterilmiştir (61). Fotoduyarlılaştırıcılar, görünür ışıkla aktivasyona izin veren, çoğunlukla tetrapirolik yapıya sahip genişletilmiş halka sistemleri ile karakterize edilir (62). Işığın absorbe edilmesi üzerine, hücre içi molekülleri oksitleyen ve böylece hücreleri yok eden reaktif oksijen türleri oluşur. Klinik olarak uygulanan ilk fotoduyarlılaştırıcılar, optimal olmayan özelliklere sahip olan hematoporfirinlerdi. W. Haussmann, hematoporfirin ile porfirin bazlı FDT'ye öncülük eden ilk isimlerdendir. İki yıl sonra, 1913'te Alman Doktor Friedrich Meyer-Betz, memelilerde, özellikle de insanlarda intravenöz hematoporfirin uygulamasının fizyolojik etkilerini anlamaya çalıştı ve sonuç olarak kendisine 200 mg hematoporfirin enjekte etti (63). Güneşe maruz kaldıktan birkaç dakika sonra Meyer-Betz yüzünde ve vücudunun ışığa maruz kalan kısımları olan ellerinde şişlik ve aşırı ağrı hissetti.

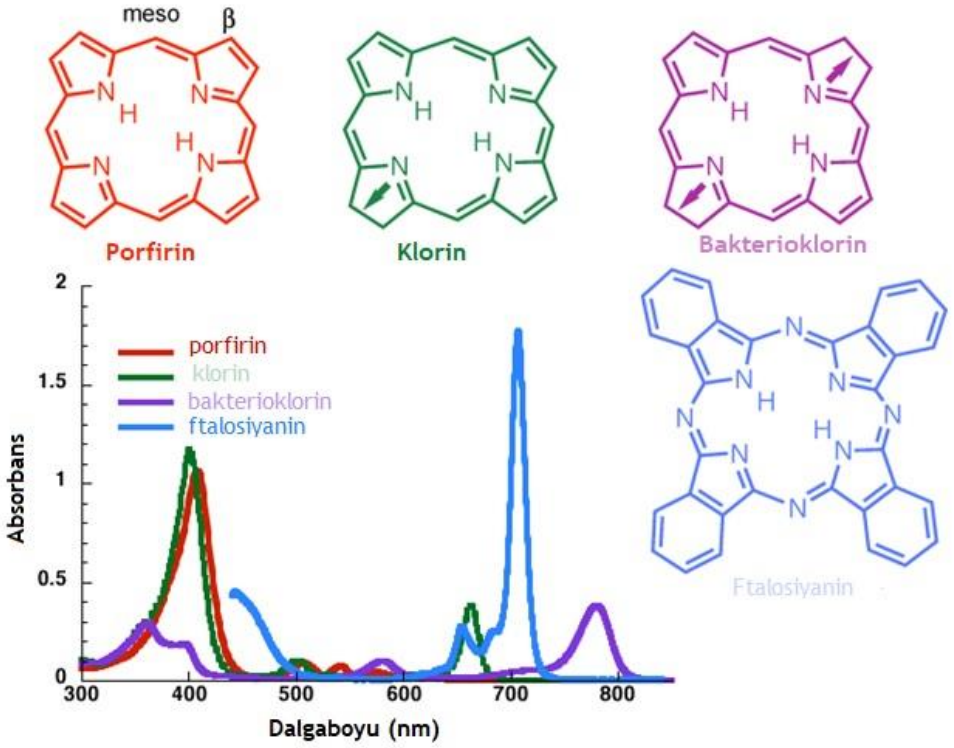
Bu akut fotoduyarlılık 2 aydan fazla sürdü ve hedeflenen porfirin terapötiklerinin potansiyel biyomedikal uygulamalarda kullanılabileceğini ifade etti (64). Porfirinler ve diğer tetrapirolik sistemler en çok çalışılan fd'lerdir. Bu fd'ler, soret bandı olarak bilinen yaklaşık 400 nm'de güçlü bir absorpsiyon bandına sahiptir (Şekil 6) (64). Ancak, soret bandına sahip ajanlar, FDT çalışmaları için fazla tercih edilmez. Çünkü kısa dalga boyunda ışık dokuya çok daha az nüfuz eder; ayrıca, hemoglobin bu aralıktaki ışığı absorbe eder.



Şekil 6. Porfirin bazlı fd'ler A- Porfirin makromolekülü ve B- Hematoporfirin

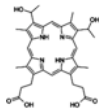
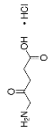
Toplam π elektron sayısına bağlı olarak, tetrapirollerin ana sınıfı olan porfirin üç sınıfa ayrılır: porfirinler, klorinler ve bakterioklorinler'dir. Dalga boyları, molar sönümleme katsayıları ve λ_{maks} değerleri, triplet ve singlet oksijenin kuantum verimleri olmak üzere fotofiziksel özellikleri arasındaki fark önemsiz derecede azdır. *İn vivo* deneyler yüksek bir fotodinamik aktiviteye sahip olan bakterioklorin'in, klorin analoğu (Foscan®) ile karşılaştırıldığında çok daha az kararlı olduğu kanıtlanmıştır (65). Bakterioklorinler, spektrumun yakın IR bölgesinde ışığı yoğun bir şekilde absorbe eder (λ_{maks}=760-780 nm) Çinko bakterioklorin, aprotik bir çözücü (benzonitril) içinde hem singlet oksijen hem de süperoksit anyon üretmesi bakımından ikili bir role sahip bir fd olarak işleve sahiptir (66). Bakterioklorinler, porfirin makrohalkasında iki olefinik bağa sahip olmadıkları için porfirinlerden farklıdır. Bakterioklorinler doğada, fotosentezde işlev gören proteobakterilerde bulunan bir grup pigment olarak bilinir; kükürt, sülfür veya diğer molekülleri indirgeyici olarak kullanır (67,68). Hematoporfirin,

hemoglobinin asit hidrolizinden elde edilir ve ilk olarak Alman kimyager Johann Joseph von Scherer tarafından 1841'de kurutulmuş kanı sülfürik asitle muamele ederek ve hemoglobindeki hem yapısından demir'in uzaklaştırılması ile sentezlenmiştir (69). Tek başına hematoporfirin, saf olmayan hematoporfirinden daha kötü bir fd olduğunu kanıtlandı. Hematoporfirin karışımının aktif bileşenini daha fazla saflaştırma girişimlerinde bulunarak, Schwartz hematoporfirin karışımının çeşitli türevlerini izole etti ve asetik-sülfürik asit karışımları ile muamele edilen örneklerin en iyi tümör lokalizasyonuna sahip olduğunu keşfetti (70). HpD'nin en büyük dezavantajı, tüm vücuda dağıldığı için tedavi edilen hastaların tedavinin ilk haftalarında karanlıkta kalmaları gerektiği gerçeğidir. Yani bu süre zarfında güneş ışığına veya yapay ışığa maruz kalan sağlıklı hücrelerde ölmekteydi. FDT'de fotoduyarlılaştırıcı olarak kullanılan porfirinlerin en önemli özellikleri, optik pencerede düşük absorpsiyon katsayılarıdır. Daha sonra, klorin, enzoporfirin, feoforbid, purpurin, teksafirin, porfisen ve ftalosiyanin gibi temel moleküllerinden türetilen daha birçok fd (Şekil 7) tasarlanmış ve sentezlenmiştir (71-73). Diğer fd'ler, sarı kantaron'un bir bileşeni olan hiperisin veya zerdeçaldan elde edilen kurkumin gibi doğal maddeler (Tablo 1) ve borondipirrometen (BODIPY) boyaları gibi son zamanlarda yapay fd'ler sentezlenmeye devam etmektedir (74,75).

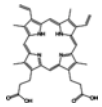
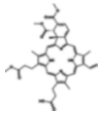


Şekil 7. FDT için kullanılan tetrapirol yapıları ve absorpsiyon spektrumları (76)

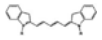
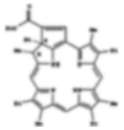
Tablo 1. Klinik kullanımı, temel molekül yapısı ve önemli özellikleri olan fotoduyarlılaştırıcıların listesi (55,77-81)

Sınıf	Moleküler yapı	Fotoduyarlı ajan	Ticari ismi	Distribütör	Uygulama Alanları	Onay	Absorsiyon dalgaboyu (nm)	Molar absorbsiyon katsayısı ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Hematoporfirin		HpD (kısmen saflaştırılmış), porfimer podiyum	Photofrin	Axcan Pharma Inc.	Endobronşiyal küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, yemek borusu kanserleri, mesane kanseri, mide ve rahim ağzı kanseri	Kanada (1993) Japonya (1994) US (1995) 40'tan fazla ülkede onaylandı	630	3.000
			Photogem	Moscow Research Onco-logical Institute				
Protoporfirin öncü ilaç		5-aminolevulinik asit (5-ALA)	Levulan	DUSA Pharma-ceuticals Inc.	Aktinik keratoz, bazal hücreli karsinom, jinekolojik tümör, beyin, baş ve boyun ve mesane tümörlerinin teşhisi	US (1999) EU (2001)	635	<10.000
		5-ALA-hexylester/H-ALA	Hexvix	PhotoCure ASA	Mesane tümörlerinin teşhisi	US (2010)	375–400	
			Cysview	Photocure Inc.				
		5-ALA-methylester/M-ALA	Metvix	Galderma S.A.	Aktinik keratoz, Bowen hastalığı	US (2004) EU (2001)	635	
		5-ALA-benzylester	Benzvix	PhotoCure ASA	Gastrointestinal kan.	Onaylanmamış	635	

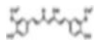
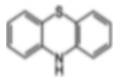
Tablo 1. (Devamı) Klinik kullanımı, temel molekül yapısı ve önemli özellikleri olan fotoduyarlılaştırıcıların listesi

Sınıf	Moleküler yapı	Fotoduyarlı ajan	Ticari ismi	Distribütör	Uygulama Alanları	Onay	Absorsiyon dalgaboyu (nm)	Molar absorbsiyon katsayısı ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Proto-porfirin		Boron proto-porfirin	BOPP	–	Beyin tümörleri	Onaylanmamış	630	–
Benzoporfirin		Benzoporfirin türevi monoasit halka A (BDP-MA)/ Verteporfin	Visudyne	Valeant Pharma-ceuticals Inter-national, Inc.	Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD), patolojik miyopi, histoplazmoz tedavisi	US (2000) EU (2000) Kanada (2000)	689–693	35.000
Klorinler		Meta-tetrahidro-fenilklorin (m-THPC)/Temoporfin	Foscan	Biolitec Pharma Ltd.	Baş ve boyun, prostat ve pankreas tümörleri	EU (2001)	652	30.000
		Mono-L-aspartil klorin e6 (Talaporfin, NPe6, LS11 veya MACE)	Aptocine	Light Sciences	Farklı kökenlerden akciğer kanseri ve solid tümörler	Japonya (2003)	664	45.000

Tablo 1. (Devamı) Klinik kullanımı, temel molekül yapısı ve önemli özellikleri olan fotoduyarlılaştırıcıların listesi

Sınıf	Moleküler yapı	Fotoduyarlı ajan	Ticari ismi	Distribütör	Uygulama Alanları	Onay	Absorsiyon dalgaboyu (nm)	Molar absorbsiyon katsayısı ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Siyaninler		Sodium 3-[(2Z)-2-[(E)-4-(1,3-Dibutyl-2,4,6-trioxo-5-hexahydropyrimidinylidene)but-2-enylidene]-1,3-benzoxazol-3-yl]propane-1-sulfonate	Mero-cyanine 540	–	Lösemi, nöroblastoma	–	556	110.000
Purpurinler		Tin etiopurpurin ($SnET_2$)/ Purlytin/Rostaporfin	Photrex	Miravant Medical Technologies Inc.	Kutanöz metastatik meme kanseri, bazal hücreli karsinom, Kaposi sarkomu ve prostat kanseri	Klinik aşama (Faz II)/ABD	660	28.000
Porpisenler		9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(-β-methoxyethyl)-porphycene	ATMPn	Glaxo Wellcome and Cytopharm	Sedef hastalığı ve melanom dışı cilt kanseri	Almanya (1997)	610–650	50.000

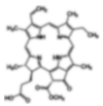
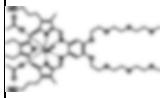
Tablo 1. (Devamı) Klinik kullanımı, temel molekül yapısı ve önemli özellikleri olan fotoduyarlılaştırıcıların listesi

Sınıf	Moleküler yapı	Fotoduyarlı ajan	Ticari ismi	Distribütör	Uygulama Alanları	Onay	Absorsiyon dalgaboyu (nm)	Molar absorbsiyon katsayısı ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Antrakinonlar		4,5,7,4',5',7'-Hexahydroxy-2,2- -dimethylnaphthodianthrone/Hypericin	Vidon(PVP-Hypericin)	Sanochemia Pharmazeutika AG	Mesane tümörlerinin teşhisi, Skuamöz hücreli karsinom ve bazal hücreli karsinom tedavisinde	Klinik aşama (Faz II)/EU	590	<52,000
Kurkuminoidler		(1E,6E)-1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione	Curcumin	–	Ağız Dezenfeksiyonu	Klinik aşama (Faz I)/ABD	425	55.000
Fenotiyazinler		3,7-bis (Dimethylamino)-phenothiazin-5-ium chloride	Methylene blue	–	Bazal hücreli karsinom, Kaposi sarkomu, kronik periodontitis	Klinik aşama (Faz I)/ABD	666	82.000
		(7-amino-8-methyl-phenothiazin-3-ylidene)-dimethyl-ammonium	Toluidine blue	–	Kronik periodontitis	Klinik aşama (Faz II)/ABD	596, 630	<51.000

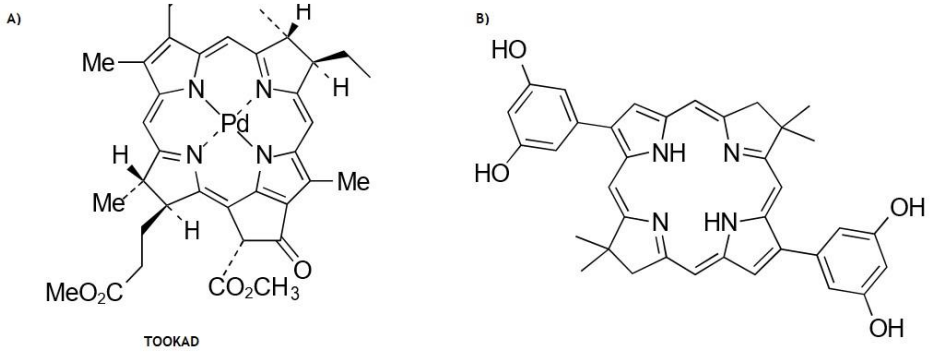
Tablo 1. (Devamı) Klinik kullanımı, temel molekül yapısı ve önemli özellikleri olan fotoduyarlılaştırıcıların listesi

Sınıf	Moleküler yapı	Fotoduyarlı ajan	Ticari ismi	Distribütör	Uygulama Alanları	Onay	Absorsiyon dalgaboyu (nm)	Molar absorbsiyon katsayısı ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Ftalosiyaninler		Sülfonatlı alüminyum ftalosiyaninler ($AlPcS_4$)	Photosens	General Physics Institute Moscow	AMD, çeşitli kanserler	Rusya (2001)	675	110.000
		Silisyum ftalosiyaninler	Pc4	Case Western Reserve University	Aktinik keratoz, Bowen hastalığı, T hücresi Hodgkin olmayan lenfoma ve cilt kanserleri	Klinik aşama (Faz I)/ABD	670	40.000
		Çinko ftalosiyanin (ZnPc)	CGP55847	Ciba-Geigy Ltd.	Aktinik keratoz, Bowen hastalığı, cilt kanseri, üst solunum-sindirim sisteminin skuamöz hücreli karsinomu	Klinik aşama (Faz I)/ABD	675	243.000

Tablo 1. (Devamı) Klinik kullanımı, temel molekül yapısı ve önemli özellikleri olan fotoduyarlılaştırıcıların listesi

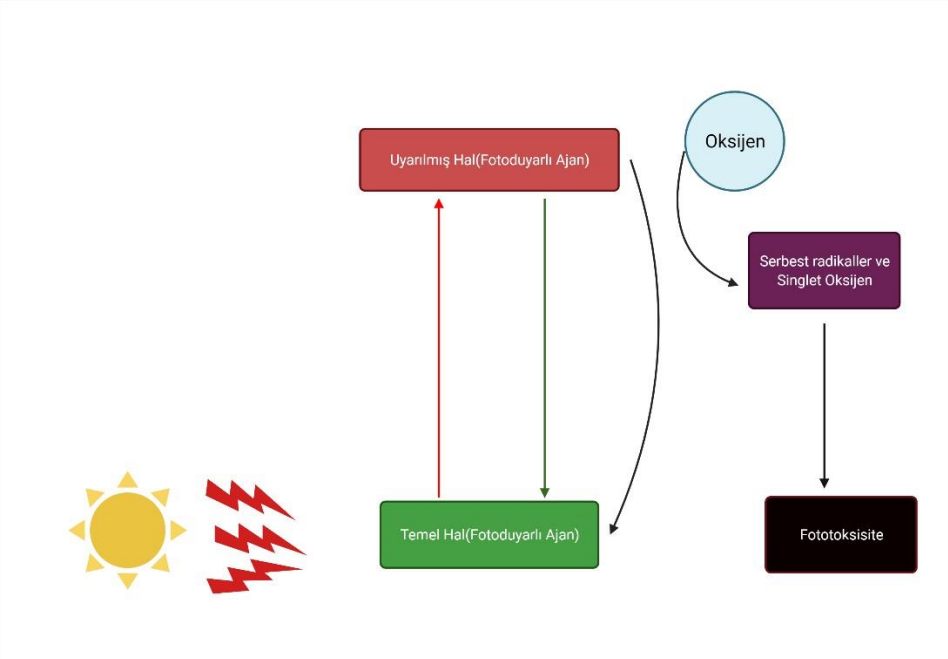
Sınıf	Moleküler yapı	Fotoduyarlı ajan	Ticari ismi	Distribütör	Uygulama Alanları	Onay	Absorsiyon dalgaboyu (nm)	Molar absorbsiyon katsayısı ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Pheophorbide-a		Paladyum-bacterio-pheophorbide	Tookad (WST09)	The Weisman Institute of Science	Tekrarlayan prostat kanseri	Klinik aşama (Faz III)/ EU	763	>10.000
Teksafrinler		Motexafin lutetium/Lutexaphrin	Antrin	Pharmacylics Inc.	Prostat kanseri ve foto anjiyoplasti	Klinik aşama (Faz II)/ABD	732	42.000
Ksantenler		4,5,6,7-Tetrachloro-30,6-0 -dihydroxy-20,40,50,70-tetraiodo-3H- spiro[isobenzofuran-1,9-0-xanthen]-3-one	Rose Bengal	Provectus Pharmaceutical	Melanom, meme kanseri, egzama, sedef hastalığı	Klinik aşama/ ABD	549	100.000
		4,5-Dibromo-rhodamine methyl ester	TH9409	Kiadis Pharma	Graft-versus-host hastalığı, allojenik kök hücre nakli	Klinik aşama/ ABD	514	100.000

Şimdiye kadar, çeşitli fotoduyarlılaştırıcılarla uygulanan FDT, malign ve malign olmayan hastalıkların tedavisi için klinik olarak uygulanmış ve onaylanmıştır (Tablo 1). Klorinler ve bakterioklorinler son zamanlarda fazla ilgi görmüştür. Klor türevleri arasında [tetra(m-hidroksi)fenilklorin] (82) ve purlytin (etiopurpurin olarak adlandırılan bir klorin kalay kompleksi) (83) bulunurken, bakterioklorin türevleri (bakteriyoklorofilin paladyum kompleksi) içerir (Şekil 8) (84).



Şekil 8. FDT'de kullanılan bakterioklorinler. A- Paladyum bakteriyofeoforbit (TOOKAD). B- Gem-dimetil grupları ile sentetik stabil bakteriklorin

Bakterioklorinler, yakın kızılötesi spektral pencerede güçlü absorpsiyon ve yüksek Φ_{ISC} (>0.50) dahil olmak üzere, FDT için fotoduyarlılaştırıcılar olarak uygulanabilecek umut verici optik özelliklere sahip görünüyor. Pd bakterioklorin, önemli ölçüde daha kısa bir τ_T'ye sahip olmasına rağmen (Pd için 7 μs, metalsiz için 84 μs ve Zn türevi için ise 121 μs süreye sahip) benzer Zn kompleksi ve metal içermeyen bakterioklorin ile karşılaştırıldığında *in vitro* çalışmalarda en yüksek FDT etkinliğine sahiptir. Görünüşe göre bu kadar kısa bir triplet yaşam süresi bile ROT üretimi için yeterlidir. Bakterioklorin uygulamalarında (fotokimyasal bakış açısından) en büyük dezavantaj, fotostabiliteleri çok düşüktür ve elektron transferi yoluyla ROT üreten türevlerdir (85). Photofrin®'den farklı olarak, TOOKAD®'ın sistemik uygulaması fototoksisite'ye (Şekil 9) neden olmaz (86). TOOKAD®, tip II fotokimyasal reaksiyonlarından ziyade tip I reaksiyonlara yol açması ile porfirin bazlı fotoduyarlı malzemelerden farklıdır (87,88). Ftalosiyaninler ve naftaftalosiyaninler karşılık gelen klor ve bakterioklorinden daha fazla kırmızı bölgeye kayma gösterir ve daha uzun bir dalga boyuna ve maksimum absorpsiyona sahiptirler.



Şekil 9. Fototoksisite şematik gösterim

İdeal Fotoduyarlı Ajan ve Özellikleri

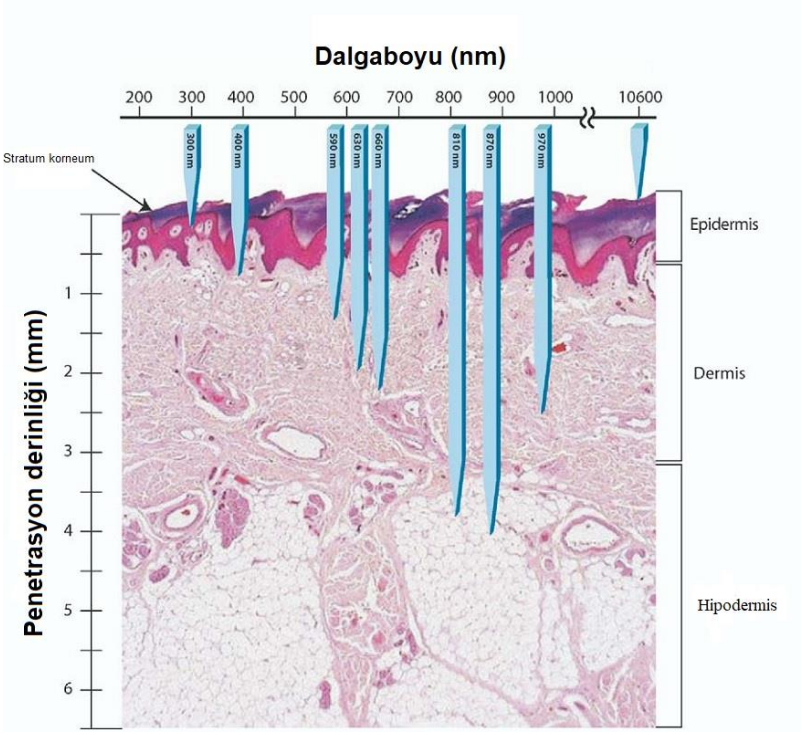
Fd'lerin çoğu, bazı ülkelerde farklı uygulamalar için onaylanmıştır ve klinik olarak kullanılmaktadır; bazıları ise şu anda klinik öncesi test aşamasındadır (53,87,89). Tüm fotodinamik işlemlerde fd'nin çözünürlüğü önemli bir rol oynar. Özellikle fd'nin sistemik bir uygulama esnasında, çökelme veya agrege oluşumu olmadan kanda taşınması, aynı zamanda hücre zarının lipid tabakasına etkili bir şekilde nüfuz etmesi sağlanmalıdır. Fd molekülleri, ışığın absorbe ve emisyon yeteneklerini azaltabileceğinden kümeler oluşturmamalıdır; ek olarak, intersystem crossing(ISC) değerlerinde, yani kullanım ömründe ve kuantum veriminde bir azalmaya sebep olabilir. Bir fd'nin fotofiziksel özellikleri ile ilgili olarak, görünür bölgedeki fotoaktivasyonu için dalga boyu ve triplet hal kuantum verimliliği, terapötik kullanım için en önemli olanlardan bazılarıdır. Fd'nin maksimum absorpsiyonu, ışığın doku penetrasyonunun en az birkaç mm olduğu, dalga boylarının 650 ve 850 nm arasında olması, yüksek kuantum verimine ve uzun süreli triplet duruma sahip ISC fd'ler, sitotoksik ürünlerin etkili bir şekilde üretilmesinde ideal olarak kabul edilir. (90,91). İdeal bir fd henüz mevcut olmadığından, mevcut araştırmalar fd özelliklerinin iyileştirilmesine odaklanmıştır. Bu gelişmelerden biri, taşıyıcılar kullanılarak fd'nin tümör dokusuna taşınmasının kolaylaştırılması, bir diğeri, fd'nin tümöre özgü antikorlara veya LDL'lere bağlanmasıyla seçici tümör hedeflemesidir (92).

Lipofilik fd'ler lipoproteinlere bağlanırken hidrofilik olanlar ise serum albümine bağlanır. Amfifilik olan komponentler hem lipofilik hem de hidrofilik özellik gösterdiğinden daha avantajlıdır. Amfifilik türler membranlarda hidrofobik ve hidrofolik interfaz ve yüzey proteinlerinin üzerlerine yerleşebildikleri için, fotodinamik olarak daha aktiftir (93-95).

Hem absorpsiyon dalga boyu hem de molar absorpsiyon(sönümleme) katsayısı, bir fotoduyarlılaştırıcıyı karakterize eden önemli parametrelerdir. Yüksek bir absorpsiyon katsayısının fotoduyarlılaştırıcının uyarımını kolaylaştırdığı göz önüne alındığında, ε mümkün olduğunca yüksek olmalıdır. (çoğunlukla ε>100.000 $M^{-1}.cm^{-1}$ değeri en çok istenen değer olarak belirtilir). Birinci nesil fd, absorbe oldukları dalga boylarında, düşük bir absorpsiyon katsayısına sahiptir, bu nedenle optimal terapötik yanıtı elde etmek için yüksek dozlarda ilaç uygulanmalıdır. Birçok singlet oksijen fotoduyarlılaştırıcı için ε, 40.000 ila 100.000 $M^{-1}.cm^{-1}$ arasındadır (Tablo 1). Bu özellik, fotoduyarlılaştırıcının tıbbi uygulamalar için kullanılmasında aranan bir özelliktir. Bir fotoduyarlılaştırıcının floresan özelliği olması da istenir, bu nedenle floresan görüntülemelerde kullanılarak molekül istenilen şekilde izlenebilir ve lokalizasyonu takip edilebilir (96). Yüksek düzeyde floresan özellik gösteren moleküller genellikle yalnızca orta ila düşük Φ_{ISC}'ye sahiptir. İdeal olarak, bir fotoduyarlılaştırıcı molekül aynı zamanda fotostabil olmalıdır. Bunlar fotoduyarlılaştırıcıların temel spektral özellikleridir. Fotokimyasal özellikleri ise, kimyasal saflık, uygun lipofiliklik/hidrofiliklik dengesi, sentezleme kolaylığı, sistemik olmayan toksisitenin olmaması bunlardan bazılarıdır (97). FDT'de kullanım için "ideal" fotoduyarlılaştırıcıların özellikleri birkaç bilim insanı tarafından üç özellikte birleşmiştir. Bu değerlendirmeler ışığında, doku veya hücrelerde verimli ROT üretimine izin veren fotoduyarlılaştırıcıların fotokimyasal özellikleri şunları içerir (1) ε > 100.000 $M^{-1}.cm^{-1}$ ve NIR-I spektral penceresinde (700–900 nm) güçlü absorpsiyon bandı, (2) yüksek ISC verimi (Φ_{ISC} > 0.70) ve (3) uzun ömürlü triplet durum (τT > 100 μs). Amfifilik olmalıdır büyük ölçüde hidrofilik, ancak lipit membranlar boyunca hareketi kolaylaştırmak için hidrofobik bir kısım ile birleşmiş olmalıdır. İyonik yükü hedef uygulamaya göre ayarlanmalıdır, antimikrobiyal fd için daha katyonik ve antikanser fd için daha az katyonik veya nötr olmalıdır.

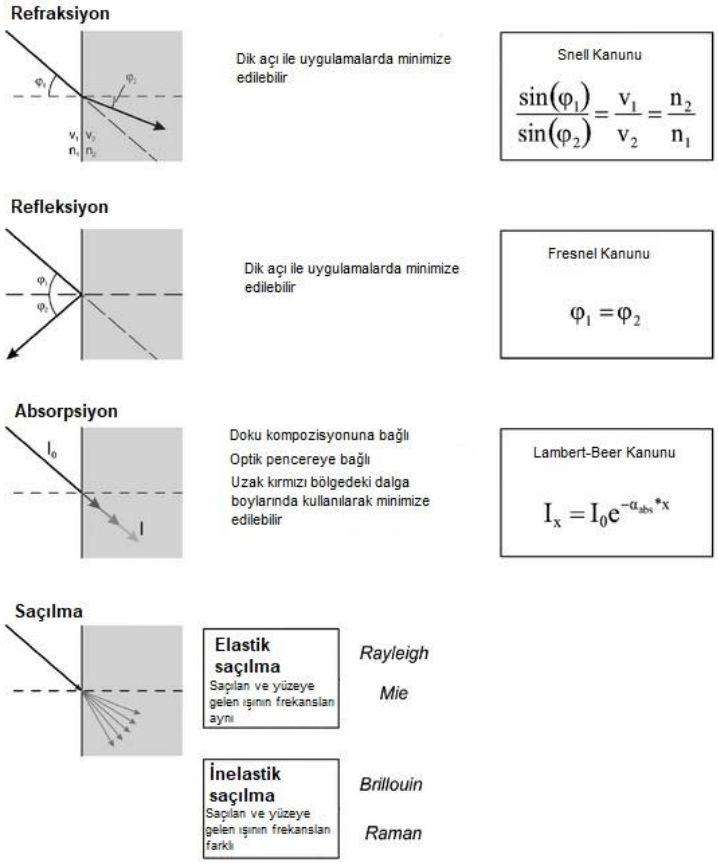
DOKU ile IŞIK ETKİLEŞİMİ

Işık bazlı bir terapi olan FDT, ışık-doku etkileşimine ve bunun fd'nin aktivasyonu üzerindeki etkisine dayanır. İnsan dokusu, ışığın sınırlı penetrasyona sahip olduğu oldukça karmaşık bir yapıdır. LED ve lazer kaynaklar, biyolojik doku ile birçok farklı mekanizma yoluyla etkileşime girebilir. Işığın biyolojik moleküller ile etkileşimi hayatımızda önemli bir rol oynar; fotosentez ve görme iyi örneklerdir. Bu etkileşimler fotobiyomodülasyon (düşük seviyeli ışık tedavisi), fotokimyasal etkileşimler, termal etkileşimler (örneğin; pıhtılaşma ve buharlaşma), fotoablasyon, plazma kaynaklı ablasyon ve fotobozunma olarak kategorize edilebilir. Absorbe edilen enerji, floresan olarak yeniden yayılabilir veya dokuda ısı olarak dağılabilir. Dokudan çıkan ışık (yansıma, iletim, saçılma veya emisyon) optik özelliklerine bağlıdır ve bu nedenle doku teşhisinde kullanılabilir. Doku tipine bağlı olarak, penetrasyon derinliği 400 nm'de 1 mm'den az, 514 nm'de 0,5-2 mm, 630 nm'de 1-6 mm ve 700 ila 900 nm'de maksimumdur (Şekil 10) (97). FDT uygulaması için, dokuya daha derinlemesine nüfuz edebilmesi için kullanılan molekülün Q-bantlarının (600-800 nm arasında) kullanılması daha etkilidir (98). Bu dalga boylarına sahip ışık daha az şekilde saçılır ve bu nedenle, dokuda daha derine nüfuz edebilir.



Şekil 10. Optik penetrasyon derinliği (99)

Işık saçılması, ışık yolunun ortamındaki bir veya daha fazla lokalize düzensizlik (veya saçıcı) tarafından düz bir yörüngeden saptığı fiziksel bir süreçtir. Dokudaki fotonların saçılması, ışık-doku etkileşimlerinin davranışında önemli bir faktördür. Saçılmalar; parçacıklar, kabarcıklar, damlacıklar, sıvılardaki yoğunluk dalgalanmaları, kristal katılardaki kusurlar veya yüzey pürüzlülüğü nedeniyle olabilir. Fotonların absorpsiyonu ve çoklu saçılımı ile birlikte, fotonlar dokudan geçerken ışık hüzmelerinin genişlemesine ve bozulmasına neden olur. Biyolojik dokuda, ışık saçılması genellikle, fiziksel inklüzyonlar veya hücre zarları ve organeller gibi farklı hücresel bileşenlerin kırılma indislerinin düzgün olmayan dağılımı ve heterojenlerin varlığından kaynaklanır. FDT için ışık iletimini tartışırken, vücut dokularını toplu bir ortam olarak düşünmek gerekir. Işığın böyle bir ortamda yayılması, kırılma, yansıma, absorpsiyon ve saçılma süreçlerini içerir (Şekil 11).



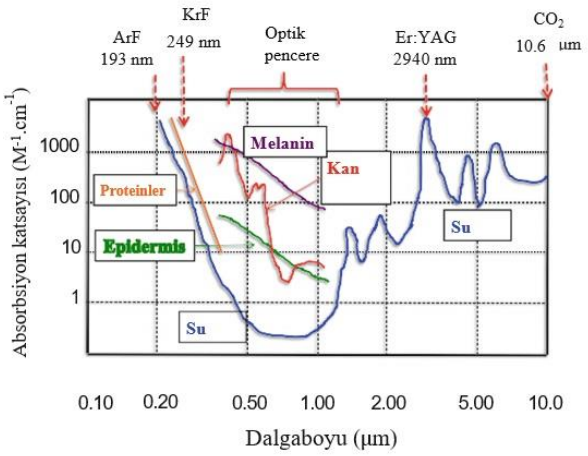
Şekil 11. Işık-doku etkileşimi kanunları (98,100,101)

Işık-doku etkileşimi öncelikle biyolojik dokunun ışık ile olan karakteristiğine, absorpsiyonuna ve saçılma özelliklerine bağlıdır (102). Genel olarak, dokudaki ışık yoğunluğunu ciddi şekilde azaltan iki süreç meydana gelebilir: absorpsiyon ve saçılmadır. İki ortam arasındaki arayüzden yansıma ve kırılma, sırasıyla Fresnel yasası ve Snell yasası tarafından açıklanır ve yoğunluk kaybı üzerindeki etkileri, kırılma indislerinin göreli değerleri tarafından belirlenir (103,104). Her iki süreçte de gelme açısıyla orantılı olduğundan, iki ortam arasındaki arayüze dik ışık hüzmesi uygulanarak bunlar en aza indirilebilir. Işığın dokudaki saçılması, ışık yoğunluğu ve yönlülüğü üzerinde en belirgin etkiye sahiptir. Saçılma, kırılma ile birlikte, ışık hüzmesinin genişlemesine neden olur, bu da bir güç kaybına ([W/m^2] cinsinden ışığın birim alan başına gücü olarak verilir) ve ışık hüzmesinin yönlülüğünde bir değişikliğe neden olur. Dokular, nanometrenin onda biri ile mikrometrenin onda biri arasında değişen farklı boyutlarda hücre ve elementlerden oluşur ve doku tipine bağlı olarak optik açıdan homojen olmayabilir (105). Bu nedenle, bu yapıların optik özellikleri, boyutu, şekli ve yoğunluğu dokularda absorpsiyon ve saçılmayı etkiler.

Dokuda saçılma oldukça karmaşıktır. Fotonların saçılması, elastik veya elastik olmayan bir proseste olabilir. Elastik olmayan saçılma (Brillouin ve Raman saçılması) bu durumda önemli bir rol oynamamaktadır. Elastik saçılma için ise, ne Rayleigh saçılması ne de Mie saçılması dokuda gözlenen etkileri tam olarak tanımlamaz; burada fotonlar esas olarak ileri yönde saçılır (106,107). Rayleigh yasasına göre belirli bir ortamdaki ışığın saçılma derecesi $1/\lambda^{w}$ ile orantılıdır, burada *w* ortamın türüne bağlıdır; bu nedenle saçılma, kısa dalga boylarında ışık için daha belirgindir. Hem absorpsiyon hem de saçılma, ışığın sınırlı doku penetrasyonuna sahip olmasına neden olur ve her iki faktör daha uzun dalga boylarında (>650 nm) ışık için daha az belirgin bir özelliktir. Saçılma, 600-1600 nm spektral aralığında absorpsiyondan daha baskındır ve doku içinde gelen ışığın hem ileri saçılması hem de geri saçılması çeşitli biyofotonik uygulamalarda kullanılır. Elastik saçılmanın özelliklerini kullanarak, optik koherans tomografisi, konfokal mikroskopi ve elastik saçılma spektroskopisi gibi birçok biyofotonik uygulamada kullanılmaktadır (108). Esnek olmayan saçılma, elastik saçılmaya göre çok daha düşük bir olasılıkla (yaklaşık 10^{-6} faktörü ile) meydana gelir ve foton ile saçılan element arasında bir enerji alışverişini içerir. Raman saçılması, esnek olmayan saçılma sürecine örnektir (109).

Saçılmanın yanı sıra, ışığın absorpsiyonu, penetrasyon derinliği ile ışık yoğunluğunun kaybıyla çok yakından ilişkilidir. Her iki sürecin neden olduğu yoğunluktaki azalma, Lambert-Beer yasasına benzer bir üstel fonksiyonla matematiksel olarak tanımlanabilir: Belirli bir x derinliğindeki yoğunluk, $I_x=I_0e^{-(\alpha_{abs}+\alpha_{sca})x}$ denklemi ile hesaplanır; I_x, x derinliğindeki yoğunluk ve I_0 ortam arayüzündeki yoğunluk, α_{abs} ve α_{sca} parametreleri sırasıyla absorpsiyon ve saçılma katsayılarını temsil eder.

Genel olarak dokuların absorpsiyon özellikleri doku bileşenlerine ayrılabilir. Dokudaki en önemli kromoforlar; su, oksihemoglobin (HbO_2) ve deoksihemoglobin, melanin ve sitokromlardır. Bir kromofor, organik bir molekülün belirli dalga boylarını absorbe eden ve diğer dalga boylarını ileten veya yansıtan kısmıdır. Yansıma ve iletim süreci, molekülün veya bileşiğin belirli bir renge sahip olmasına neden olur. Bu moleküllerin absorpsiyon spektrumları, dokudaki FDT için optik pencereyi tanımlar (Şekil 12) (80,104).



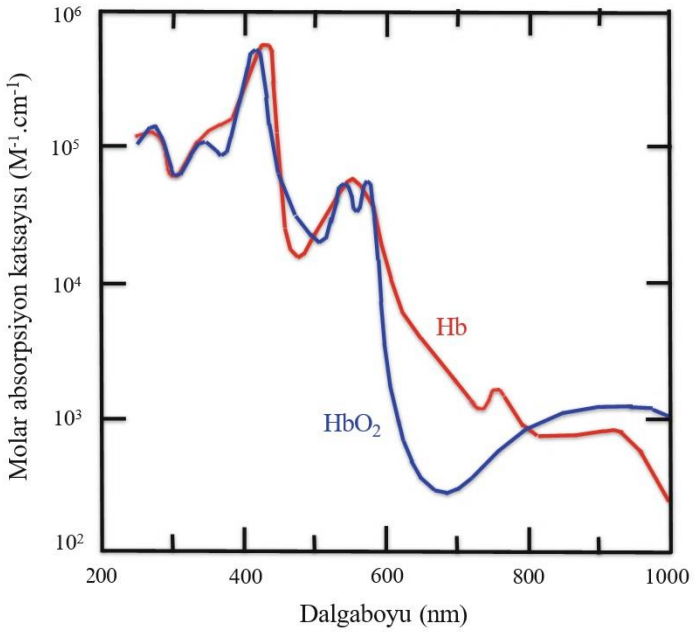
Şekil 12. Birincil doku bileşenlerinin sönümleme katsayıları

FDT için yaygın olarak kullanılan 600-800 nm aralığında hemoglobin (Hb) ve HbO_2'nin farklı absorpsiyon gösterdiği unutulmamalıdır. *İn vivo*, tümör olmayan ve tümör dokusu arasında HbO_2 ve Hb miktarlarında, tümör dokusunda daha düşük oksijenasyon ve pH nedeniyle önemli bir fark olabilir (110). Absorpsiyona doku ve hücrelerde bulunan belirli kimyasal yapılar neden olur: hemoglobin, proteinler ve bunların kofaktörleri, amino asitler, flavinler ve nükleotitler gibi hücresel komponentler

çoğu kısa dalga boyuna(<500nm) sahip optik penceredeki ışıkları absorbe ederken hemoglobin ise 650 nm'ye kadar dalga boyundaki ışıkları absorbe eder (111). Solunum zincirinin son üyesi olan sitokromlar, çok yüksek bir molar sönümleme katsayısına sahiptir (NIR bölgesindeki oksihemoglobin ve deoksihemoglobin sahip olandan daha yüksek), bunların dokunun absorpsiyon özellikleri üzerinde önemli bir etkisi yoktur, çünkü miktar olarak çok küçüktür. Melanin ve hemoglobin, dalga boyları (λ) <1000 nm için en yüksek absorpsiyon katsayısına (μ_a) sahiptir ve bu bölgedeki absorpsiyona hakimdir. Bu dalga boyları Hb ve melanin tarafından yüksek oranda emilir ve özellikle epidermal pigment lezyonların ve yüzeysel damarların tedavisinde faydalıdır. Melanin μ_a yüksek olmasına rağmen, tipik olarak belirli bölgelerde (örneğin; cilt) düşük konsantrasyonlarda oldukça lokalizedir, bu nedenle emilimi çoğu dokuda önemli değildir. Işığın dokuda hem absorpsiyonu hem de saçılması dalga boyuna bağlıdır (her ikisi de spektrumun, mavi bölgesinde kırmızıdan çok daha yüksektir) ve temel doku kromoforları (hemoglobin ve melanin), 600 nm'den kısa dalga boylarında yüksek absorpsiyon bantlarına sahiptir (112). Solid tümörler üzerindeki FDT için, etkili penetrasyon derinliği büyük önem taşımaktadır. λ > 900 nm için vücutta su, doku tipine bağlı olarak yağ, kolajen ve elastin önemli bir absorpsiyona hakimdir. Dokunun floresans özelliği, dokuda bulunan bir dizi endojen florofordan kaynaklanır. Öne çıkan floroforlar; triptofan gibi aromatik amino asitler, kolajen ve elastin gibi yapısal proteinler, NADH ve flavinler gibi koenzimler ve porfirinlerdir. Doğal dokunun gözlenen floresans emisyonu, esasen, dokudaki endojen floroforların emisyon spektrumlarının bir özelliğidir ve bu nedenle, uyaran ışığın dalga boyu enerjisine bağlıdır (113,114). Uyaran maksimum absorbans değerleri 280-500 nm aralığında bulunurken, emisyon maksimumları 300-700 nm aralığındadır (115,116).

Su çoğu dokunun ana bileşenidir, absorpsiyon özelliği ışık-doku etkileşimlerinde önemlidir. Su, 1150 nm'den büyük dalga boylarında gelen ışığı önemli ölçüde absorbe etmeye başlar (117). Melanin, etkili bir ışık absorbe edicidir ve emilen UV radyasyonunun %99,9'undan daha fazla zararını ortadan kaldırabilir (118). Hemoglobin, oksijeni akciğerlerden vücuda taşıyan temel proteindir ve aynı zamanda bir antioksidan ve demir metabolizmasının düzenleyicisi olarak işlev görür. Kırmızı kan hücreleri içindeki her bir hemoglobin molekülü, dört demir içeren hem grubuna ve globin proteinine sahiptir. Oksijen atomları demir atomlarına kolayca bağlanır ve

bunun sonucunda hemoglobin molekülleri kandaki oksijenin %97'sini taşır. Kendisine bağlı oksijen atomu olmayan hemoglobine deoksihemoglobin denir ve Hb ile gösterilir. Oksijen demir atomlarına bağlandığında, oluşan hemoglobin molekülünün yapısını değiştirir ve oksihemoglobin (HbO_2 ile gösterilir) olarak adlandırılır. Her iki hemoglobin formu 600 nm'ye kadar güçlü bir şekilde ışığı absorbe eder ve hemogram analizleri için kullanılan 280, 420, 540 ve 580 nm civarındaki dalgaboylarında maksimum absorpsiyon değerlerine sahiptir (Şekil 13).

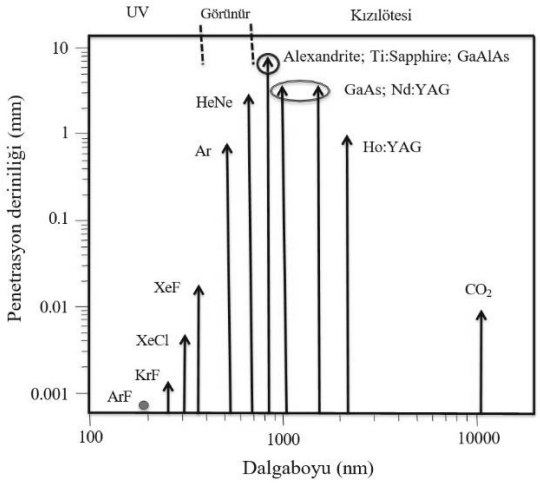


Şekil 13. Deoksihemoglobin ve oksihemoglobin spektrumları

600 nm dalga boyunda HbO_2 spektrumu neredeyse iki katlık bir oranda keskin bir şekilde düşer ve daha sonra daha uzun dalga boylarında düşük seviyeler civarında kalır (Şekil 13) (80,112,119). Bunların her ikisi de UV ve görünür bölgeleri absorbe eden demir porfirin sistemini içerir (120). ~650 nm'den büyük ve 2000 nm'den küçük dalga boyları için dokunun absorpsiyonu zayıftır, bu nedenle ışık daha derine nüfuz edebilir (121). Biyomedikal görüntüleme ve tanı uygulamaları için, dokuda minimum absorpsiyona sahip olmak iki nedenden dolayı istenir: Birincisi, dokuda daha derin bölgelerin araştırılmasına izin verir ve ikincisi, dokuda enerji birikmesi geri dönüşü olmayan değişikliklere neden olabilir. Bu nedenle, genellikle,

biyomedikal görüntüleme ve teşhis için doku absorpsiyonunun minimum olduğu optik pencere içerisindeki (700-1500 nm) dalgaboylarına sahip ışık kullanılır.

Bu nedenlerle, dokuda ışığın etkin doku penetrasyonunu maksimize eden kırmızı ve NIR dalga boylarını kapsayan alana “optik pencere” adı verilir (122). Bu etkileşimlerde yer alan doku, dokunun ısı iletimi ve kapasitesi ile birlikte yansıma, soğurma ve saçılma katsayılarına bağlıdır (123). Doku bileşenlerinin absorpsiyon ve saçılma katsayıları büyük ölçüde dalga boyuna bağlı olduğundan, farklı dalga boylarında çalışan lazerlerden gelen ışığın penetrasyon derinliğinde önemli farklılıklar vardır (Şekil 14) (124-126).



Şekil 14. Lazer türleri ve penetrasyon derinlikleri

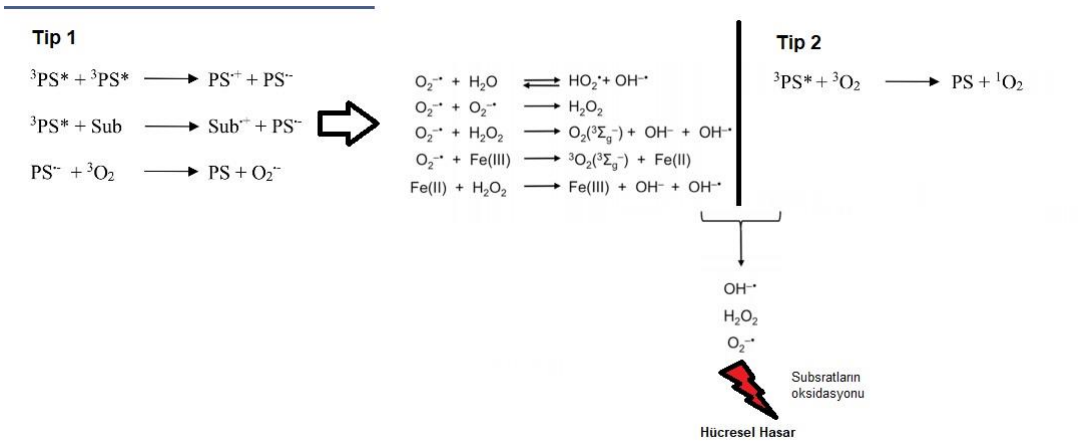
Dokunun absorpsiyon ve saçılma özelliklerindeki değişiklikler, aynı zamanda floresan özelliklerinde küçük değişikliklere yol açabilir. Örneğin, malign meme dokusundaki bölgelerin normale göre daha büyük bir saçılma katsayısına sahip olduğu gösterilmiştir (127,128). İnce doku kesitlerinde floresan depolarizasyonunun malign dokularda normale göre daha küçük olduğu gözlenirken (floroforların biyokimyasal ortamındaki değişikliklerin bir sonucu olarak), ters durum ise, depolarizasyonun ana nedeni olan saçılma daha kalın doku kesitlerinde gözlenmiştir (129-131).

630 nm'de eksitasyon için bir hematoporfirin türevi olan Photofrin ile klinik tedavide, ışık penetrasyon derinliği dokuya bağlı olarak yaklaşık 3-5 mm'dir (104).

>~700 nm (veya daha yüksek) dalga boylarında absorpsiyon noktalarına sahip fd'lerin kullanımı, en azından penetrasyon derinliğini iki katına çıkarır ve böylece daha kalın solid tümörlerin tedavisi sağlanır (104,132). Bununla birlikte, uyarma dalga boyunun üst sınırı, singlet oksijen üretimi için gereken minimum enerji miktarına sahip olmalıdır. FDT'nin terapötik penceresi olarak adlandırılan optik pencere, doku bileşenlerinin optik özelliklerine ve fd'nin konsantrasyonuna, izleme veya görüntüleme için uygunluğuna göre farklı tanımlabilir (133). Bu nedenle, terapötik pencereleri tanımlamak zordur ve literatürde farklı aralıklara sahip birkaç optik pencere bulunabilir (134). Bir yandan, yüzeyselden daha derin tümör tedavilerine kadar UV'den NIR'a kadar FDT'nin etkileri ve etkinliği gösteren başarı ile uygulanmış çalışmalar vardır (135,136). Öte yandan, en yaygın FDT optik penceresi genellikle ~650-900 nm (NIR-I ifade edilir) ve 1000-1400 nm (ikincil biyolojik pencere veya NIR-II) arasında sınırlıdır (126,137). ROT üreten fd'lerin büyük çoğunluğu NIR-I'deki dalga boylarını absorbe eder. Yüzeysel FDT için kullanılan dalga boyları~400-600 nm (UV-Vis) bölge içinde yer alır. λ > 950 nm için su absorpsiyonu önemli ölçüde artacağı için aşırı doku ısınmasına neden olabilir (135,138,139).

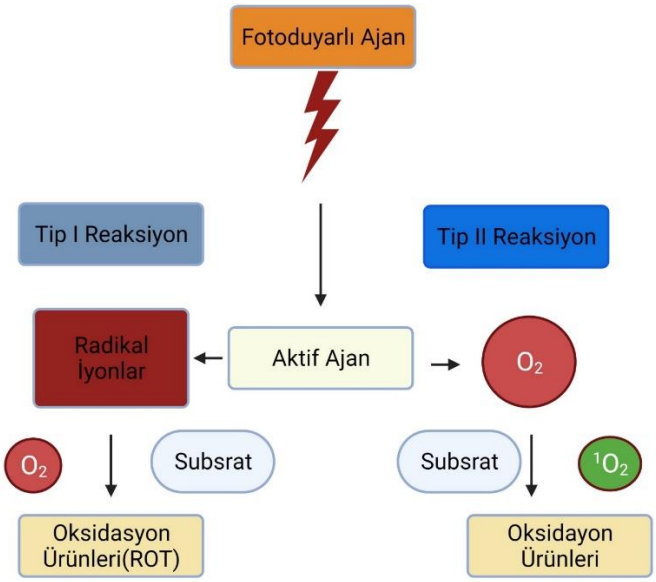
FDT'DE FOTOKİMYASAL SÜREÇLER

Fotoduyarlı ajanlar, uyarılmadan sonra triplet durum oluşturan yüksek bir olasılığa sahip olan moleküllerdir. Uyarılmış triplet durumda aktive edilmiş fd'ler, tip-I ve tip-II olarak adlandırılan iki farklı fotokimyasal reaksiyon aracılığıyla komşu bir molekülde kimyasal değişiklikleri indükleyebilir (Şekil 15).



Şekil 15. Tip 1 ve Tip 2 reaksiyonları (140-142)

Tip-I fotokimyasal reaksiyon, sırasıyla bir radikal anyon veya katyon oluşturmak için elektronların (veya protonların) oksijene veya diğer komşu moleküllere transferi anlamına gelir. Bu radikallerin ROT üretmek için moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi muhtemeldir. Tip-I fotokimyasal reaksiyonlar sıklıkla fd'den moleküler oksijene bir elektron transferi yoluyla süperoksit anyonlarının oluşumuyla sonuçlanır (Şekil 16) (91,142-144).



Şekil 16. Tip 1 ve Tip 2 reaksiyonlarının şematik gösterimi

ROT, diğerlerinin yanı sıra singlet oksijen ($^1O_2$), süperoksit (O_2^-) ve H_2O_2 içeren kısa ömürlü moleküllerdir. $^1O_2$'nin kendisi çok güçlü bir oksidan olsa da, hem (O_2^-) hem de H_2O_2, ferrüs (Fe^{2+}) veya bakır gibi metal iyonlarının varlığında katalizli Fenton reaksiyonları yoluyla yüksek oranda reaktif hidroksil radikallerine ($OH^{\bullet}$) dönüştürülebilir, ancak alternatif olarak (O_2^-), nitrik oksit (NO) ile de reaksiyona girerek peroksinitrat ($ONOO^-$) üretir (145). Antioksidan enzimler ROT'u daha az toksik moleküllere dönüştürür. Örneğin; süperoksit dismutaz (SOD), süperoksidin (O_2^-) H_2O_2'ye dismutazyonuna yardımcı olur ve bu da katalaz ile O_2 ve H_2O'ya nötralize edilir (146). Hücre içindeki herhangi bir molekülle tepkimeye girebilir ve okside edebilir ve bu reaksiyonların aktivasyon enerjileri çok düşüktür. Hidroksil radikalleri membranlardan kolayca yayılır; bu nedenle, hidrojen peroksitte olduğu gibi, hasar bir hücresel kompartmanla sınırlı değildir (Şekil 15) (147-150).

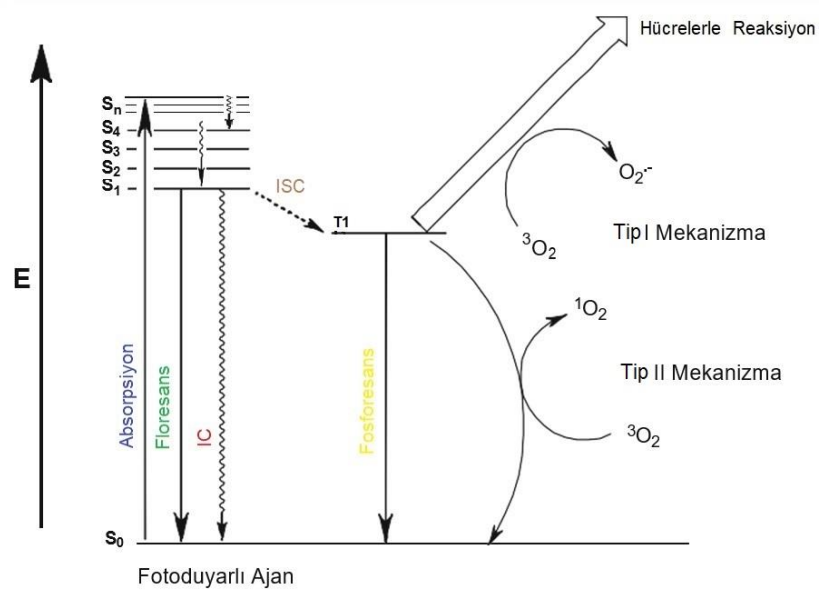
Enerjinin moleküler oksijene transferi, tip II fotokimyasal reaksiyon olarak adlandırılmıştır (151). Moleküler oksijenin farklı bir özelliği vardır, çünkü üçlü konfigürasyon ($^3O_2$) molekülün temel durumunu temsil eder. Tip II fotokimyasal reaksiyonda, enerji transferi sırasında çok reaktif singlet oksijen ($^1O_2$) oluşur.

Hem tip I hem de tip II fotokimyasal reaksiyonlar paralel olarak meydana gelir ve reaksiyonların gerçekleşme oranı, kullanılan fd'nin ve en önemlisi oksijen konsantrasyonu olmak üzere çeşitli parametrelere bağlıdır (145,152). FDT'de kullanılan çoğu fd için, tip II fotokimyasal reaksiyon baskın süreci temsil eder (145,153, 154).

Jablonski Diyagramı

Fotoduyarlı ajan, uyarılmış durumunu elde etmek için ışığın absorpsiyonu, FDT'de ROT üretiminde ilk adımdır. Fotoduyarlı ajan, tüm elektronların düşük enerjili olarak orbitallerde spinlerinin eş olduğu temel singlet hal durumunda bulunur. Fd'nin absorpsiyon karakteristiğinde tepe noktalarına karşılık gelen dalga boyunda bir ışıkla uyarılması üzerine, fd'nin en yüksek dolu moleküler orbitalindeki (HOMO) bir elektron, fd'nin en düşük boş moleküler orbitaline (LUMO) uyarılır (155,156). Birçok fd'nin aromatik karakteri nedeniyle, HOMO ve LUMO arasındaki enerji farkı oldukça düşüktür (157,158). HOMO'dan LUMO'ya elektronik uyarım gerçekleştiğinde, fd kararsız ve geçici uyarılmış singlet durumdadır. FDT ise, en kritik süreç, sistemler arası geçiş olarak bilinen uyarılmış elektronun spininin fd'nin triplet durumuna ters

çevrilmesidir. Sistemler arası geçiş, fd triplet durumunun singlet duruma kıyasla daha düşük enerjiye sahip olması nedeniyle tercih edilir, ancak üçlü durum önemli ölçüde daha uzun bir ömre sahiptir. Bunun nedeni, uyarılmış elektronun, şimdi önceki eşleştirilmiş elektronuna paralel bir dönüşle, hızlı bir şekilde singlet durumuna gevşeyememesidir. Uyarılmış durumdaki ışık absorpsiyonu ve enerji seviye süreçleri, bir Jablonski diyagramı kullanılarak kolaylıkla tanımlanabilir. Kısaca, uygun dalga boyunun absorpsiyonu ile fd'nin ışıkla uyarılması üzerine, temel durumdan (S_0) bir yörünge elektronu daha yüksek enerji seviyelerine yükseltilir. Elektronlar, moleküllerde kademeli enerji seviyelerini işgal eder ve doğru miktarda enerjinin absorbe edilmesiyle daha yüksek seviyelere yükseltilebilir. Bu nicelleştirilmiş yaklaşım, elektronların uyarılmasının belirli bir dalga boyundaki radyasyona özel olarak nasıl karşılık verdiğini açıklar. Elektronlar, çoğu durumda, belirli orbitallerde çiftler halinde bulunur. Her elektron çifti, biri saat yönünde ve biri saat yönünün tersine olmak üzere karşıt spinlere sahiptir ve bu, singlet durum olarak bilinir (159-161). Böyle bir çiftin bir elektronu daha yüksek bir enerji seviyesine yükseltildiğinde, aynı spin yönünü korur (yani singlet temel durum singlet uyarılmış durum). Bir fotonun absorpsiyonu, moleküldeki elektronik konfigürasyonun yeniden düzenlenmesine ve tüm elektronların spinleri eşleştirilmiş haldeyken, daha yüksek enerjili uyarılmış durumdaki bir molekülle sonuçlanır (soğurulan fotonun enerjisine bağlı olarak S_1, S_2, vb.). Bu tür enerji seviyeleri (S_x) kararsızdır, bu nedenle bir süre sonra (ps) titreşimsel gevşeme meydana gelir (yani, içsel dönüşüm (IC) olarak adlandırılan bir süreçte foton emisyonu olmadan) ve elektron en düşük uyarılmış enerji durumuna (S_1) gevşer (Şekil 17).



Şekil 17. Jablonski diyagramı

Bu durumda, birkaç olası geri salınım yolundan geçebilir. S_1, daha sonra, genellikle pikosaniye ile nanosaniye sürelerinde, ya içsel dönüşüm ile radyasyonsuz olarak veya floresans adı verilen süreç yoluyla bir foton yayarak, temel S_0 durumuna gevşer. Bu yollar, sistemler arası geçiş olarak bilinen bir süreç yoluyla, ışımasız veya ışınımsal olarak floresans yayan (ns) S_0'a geri geçişi veya triplet bir durum (T_1) konfigürasyonuna geçişi içerir. S_1'in devre dışı bırakılması için üçüncü olası süreç, sistemler arası geçiş (ISC) adı verilen süreç tarafından elektron spininin ışınımsız çevrilmesi ve iki eşleşmemiş spin elektronuna sahip olan triplet durum olan T'nin oluşumudur. Spesifik moleküle ve enerjilerine bağlı olarak, ya birinci triplet uyarılmış durum T_1 ya da daha yüksek triplet uyarılmış durumlar T_2, T_3, vb. oluşturulabilir.

Önemli gözlem şudur ki, Hund kuralına göre, T_1'in enerjisi her zaman S_1'den daha düşüktür ve benzer şekilde T_2'nin enerjisi S_2'den daha düşüktür, vb. singlet durumlara benzer şekilde, daha yüksek uyarılmış üçlü durumlar (T_2, T_3, vb.) IC yoluyla hızlı bir şekilde T_1'e gevşer ve T_1, IC yoluyla radyasyonsuz olarak veya fosforesans (P) adı verilen süreç ile bir foton yayarak temel duruma gevşer. T_1'den S_0'a geçiş için spin durumu yasaktır, bu nedenle T_1 nispeten uzun ömürlü bir ara durumdur (162). İki atomlu oksijenin temel durum elektronik konfigürasyonu bir triplet ($^3O_2$) olduğundan, T_1'deki fd'den çevredeki oksijene enerji aktarımı olasılığını artırır (163). Bu tür bir enerji transferi oksijeni singlet duruma ($^1O_2$) uyarır ve fd'nin temel

duruma geri dönmesi için gerekli enerji salınımı için bir mekanizma sağlanır. Singlet oksijen, yakındaki bütün hücrelerle reaksiyona girer ve fd proseste tüketilmediği için (fd'nin fotobozunma(photo bleaching) veya fotodegradasyon meydana gelmedikçe), aynı fd birçok singlet oksijen molekülü üretebilir. $^3O_2$'den $^1O_2$'ye geçiş için gereken doğrudan enerji transferi 0.974 eV'dir (veya 22.4 kcal/mol). Bununla birlikte T_1, $^1O_2$'nin geri döndürülemez oluşumu için 0.974 eV'den daha fazla enerji gerekir ve çoğu fd tarafından bu işlem için karşılanan minimum enerji $E(T_1)$ = 109 kJ/mol = 1.13 eV'dir (163,164).

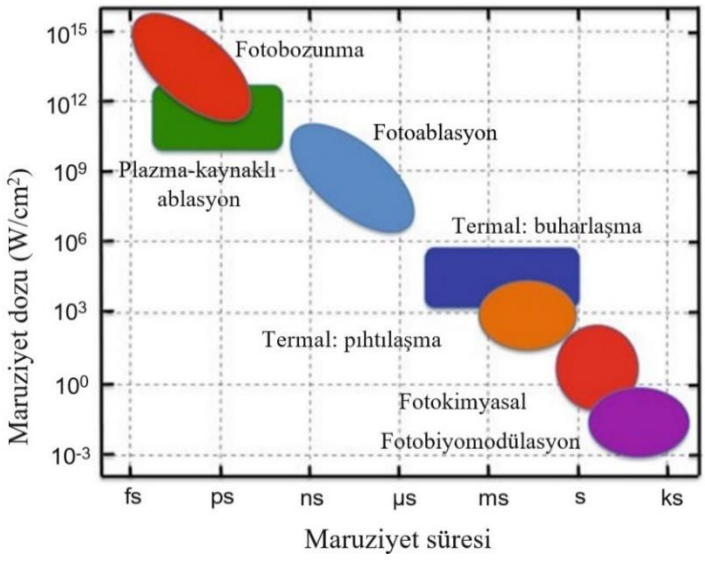
Singlet Oksijen Üretimi

Singlet oksijen $^1O_2$, oksijenin oldukça reaktif bir halidir ve FDT'nin etkin çalışmasından sorumlu ana ROT'lardan biri olduğu bilinir. Temel durumundaki oksijen, $^3O_2$, eşleşmemiş iki elektrona sahiptir ve bu nedenle triplet durumdadır (temel durumun tekli durum olduğu organik moleküllerin çoğunluğunun aksine). Oksijenin en düşük uyarılmış hali, bir elektronun spininin ters çevrilmesini gerektiren $^1O_2$'dir. Uyarılmış bir fd tarafından $^1O_2$ üretimi için, genellikle tip II mekanizmasını kullandığı kabul görür (124,165). $^1O_2$ oluşumu için, fd'nin uyarılmış hali ile temel durum triplet oksijeninin fiziksel çarpışmasını gerektirir; fd'den gelen enerji, hem oksijen hem de fotoduyarlılaştırıcı'daki elektronların dönüşlerinin ters çevrilmesiyle birlikte oksijene aktarılır. Fotoduyarlılaştırıcının uyarılmış durumu, daha düşük enerjili ve farklı spinli bir duruma bozunur. FDT'deki en yaygın süreç, T_1'deki fotoduyarlılaştırıcının, singlet oksijen üreten triplet oksijen ile çarpışmasıdır. Proses öncesi ve sonrası fotoduyarlılaştırıcıdaki ve oksijendeki spinlerinin toplamları aynı olması nedeniyle izin verilir (166). Moleküler oksijen yörüngelerinde valans elektronuna sahip olacak şekilde bir elektron konfigürasyonuna (($^3O_2$): $(\sigma 2s)^2$ $(\sigma 2s^*)^2$ $(\sigma 2p)^2$ $(\pi 2p)^2$ $(\pi 2p)^2$ $(\pi 2p^*)^1$ $(\pi 2p^*)^1$) sahip, onun Hund kuralı ve Pauli dışarlama ilkesine göre temel durumunda iki tane eşlememiş elektronu vardır. Manyetik alan varlığında, spinler üç elektronik konfigürasyon halinde bulunabilir. Bu yüzden temel-hal durumunda bulunan bir oksijenin triplet-hal durumunda var olduğu bilinir (4). Singlet oksijen moleküler oksijen türlerinden en yüksek aktivitesi olan ve elektron konfigürasyonuna (($^1O_2$): $(\sigma 2s)^2$ $(\sigma 2s^*)^2$ $(\sigma 2p)^2$ $(\pi 2p)^2$ $(\pi 2p)^2$ $(\pi 2p^*)^2$) sahiptir. Moleküler oksijen hal diyagramları ve potansiyel enerji eğrilerine göre, singlet oksijen

uyarılmış-hal ile temel-hal arasındaki enerji farkı (~22,5 kcal/mol) en düşük olan moleküler oksijen türüdür (165).

Doz ve Işıma Parametreleri

Işığın biyolojik dokularla etkileşimi karmaşık bir süreçtir çünkü doku materyallerini oluşturan yapılar çok katmanlı, çok bileşenli ve optik olarak homojen değildir. Doku özelliklerinin teşhisinde ve ışığın doku ile etkileşimine dayalı anormal dokuların tedavisinde oldukça önemli bir faktör olan ışığın absorpsiyon özelliğidir. Absorbe olan ışık ısıya dönüştürülebilir, floresans olarak yayılabilir veya fotokimyasal reaksiyonlarda tüketilebilir. Farklı doku bileşenleri için absorpsiyon katsayıları, ışığın belirli bir dalga boyunda belirli bir dokuya ne kadar nüfuz edebileceğini ve ayrıca belirli bir dokunun belirli bir optik kaynaktan ne kadar enerji absorblayacağını belirler. Foton enerjisi, moleküllerin kuantum mekanik enerji seviyeleri arasındaki bir aralığa eşit olduğunda, moleküller ışığı absorblayacaktır (167,168). Işığın biyolojik doku ile etkileşimleri, Şekil 18'de gösterildiği gibi, W/cm^2 (veya $J/s.cm^2$) olarak ölçülen maruziyet dozu ve maruz kalma süresine göre kategorize edilebilir. Işık-doku etkileşim koşulları, son derece kısa sürelerde (10^{10}-10^{15} W/cm^2, karşılık gelen 10^{-9}-10^{-15} s, yani nanosaniyeden femtosaniyeye kadar) çok yüksek maruziyet dozlarına kadar değişebilir. Ya da uzun zaman periyotlarında düşük maruziyet dozlarında (saatlerden dakikalara karşılık gelen zaman periyotlarında 1-100 mW/cm^2) değişebilir (112,169).

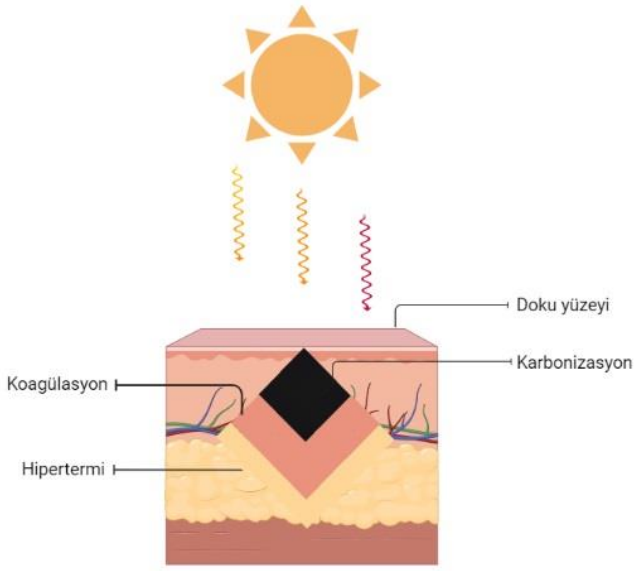


Şekil 18. Işık-doku etkileşim modlarının doz ve süreye bağlı gösterimi (170)

Çeşitli etkileşim modlarında maruz kalma veya enerji yoğunluğu yaklaşık 1 mJ/cm^2-1 kJ/cm^2 arasında değişir. Enerji yoğunluğu bazen ışık dozlarını tanımlamak için bir parametre olarak kullanılır, ancak bu yanlış uygulamalara yol açabilir, çünkü enerji, gücün zamanla çarpımı E(Joule)=W.t denklemi ile tanımlanır. Böylece güç iki katına çıkarsa ve süre yarıya inerse dokuya aynı enerji verilir ancak farklı bir biyolojik etki gözlemlenebilir. Bu nedenle daha kesin bir dozaj parametresi tanımı, belirli bir aydınlatma süresi boyunca belirli bir ışımayı tanımlamak daha doğru olur (171). Terapötik ve cerrahi kullanımlar için temel ışık-doku etkileşim modları genel olarak aşağıdaki gibi bazı sınıflara ayrılabilir.

Fototermal etkileşimler(FTT): Foto-uyarılmış bir molekül kimyasal bir reaksiyona girmediğinde, enerjinin titreşim modlarına dönüştürülmesi veya çevreleyen moleküllerle esnek olmayan çarpışmalar yoluyla gevşeyebilir ve sonuçta ısı üretir. En yaygın etki doku sıcaklığındaki artıştır. Hem FDT hem de FTT, ışığı absorbe eden moleküllerin uygulanması ve ardından görünür veya yakın kızılötesi (NIR) bölgede belirli dalga boyunun lazer aktivasyonuna dayanır, ancak farklı enerji dönüştürme mekanizmaları için farklı lazerler kullanılır. FDT, yeterli singlet oksijen üretimi için moleküler oksijene büyük ölçüde bağımlıyken, fiziksel ısıtma işlemine dayanan FTT, hipoksi altında bile etkili kalan alternatif bir fototerapidir. Termal etkileşimler, lokal bir bölgede doku sıcaklığındaki bir artış ile karakterize edilir (172,173). Ulaşılan doku sıcaklığının süresine ve pik değerine bağlı olarak pıhtılaşma, buharlaşma, karbonizasyon ve erime gibi farklı etkilerle ayırt edilebilir. Farklı sıcaklık seviyelerinde dokular üzerindeki termal etki şu şekilde gösterilmektedir. Termal enerji üreten reaksiyonlar, fotokimyasal enerji üreten reaksiyonlardan optik enerji açısından önemli ölçüde daha büyüktür. Termal etkileşimlerle ilişkili ışıma maruziyeti, saniyelik uygulama sürelerinde yaklaşık 10 W/cm^2'den mikrosaniyelik zaman dilimlerinde 10^6 W/cm^2'ye kadar değişir. Bir fototermal etkileşim, foton enerjisinin (doku sıvıları tarafından absorbe edilir) moleküler titreşim ve moleküller arasındaki çarpışmalar sonucunda ortaya çıkan ısı enerjisine dönüşmesiyle oluşur. Uyarılmış moleküllerin titreşim enerjisinin bir kısmı, sıcaklık artışı olarak makroskopik ölçekte yansıması olan kinetik enerji olarak çarpışan moleküllere aktarılır (174). Su, çoğu yumuşak dokunun termal özelliklerinin

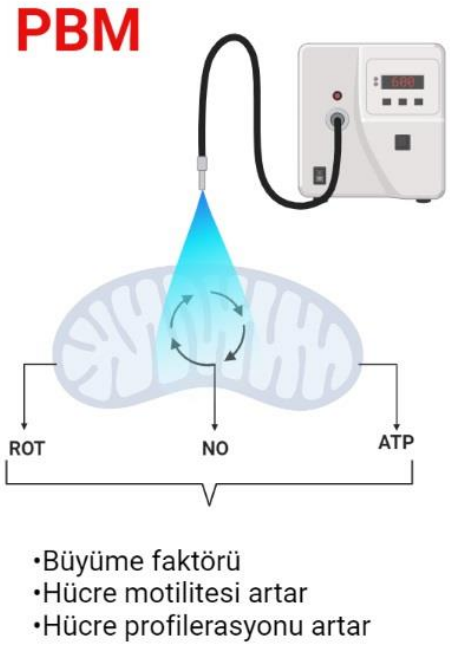
ana belirleyicisi olarak baskındır, ancak kemik ve diş minesi gibi sert dokularda daha az öneme sahiptir (175). Ayrıca, subkutan doku ve yağlı ateromatöz plaklar gibi yağlı dokular, suyun baskın olduğu dokulardan önemli ölçüde farklı termal özelliklere sahiptir (176). Denatürasyon, proteinlerin hem ikincil hem de üçüncül yapılarının bozulmasını ve olası yıkımını ifade eder. Canlı bir hücredeki proteinlerin denatüre olması durumunda hücre aktivitesi ve muhtemelen hücre ölümü meydana gelebilir. 50°C'den başlayarak enzim aktivitesinde gözle görülür bir azalma olur. Bu etki hücre hareketsizliğine, hücrede enerji transferinin azalmasına ve hücre onarım mekanizmalarının aktivitesinde azalmaya neden olur. Sıcaklıktaki küçük bir artış (5°C-10°C), enzimlerin aktivitesini etkileyebilir ve kan akışında ve damar geçirgenliğinde değişikliklere yol açabilir. 45°C-80°C sıcaklığa ısıtılan dokular, proteinlerin ve diğer makromoleküllerin konformasyonunu stabilize eden van der Waals bağlarının kırılmasının bir sonucu olarak denatüre olur (177,178). Dokuların termal koagülasyonu, çıplak gözle ve/veya mikroskobik tekniklerle gözlemlenebilen, proteinlerin ve diğer biyolojik moleküllerin, organellerin, zarların, hücrelerin ve hücre dışı bileşenlerin termal olarak indüklenen, geri dönüşü olmayan değişiklikler olarak tanımlanır. Pıhtılaşmış uterus doku numunesi, bir Nd:YAG lazer kullanılarak pıhtılaştırıldı. Bir histolojik kesitte, doku hematoksilen ve eozin ile boyanırken pıhtılaşmış alan kolaylıkla tespit edilebilir. Pıhtılaşmış doku diğer dokulardan daha koyu görünür. Pıhtılaşma sürecinde sıcaklık en az 60°C'ye ulaşır ve doku nekrotik hale gelir. Bu değişikliklerin çoğu, yapısal proteinlerin termal denatürasyonundan kaynaklanır, ancak membran yırtılması, lipidlerdeki değişikliklerden kaynaklanabilir (177,179). 100°C'de çoğu dokuda bulunan su molekülleri buharlaşmaya başlar (Şekil 19).



Şekil 19. Farklı sıcaklık seviyelerinde dokular üzerindeki etkiler (180)

Suyun buharlaşma ısısının yüksek olması (2253 kJ/kg) avantajdır, çünkü üretilen buhar fazla ısıyı uzaklaştırır ve yakında olan doku sıcaklığında daha fazla artışın olmamasına yardımcı olur.

Fotobiyomodülasyon: Bu tedavi günümüzde “fotobiyomodülasyon tedavisi” (PBM) olarak adlandırılmaktadır, ancak bilimsel literatürde 60'tan fazla başka isme de sahiptir; “Düşük seviyeli lazer tedavisi” (LLLT) en sık kullanılan isimlendirmelerden biridir (181). Fotobiyomodülasyonda kullanılan lazerler, 500 mW çıkış gücü ile tanımlanan düşük seviyeli lazerlerdir (sınıf III) ve ayrıca 500 mW çıkış gücüne sahip yüksek seviyeli lazerler (sınıf IV) vardır (182,183). PBM'nin iyileşme sürecini hızlandırma etkisi, 1960'larda Endre Mester ve Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi (NASA) araştırmacıları tarafından uzaydaki iyileşme süreçlerini geliştirmek için kullanılmıştır (184). Lazer ve LED ışığı, ATP'nin mitokondriyal ve hücre zarı fotoreseptör sentezini uyararak hücre canlılığını arttırmak ve iyileşmeyi hızlandırmak için kullanılan bir fotobiyomodülasyon (PBM) etkisini indükler (Şekil 20).



Şekil 20. Fotobiyomodülasyon çalışma mekanizması

Fotobiyomodülasyon (PBM) tekniğinin tedavide kullanımı, mekanizmanın hücreler ve dokular üzerinde nasıl çalıştığının tam anlaşılamaması nedeniyle henüz doku onarımı ve rejenerasyonu için standart tedavinin bir parçası değildir (185,186). Lazer ilk olarak 1960 yılında ABD, Kaliforniya'da Theodore Maiman tarafından geliştirildi ve hızla biyomedikal alanında büyük bir kullanım alanı buldu (187,188).1967'de, ilk çalışan lazerin icat edilmesinden birkaç yıl sonra, Semmelweis Tıp Üniversitesi'nden Mester, lazer radyasyonu'nun farelerde kansere neden olup olmadığını test etmek istedi (189,190). Yaptığı deneyde farelerin sırt tüylerini tıraş etti ve fareleri iki gruba ayırdı ve bir gruba düşük güçte rubi lazer (694 nm) ile lazer tedavisi uyguladı (191). Fareler kansere yakalanmadı ve onu şaşırtan bir şekilde, tedavi edilen gruptaki saç, tedavi edilmeyen gruba göre daha hızlı çıktı. Bu, daha fazla düşük enerjili lazer teknolojileri ve fotobiyostimülasyon uygulamalarının ilk gösterimiydi (191,192). Çok sayıda çalışma, dişeti fibroblastları (191), kalıcı dişlerden çıkarılan diş pulpası kök hücreleri (193,194), dökülen süt dişleri (195) kök hücre proliferasyonunun, fotobiyomodülasyon ile iyileştirildiği bildirilmiştir (196). Kırmızı ışık veya yakın kızılötesi ışık (NIR), PBM'de (600-1100 nm) en yaygın olarak kullanılan dalga boylarıdır (186). Çalışmalar, lazer biyostimülasyonunun, istenmeyen inflamasyon yanıtlarını (histamin, prostaglandinler, kininler, vb.) hafifletmeye yardımcı

olan bağışıklık sistemi bileşenlerini aktive ettiği ileri sürülmüştür (187). Işık kaynakları tipik olarak puls modda çalışır, ancak bazen sürekli ışıklarlarda kullanılır. LLLT'nin etkilerinin çoğu, mitokondri içinde ışık absorpsiyonu ile açıklanabilir (Şekil 20) (197,198). Hücreler, oksijen ve piruvattan hücresel enerji (ATP) üreten binlerce mitokondri içerebilir. Ek olarak, stresli veya iskemik dokularda mitokondri, oksijenin sitokrom c oksidaza (CcO) bağlanmasıyla rekabet eden ve yerini alabilen nitrik oksiti (NO) sentezler (199-202). En çok araştırılan hücreye özgü fotoduyarlılaştırıcılardan biri sitokrom c oksidazdır. Sitokrom c oksidaz, görünür spektrumda, 420 nm'de ve 550 nm'de ışığı absorbe eder (203). Uygulamada fd'lerin ışık aktivasyonu düşünüldüğünde, endojen absorpsiyon özellikle önemlidir (204). Fotonları absorbe ettikten sonra, hücrenin enfeksiyonla savaşma yeteneğini geliştiren adenozin trifosfatta (ATP) bir artışa neden olabilir, hücresel onarım için transkripsiyon faktörlerini aktive eden reaktif oksijen türlerinde (ROT) bir artışa neden olmak ve vazodilatör nitrik oksitin (NO) salınmasına neden olarak dolaşımını artırır (205). Genel olarak, LLLT için kullanılan ışıma gücü, dalga boyuna ve doku tipine bağlı olarak, dokunun ısıtılması için gerekenden daha düşüktür, yani 100 mW/cm^{2}'den azdır (206,207).

Fotomekaniksel etki: Fotomekanik etkiler genellikle yalnızca kısa süreli (10^{-9}-10^{-12} s) lazer pulslarında yüksek yoğunluklarda olur (31,208,209). Kısa puls sürelerinde (nanosaniye ve pikosaniye) ve yüksek yoğunluklarda çalışan lazerlerin absorpsiyonu basınç dalgalarına veya şok dalgalarının (fotomekanik etkiler) oluşmasına neden olabilir (örneğin; dövme izlerinin lazerle çıkarılmasında, dövme mürekkebi, vücudun bağışıklık sisteminin ortadan kaldıramayacağı kadar büyük pigmentli moleküler parçacıklara sahiptir). Bunların daha küçük parçacıklara ışıkla bozulması, vücudun lenfatik sisteminin bunları atmasını sağlayarak dövme izlerinin kaldırılması mümkün olur (210-212). Plazma aracılı şok dalgaları, böbrek veya üretradaki (litotripsi) taşları kırmak için ve göz merceğinin opaklaşmış bir arka kapsülünün çıkarılması için arka kapsülotomide kullanılır (213,214).

AMİNOLEVULİNİK ASİT

5-aminolevulinik asit hidroklorür, 5-aminolevulinik asidin monohidroklorürü olan bir hidroklorürdür. Deride biriken fotoduyarlı bir bileşik olan protoporfirin IX'a metabolize edilir. Yüz veya kafa derisinin minimal ila orta kalınlıkta aktinik keratozunun tedavisi için mavi veya kırmızı ışık aydınlatması PpIX oksijeni, süperoksit ve hidroksil radikalleri oluşturmak üzere daha fazla reaksiyona girebilen hücre içi bir toksin olan singlet oksijene katalize eder. Bu hücrede sitotoksik etkilere yol açar. Antineoplastik ajan, fotoduyarlı ajan, dermatolojik ilaç ve prekürsör ilaç gibi rolleri vardır. Kullanım alanları aktinik keratoz, aktinik kilitis ve bazal hücreli karsinomların tedavisini içerir (215). 5-ALA'nın fonksiyonel hem modifikasyonu, hiçbir geçici ışığa duyarlı porfirinin birikip konak organizmaya zarar vermemesini sağlayan hassas bir süreçtir. 1987'de Malik ve Lugaci, 5-ALA'nın kırmızı ışıkla eksojen uygulamasının, üroporfirin ve protoporfirin IX'un endojen senteziyle eritrolösemik hücrelerin yıkımıyla sonuçlandığını gösterdi (216). 1980'lerde HpD ve 5-ALA'nın başarısının bir sonucu olarak, bazı tıbbi düzenleyici kurumlar, klinik ortam için fd olarak kullanımını onayladı (217,218). Amerika Birleşik Devletleri'nde, Photofrin 1998'de ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından tamamen veya kısmen obstrüktif özofagus kanserinin tedavisi için onaylandı ve 1998'de FDA, Photofrin'i obstrüktif endobronşiyal küçük olmayan hücre akciğer kanseri için onayladı (50,219). O zamandan beri, ALA'nın metil esteri (Metvix, Photocure ASA, Oslo, Norveç) 5-aminolevulinik asit (ALA, Levulan, DUSA Pharmaceuticals Inc., Wilmington, Massachusetts) ve mezo-tetra-hidroksifenil-klorin (mTHPC, temoporfin, Foscan, Biolitec Pharma Ltd., Dublin, İrlanda) dahil olmak üzere en az üç fd daha klinik kullanım için onaylanmıştır. 1999'da FDA, kanser öncesi ve kanserli cilt lezyonlarının tedavisi için Levulan Kerastick'i (topikal 5-ALA merhemi) onayladı (220). Topikal uygulama fotodinamik tedavinin melanom olmayan cilt kanseri tedavisinde ve önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (221). FDT'nin yaşlı ciltler için estetik etkileri iyi belgelenmiştir (222,223). En yaygın kullanılan fd %20'lik 5-aminolevulinik asittir (224). Fotoduyarlılaştırıcının uygulanmasından ve uygun inkübasyon süresinden sonra ALA, protoporfirin IX'a dönüştürülür ve ışık kaynağı ile hedeflenir (225).

ALA, porfirinlerin etkili bir öncüsüdür, fototerapi ile aktive olan protoporfirin üretmek için aktinik keratozda topikal olarak uygulanan bir fd olarak geliştirilmiştir (226,227). Mavi ışık, Soret bandı olarak bilinen protoporfirin IX'un en büyük

absorpsiyon bandını hedeflediği için klasik olarak FDT'de kullanılır. Bununla birlikte, gençleştirme için kullanıldığında, kırmızı ışık, yoğun pulslu ışık (IPL) veya 585 nm pulslu boya lazeri dahil olmak üzere çeşitli ışık kaynakları kullanılır (228-230). Protoporfirin potansiyel olarak hepatotoksik ve kolestatiktir (231,232). Hastaların %5'inden azında hızla ilerleyleyebilen ve yaşamı tehdit edebilen ve karaciğer nakli gerektiren protoporfirik hepatopati gelişir. Karaciğer fonksiyon bozukluğu ilerledikçe, plazma protoporfirin seviyeleri ve ışığa duyarlılık artar (233). Metil 5-aminolevulinat (MAL), ALA'nın bir ester türevidir. ALA'ya göre daha lipofiliktir ve daha yüksek penetrasyona sahiptir. Ester türevleri, basit 5-ALA kadar PpIX üretmede iyi olmasa da, hücrelere gelişmiş penetrasyonu nedeniyle 5-ALA'dan çok daha iyi hücresel hedeflemeye sahiptirler (234). Aktinik keratoz'u olan 69 hasta üzerinde gerçekleştirilen başka bir klinik çalışma, MAL'li FDT'nin ALA'dan daha az ağrıya neden olduğu ve daha iyi tolere edildiği gösterilmiştir (235,236). Memeli hücrelerinde, hem sentezi çoğunlukla karaciğer ve eritropoietik dokularda meydana gelir, sekiz aktif enzim gerektirir ve süksinil CoA ile glisin arasındaki yoğunlaşma ile başlar (237). Bir hem molekülü, organizmaya bağlı olarak sekiz veya dokuz enzimatik adımda sekiz ALA molekülünden oluşur (238,239). Sekiz enzimin tamamı çekirdek genler tarafından kodlanmıştır ve insan tam uzunluktaki cDNA'ları ve genomik dizileri izole edilmiş ve karakterize edilmiştir (Şekil 21).

Hem biyosentezi: ALA sentaz, kataliz için kofaktör olarak piridoksal-5'-fosfat (PLP) gerektiren bir homodimerik enzimdir. ALA sentaz, sadece hepatik dokularda hem tarafından negatif olarak düzenlenir (240). Eritroid dokularda hem tarafından negatif geri besleme regülasyonu gözlenmemiştir (241). Hem biyosentezinin son adımı, farklı fakat biyokimyasal olarak senkronize edilmiş porfirin sentezi ve demir taşıma yolaklarını birleştirir ve protoporfirin IX ve ferrüs demirin ferroşelataz enzimi tarafından hem'e dönüştürülmesini içerir (242). Hem birçok fonksiyona sahip önemli bir moleküldür.

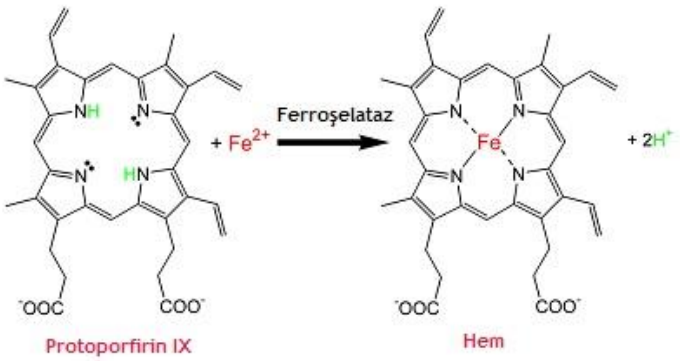
İnsan hem biyosentetik enzimleri, genleri ve porfirileri

Enzim	Protein AA	Yapı 3D[c]	Gen Sembol	Kromozomal Lokasyon	Ekzon[a]	cDNA, bp	Porfiri/Diğer Hastalıklar	Genetik	Mutasyon[b]
ALA-sentaz									
Housekeeping	640	—	*ALAS1*	3p21.1	11	2199	—	—	0
Eritroid-spesifik	587	R	*ALAS2*	Xp11.2	11	1937	XLDPP/XLSA	X-linked gain function	2
								X-linked loss function	60
ALA-dehidraz									
Housekeeping	330	Y	*ALAD*	9q32	12 (1A+2–12)	1149	ADP	AR	12
Eritroid-spesifik	330	Y,P,E	*ALAD*	9q32	12 (1B+2–12)	1154	—	—	0
HMB-sentaz									
Housekeeping	361	H	*HMBS*	11q23.3	15 (1+3–15)	1086	AIP	AD	374
Eritroid-spesifik	344	E	*HMBS*	11q23.3	15 (2–15)	1035	AIP	AD	3
URO-sentaz									
Housekeeping	265	H,T,S	*UROS*	10q26.2	10 (1+2B–10)	1296	CEP	AR[d]	35
Eritroid-spesifik	265	—	*UROS*	10q26.2	10 (2A+2B–10)	1216	CEP	AR[d]	4
URO-dekarbosilaz	367	H,A,N,B,F	*UROD*	1p34.1	10	1104	PCF HEP	AD AR	103 6
COPRO-oksidaz	354	H,Y,E,L,D	*CPOX*	3q12.1	07	1062	HCP, Harderoporphyria	AD, AR	60, 2
PROTO-oksidaz	477	H,B,N,X,ES	*PPOX*	1q23.3	13	1431	VP	AD	166
Ferroşelataz	423	H,Y,B	*FECH*	18q21.31	11	1269	EPP	AR[e]	138

[a]Eksonların sayısı ve parantez içinde gösterilenler housekeeping ve eritroide özgü formları kodlayanlar
[b]www.hgmd.org'dan bilinen mutasyonların sayısı
[c]İnsan (H), murin (M), *Escherichia coli* (E), *Bacillus subtilis* (B), *Rhodobacter capsulatus* (R), *Pseudomonas aeruginosa* (P), *Shewanella amazonensis* (S), *Thermus thermophilus* (T), *Nicotiana tabacum* (N), *Aquifex aeolicus* (A), *Shigella flexneri* (F), *Leishmania donovani, naafi ve majör* (L), *Desulfovibrio desulfuricans* (D), *Exiguobacterium sibiricum* (ES), *Myxococcus Xanthus* (X), maya (Y) saflaştırılmış enzim; referans www.rcb.org
[d]*ALAS2* fonksiyon kazancı veya *GATA1* gen mutasyonu, tek bir URO-sentaz gen mutasyonu ile ilişkili CEP'ye katkıda bulunabilir .
[e]Yabani tip alelin A *IVS3-48C/T* polimorfizmi enzim aktivitesi düzeyini ve klinik ekspresyonu etkiler.
Not: AA, amino asit; AD, otozomal baskın; ADP, ALA-dehidrataz eksikliği olan porfiri; AIP, akut aralıklı porfiri; AR, otozomal resesif; ALAD, d-aminolevülinik asit dehidrataz; ALAS, d-aminolevülinik asit sentaz; 3D, üç boyutlu; bp, baz çiftleri; KEP, konjenital eritropoetik porfiri; CPOX, koproporfirinojen oksidaz; EPP, eritropoietik protoporfiri; FECH, ferroşelataz; HCP, kalıtsal koproporfiri; HEP, hepato-eritropoietik porfiri; HMBS, hidroksimetilbilan sentaz; PCF, porfiria cutanea ailesel; PPOX, protoporfirinojen oksidaz; UROD, üroporfirinojen dekarboksilaz; UROS, üroporfirinojen sentaz; VP, variegate porfiri; XLDPP, X'e bağlı dominant protoporfiri; XLSA, X'e bağlı sideroblastik anemi.

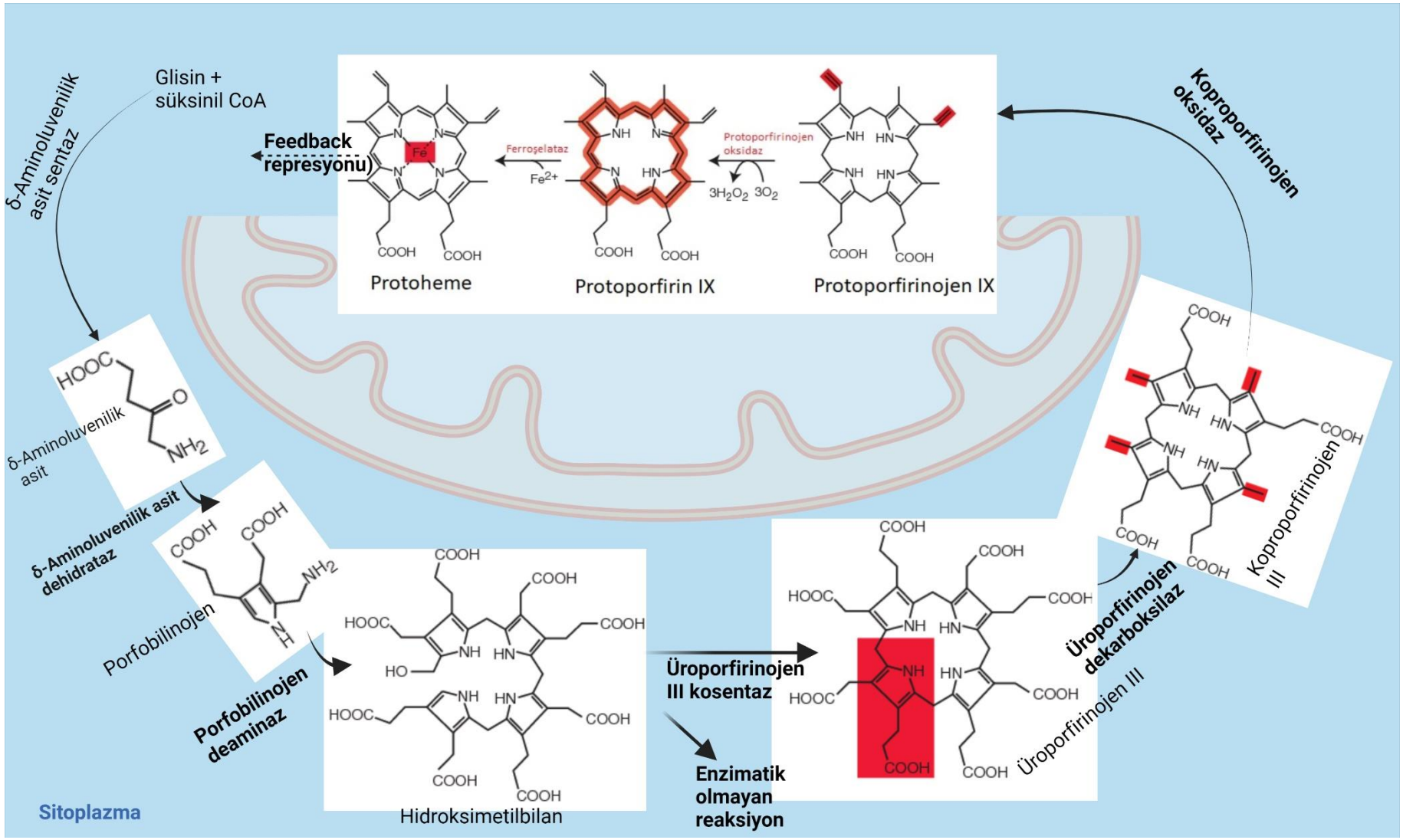
Şekil 21. İnsan hem biyosentetik enzimleri, genleri ve porfirileri (239)

Ayrıca protein sentezini, gen transkripsiyonunu ve protein lokalizasyonunu ve interaksiyonunu kontrol ederek birçok hücrenin büyümesini farklılaşmasını ve hayatta kalmasını etkileyen bir sinyal molekülü olarak kabul edilmiştir (Şekil 22) (243,244).



Şekil 22. Hem biyosentezinin son adımı (245)

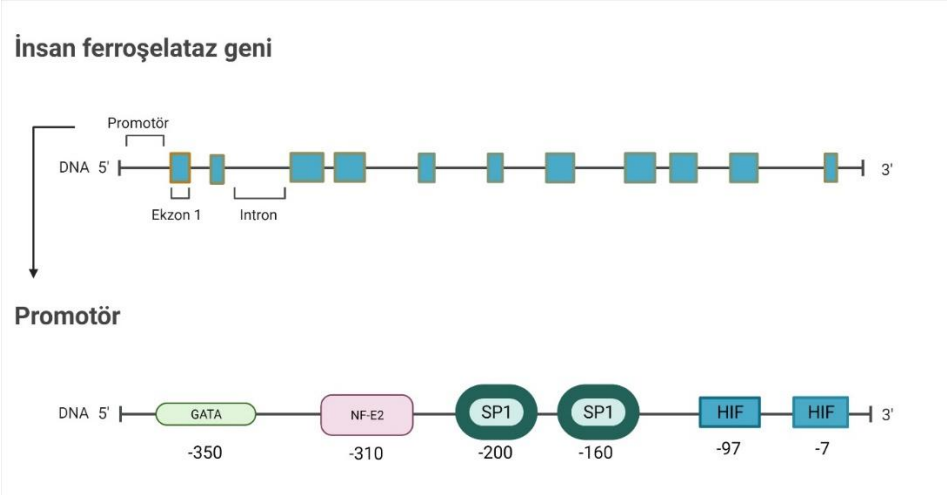
Porfiri hastalarının her birinde hem biyosentetik yolağın spesifik bir enziminin değişmesinden kaynaklanan farklı metabolik bozukluklar meydana gelebilir. İnsan porfirin sentezi ve demir taşıma yollarındaki herhangi bir noktadaki eksiklik, çok sayıda olası hastalığa, bozukluğa ve rahatsızlığa yol açabilir ve çoğu için mekanik ayrıntılar hala belirsizdir. Hem biyosentezi, doğal olarak oluşan tüm tetrapirollerin ortak prekürsörü olan ALA'nın oluşumu ile başlar. Hem, yapısında demir atomunun bulunması, insan vücudunda birçok önemli role hizmet eder. Demirin elektron alıp veya bağışlamasına bağlı olarak ferrüs (Fe^{2+}) ve ferrik (Fe^{3+}) olmak üzere iki iyonik formu vardır (246). Hem proteinleri özellikle moleküler oksijenin (örneğin; hemoglobin ve miyoglobin) taşınmasında ve depolanmasında, elektronların taşınmasında (örneğin; solunum sitokromları) ve oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında (örneğin; sitokrom P450 enzimleri, nitrik oksit sentaz ve katalaz) önemlidir. Hem biyosentetik yolağı, her biri farklı bir enzim tarafından katalize edilen sekiz adımdan oluşan bir dizidir (Şekil 23). Bu enzimlerin ilk ve son üçü mitokondriyal, diğer dördü sitozoliktir. Hem sentezi için öncü molekül, en basit ve zorunlu olmayan ve optik olarak aktif olmayan amino asit glisin ve TCA döngüsü ara maddesi olan ve süksinil-CoA enzim ile başlar ve bunlar ilk enzim olan δ-aminolevülinik asit sentazın substratlarıdır (247). Glisin, süksinil-CoA ile yoğunlaşır ve sadece hem sentezine katılan hem de porfirinler dahil olmak üzere yolaktaki diğer ara maddelere bağlanan bir amino asit olan δ-aminolevülinik asiti oluşturur.



Şekil 23. Hem biyosentetik yolak enzimleri ve ara ürünleri

İki ALA molekülü ve ALA dehidrataz enzimi tarafından porfobilinojeni oluşturur (248). Dört molekül porfirinojenin yoğunlaşması ile üroporfirinojen-III oluşur. Bu reaksiyon üroporfirinojen-I sentaz tarafından katalize edilir ve üroporfirinojen-III kosentaz sitozolde yer alır. Protoporfirin IX, son ara madde, oksitlenmiş bir porfirindir. PPOX inhibitörleri genellikle aktif bölgeye bağlanan ve protoporfirinojen bağlanmasını engelleyen ve rekabetçi inhibitörlerdir (249,250). Bu durumda, serbest protoporfirinojenin hücresel konsantrasyonu artar, daha sonra ışık ve oksijene maruz kaldığında spontan olarak protoporfirin IX'a oksitlenebilir, ancak önemli bir farkla kendiliğinden üretilen protoporfirin IX enzim bağlanarak üretilenden daha serbesttir (251-253). Çünkü normal olarak hem'e dönüşüm için hemen ferroşelataz'a yönlendirileceği enzime bağlı değildir. Birikmiş olan "serbest" protoporfirin IX ışığa çok duyarlıdır ve absorbe edilen ışık enerjisinin bir kısmını moleküler oksijene aktararak singlet oksijen üretebilir. Bu da sonuçta hücre ölümüne yol açan bir dizi oksidatif stresi tetikler. Bu yolaktaki spesifik bir enzim değişikliği, belirli bir porfiri tipinin klinik özelliklerini belirleyen ara ürünlerin birikmesine yol açabilir (254). 1960'larda ve 1970'lerde ALA araştırmacıları, ALAS1'in hücre içi konsantrasyonunun normalde düşük olduğunu (255), ancak geniş bir ksenobiyotik ve steroid seçiminin memeli ve kuş karaciğer hücrelerindeki aktivitesini önemli ölçüde artırdığını (256) ve yüksek konsantrasyonlarda porfirin sentezine neden olduğunu kaydetti (257). 5-ALA'nın eksojen uygulamasıyla teorik olarak sınırsız miktarda endojen PpIX oluşturulabilir (241). Bunun WiDr adenokarsinom hücrelerinde 5-ALA uygulamasıyla doğru olduğu kanıtlandı (258,259). 5-ALA penetrasyonu artırmak için en basit yaklaşım, çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmasıdır. DMSO aprotik polar bir çözücü olduğundan, iyonlaşmayı önlerken 5-ALA'nın çözünmesine izin verir (260,261).

Özel bir durum ise, endojen olarak üretilen protoporfirin IX'dir (PpIX). Bu molekül normalde çoğu hücrede öncül 5-aminolevulinik asitten (5-ALA) hem sentezi yoluyla oluşturulur. PpIX, hem'den önceki son sentez adımıdır ve konsantrasyonu, ilgili prekürsörü bir sonraki moleküle dönüştüren enzimlerin aktivitesine güçlü bir şekilde bağlıdır. Ferroşelataz tarafından PpIX'e Fe^{2+} eklenerek hem üretilmesidir. İnsan ferroşelataz geni, q21.3 bölgesinde 18. kromozomda bulunur ve toplam uzunluğu ~45 kb olan 11 ekzon içerir (Şekil 24).



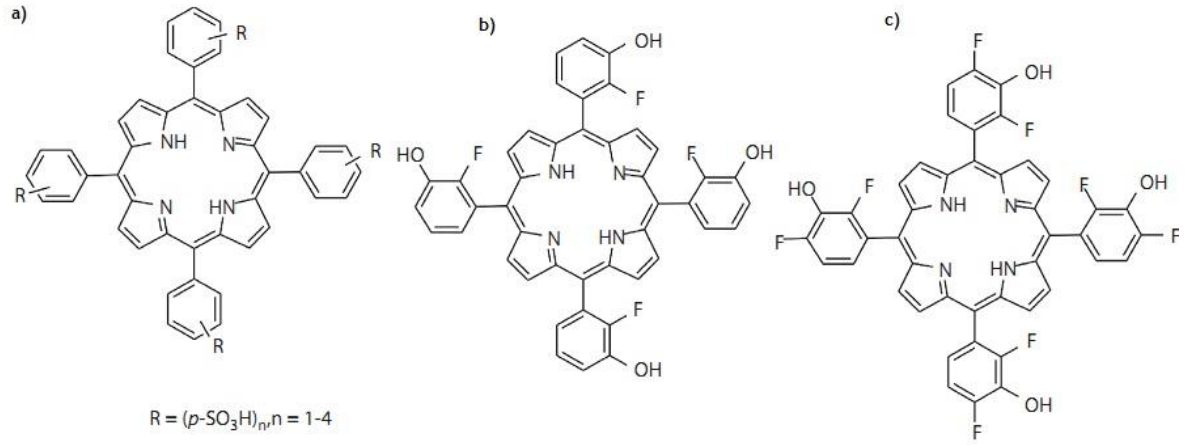
Şekil 24. Ferroşelataz: insan ferroşelataz geni ve promotör yapısı (262,263)

5-ALA dışarıdan verildiğinde, hem dönüşüm normal bir fizyolojik hızda gerçekleştirildiğinden PpIX oluşur ve birikir (246). Böylece, PpIX çok etkili bir fd olarak birkaç saatliğine kullanılabilir. Tümörlerde ferroşelataz azaldığından, PpIX'in hem dönüşümü daha yavaştır. Hem biyosentetik yolağı boyunca metabolitlerin akışı, ilaçlar ve hava veya su kaynaklı kirleticiler gibi çevresel faktörlere karşı oldukça hassastır (264). Örneğin, demir yetersizliği ile sonuçlanan veya demir kullanımını bozan bileşiklere maruz kalma, alternatif substratı olan çinko protoporfirinin, ferroşelataz tarafından artan kullanımı neden olur (265,266).

Aşırı hem, hücresel bileşenlere zarar verebilir ve sitotoksik hale gelerek doku iltihabına ve yaralanmasına neden olabilir (267,268). Serbest hem, lipidleri oksitleyebilir ve bu durum mitokondri ve çekirdekler dahil olmak üzere membran katmanlarına ve organellere zarar verebilir. Hidrojen peroksit, proteinleri oksitleyen ve seçici protein bozunmasını indükleyen reaktif oksijen türlerini oluşturmak için serbest hem ile tepkimeye girebilir (269). Aşırı hem varlığının vücuda reaktif oksijen türleri (ROT) üreterek zarar verdiği düşünülmektedir. Ayrıca, hem, süper sarmallı DNA'yı çentikleyerek DNA'nın bölünmesine ve zarar görmesine neden olabilir (270). 5-ALA hidrofiliktir, intravenöz uygulama sonucunda 50 dakika gibi kısa bir yarı ömrüne sahiptir (271).

Porfirinler

Porfirinler, kandaki hemoglobin gibi doğal kaynaklardan temin edilebilmeleri ve porfirinin yapısal modifikasyonlarının kolaylığı nedeniyle belki de en yaygın olarak test edilen fd'yi temsil eder. Porfirin sınıfı fd'lerin belki de en dikkat çekici özelliği, çeşitli metalleri ve yarı metalleri şelatlama yetenekleridir. Şelasyon, molekülün merkezine doğru olan tetrapirol makrohalkasındaki nitrojenler sayesinde kolaylaşır (272). İhtiyaçlar doğrultusunda, porfirin molekülüne çeşitli mezo-sübstitüentler eklenmiştir ve bunlar daha uzun dalga boylarında, absorpsiyonu maksimum şekilde sağlamaktadır. Tetrasülfonatlı mezo-tetrafenilporfirinler H2(TPPS4) (Şekil 25), tümör lokalize olma özellikleri ile bilinmektedir.

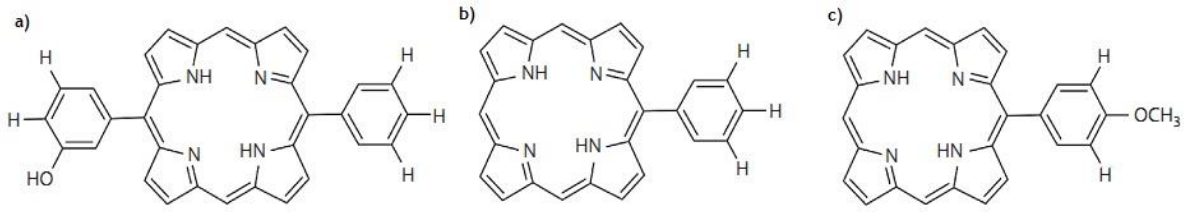


Şekil 25. A-Tetrahidroksi porfirinler ve B- ve C- florlu türevler

Ama neoplastik olmayan hücrelerde lokalize olamaz (273,274). Bu, birkaç kritik gözlemle açıklanabilir; bunlardan en önemlisi, kötü huylu tümörün amino asitler ve 5-ALA dahil olmak üzere besin maddelerine daha fazla ihtiyacı olduğu gerçeğidir (275). Bu bileşiklerin yüksek bir singlet oksijen verimi olmasına rağmen, *in vitro* ve *in vivo* olarak düşük bir fotokimyasal verim rapor edilmiştir (276). Hem hidrofilik hem de hidrofobik gruplara sahip amfifilik moleküllerin daha iyi tümör alımı ve retansiyon gösterdiği bilinmektedir (277). Hans Fischer, hem'e çok benzer özelliklere sahip bir tetrapirol yapısı için sentetik bir deney tasarladı. 15 farklı olası izomerik yan zincir düzenlemesinden sonra, incelenen dokuzuncu porfirin yapısı, demir atomu çıkarılmış hem ile aynı özelliklere sahipti ve bu yapıya o zamandan beri tesadüfen protoporfirin

IX adı verildi. Fischer, başarılarından dolayı 1930 Nobel Kimya Ödülü'nü aldı (278,279).

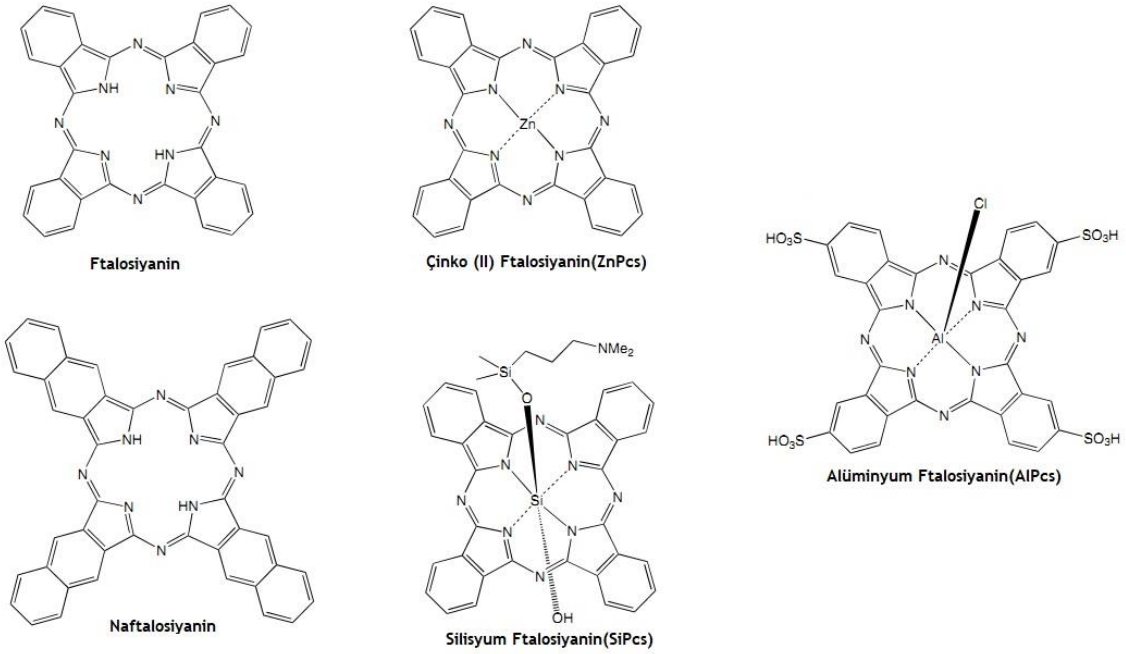
Uzun süredir tümörlerde porfirin birikiminin, neoplastik hücrelerdeki ferroşelataz aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir (280). Kolon tümörlerinde, aktivitedeki bu azalmanın, ferroşelataz haberci RNA'sındaki (mRNA) azalmadan kaynaklandığı bulunmuştur (281). Mezo pozisyonunda farklı substitüentlere sahip fenil gruplarının etkisini araştırmak için bir dizi tetraaril porfirin ve diarilporfirin sentezlendi (282). Şekil 26'daki bileşikler *in vitro* olarak HCT116 insan kolon adenokarsinoma hücrelerinde klinik olarak onaylanmış fd'lerdir ve porfimer sodyum ve temoporfinden daha aktif bulunmuştur (283). Porfirin ile klorin yapısı arasındaki tek fark, porfirinlerin bir tane daha periferik olefin içermesidir. Bununla birlikte, klorofillerin fotosentezde her yerde bulunmasıyla en iyi örneklendiği gibi, klorinler bilinen en foto-uyarılabilir maddelerden biridir (283). Klorinler tipik olarak daha yüksek triplet verimlerine sahiptir (uyarılmış triplet durumuna daha kolay ulaşır) ve bu nedenle elektronik olarak uyarılmış ve reaktif oksijen türlerini üretmede yüksek verime sahiptir (284).



Şekil 26. A- Diarilporfirinlerin ve B- ve C- Mono yapılar

FTALOSİYANİNLER

Porfirinler, basit Urey-Miller tipi deneylerde abiyotik olarak sentezlenebilir ve çeşitli oksidasyon durumlarında çok çeşitli metal iyonlarını bağlayabilir. Bu yapı X-ışını kırınım tekniği ile de doğrulanmıştır. Daha fazla elektron delokalizasyonundan ve dolayısıyla görünür spektrumun uzak kırmızı ve yakın kızılötesi bölümlerinde absorpsiyon bantlarının varlığından sorumlu olan aromatik karakterleri nedeniyle ideal fd adayıdırlar. Porfirinlerden, dört ek nitrojen atomuna sahip olması ile ayrılırlar. Ftalosiyanin molekülü oldukça gergin bir yapıda olup, dört iminoizoindol çekirdeğinden oluşmuştur. Ftalosiyaninin kimyasal özellikleri büyük ölçüde merkez atomuna bağlıdır (Şekil 27).



Şekil 27. FDT'de kullanılan ftalosiyaninler

Naftalosiyanin bileşikleri tipik olarak düşük kuantum verimlerine ve dolayısıyla düşük $^1O_2$ verimlerine sahiptir. Kovalent ftalosiyanin türevleri elektrovalent olanlara göre daha kararlı bir yapıdadır, klornaftalen, kinolin gibi bazı çözücülerde sıcakta kısmen çözünürler (285-288). Ftalosiyaninlerin fotofiziksel özellikleri merkezde bulunan metal iyonlarına çok bağlıdır. Cu^{2+}, Co^{2+} ve Ni^{2+} gibi metal iyonlarından oluşan ftalosiyanin komplekslerinde, bu metal iyonlarda bulunan açık kabuk ya da paramanyetik özellikleri olan bu iyonlar, uyarılmış halde kalım süreleri, çiftleşmemiş elektron çiftleri yüzünden bu metal iyonlarının bileşikleri fotoinaktive ile sonuçlanır. Zn^{2+} ve Al^{3+} gibi iyonlar ise triplet-state durumlarında daha yüksek triplet kuantum verimlerinden dolayı daha uzun süre kalırlar. Triplet-state durumda bulunan bu metaloftalosiyaninlerin enerjileri 110'dan 126 kJ.mol^{-1} sahip olduğu için, singlet oksijen(96 kJ.mol^{-1}) oluşumunu tetikler. Bu yüzden, bu metaloftalosiyaninler çok daha yüksek kuantum verimlerine sahiptirler (289-291). Photosens®, Rusya'da klinik uygulama için onaylanmış, bazen AlPcs (Şekil 27) olarak bilinen sülfonatlı alüminyum bazlı ftalosiyaninlerin bir karışımıdır. Kimyasal saflık sorunları nedeniyle uluslararası kabul görmedi (292). Dördüncü grupta bulunan metal merkezli ftalosiyaninler(pc) aksial substituentlerin eklenmesi ile istenildiği gibi modifiye edilebilirler. Aksial subsite

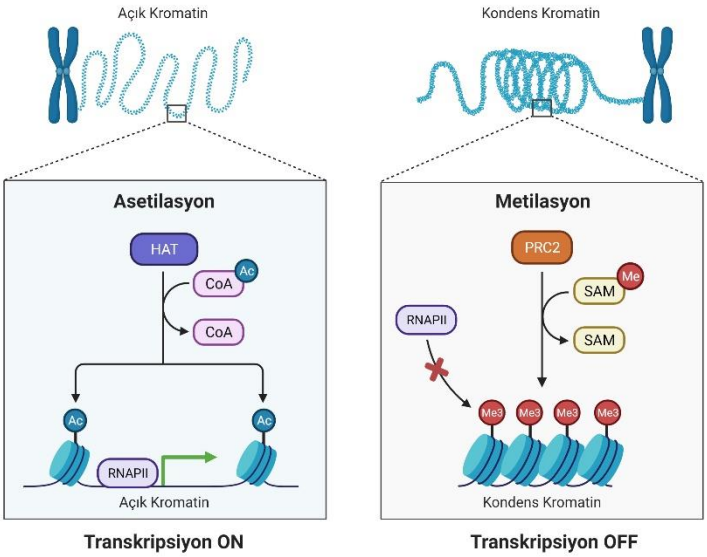
olan silisyum ftalosiyaninlerin çevresel olarak yapılan ftalosiyaninlere göre çok daha fazla avantajları vardır. İlk olarak bu ftalosiyaninler izomerlerden serbesttirler.

En büyük problem bu moleküller ile ftalosiyaninlerin çözelti içinde agrege olma ve hücrelere girişinin engellenme eğilimidir. Bununla birlikte, ftalosiyaninlerin sülfonasyon ve karboksilasyon reaksiyonları aracılığıyla, bu agregasyon sorunları azaltılabilir (293). Ek olarak, aksial ligandlar ftolasiyanlerin agrege olmasını engeller ve aynı zamanda stabilitesini artırır (294). Ftalosiyaninler agrege olması uyarılma süresinin çabuk sönmesine ve bu yüzden floresans emisyonları ve singlet oksijen oluşumunu engeller (295). Birçok silisyum pc kompleksleri ilk rapor edildiği tarih olan 1960'dan beri sentezlenmektedir. Bunlar hem *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda çok etkili bir fototoksisite gösterdiler (296-299). 1999 yılında FDA onayıyla birlikte, klinikte Faz 1 çalışması olarak silisyum ftalosiyaninlerin uygulamasına başlandı. Aksial'li olan silisyum subsite olan pc triplet-state durumunda bulunma süresi 100 ile 200 μs arasında ve kuantum verimleri ise yaklaşık olarak 0.2 ile 0.5 arasındadır.

Çinko pc tümörlü bölgedeki konsantrasyonu maksimuma ulaştıktan bir iki gün sonra vücuttan kolaylıkla atılabilir. Suda çözünebilen sülfonat çinko pc ise herhangi bir taşıyıcı kullanılmadan fd olarak kullanılmaktadır. *İn vivo* koşullarda, disülfonat çinko pc tümörisidal aktivitesi yüksek olduğu için ve galyum ve alüminyum komplekslerinden daha iyi tümör yok edici ve hücre inaktivasyonuna neden olan fd olarak ortaya çıktı (300). Çinko(II) ftalosiyanin çözünmesi zor bir bileşik olmasına rağmen, potansiyel olarak güçlü bir fd'dir. Amfilik sülfonat Al pc benzen halkasına bitişik olan iki sülfonat grupdan oluşan Al pc hücreler tarafından içeri alınması çok daha kolay olduğu için sülfonat türleri arasında en aktif olanıdır (301). Hücre içi yerleşimlerine, farklı yapıda olan sülfonat Al pc'ler için, insan melanoma hücrelerinde konfokal lazer taramalı mikroskobu ile bakılmıştır. Mono ve di sülfonat türevleri sitoplazmaya yerleştiği bulunurken, tri ve tetra türevleri lizozomda bulunmuştur. Al pc ile bazı Si pc karşılaştırıldığında V79 hamster akciğer fibroblastlarında Si pc 3 kat daha aktif olduğu gözlenmiştir (302). Hücresel alım açısından, iki pc arasında çok fark olduğu gözlenmesine rağmen, Si pc fototoksisitesinin daha yüksek olmasının nedeni hücre içi dağılımının ve fotoalgılayıcıların agrege olma durumundan kaynaklandığı düşünülür (297).

EPİGENETİK

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik meydana gelmeden, ama aynı zamanda kalıtsal olarak aktarılabilen, gen ifadesi değişikliklerini inceleyen bilim alanıdır. Eksiksiz DNA dizimiz genomumuz olarak adlandırılır. Her birimiz dizinin biraz farklı bir versiyonuna sahip olsak da, tüm insanlar son derece benzer genomlara sahiptir. Çift sarmal yapı, önce DNA'ya çok sıkı bağlanan histon adı verilen sekiz küçük proteinden oluşan bir kümenin etrafını sarar. Sekiz histon proteini artı DNA'nın her bir birimine nükleozom denir. Bir DNA dizisi boyunca bir araya gelen nükleozomlar, bir ip üzerindeki boncuklara benzer (303,304). Nükleozom proteinlerinin translasyon sonrası modifikasyonlarından dört tanesi; metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon ve ubikuitinasyon en çok çalışılanları ve bilinenleridir (Şekil 28).



Şekil 28. Asetilasyon ve Metilasyon mekanizmaları

Ancak, nükleozomun zamansal ve uzamsal konumuna bağlı olarak, gelişim programı sırasında farklı hücre tiplerinde farklı etkilere sahip olabilir ve meydana gelebilecek bir dizi başka posttranslasyon modifikasyonuna neden olabilir. Asetilasyon, fosforilasyon, metilasyon ve ubikuitinasyon'a ek olarak, histon polipeptitlerinin ve bunların rezidülerinin karakterizasyonunda, formillenmiş, proprionillenmiş, butirillenmiş, krotonillenmiş, malonillenmiş, süksinillenmiş, 5-

hidroksillenmiş, sumolatilenmiş, ADP-ribosillenmiş, sitrüline edilmiş ve glikosile edilmiş olabilir (305-307).

Kromatin, düzenleyici etkilerine, rollerine veya işlevlerine uyum sağlamak için, sıkıştırma derecesini ve üç boyutlu özelliklerini değiştiren dinamik bir yapıdır. Transkripsiyon, replikasyon ve DNA onarımı gibi temel nükleer süreçler bu kromatin yapıda gerçekleşir (308,309). 1948'de Amerikalı biyokimyacı Rollin Hotchkiss, bazı DNA bazlarının kendilerine bağlı metil grupları adı verilen küçük moleküllere sahip olduğunu gösterdi (310,311). İnaktive edilmiş X kromozomlarının birçok metillenmiş baz içerdiği biliniyordu (312). 1970'lerin ortalarında, İngiliz genetikçi Adrian Bird (313,314), diğer DNA bölgelerinin metilasyonununda transkripsiyonel düzenleme ile ilişkili olabileceğine dair kanıtlar bulmaya başladı; metillenebilen bölgeler, genom boyunca rastgele dağılmamaktadır, ancak genlerin konumları ile ilişkilidir. Amerikalı Mark Tykocinski ve Edward Max ve Belçikalı Benoit de Crombrugghe 1980'lerin başında benzer bulgular yayınladılar. Kromatin modifikasyonları, sonunda DNA dizisi ile tüm organizmanın fenotipi arasındaki boşluğu dolduran adaylar gibi görünüyordu (315). Çoğu metillenmiş sitozin'ler, guanin bazlarına bitişiktir. Birçok aktif gen, transkripsiyonun promotör bölgeleri çevresinde bunlardan oluşan bir kümeye sahiptir (316). Bu kümelere, CpG adacıkları denir ve çoğu metillenmemiştir. Buna karşılık, genler arasındaki veya tekrarlayan DNA dizilerindeki CpG'ler genellikle metillenir (317). Normal memeli hücrelerindeki tüm CpG dinükleotitleri metillenmez; aslında, CpG adacıklarının promotör bölgelerindeki CpG'ler DNA metilasyonundan korunurken, gen kodlayan veya kodlamayan bölgelerdeki CpG bölgeleri yaygın olarak metillenir (318). Kanserde, CpG adalarının hipermetilasyonu iyi bilinen bir epigenetik olaydır. Tümör baskılayıcı genlerin promotörlerindeki metilasyonlar daha çok karsinogenezle ilişkilidir ve hipermetilasyon olarak ifade edilirler (319).

Epigenetik kodun oluşumu esnasında DNA dizisi herhangi bir şekilde değişime uğramaz fakat DNA fragmentinin o kısmı artık anlamlı değildir. En sık görülen epigenetik değişiklikler histon proteinlerinde görülen değişimler ve DNA metillenmesidir. Tüm epigenetik mekanizmalar arasında en sık çalışılmış ve en iyi anlaşılmış olanı DNA metillenmesidir. Enzimatik bir değişim olup sitozinlerin 5'-metil sitozine dönmesi ile oluşur. Beşinci karbonun sitozin-guanince zengin promotör bölgesinin sitozin bazındaki metilasyonu, transkripsiyon makinesi tarafından sınırlı erişilebilirliğe neden olur (6). Tersi durumda, bu 5-metilsitozin kalıntılarının

demetilasyonu, önceden erişilemeyen bölgenin düzenleyici faktörler için erişilebilir hale gelmesiyle sonuçlanabilir (320). Memeli genomunda görülen sitozin uç metillenmesi genellikle CpG ikili nükleotidleri olarak da isimlendirilen nükleotit çiftlerinde gerçekleşir. DNA metilasyonu gen sessizliğine neden olur.

Hücre çekirdeğinde, özellikle metillenmiş C bazlarını (^{m}C) tanıyan ve bunlara bağlanan kod çözücü proteinler keşfedildi (308). Bu proteinler, metillenmiş DNA içeren genlerden gelen transkripsiyonu kapatarak karşılık gelen RNA'ların ve proteinlerin üretimini engeller. Genom üzerinde bu metilasyona uğramış gen bölgelerinin tespiti kanserogenezden, yaşlanmaya kadar pek çok biyolojik süreçte genlerin etkilerini anlamada oldukça bilgi verici olmaktadır (321). Metilasyon değişimleri ökaryotik hücrenin bütün genetik materyalinin herhangi bir yerinde görülebilmektir. Ökaryotik hücrelerde genetik materyal iki organelde bulunur. Neredeyse bütün genetik materyali tek başına bulunduran nükleus ve nükleusa göre oldukça küçük genoma sahip mitokondridir. Bu iki organelin genomlarına özgü metilasyonlar görülebilmektedir (322).

1980'lerin başında, hem ABD'deki Carol Prives hem de Alman, İsviçreli ve İsrailli bilim insanlarından oluşan bir ekibe liderlik eden Walter Doerfler, viral DNA parçalarını yapay olarak metilledi ve hücrelere enjekte etti. Her iki ekipte, metillenmemiş DNA'nın aynı diziye sahip metillenmiş DNA'dan daha transkripsiyonel olarak aktif olduğunu buldu (323,324). 1990'larda David Allis, histonlara asetil grupları ekleyen proteinlerin bazı durumlarda gen transkripsiyonunu aktive etmekten doğrudan sorumlu olduğunu gösterdi (325). Transkripsiyonel susturma, yalnızca DNA çift sarmalının her iki ipliği de aynı CpG bölgesinde metillendiğinde meydana gelir.

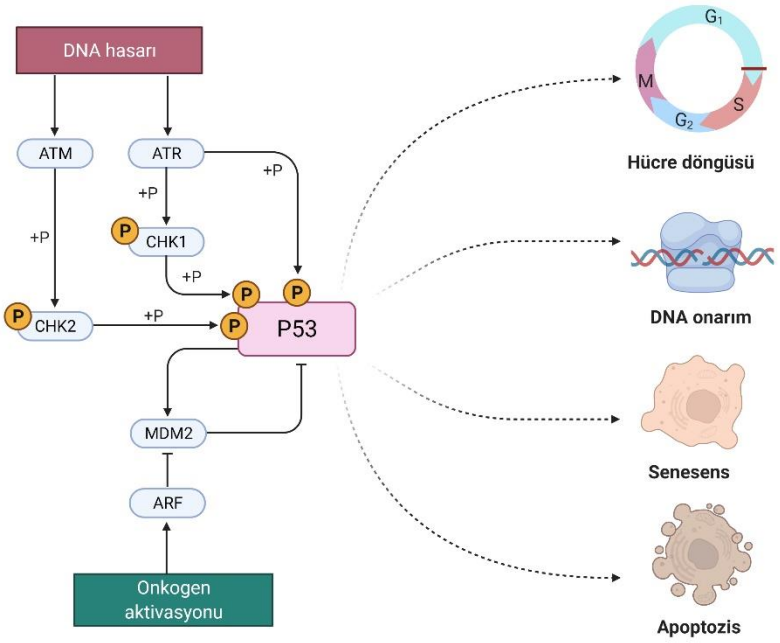
Çevrenin epigenetik etkileri ilk olarak agouti geninden sonra, aynı isimli bir fare suşunda incelenmiştir. Agouti fareleri, adaşı genlerine yakın, bir parça tekrarlayan DNA'ya sahiptir ve bu, metillenmediğinde gen sürekli olarak aktive olarak sarı bir dış tüy rengine, obeziteye, tip 2 diyabete ve artan kanser riskine neden olur. Bu DNA metillendiğinde, agouti geni susturularak daha koyu, daha ince ve daha sağlıklı farelere neden oldu. Epigenetik modifikasyonlar dolaylı olarak da kalıtsal olabilir. Örneğin, bazı anne fareler yavrularını sık sık yalarken, diğerleri daha az yalamaktadır. Yalamak, stresli durumlara uygun şekilde yanıt vermekle ilgili genlerin demetilasyonuna neden olur; yalanmayan ve ihmal edilen yavrular daha stresli yetişkinlere dönüşür.

Çapraz besleme deneyleri, yavruların stres düzeylerinin biyolojik anneden ziyade koruyucu annenin ebeveynlik becerileri tarafından belirlendiğini göstermektedir (326,327). Kanserli ve diğer anormal hücrelerde meydana gelen epigenetik değişiklikleri tersine çevirmek için iki olası yaklaşım vardır. Birincisi, değişikliklerden nihai olarak sorumlu olan anormal epigenetik düzenleyicileri hedef almaktır; ikincisi, modifikasyon paternleri'nin kendilerini silmek ve üzerine yazmaktır. İkinci yaklaşım daha kolaydır ve bu nedenle daha fazla çalışma vardır (328). Ancak bazı dezavantajları vardır. Örneğin, DNA'nın yanlışlıkla susturulmuş bölümlerinden metil gruplarını kaldıran ilaçlar, sessiz kalması gereken bölgelerden de ayrım gözetmeksizin metil gruplarını çıkaracaktır. Yine de, bu spesifik olmayan yaklaşım bir miktar umut vaat ediyor (329). Yeni DNA modifikasyon türleride keşfediliyor. Örneğin, metillenmiş C bazlarına ek olarak hidroksimetilsitozin (hmC), formilsitozin (fC) ve karboksilsitozin (caC) olarak adlandırılan, moleküler varyantlar vardır. hmC'nin aktif DNA demetilasyonuna dahil olduğu zaten biliniyordu. Yi Zhang liderliğindeki bir Amerikalı ekip, fC ve caC'ninde benzer rollere sahip olduklarını gösterdi (330,331). 2015 yılında, Shankar Balasubramanian liderliğindeki bir İngiliz ekip, fC'nin DNA çift sarmalını fiziksel olarak daha açık bir yapılandırmaya zorlayabileceğini keşfetti (332-334). DNA dizilimindeki bu modifikasyonlar, hem DNA molekülünün üç boyutlu yapısını değiştirme hem de diğer moleküller tarafından DNA yapısına erişimi engelleme veya buna izin verme potansiyeline sahiptir.

Protein 53

Protein 53(p53) fosfoproteinini kodlayan TP53 tümör baskılayıcı gen ve "kanser belirteci" olarak bilinir. İlk olarak 1979'da Simian Virüsü SV40'ın büyük T antijeni ile birlikte çökeltilen hücresel kökenli bir protein olarak ortaya çıktı (335,336). Aynı zamanda, kimyasal olarak dönüştürülmüş fare hücrelerine karşı oluşturulan antiserumlar tarafından tanınan bir antijen olarak tanımlandı (337). p53 tüm insan kanserlerinin yaklaşık %50'sinde mutasyona uğrayan veya delesyon olan TP53 tümör baskılayıcı gen tarafından kodlanan proteindir. 1989'dan itibaren, TP53'teki missens mutasyonların ve/veya TP53 allel kaybının, kolorektal, akciğer, meme, karaciğer ve diğer birçok kanserde yaygın olduğunu gösteren çalışmalar ile ortaya konmuştur (338-340).

1990'ların başlarında, aynı zamanda yapılan çalışmalarda, p53'ün DNA hasarına tepki olarak aktive olduğu ortaya kondu ve 1992'deki "genomun koruyucusu" takma adını aldı (341,342). p53, hücrenin apoptoza teşvik edilmesi ve hücre döngüsünün durması dahil olmak üzere birçok biyolojik role sahip olan, tümör baskılayıcı ve DNA bağlayıcı bir transkripsiyon faktörüdür. Transkripsiyonu p53 tarafından aktive edilen genler arasında DNA onarım genleri (GADD45, PCNA, XPCC, DDB2), hücre döngüsünün durması (p21) ve apoptozdan sorumlu (Bax, Puma, Noxa, Fas) yer alanlardan bazılarıdır (Şekil 29) (343-345).



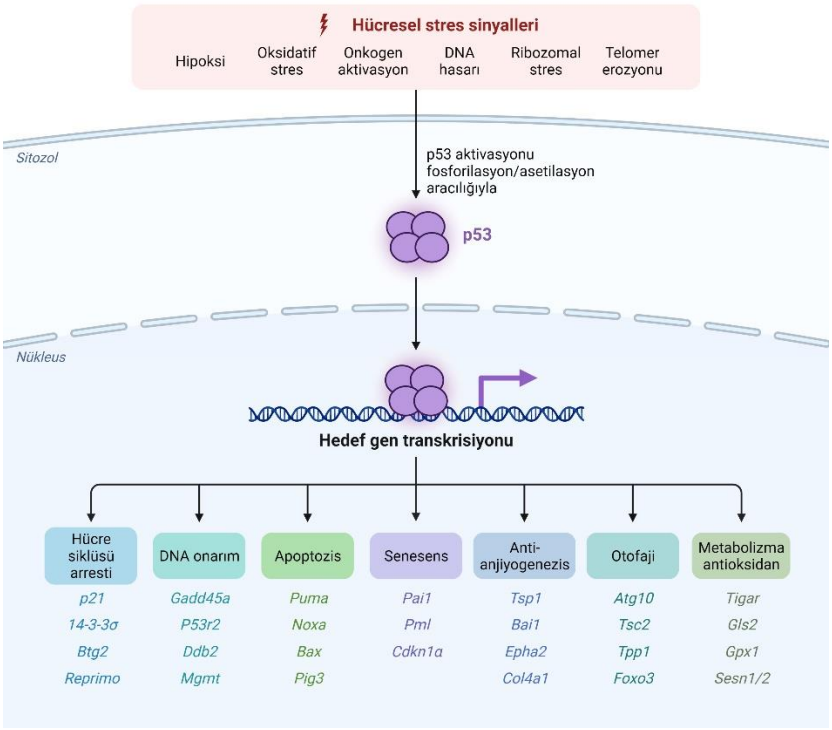
Şekil 29. p53 yolağı

DNA hasarı orta düzeyde olduğunda, p53, p21'in transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla G_1'de hücre döngüsünü durdurarak onarıma izin verir (346). Örneğin, tümör baskılayıcı p53'ten yoksun hücreler insan solid tümörlerinin %50'sinden fazlasında olduğu gibi bir G_2/M kontrol noktasından yoksundur ve siklüs arestinden kurtulabilir (347). Bir ubikutin ligaz olan MDM2, p53'ün transaktivasyonunu inhibe eder ve bunu ubikuitinasyon ile proteazomal bozunmayı hedefleyerek düzenler (348). Metilleyici ajanlara bağlı apoptozun, özellikle Fas'ın p53'e bağlı yukarı regülasyonuna bağlı olduğu, iyonize radyasyon veya sisplatine bağlı apoptozun Noxa ve/veya PUMA'ya dayandığı öne sürülmüştür (349).

Timus, dalak ve ince bağırsak gibi radyasyona duyarlı organlarda, kaspaz 3'ün aktivasyonu, γIR ve DNA'ya zarar veren ilaçlardan sonra apoptoz büyük ölçüde veya tamamen p53'e bağlıdır (350-352). Vahşi tip p53, apoptoz sinyalleşmesinde farklı seviyelerde yer alan birkaç gen yolağının transkripsiyonunu doğrudan kontrol eder. p53 proteini, APO1/FAS/CD95 ve KILLER/DR5 gibi ölüm reseptörlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunu doğrudan aktive eder (353). DNA'ya zarar veren ilaçlar veya hipoksi gibi bir ölüm uyaranına yanıt olarak, stabilize edilmiş p53'ün bir kısmı primer, ölümsüz ve transforme edilmiş hücre hatlarında hızla mitokondriye yerleşir (354-356). İçsel yolakta, merkezi bir rol oynayan organel mitokondri ile hücre içi kaynaklı çoklu sinyalleri birleştirir. Bu programda p53'ün rolü hem transkripsiyona bağımlı hem de bağımsız yönler olmak üzere iki tiptedir. p53, hücreleri ağırlıklı olarak ölüm reseptörü yolağından ziyade mitokondriyal apoptoz yolağı üzerinden apoptoza götürür (357). Apoptozun mitokondriyal düzenleyicileri, mitokondriyal p53 birikiminin indüklenmesini etkiler (358). Dışsal apoptotik yolak, tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) reseptörleri, ölüm reseptörü-4 ve -5 (KILLER4-5) ve CD95 reseptörü (Fas/Apo-1) ve CD95'in(Fas/Apo-1) ligandı transkripsiyonel regülasyon yoluyla p53 tarafından aktive edilir (355). Deasetilasyon enzimi HDAC, p53 için bir yardımcı baskılayıcı olabilir (359). p53 tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenen genlerin ürünleri arasında, birçoğu antiapoptotik faktör Bcl-2 ve/veya aile üyeleri ile etkileşime girer (360,361). p53 hedef genleri, Bcl2 ile etkileşime giren ve dış mitokondriyal membranın bütünlüğünü bozan BH3 motifli proteinleri kodlayan Puma, Noxa ve Bcl-2-associated X Protein(Bax)'i içerir ve bunlar arasında en önemlisi olan sitokrom C gibi apoptoz sinyal faktörlerinin salınmasına yol açar (362-365). Anti-apoptotik Bcl-2 veya Bcl-xL'nin aşırı ekspresyonu, stres sinyali aracılı mitokondriyal p53 birikimini ve apoptozu ortadan kaldırır, ancak toplam hücresel p53 birikimini veya stres kaynaklı hücre döngüsünün durmasını ortadan kaldırmaz (366). p53'e bağlı bir mekanizma yoluyla işlev gören DNA'ya hasar veren bir ajan olan kamptotesin tarafından nöronal hücre ölümünün indüklenmesi, apoptoz aktive edici faktör-1(Apaf-1) ekspresyonunun artmasına neden oldu (367-369). İyonlaştırıcı radyasyon ve doksorubisin ile tedaviden sonra p53 aracılı apoptoza maruz kalan izojenik hücre hatlarında, mikrodizi analizi yoluyla Apaf-1'in yukarı yönlü regüle edildiği bulundu (368). Apaf-1, p53 kaynaklı apoptozun önemli bir aracısı olabilir.

Çalışmalarda yukarı regüle edilen başka bir aday gen, p53 ile indüklenen apoptozda ana faktör olduğu bulunan Bcl-2 bağlayıcı bir gen olan Puma'dır (370).

Bir onkogenin uygun olmayan aktivasyonu veya DNA hasarına neden olan stres sinyallerine karşı p53 hücrelerde fosforilasyon, asetilasyon ve metilasyonu içeren çeşitli mekanizmalar yoluyla translasyon sonrası modifiye edilir (Şekil 30) (371-373).

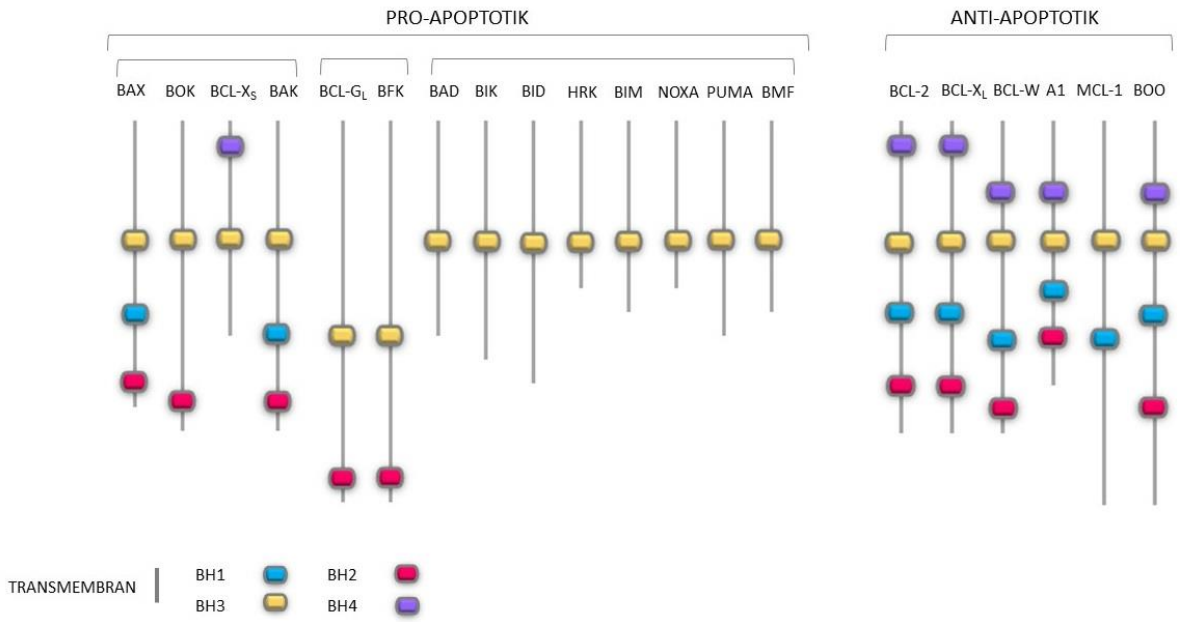


Şekil 30. p53'ün translasyonu

B Hücreli Lenfoma Protein-2 Ailesi

Sinyal yolaklarından bazıları, ölüm reseptörleri ve intrinsik mitokondriyal yolak aracılığıyla apoptozun başlamasını düzenler. Bcl-2 protein ailesi, apoptotik yolakta önemli bir hücre içi kontrol noktasını temsil eder. Bcl-2 ekspresyonu, sitokin çekilmesi, DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi, hücresel homeostaz ve oksidatif stres dahil olmak üzere birçok farklı ölüm uyaranına karşı hücrelerin direncini arttırır (374). Bcl-2 protein ailesi, dört taneye kadar korunmuş α-sarmal Bcl-2 homoloji(BH) domeynine sahip hem pro- hem de anti-apoptotik üyelerden oluşur (375). Bcl-2 ailesinin her bir üyesi, belirli ölüm uyaranlarına karşı; farklı gelişimsel ekspresyonlara, hücre altı lokalizasyonuna ve farklı tepki modellerine sahiptir (376). Mitokondriyal

membrandaki pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerin fonksiyonel balansı, bir hücrenin yaşayıp yaşamayacağını belirler (Şekil 31) (377).



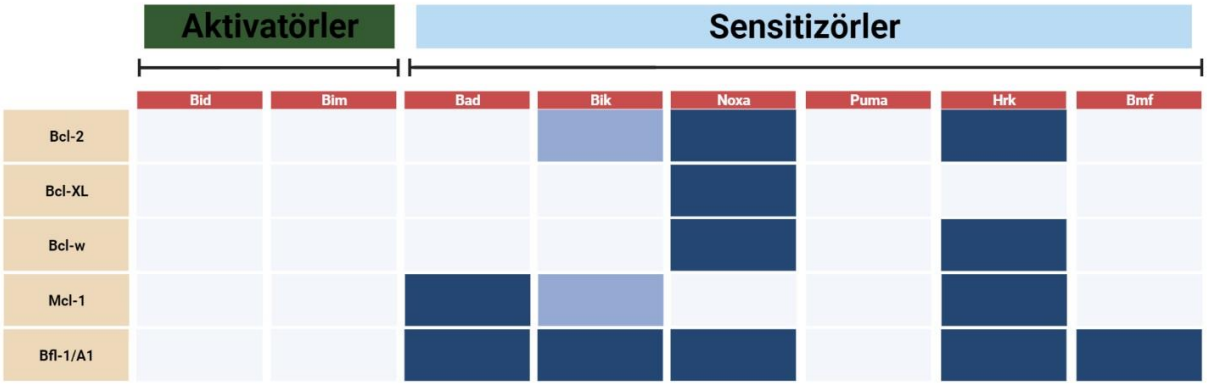
Şekil 31. Bcl-2 ailesi üyeleri

Bcl-2 ile ilgili protein ailesine sahip üyelerden bazıları, endoplazmik retikulum, çekirdek ve diğer organeller içindeki multiprotein komplekslerinde bulunur ve apoptozun dışında çeşitli hücresel süreçlerin kontrolüne yardımcı olur (378). Proapoptotik Bcl-2 üyeleri BH1, BH2 ve BH3 (Bax ve Bak) domeynleri yüksek oranda korunmuş bir homoloji sergileyen "çok domeynli" üyelere veya "yalnız-BH3 içeren" üyelere (Hrk, Mule, Bck-G, Bid, Bik, Bim, Puma, Bmf ve Noxa) ve apoptoz aktivasyonu için kritik olan, tek bir α-sarmal domeyne sahip olan proteinlere ayrılabilir (377,379). Yalnız-BH3 proteinleri iki alt tipe: Aktivatörler (Bid ve Bim gibi) ve sensitizörler (Bad ve Noxa gibi) olarak ayrılabilir. Fizyolojik koşullar altında, Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik üyeleri, doğrudan bir bağlanma ile yalnızca aktivatör olan BH3 proteinlerini inhibe eder. Bir apoptotik uyaran geldiğinde, aktivatörler ayrıca anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri tarafından inaktivasyona karşı uyarılır. Alternatif olarak, sensitizörlerin yukarı regülasyonu, aktivatörleri anti-apoptotik proteinlerden uzaklaştırır. Aşağıdaki şekilde belirtilen çeşitli anti-apoptotik üyelerin yalnız-BH3 protein oligomerlerinin bağlanma özgüllüğü, açık renk bloklar güçlü afiniteyi, grimsi

bloklar zayıf afiniteyi ve lacivert bloklar ise bağlanma olmadığını gösterir (Şekil 32) (377).

Serbest aktivatörler daha sonra Bax ve Bak oligomerizasyonunu ve mitokondriyal membran geçirgenliğini tetikler (380,381). Aktivatörler, aktivasyonlarını teşvik etmek için doğrudan Bax ve Bak ile etkileşime girebilir.

BH3-etkileşimli domeyn(Bid), proteolitik olarak kesik formu olan tBid'e bölünene kadar tam olarak aktif değildir. Bid, kaspaz-8 tarafından bölünebilir ve böylece dışsal apoptotik yolağın, içsel yolu aktive edebileceği bir araç olarak hizmet eder (382). Bid'in, çoğu inaktif ve ayrılmamış olmasına rağmen, γ-ışınlaması sırasında p53 tarafından transkripsiyonel olarak indüklendiği gösterildi (383).



Şekil 32. Yalnız-BH3 protein oligomerlerinin bağlanma özgüllüğü

Hücresel düzeyde, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin Beclin 1 ile etkileşimi çoklu mekanizmalarla düzenlenir. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri ve Beclin 1'in etkileşimini etkileyen düzenleyici mekanizmalar, Bnip3, Nix, Bad, Noxa, Puma, Bim_{EL} ve Bik gibi, yalnız-BH3 domeynini içerir ve aynı bağlanma yeri için rekabet ederek Beclin 1'i anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinden ayırabilir (384,385).

Bax veya Bak'ı bağlanma yeteneği olmayan, ancak yine de yalnız-BH3 proteinlerini bağlayabilen mutant Bcl-xL proteini, neredeyse tüm anti-apoptotik işlevini sürdürmüştür. Çoklu domeyne sahip proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri Bax, Bak ve Bok'tan oluşur. Bax ve Bak yaygın olup ve farklı dokularda eksprese edilirken, daha az çalışılan Bok'un yalnızca üreme dokusunda ekspre olduğu bilinmektedir. Canlı hücrelerde, Bcl-2 hücre ölümüne karşı korur ve genellikle Bax ve Bak aktivasyonunu

önleyerek yapar. Bu, Bax ve Bak aktivasyon sinyallerinin kesilmesinin Bcl-2 ve ilgili anti-apoptotik proteinlerin birincil işlevi olduğu tezini destekler (386,387).

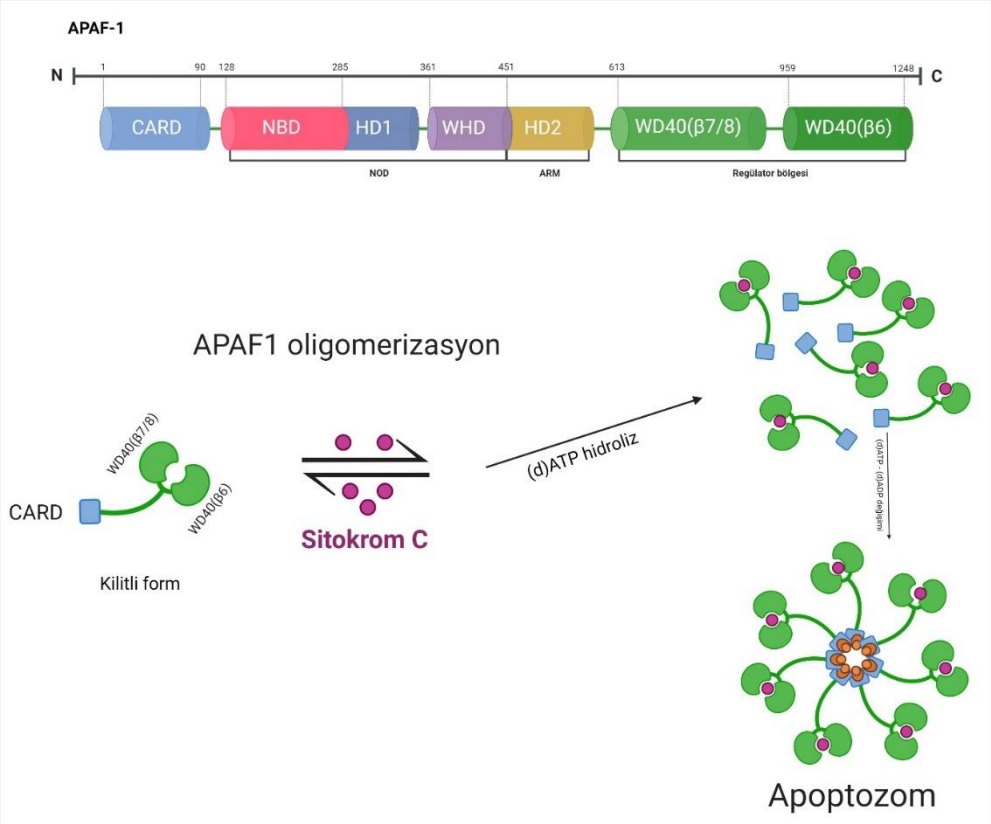
Bad, en iyi sitokin veya büyüme faktörü deprivasyonunda indüklenen apoptozdaki rolüyle bilinir. Bad geni, alternatif translasyon başlangıcı ve başlangıç bölgeleri nedeniyle iki farklı boyutta proteinden (Bad uzun ve kısa) meydana gelir. Çeşitli yolaklar aracılığıyla fosforilasyon ile sıkı bir şekilde düzenlenir (388). Noxa, p53 transkripsiyonel hedefi olduğu bildirilen yalnız-BH3 içeren ilk proteindir. İnsan Noxa proteininin bir BH3 domeyni varken, ancak fare Noxa proteinin ise, iki işlevselliğe sahip BH3 domeyni olduğu bilinen tek Bcl-2 aile üyesidir. Hem insan hem de fare Noxa genleri, promotörlerinde p53'ün doğrudan bir efektörü olmalarına etken olan p53 bağlanma bölgesine sahiptir (389,390).

Anti apoptotik(Bcl-2 ve Bcl-xL) bazı proteinler fd ajanların hedefleri arasındadır. Bcl-2 proteinlerinin kaybı devamlı olarak bir apoptotik cevabı tetikler (391,392). İkinci başka bir mekanizma ise fotodinamik olarak tetiklenen apoptoza neden, fotohasara uğramış lizozomdan salınan bazı proteinlerin devreye girmesi ile olur. Bu enzimler apoptoz başlatıcı, sitokrom-c salınımını ve mitokondri ile doğrudan etkileşimde olan pro-apoptotik Bid proteinin başka formu olan t-Bid formuna yapışır (393). Bcl-2 aynı zamanda anti-otofajik bir proteindir. Bcl-2 pro-otofajik süreçte rol oyanyan beclin-2 proteinin bir formunu oluşturur. Bcl-2 kaybında oluşacak herhangi bir proseste bu aynı zamanda otofajiyede neden olur (394). Atg7 gen bölgesinin nakdavn edilerek sınırlandırıldığında, otofaji düşük dozlarda FDT etkinliğini desteklediği ortaya kondu (395).

Apoptoz Aktive Edici Faktör-1

Apoptoz aktive edici faktör-1(Apaf-1), bir N-terminal kaspaz recruitment domeyn (CARD) motifinden, bir nükleotit bağlama ve oligomerizasyon domeyninden ve on üç WD40 tekrarından oluşur (396). Yapıda, beş farklı domeyn, CARD, üç katmanlı a/b alanı, sarmal alan I, kanatlı sarmal alan ve sarmal alan II, domeynler arası etkileşimler yoluyla birbirine yakın ve bir şekilde paketlenmiş haldedir (397) Sitokrom c mitokondriyal zarlar arası boşluktan serbest bırakıldıktan sonra, Apaf-1'deki WD40 tekrarlarına bağlanır ve konformasyonel bir değişiklik başlatır ve CARD motifinin üzerindeki maskelenmeyi kaldırır (398,399). CED-4, mitokondriyal kaspaz bağımlı hücre ölüm yolağında yer alan apoptozomun merkezi proteini olan memeli

Apaf-1'in (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) ortologudur (400). Apaf-1/pro-kaspaz-9/sitokrom c kompleksine ATP bağlanması ile apoptozom adı verilen heptamerik tekerlek şeklinde bir kompleksin oluşumuyla sonuçlanan farklı konformasyonel değişiklikler tetiklenir (401,402). Memelilerde apoptozomun merkezi yapısının iskeletini oluşturan Apaf-1 ~130 kDa'lik bir proteindir (Şekil 33).



Şekil 33. Apaf-1 yapısı ve apoptozom oluşumu

Apaf-1, sitokrom c ve dATP varlığında çok büyük (~700 ila 1400 kDa) bir apoptozom kompleksi oluşturmak üzere oligomerleşir (397). Apaf-1 ve pro-kaspaz-9'un CARD domeynleri kompleksin merkezinde yer alır, WD40 domeyni ise tekerleğin "jant tellerini" oluşturur (403). CARD etkileşimleri, aktif bölgenin alosterik olarak yeniden düzenlenmesine neden olur ve aktif olmayandan aktif konformasyona geçiş yapar (404,405). Pro-kaspaz-9, tetiklendiği apoptozom içinde otomatik olarak aşağı yönlü olarak kaspazları aktivite eder (406,407). Apoptozom, kaspaz-9 içindeki aktivasyonun ardından, pro-kaspaz-3 ve -7'yi hedefler ve eşzamanlı olarak işleme alır. Kaspaz-3, sırayla, pro-kaspaz-2 ve -6'yı keser, ardından kaspaz-6-aracılığıyla kaspaz-8 ve -10 işleme alınır (403,408,409). Apaf-1'deki bağlı nükleotidin,

apoptozom oluşumu sırasında dinamik değişikliklere uğraması muhtemeldir. Monomerik Apaf-1'e sitokrom c bağlanmasının, dATP'nin daha sonra eksojen olarak değiştirilen dADP'ye hidrolizi indüklediği bildirildi (410,411). Bu gözlem, dATP'nin hidrolizinin ve ardından dATP'nin dADP ile değiştirilmesinin apoptozom oluşumu için gerekli iki adım olduğu hipotezine yol açtı (412). Başka bir çalışmada, monomerik Apaf-1'in ATP veya dATP değil, ağırlıklı olarak ADP içerdiği bulundu (398,411).

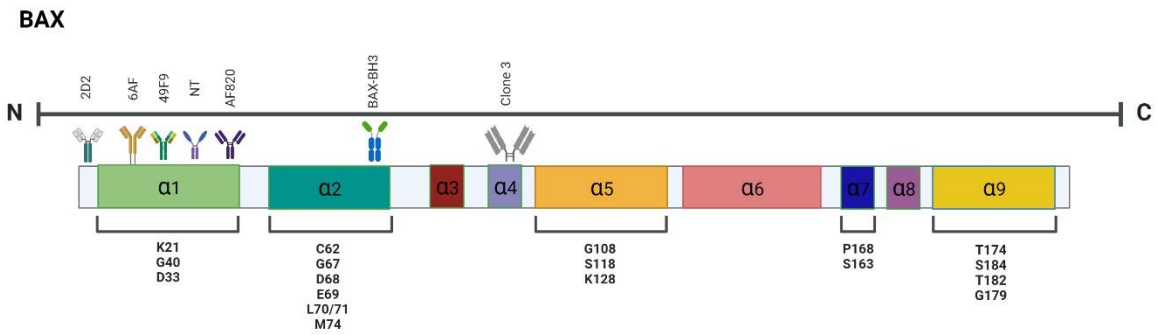
Kalsiyumun otomatik olarak inhibe edilmiş olan Apaf-1'e doğrudan bağlandığı ve ADP'ye bağlı yapısını stabilize ettiği bulundu. Kalsiyum, apoptozom oluşumuna müdahil olarak Apaf-1'e bağlı apoptotik yolağı düzenleyebilir (413,414). Kaspaz-9 veya Apaf-1 yoksunluğu, fare fibroblastlarını p53'e bağlı apoptoza dirençli hale getirir (415,416). Son zamanlarda Apaf-1'in, retinoblastoma protein yolundan bağımsız olarak, p53'ün doğrudan transkripsiyonel bir hedefi olduğu gösterildi. Bu, p53'ün Apaf-1 seviyelerini artırarak hücreleri apoptoza duyarlı hale getirebilir (417,418).

Apaf-1'in susturulması bazı tümörlerde görülür. Özellikle, Apaf-1 lokusunun sıklıkla allelik kayıp gösterdiği, melanomda gözlenmiştir (419-421). Apoptozda yer alan proteinleri kodlayan genlerin anormal ekspresyonu, kanser hücrelerinin bir başka özelliği olan DNA metilasyonunun bozulmasıyla bağlantılıdır (422). DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünün durmasına yol açan bir dizi süreçtede yer alır. Bu işlevi gerçekleştirmek için Apaf-1, sitozolden kontrol noktası kinaz 1 ile etkileşime girdiği hücre çekirdeğine girer (423). ~700 kDa apoptozom kompleksini oluşturmak için Apaf-1'in oligomerizasyonu hızlı bir süreçtir ve dATP aktivasyonunun başlatılmasından sonraki 5-10 dakika içinde maksimum seviyededir ve bir kez bir araya getirildikten sonra apoptozom oldukça stabildir (424). İlk çalışmalarda, Bcl-xL'nin Apaf-1 ile doğrudan etkileşime girdiği ileri sürüldü, ancak daha sonraki çalışmalarda, Bcl-2 homologlarının Apaf-1'e bağlanmadığı gösterildi (425,426). Apoptozom oluşumunun iyi bir şekilde düzenlenmesinde, hücre içi K^+ ve Ca^{2+} seviyelerindeki değişim katkıda bulunur (427,428). Apoptoz geçiren hücrelerde Apaf-1 oluşumunu ve işlevini kontrol etmekten sorumlu olan diğer hücresel faktörlerin tanımlanması, çeşitli insan hastalıkları ve bozuklukları için yeni tedaviler tasarlamada yeni anlayışlar sunabilir.

Bcl-2-associated X Proteini

Bcl-2-associated X Protein**(**Bax), proapoptotik (Bid ve p15tBid) veya antiapoptotik (Bcl-xL ve Bcl-2) olmak üzere diğer bazı pBcl'lerinkine çok benzer bir yapıya sahip küresel bir proteindir. Bax, yapılandırılmamış döngülerle ayrılmış 9 alfa sarmaldan oluşur. Apoptoz düzenleyici Bax veya Bcl-2 benzeri protein 4, Bax geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bax, Bcl-2'lerle birlikte immünopresipitasyon yoluyla izole edilen ilk proapoptotik proteindir (428). İlk çalışmalar, antiapoptotik proteinler Bcl-2 veya Bcl-xL'nin aşırı ekspresyonunun Bax'ın proapoptotik aktivitesini engelleyebileceğini gösterdi (429).

Apoptoz baskılayıcı Bcl-2'yi antagonize ederek programlanmış hücre ölümünü hızlandırır. Kazpaz-3'ün aktivasyonunu ve dolayısıyla apoptozu teşvik eder. Mitokondri zarına translokasyona neden olan ve sitokrom c'nin salınmasına yol açan bir konformasyonel değişikliğe uğrar, bu da stres koşulları altında apoptozu tetikler (430). Bax ve Bcl-2, insan merkezi sinir sistemindeki tüm hücre tiplerinde eksprese edilir. Bununla birlikte, purkinje hücrelerinde ve hipokampal nöronlara duyarlı alanlarda özellikle yüksek Bax ekspresyonu bulundu (431). Bax, diğer Bcl-2 ailesi üyeleri gibi, porlar oluşturan bir proteindir (432). Bax, sitokrom c'nin geçişine izin verecek kadar büyük lipozomlarda porlar(kanallar) oluşturabilir (433). Aktif olmayan çözünebilir formda Bax, α2-α5 helislerinden oluşan merkezi bir hidrofobik çekirdek etrafında, dokuz α sarmalından oluşan küresel bir yapıya sahiptir. Bu helis yapıları çoğunlukla hidrofobik'dir. Proteinin çekirdeğini oluştururlar ve amfipatik özelliklere sahip olan ve hidrofilik rezidüleri dışarıya doğru açık tutan diğer 7 sarmalın içine gömülüdürler (Şekil 34).



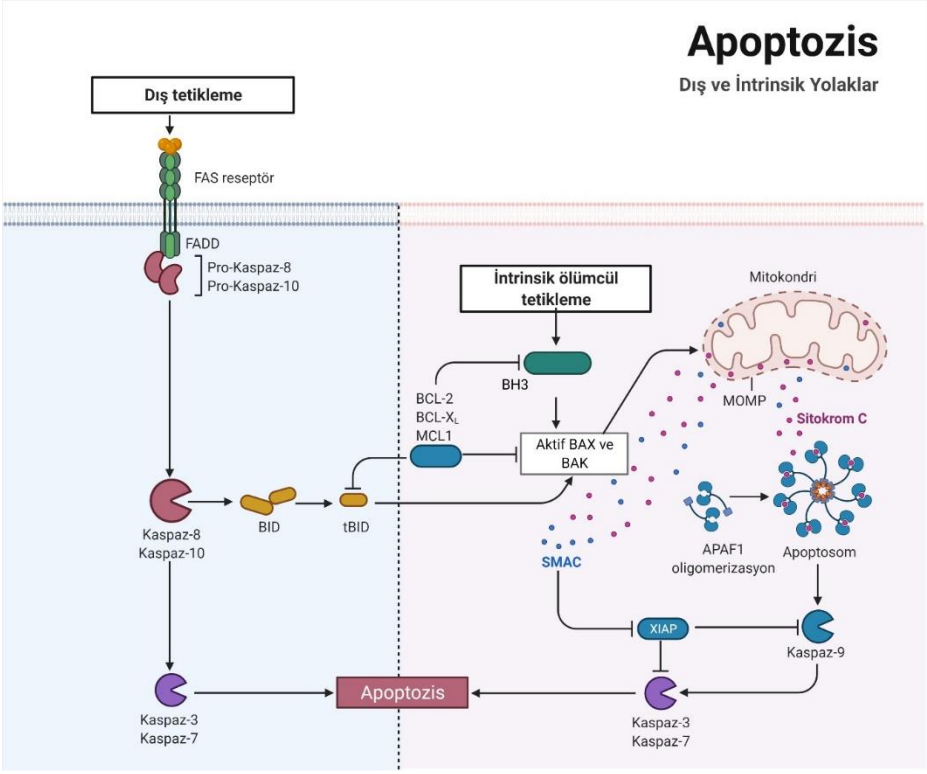
Şekil 34. Bax'ın yapısı

Bu globüler yapı sayesinde, proteinin doğal sitozolik konformasyonunda çözünür kalması sağlanır (434,435). Apoptoz sırasında, Bax'ın sitozol'den mitokondriyal zara yerleştirilmiş bir proteine geçiş yapmasını sağlayan büyük bir konformasyonel değişiklik meydana gelir. Bu aktif formda, daha önce doğal konformasyonda gizlenmiş olan birkaç alan açığa çıkar. Bax mitokondride birikir ve yalnız-BH3 proteinleri ile etkileşerek aktive olur (436). Bax, apoptoz sırasında diskret mitokondriyal lokilerde GTPazlar dinaminle ilişkili protein 1 (Drp1) ve mitofusin 2 (Mfn2) ile aynı yerde bulunur (437). Drp1 yokluğunda sitokrom c salınımı gecikirken, Smac/Diablo salınımı etkilenmeden kalır, bu da Drp1'in sitokrom c salınımının düzenlenmesindeki rolünü destekler (438).

Bax hala kardiyolipin olmadan mitokondride sitokrom c salınımını oligomerize edebilir ve indükleyebilir, bu lipidin apoptozdaki rolünü sorgulatır (439). Farklı boyutlarda oluşturulan yapay membran kesecikleri ve izole edilmiş mitokondride yapılan bir çalışmada, yüksek eğriliğe sahip küçük keseciklerin Bax sarmalının α9'a yerleştirilmesini ve mitokondriyal dış zar geçirgenliği (MOMP)'nun yürütülmesini engellediği öne sürüldü (440). Bax, sitokrom c ve diğer proteinlerin mitokondriyal intermembran boşluğundan sitoplazmaya geçişine izin verecek kadar büyük olan yüksek iletkenliğe sahip bir kanalı indükler (441). Bax, nötr pH'da kanallar oluştururken, anti-apoptotik proteinler sadece düşük pH'da kanal aktivitesi gösterir (433,442). Bu kanalların iletkenliği, lipid çift katmanlarında tek başına Bax tarafından üretilenlerden çok daha yüksektir, bu da Bax'ın diğer dış mitokondriyal membran gözeneklerinin açılmasını düzenleyebileceğini ve bu gözeneklerin proapoptotik faktörler için ana çıkış yolu olarak hizmet ettiğini düşündürür. Bax, Bak ve Bok/Mtd multidomeyn proteinler olup, korunmuş BH1-3 domeynlerinden üçüne sahiptir ve hepsi C-terminallerinde hidrofobik domeyn içerir (443). Bu gruptaki bir istisna, C-terminal domeyninde yalnızca BH3 ve BH4 domeynlerine sahip olan Bcl-XS'dir. Yalnız-BH3 domeynine sahip proteinler; Bid, Bim, Bik, Bad, Blk, Hrk, Nix, BNip3, Noxa ve Puma gibi daha heterojen bir gruptur (386). Bax yapısındaki hidrofobik domeyn, proteinin BH3 yarığına giren bir sarmal (α9) oluşturur. Bu nedenle, C-terminal domeyninin Bax'ın diğer proteinlerle etkileşim duyarlılığını ve dolayısıyla komplekslerin oluşumunu düzenleyebileceği düşünülebilir (444). Bax yolağının aktivasyonu, hücre içi pH, matris alkalinizasyonu ve sitozolik asitleşmede değişikliklere neden olur.

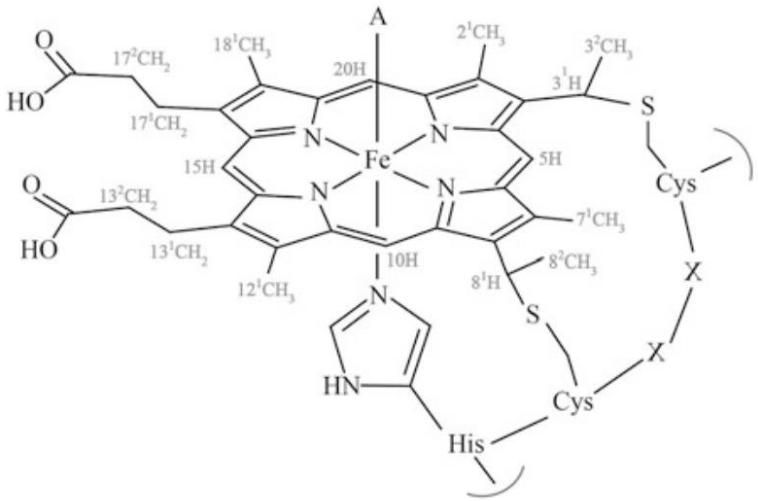
Sitokrom c Proteini

Somatik hücrelerden elde edilen sitokrom c, bir nükleer gen tarafından kodlanan, suda çözünür 13 kDa ağırlığında, hem içeren bir proteindir (445,446). Sitokrom c, aerobik ve anaerobik solunum süreçlerine katılan elektron transfer proteinidir ve bu nedenle yaşam için çok önemlidir (447). Hücre hasarı, DNA hasarı, metabolik stres veya katlanmamış proteinlerin oluşması gibi bir apoptotik uyaran tespit ettiğinde, içsel apoptotik yolak tetiklenir ve mitokondriyal sitokrom c(Cyt c) sitozole salınır (448,449). Sitozolde, sitokrom c Apaf-1'e bağlanır ve apoptozomu oluştururlar (450). Normal koşullar altında, sitokrom c ve ikincil mitokondri türevli kaspaz aktivatörü (Smac/Diablo) gibi proapoptotik iç mitokondriyal membran proteinleri mitokondride sekestre olarak kalır (Şekil 35).



Şekil 35. Apoptozis yolakları

Sitozoldeki kaspazlar, bağlanmamış halde, aktif olmayan prokaspazlar olarak kalır ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1, oto-inhibe edilmiş monomerik formunda bulunur. Bir apoptotik uyarının (DNA hasarı, katlanmamış protein tepkisi veya stres gibi) ardından Bid, (t)Bid olacak şekilde bölünür. tBid sırayla dış mitokondriyal zarda gözenekler oluşturmak için oligomerizasyonlarını indükleyerek Bax ve Bak'ı aktive eder. Sitokrom c mitokondriyi bu gözenekler ve/veya diğer kanallar yoluyla terk eder. Sitokrom c, Apaf-1'e bağlanır ve heptamerizasyonunu ve prokaspaz-9'a bağlanmasını sağlar. Etkinleştirilen kaspaz-9 daha sonra kaspaz-3 ve -7'yi etkinleştirir (451,452). Proapoptotik olaylara karşı koymak için sitokrom c salımı, ısı şoku protein-27 (Hsp27) tarafından inhibe edilebilirken, kaspazlar apoptoz inhibitör protein(IAP')'leri tarafından inhibe edilebilir. IAP'ler, Smac tarafından inhibe edilir (446,453). İntrinsik apoptozun altında yatan mekanizmalarla ilgili detaylı çalışmalarda, sitokrom c'nin redoks fonksiyonları olmasa da, Apaf-1 aktivasyonu için, sitokrom c'nin hem grubunun gerekliliği gösterilmiştir (454,455). Apoptozda sitokrom c'nin işlevi için hem grubu gereklidir. Sitokrom c'nin redoks fonksiyonları, intrinsik apoptoz için gerekli değildir ve bunların düzenleyici bir rolü olabilir (456). 1920'lerde Keilin, farklı hem kofaktörlerinin spektroskopik özelliklerine dayanarak sitokromları sınıflandırdı (457). Bu proteinlerin (apoprotein) polipeptit zinciri, korunmuş bir bağlanma motif dizisinde iki sistein rezidüsünün sülfihidril gruplarıyla kurulan tiyoeter bağlantıları yoluyla en az bir hem grubuna kovalent olarak bağlanır: Cys-X-X-Cys-His, burada X herhangi bir aminoasiti temsil eder (Şekil 36) (458).



Şekil 36. Hem ve karşılık gelen polipeptid bağlama motifi (459)

Altı hem demir koordinasyon pozisyonundan dördü ekvatoral olarak protoporfirin IX nitrojen atomları tarafından işgal edilir. İki eksenel koordinasyon konumundan biri, tipik olarak, aynı zamanda yakın ligand olarakta adlandırılan, bağlama motifi dizisindeki histidin rezidülerinin yan zinciri tarafından işgal edilir. Sitokrom proteinleri en az bir hem molekülü içerir ve elektronlarını redoks reaksiyonları yoluyla hareket ettirir. Hem grubu tipik olarak ya beş koordinelidir ya da dinlenme durumunda altıncı koordinasyon bölgesinde bir su molekülüne bağlanır. Tipik olarak bu proteinler, hem demiri tarafından erişilebilen substrat(lar) için bağlama cebine sahiptir (459,460).

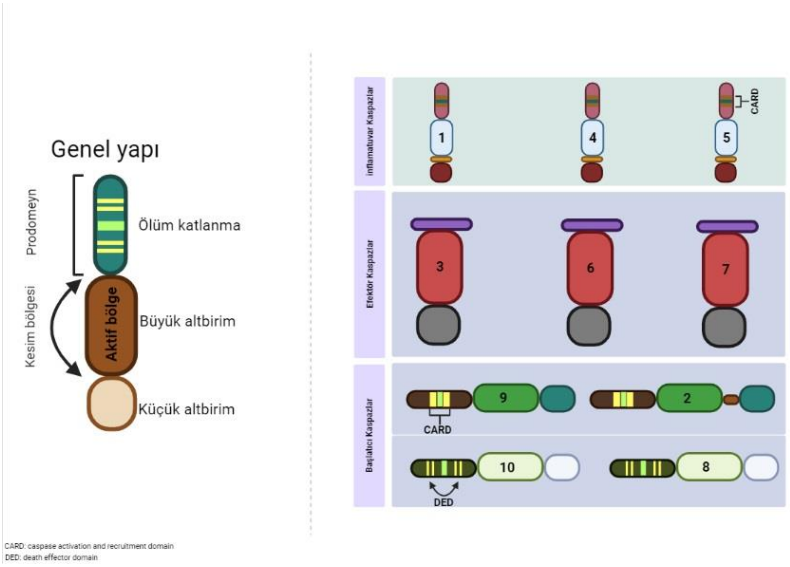
Birçok hücre tipinde apoptoz sırasında sitokrom c salınımı tam, hızlı ve geri döndürülemezdir. Ölüm, muhtemelen bir hücrenin vermesi gereken en önemli karardır ve bu nedenle mitokondriden sitokrom c'nin salınması, çoklu regülasyon aşamaları tarafından kontrol edilir (461). Apoptotik kalıntılar(bodiler) hızla fagositler tarafından yutulur ve böylece potansiyel bir inflamatuvar yanıttan kaçınılır. Sitokrom c aracılı yolak, doğumdan sonraki normal yaşam süresi boyunca, bağışıklık sistemi homeostazı ve hasarlı veya zararlı hücrelerin ortadan kaldırılması dahil olmak üzere birçok biyolojik olayda yer almaktadır.

İzole edilmiş mitokondride, fizyolojik sınırları içinde hücre içi K^+ konsantrasyonu 50-80 mM'dır ve K^+'ya maruz kalma sonucunda, sitokrom c'yi iç mitokondriyal membrandan salmak için yeterli konsantrasyondur (462). Sitokromun mobilizasyonu, ROT'un daha fazla üretimi ile artabilir (455,463). Örneğin, mitokondride sitokrom c eksikliği, solunum fonksiyon bozukluğuna neden olur (464) ve bu da ROT türevlerinin ani bir artışına yol açabilir (465). ROT birikimi, sitokrom c'nin süpürme işlevinin olmaması nedeniyle daha şiddetlenebilir. Ayrıca, bu artan ROT üretimi, apoptoz geçiren hücrelerde kendi içinde diğer intermembran proteinlerinide ekspre edebilir (466).

Kaspazlar ve Kaspaz-3

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümü, yani apoptoz, piroptoz ve nekroptoz'da çok önemli bir rol oynayan bir grup proteaz enzimidir. Bu enzimler, spesifik sistein proteaz aktiviteleri nedeniyle kaspaz olarak adlandırılır (467). Kaspazlar, yüksek düzeyde korunmuş sisteinil aspartat proteinazların formu olup, bir

aspartik asit rezidüsü ile substratlarının özgül olmasını sağlar. Kaspazlar, apoptoz ve inflamasyondaki aksiyona göre işlev görür. Tüm kaspazlar başlangıçta aktif olmayan zimojenler (prokaspazlar) olarak üretilirler ve bunlar genellikle aktif proteazı vermek için dimerizasyon ve proteolitik bölünmeyi içeren işleme tabi tutulur (Şekil 37) (468).



Şekil 37. Kaspazlar'ın genel yapısı

Kaspaz ailesinin bilinen ilk üyesi, başlangıçta interlökin-1b-dönüştürücü enzim (ICE) olarak bilinen, IL1β'nin matürasyonu için gerekli bir enzim olan kaspaz-1'di (469). Nematodlar'daki apoptoz, omurgalılardaki mitokondriyal apoptoz yolu ile benzerlik gösteren basit bir yol izler. Çeşitli memeli ve memeli olmayan türlerden çeşitli kaspazlar klonlanmıştır. Nematod gelişimi sırasında hücre ölümünden sorumlu olan tek kaspaz, C. elegans ölüm geni ced-3'ün (CED-3) ürünüdür (470). Omurgalılardaki kaspaz-9 gibi, CED-3'de bir CARD içerir ve dimerizasyon ile aktive edilir (471). CED-3'ü aktive etmekten sorumlu olan adaptör molekül, Apaf-1'in homologudur ve kaspazı kendi CARD'ı aracılığıyla bağlar (472). Apaf-1'den farklı olarak, CED-4 olarak adlandırılan bu proteinin sitokrom c tarafından aktivasyona gerek olmadığı görülmektedir. İnsanda 11, farede 10, tavukta 4, zebra balığında 4, Drosophila melanogaster'da 7 ve C. elegans'ta 4 adet kaspaz türü tanımlanmıştır (403). Kaspazlar apoptotik, başlatıcı ve uygulayıcı kaspazlar gibi alt sınıflara ayrılır (473).

Kaspaz aktivasyonunun sonucu her zaman öldürücü değildir: nöronlarda, sınırlı ve lokalize kaspaz aktivasyonu, sinaptik plastisiteyi modüle etmede veya

nöronal devrelerin ayarlamasında nörit budamasında rol oynamaktadır (474). Sitokrom c tarafından başlatılan kaspaz aktivasyonu, mitokondriyal membran potansiyeli kaybından önce gelir ve mitokondriyal membran bütünlüğünün tamamen kaybı için aşağı yönlü kaspaz aktivasyonu gereklidir. Apoptoz'un kritik aracılarının genetik olarak delesyon edilmiş fare çalışmalarında, Apaf-1, kaspaz-9 veya kaspaz-3 için genleri olmayan fareler, embriyonik safhada ölümcüllük sergiler ve sinir sisteminde belirgin deformiteler gösterir (475,476). Apaf-1, kaspaz-9 veya kaspaz-3 genlerinin delesyon edilen farelerin ön beyninde önemli miktarda nöron fazlalığı vardır, omurilik ve beyin sapı gibi diğer bölgeler normal olarak gelişiyor gibi görünmektedir, bu da bu modellerde nöronal ölümün hala atipik, apoptotik olmayan bir yolla meydana gelebileceğini düşündürmektedir (476-478).

Efektör kaspazlar (omurgalılarda ağırlıklı olarak kaspaz-3 ve -7), apoptozu etkilemek için birçok farklı proteinin parçalanmasından sorumludur (479). Bu kaspazlar genellikle substratları Asp-Xaa-Xaa-Asp/Gly, Asp-Xaa-Xaa-Asp/Ser veya Asp-Xaa-XaaAsp/Ala bölgelerinden parçalar ("/" kesilmeyi gösterir ve Xaa herhangi bir amino asit anlamına gelir.). Memeli hücrelerinde kaspazlar için tahmini 500 substrat bulunur. Ancak, çoğunun kesim etkileri bilinmemektedir (480).

Kaspaz aktivasyonu, omurgalı hücrelerinde farklı apoptoz yolakları ile tetiklenir. İyi tanımlanmış iki yolak, Şekil 35'te gösterilen ölüm reseptörü yolu (dışsal yolak olarakta adlandırılır) ve mitokondriyal yolaktır (iç yolak olarakta adlandırılır) (481). Memeli hücrelerinde çoğu apoptoz, mitokondriyal dış zarların bozulduğu ve mitokondriyal zarlar arası boşluktaki içeriğin sitozole salındığı bir yolaktan ilerler. Mitokondriyal dış zar geçirgenliği (MOMP), bu yolağın önemli bir özelliğidir. MOMP üzerine salınan proteinler arasında, sitozoldeki proteinlerle temas ettiğinde kaspazları aktive etmede temel bir rol oynayan holositokrom c bulunur (455,482). Bu rol, elektron taşıma zincirindeki Kompleks III'ten Kompleks IV'e elektron transferi rolünden tamamen farklıdır. Holositokrom c, kaspaz-9'u bağlayan ve aktive eden sitozolik apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'in aktivasyonunu tetikler (483). Mitokondriyal zarlar arası boşluk proteinleri Smac ve Omi, IAP'lerin kaspaz inhibe edici aktivitesini antagonize eder (484). Efektör kaspazların belirli bölgelerde kesilmesi, aktivasyonları için gereklidir. Bu kesilmeyi genellikle başlatıcı kaspazlar aracılık eder. Başlatıcı kaspazlar, ölüm katlanmaları adı verilen protein-protein

etkileşim domeynlerini içeren adaptör moleküller tarafından aktive edilir. Kaspaz-6, aktif kaspaz-3 ve -7 tarafından kesilme yoluyla apoptoz sırasında aktive edilir.

Apoptoz protein (IAP'ler) inhibitörleri, farklı işlevlere sahip bir protein ailesini içerir; bu proteinlerin bazıları kaspazlara bağlanır ve kaspazları inhibe eder ve proteazom tarafından bozunmalarını indükler (401). Ölüm reseptörlerinin ligasyonu üzerine aktive olan kaspaz-8, yalnız-BH3 proteini Bid'i parçalayarak aktivasyonuna neden olur. Bid daha sonra Bax ve Bak'ı MOMP'ye neden olmak için tetikler, böylece apoptozun mitokondriyal yolağı devreye sokulur. Bid, iki apoptotik yolak arasında bir bağlantı görevi görür (485). XIAP, apoptozom üzerinde başlatıcı kaspaz-9'u bağlar ve inhibe eder ve ayrıca apoptozu bloke etmek için kaspaz-3 ve -7'yi bağlayabilir ve inhibe edebilir (486). MOMP üzerine salınan en az iki protein, XIAP'yi antagonize eder ve kaspaz aktivasyonunun ilerlemesine izin verir (487). Bu proteinler Smac (Diablo olarak da bilinir) ve Omi'dir (HtrA2 olarak da bilinir) (488). Hücre ekstraktlarında kaspaz-9 aktivasyonunun biyokimyasal analizini yapılan bir çalışmadaki sonuçlar kaspaz-9'un proteolitik kesilmesi, aktivasyon için yeterli olmadığı ve kaspaz-9'un aktif olması için apoptozom kompleksi ile ilişkili olması gerektiğini gösterdi (489).

Daha sonra yapılan çalışmalarda kaspaz-9'un proteolitik kesilmesinin sadece aktivasyon için yetersiz olmadığı ve aynı zamanda gerekli olmadığıda ortaya çıkardı (490). Bazı memelilerin IAP proteini, BIR alanına bağlanarak kaspazların enzimatik aktivitesini doğrudan inhibe edebilir (491,492). BIR1 domeyni ve BIR2 domeyni arasındaki bir bağlayıcı bölge aracılığıyla efektör kaspazları (kaspaz-3 ve kaspaz-7) inhibe eder (493). Hem sitokrom c hem de Smac, nükleer genom tarafından kodlanır ve bu nedenle kaspaz aktivasyonuna katıldığı düşünülen sitozolde sentezlenir (494). Kaspaz-2 çok özel bir kaspazdır. Primer yapısına dayanarak, bir başlatıcı kaspaz gibi görünmektedir. Bununla birlikte, tipik bir başlatıcı kaspazın en karakteristik işlevi olan: efektör kaspazların proteolitik kesilmesi ile doğrudan aktivasyonunda görev almaz. Kaspaz-2, Bid'i keser ve aktive ederek apoptozu tetikler (495).

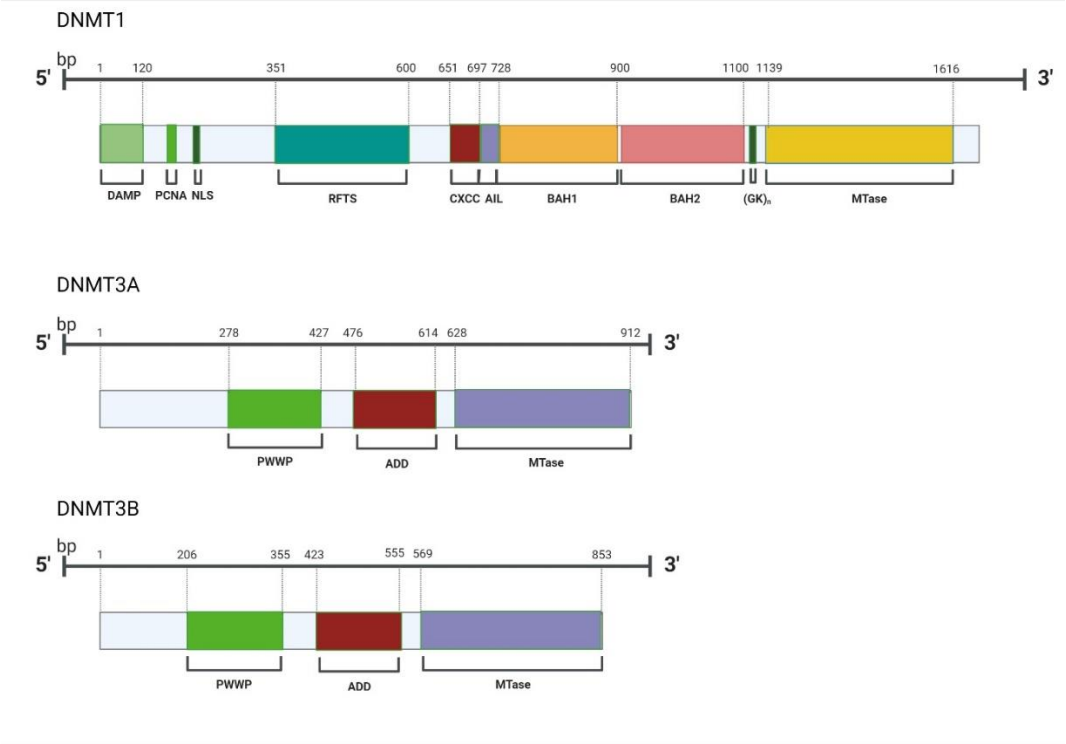
Kaspaz aktivasyonunun hücre ölümünün yokluğunda meydana gelmesi, uzun dönemli depresyonda kaspaz-3 aktivasyonunun düşük seviyelerde olduğu son bulgularla desteklenmektedir (496). Kaspaz-3, CASP3 geni tarafından kodlanan bir proteindir (497). Aktive edilmiş kaspaz-3, mitokondriyal transmembran potansiyelini ($\Delta\Psi$) daha da dağıtan ve hücre içi ROT'un daha fazla birikmesine neden olan

geçirgenleşmiş mitokondriyi geri besler (498,499). Aktive edilmiş kaspazlar, sitokrom c salınımını artırarak ve sonrasında ΔT_m'nin azalmasını kolaylaştıran pozitif bir geri besleme döngüsü ile sağlanır (500). Çeşitli apoptotik uyaranlar için büyük bir efektör olarak hizmet eden kaspaz-3, irofulven kaynaklı apoptozda etkin olarak rol oynar (501). Cyt c-/- hücreleri, kaspaz-3 yolağını aktive etmekte başarısız olur ve Apaf-1, vahşi tip hücrelerde aktif apoptozomu oluşturmak üzere Apaf-1'in normal olarak oligomerikleştiği koşullar altında monomerik bir durumda kalır. Buna karşılık, ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği dışsal apoptotik yolak etkilenmez (502). Tüm içsel kaspaz aktivasyonu kaspaz-9'a bağlıdır. Nakavt fare çalışmalarında, kaspaz aktivasyonunun içsel yolağında, kaspaz-9 ve Apaf-1'in önemi doğrulanmıştır. CASP-9'dan yoksun hayvanlardan türetilen hücreler, sitotoksik ilaçlar ve radyasyon gibi iç stres ajanlarına karşı direnç göstermiştir (503,504). Hem aktive edilmiş kaspaz-3 hem de aktive edilmiş kaspaz-6, alzaymır hastalığında apoptotik hücre ölümünde odak merkezleridir (477).

Bir serin proteaz olan granzim B, sitotoksik granüllerin önemli bir bileşenidir. *İn vitro* çalışmalarda, perforin ve granzim B'nin tek başına eklenmesinin apoptoz indüksiyonu için yeterli olduğunu göstermiştir (505). Granzim B, kaspazlara benzer şekilde aspartat rezidülerinden sonra, substratlarına ayırır (506,507), bu proteazın kaspaz ailesinin üyelerini doğrudan aktive etme kabiliyetine sahip olduğunu düşündürür. Gerçekten de kaspaz-3, granzim B için tanımlanan ilk substrattır (508,509). Jurkat hücre içermeyen ekstraktların kullanıldığı deneyler, granzim B'nin eklenmesinin pro-kaspaz-3 ve çoklu kaspaz substratlarının işlenmesiyle sonuçlanmıştır. Kaspaz-3, -7, -8 ve -10 doğrudan granzim B tarafından işlenirken, kaspaz-2, -6 ve -9 ikincil olarak, kaspaz-3'e bağlı olarak işlenir (510).

DNA metiltransferazlar

DNA metilasyonunu, germ hücre gelişimi ve erken embriyogenez sırasında *de novo* DNA metiltransferazlar(DNMT) olarak adlandırılan DNA metiltransferazlar 3a(Dnmt3a) ve 3b(Dnmt3b) tarafından sağlanır (Şekil 38) (511).



Şekil 38. DNMT'lerin yapıları

DNA metilasyon paternlerine esas olarak, replikasyona bağlı bir şekilde bakım ve onarım mekanizmalarında görev alan DNA metiltransferaz 1(Dnmt1) aracılık eder. Memelilerde, DNMT'ler, yapısal ve işlevsel olarak farklı iki ailede üç üye içerir. Dnmt3a ve Dnmt3b, başlangıçtaki CpG metilasyon modelini *de novo* oluştururken, Dnmt1 bu modeli kromozom replikasyonu ve onarım sırasında korur (331,512). Dnmt3 ailesi, iki aktif *de novo* Dnmt içerir: Dnmt3a ve Dnmt3b ve bir de düzenleyici faktör olan Dnmt3-like protein(Dnmt3l) içerir (513).

DNA metiltransferaz 1 veya Dnmt1 adı verilen bir protein, orijinal DNA metilasyon modelini yeni oluşan ipliklere kopyalamaktan sorumludur. 5-mC, bir kez oluşturulduktan sonra, DNA replikasyonu yoluyla kopyalanan hücrelere iletilebildiğinden, kararlı bir epigenetik işaret olarak kabul edilir (514). DNA metillenmesi (diğer epigenetik işaretlere göre) oldukça kararlı olmasına rağmen, iki farklı mekanizma ile çıkarılabilir: (1) pasif demetilasyon, burada 5-mC işareti hücre bölünmesi sırasında yavru iplikte korunmaz (515) ve bu nedenle, birkaç replikasyon döngüsünden sonra aşamalı olarak kaybolur (516) ve (2) on-on bir translokasyon (TET) enziminin 5-mC'nin 5-hidroksimetil sitozin (5-hmC), 5-formil sitozin (5-fC) ve 5-karboksil sitozin(5-caC)'e dönüşümünü katalize ettiği aktif demetilasyon, daha sonra

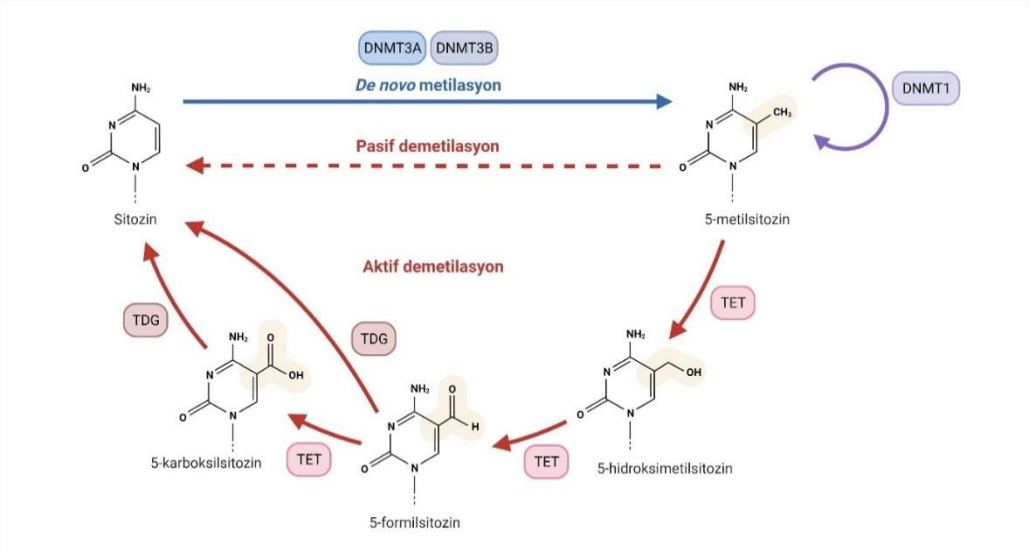
ya pasif demetilasyon ile DNA replikasyonuna bağlı olarak seyreltme yoluyla kaybedilir ya da baz eksizyon onarımı yoluyla aktif olarak değiştirilmemiş bir C ile değiştirilir (517,518). Dnmt1, özellikle asimetrik olarak metillenmiş CpG bölgelerini tanır ve bunlara bağlanır. Daha sonra yeni DNA zincirindeki metilsiz C bazına bir metil grubu ekleyerek orijinal hücrenin simetrik metilasyon modelini geri yükler. Bu süreç, olgun hücrelerin epigenetik görünümü korumak ve hücre farklılaşmasının tersine çevrilmesini önlemek çok önemlidir (519,520). Dnmt1'in delesyonu, bilinen tüm imprinted genlerin deregülasyonuna ve genomik hipometilasyona yol açar (521). Dnmt3a'da yanlış anlamlı(missens), anlamsız, çerçeve kayması ve ek bölge mutasyonları dahil olmak üzere çeşitli inaktive edici mutasyonlar nedeniyle insanlarda kansere neden olduğu belgelenmiştir (522,523). DNA'nın metilasyonu, metil parçasını metil donörü S-adenosilmetiyoninden sitozin halkasının beşinci konumuna aktaran bir DNMT ailesi tarafından katalize edilir (524). 1990'larda, DNA metiltransferaz proteinlerinden yoksun fareler ile yapılan bir çalışmada DNA metilasyonu'nun önemi gösterildi. Fareler embriyo aşamasında öldü (525).

DNMT'lerin hücre döngüsü ve embriyogenez sırasında değişken ekspresyonları vardır ve patoloji durumuna bağlıdır. Tipik bir örnek verilirse, yalnızca döllenmeden sonraki ilk aşamada ekspre edilen ve daha sonra 18 aa daha kısa bir diziye sahip olan Dnmt1'in yerini almasına izin veren Dnmt1o'dur (522). Histon metiltransferaz, zeste homologu 2'nin güçlendiricisi(EZH2), polycomb baskılayıcı kompleks 2(PRC2)'nin katalitik alt birimidir ve H3K27'nin di- ve tri-metilasyonu yoluyla gen ekspresyonunun baskılanmasında rol oynar. EZH2 önemli bir proto-onkogendir (526). EZH2, birkaç yaygın katı tümör tipinde aşırı eksprese edilir ve hastalığın ileri evreleri ve kötü prognoz ile ilişkilidir (527,528). DNA metiltransferaz inhibitörleride geliştirilmektedir. DNA metilasyon paternlerinde kararlı kalıtsallık, ilacın etkilerinin tedavi ile olumlu yanıt alan herhangi bir kanser hücresinin çoğalan yeni kopyalarında devam etmesini sağlar (529).

Ten-eleven Translocation Enzimleri

Kanser hücrelerinin genomları, öncelikle tekrarlayan gen dizilerini etkileyen bir durum olan global hipometilasyon ile karakterize edilir (530). TET adı verilen "silici" proteinler, spesifik olarak etiketlenmiş metil gruplarına bağlanır ve onları DNA'dan koparır (531). DNA demetilasyon süreçleri pasif ve aktif olarak sınıflandırılır. Pasif

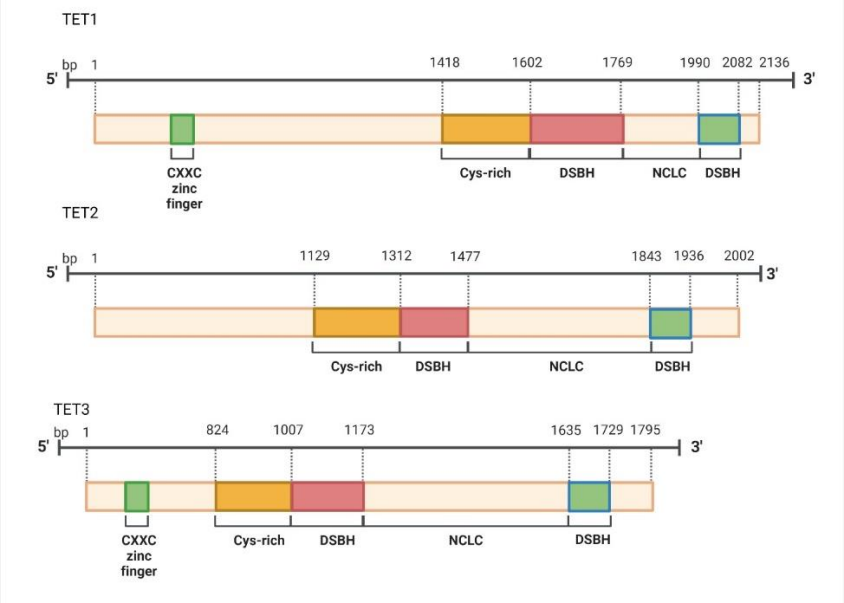
mekanizmalar, replikasyon veya DNA replikasyonu sırasında DNA metilasyon modellerini korumak için onarım mekanizmalarında meydana gelen bir başarısızlığı içerir ve sonraki replikasyon döngülerinde hemimetillenmiş CpG'lerin seyreltilerek azaltılmadır (532). Tahiliani ve ark. ve Kriaucionis ve ark. 2009'da oksidasyon yoluyla 5-mC'yi değiştirebilen bir enzimi ve sırasıyla yeni bir nükleotit olan 5-hidroksimetilsitozin (5-hmC) varlığını tanımlayarak, DNA demetilasyon mekanizmalarını anlamada önemli çalışmalar yaptılar (533-535). 5-mC'yi 5-hmC'ye dönüştüren enzim, ilk olarak 2003'te tanımlanan ten-eleven translokasyon 1(Tet1)'dir (534). Bu ilk çalışmadan kısa bir süre sonra, diğer iki TET aile üyesi, Tet2 ve Tet3 karakterize edildi (536). Aktif demetilasyon sırasında çıkarılması gereken metil grupları oksijen atomları ile etiketlenir. TET enzimleri metilsitozinleri oksitler ve DNA demetilasyonuna aracılık eder. Ten-eleven translokasyon(TET) protein ailesi, Tet1, Tet2 ve Tet3 olmak üzere üç üyeden oluşur. Bu ailenin ilk üyesi Tet1, ilk olarak 2002 yılında akut miyeloid lösemide(AML) karışık soy lösemi geni MLL'nin bir ortağı olarak tanımlandı (537). TET ailesi proteinleri ilk olarak, DNA'daki timini hidroksile eden bir dioksijenaz aktivitesine sahip olduğu keşfedildi (538). *İn vitro* biyokimyasal analizlerde, rekombinant TET katalitik domeynlerin ve tam uzunluktaki TET proteinlerinin, iki temel kofaktörü olan 2-oksoglutarat ve Fe(II) varlığında 5-mC'yi 5-hmC'ye verimli bir şekilde dönüştürebildiğini ve 5-mC seviyeleri azalırken ve 5-hmC seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (534,539). Sonraki çalışmalar, TET proteinlerinin DNA'da 5-hmC'yi 5-fC'ye ve 5-caC'ye oksitleyebildiği ortaya koyuldu (Şekil 39) (534). 5-mC'yi 5-hmC'ye dönüştürme işlemi, karbon-karbon bağı ile bağ kurulduğundan ve çok kararlı olduğundan büyük katalitik güç gerektirir (537).



Şekil 39. Metilsitozinin TET aracılı demetilasyonu (539)

TET proteinleri her iki O_2 atomunu kullanır. Çünkü 5-mC'den 5-hmC'ye oksidasyon, 2-oksoglutarat (2-OG) kosubstratın süksinat ve CO_2'ye eşzamanlı oksidasyonu ile ilerler (540,541). 5-hmC seviyesi, farklı memeli hücrelerinde büyük ölçüde değişir; embriyonik kök hücrelerdeki 5-mC seviyesi %5 ila %10'u arasında, purkinje nöronlarında 5-mC'nin oranı %40'a kadar değişir. Bununla birlikte, 5-fC ve 5-caC memeli hücrelerinde 5-hmC'den çok daha düşük seviyelerde bulunur (sırasıyla fare embriyonik kök hücrelerinde 5-mC seviyesinin %0.03'ü ve %0.01) (535,542).

Tet2'nin yapısı, CpG dinükleotidi dizisini spesifik olarak tanıdığını göstermektedir (543). TET ailesi enzimleri, hayvanlar aleminde evrimsel olarak korunmuştur. Çoğu hayvan, ~60 amino asitlik bir amino-terminal CXXC zinc finger domeyni ve bir karboksil-terminali, katalitik dioksijenaz domeyni ile karakterize edilen en az bir TET ortologu içerir (Şekil 40) (544). Tet2 gen ekspresyonunun mRNA ve protein seviyelerinde aşağı regülasyonu, önemli patolojik sonuçlara sahip olabilir. Tüm TET proteinleri bir dioksijenaz ailesine aittir ve C-terminal katalitik domeyni, içinde üç Fe(II) ve bir 2-oksoglutarat-bağlanma bölgelerini içerir (545). 5-hmC'nin promotör ve gen bölgesindeki zenginleşmesi, fare embriyonik kök hücrelerinde düşük ve yüksek gen ekspresyonu ile ilişkilidir. Askorbik asit gibi, hem olmayan Fe(II) dioksijenazlar, Tet1 ve Tet2'nin katalitik domeynleri ile etkileşime girerek aktivitelerini sağlar (541,546). MikroRNA(miRNA)'lar ayrıca TET'lerin protein ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.



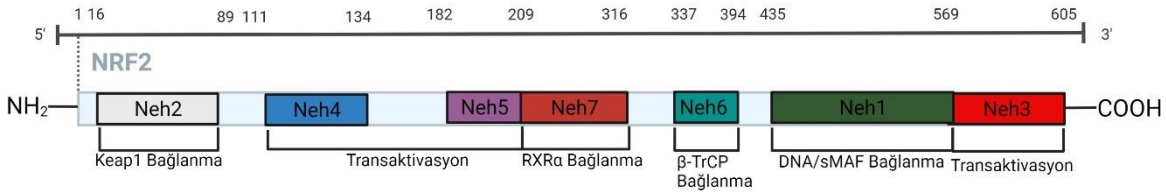
Şekil 40. TET'lerin domeyn yapısı

Aslında, miR-22'nin hematopoietik kök hücrelerin kendini yenilemesini ve dönüşümünü gerçekleştirmek için Tet2'nin tümör baskılayıcıyı hedeflediği ve lösemi ve meme kanserlerinde TET ailesine bağlı kromatin yeniden modellemesi yoluyla meme kanserini ve metastazını düzenlediği bildirildi (547,548). TET proteinlerinin seviyeleri, 30'dan fazla miRNA tarafından modüle edilebilir. Yapılan bir çalışmada, TET (özellikle Tet2) seviyeleri, normal hematopoezi bozan ve AML hastalarında aşırı eksprese edilen birkaç miRNA (miR-125b, miR-29b, miR-29c, miR-101 ve miR-7) tarafından ekspreyonları azaltıldı (549).

Nükleer Faktör Eritroid 2-ilişkili Faktör 2 Proteini

Nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2(Nrf2), antioksidan yanıt elemanı(ARE) ile ilişkili gen ekspresyonu ve immün yanıtın merkezi bir düzenleyicisidir. Nrf2, hücresel stres sinyallerini düzenleyen ve farklı transkripsiyonel programları yönlendirerek tepki veren bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf2, detoksifikasyonun rutin olarak meydana geldiği böbrek, karaciğer ve bağırsakta eksprese edilir. Nrf2, Keap1'e bağlı hücre iskeletinde bulunur. Nükleer faktör (eritroidden türetilen 2) benzeri 2(Nfe2l2) geni tarafından kodlanan Nrf2 (Şekil 41), bir lösin fermuar proteini ve bir polipeptittir. 66 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir ve yaygın olarak ekspre

olur (550,551). İnsan Nrf2 proteini, 605 amino aside ve Neh1'den Neh7'ye kadar yüksek düzeyde korunmuş yedi tane Nrf2-ECH homolojisi(Neh) domeynine sahiptir.



Şekil 41. Nrf2'nin domeyn yapısı

Neh1 alanı, küçük muskuloaponörotik fibrosarkom homolog proteinleri (MafF, MafG veya MafK) ve DNA bağlanması ve transkripsiyonel aktivasyon için heterodimerize edilmiş bir bazik lösin fermuar(bZIP) motifi içerir (552). N-terminalinin Neh2 düzenleyici alanı, Keap1 bağlanması için kritik olan ve Nrf2 bozulmasıyla sonuçlanan DLG ve ETGE motiflerini içerir (553). Neh3 domeyni, Nrf2'nin C-terminalinde yer alır ve VFLVPK motifini içerir ve CHD6 helikazına bağlanması için kritiktir (554). Nrf2'nin N-terminalinde, Neh4 ve Neh5 olmak üzere iki domeyn içerir ve her iki alanında Nrf2'nin maksimum tranaktivasyon etkinliği için gerekli olduğu bulunmuştur (555). Neh6 domeyni, serin açısından zengin rezidülerle gömülü bir DSG motifi içeren bir degron içerir. Bu bağlanma bölgesi, Cullin1-Rbx1 kompleksi tarafından Nrf2'nin ubikuitin ligazına aracılık eden adaptör protein β-TrCP için bir yerleşme bölgesidir (556). Retinoik asit reseptörü a(RARa) ile etkileşime giren ve çekirdekteki Nrf2 transkripsiyonel aktivitesini baskılayan Neh7 domeyninden oluşur (557).

Normal veya stressiz koşullarda sitoplazmada bulunan Nrf2, oksidatif stres durumunda çekirdeğe göç eder ve DNA'ya bağlanır. Nrf2 ekspresyonundaki mutasyonlar ve değişiklikler birçok kanser türünde tanımlanmıştır (558-563). Nrf2'nin yukarı regülasyonu, akciğer, deri, prostat, meme ve baş-boyun dahil olmak üzere birçok kanser türü ile bağlantılıdır (561,563-565). Nrf2'nin kanser hücrelerinde artan aktivitesi için birçok mekanizma rapor edilmiştir. Bunlardan bazıları, (1) Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1(Keap1), Cullin 3(CUL3) veya Nrf2'deki (566) somatik mutasyonlar, (2) Keap1'in epigenetik susturulması (567), (3) Nrf2 ve Keap1

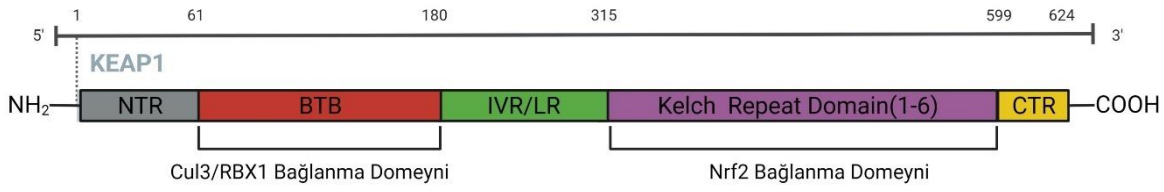
arasındaki etkileşimi bozan anormal protein birikimi (568), (4) onkogen bağımlı sinyalleşme yoluyla Nrf2'nin transkripsiyonel yukarı regülasyonu (569); ve (5) Keap1'in metabolik programlama ile modifikasyonudur (570).

Aslında, Nrf2 sadece normal hücrelerin değil, aynı zamanda kanser hücrelerinin de hayatta kalmasını sağlayabilir ve malign hücrelerde Nrf2 aktivasyonu (563,571), hastalığın gelişimini sürdürebildiği süreci destekler. Nrf2'nin kötü ya da iyi tarafının rolleri tartışmalara neden olmuştur. Çünkü, Nrf2'nin bir tümör baskılayıcı mı yoksa onkogen olarak mı hareket ettiği hala net değildir (563,564). Nrf2, bazal koşullarda proteazomal bozunma için Nrf2'yi hedefleyen düzenleyicisi Keap1'e bağlanarak transkripsiyonel olarak inaktive edilir. Nrf2, 30 dakikadan daha kısa olan bir yarı ömre sahiptir (572,573).

Kanser hücreleri, normal hücrelerden daha yüksek ROT seviyelerine sahiptir. Bununla birlikte, çoğalmalarını ve hayatta kalmalarını sağlayan belirli yolakların etkinleştirilmesiyle yüksek ROT seviyelerine uyum sağlayabilirler. Bu yollar, ROT'u azaltmak için antioksidanların aktivasyonunun yanı sıra daha fazla ROT üretebilen ve kanser hücrelerini gelecekteki strese karşı daha savunmasız hale getiren metabolik yeniden programlama yolaklarını içerir (574,575). Keap1-Nrf2 yolağı, hücrenin ksenobiyotiklere ve oksidatif strese karşı hayatta kalması ve savunmasında rol oynayan en önemli sinyal yollarından biridir.

Kelch Benzeri ECH ile İlişkili Protein 1

Kelch Benzeri ECH ile İlişkili Protein 1(Keap1), sistein rezidülerinde 20'den fazla serbest sülfhidril(-SH) grubuna sahiptir (Şekil 42).



Şekil 42. Keap1 domeyn yapısı

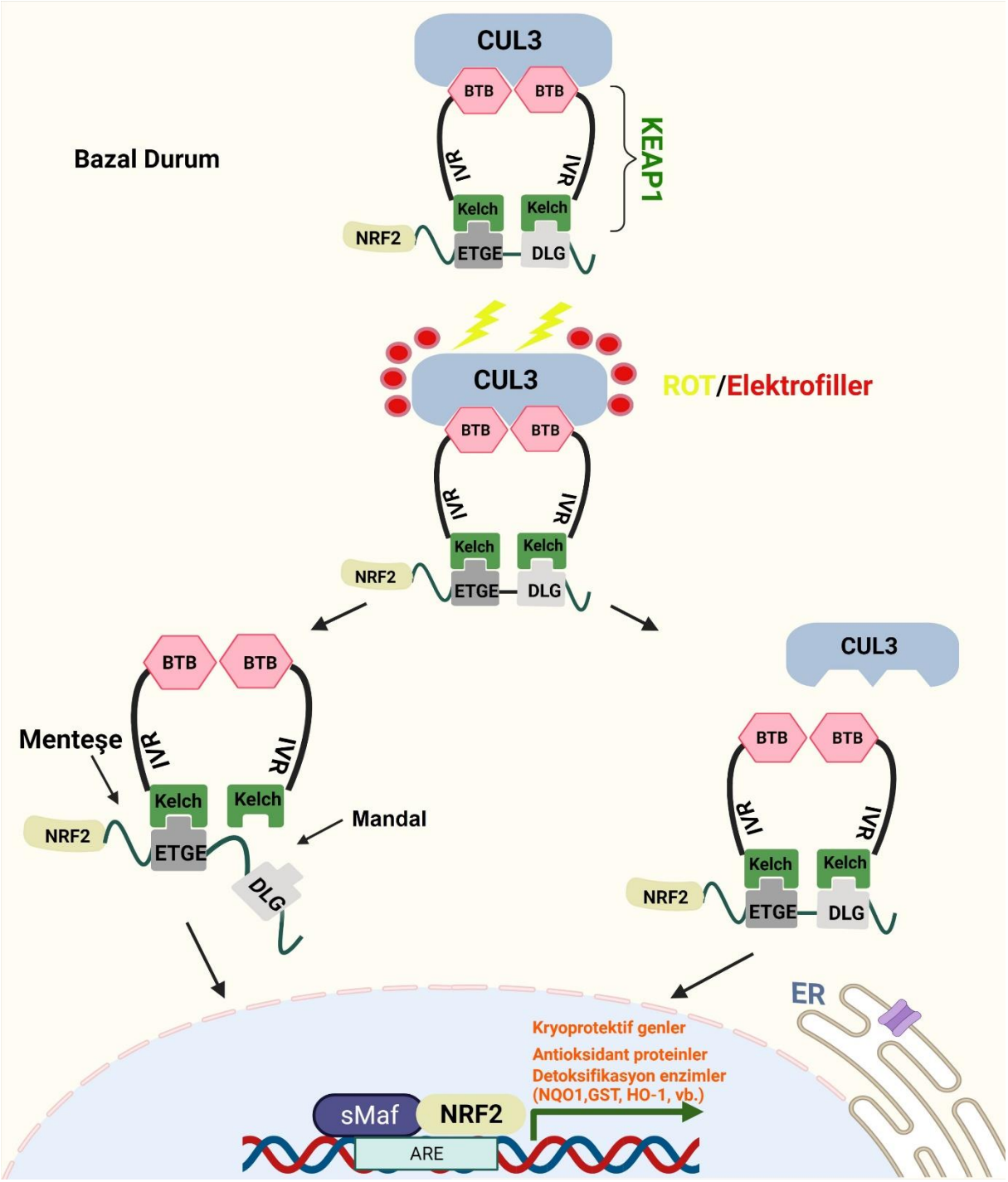
Stres esnasında bu oldukça reaktif moleküller, hassas sensörler gibi davranır. Reaktif sistein tiyolleri, fizyolojik pH altında (S-) olarak bulunur ve ROT/RNS'ye

sülfhidril gruplarından daha reaktiftir (576). Keap1, sistein rezidülerini değiştirerek oksidatif veya elektrofilik streslere yanıt verir (577,578). Keap1'in Kelch alanı, Nrf2'nin N-terminalinde bulunan iki farklı amino asit dizisi ETGE ve DLG ile etkileşime girer (579).

Farklı stres etkeni türlerine karşı, Keap1'deki sistein rezidüleri farklı tepki verir, bu da sistein rezidülerinin bir şekilde tek tek veya kombinasyon halinde Keap1'in aktivitesine katkıda bulunduğunu gösterir. Bu, Nrf2-Keap1 mekanizmasının basit bir "açma" veya "kapatma" düğmesi mekanizması olmadığını, bunun yerine çeşitli stres faktörleriyle farklı mekanizmalarla yanıt verebileceğini gösterir (580,581). Keap1, tüm amino asitlerinin %4.33'ünü oluşturan 27 sistein içerirken, insan proteinlerindeki ortalama sistein içeriği %2.26'dır (579). Keap1 sisteinlerinden sadece üçünün, Cys151, Cys273 ve Cys288'in Keap1-Nrf2 regülasyonu için fonksiyonel olarak önemli olduğu bulunmuştur (582). Cys273 ve Cys288, Nrf2 aktivatörleri'nin bir alt kümesi olan Cys151'i hedefler, ancak bunlar Keap1'in bazal koşullar altında Nrf2'yi inhibe etmesi için esastır. Oksidatif stres altında ROT, Cys151, Cys273 ve Cys288 dahil olmak üzere Keap1'in sistein rezidüleri ile reaksiyona girerek Nrf2'nin Keap1 aracılı bozulmadan kaçmasına izin verir (583). Normal koşullar altında Keap1, Neh2 domeynindeki DLG/ETGE motiflerine bağlanarak ve Nrf2'nin ubikuitinasyon ve proteazomal degradasyonu indükleyerek Nrf2 aktivitesini sınırlamada önemli bir rol oynar (584).

Bir dizi kritik gözleme dayalı olarak, "Menteşe Mandal modeli" Keap1-Nrf2 etkileşimli iki bölgeli bağlanma modeli önerildi (585). ETGE motifi, Kelch-repeat domeyni için DLG motifinden daha yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu nedenle, Keap1, DLG motifine bitişik olan boş Kelch-repeat domeynlerine eklenmeden önce ETGE motifi aracılığıyla Nrf2'yi yakalar; buna 'menteşe ve mandal' mekanizması denir (580,586). DLG ve ETGE'nin Keap1'e bağlanma modları oldukça farklıdır (587). Keap1-DLG bağlanması, termodinamik olarak hem entalpi hem de entropi tarafından yönlendirilen, kinetik olarak bir "hızlı-açma ve kapama" olarak karakterize edilebilir. Buna karşılık, ETGE-Keap1 bağlanması, tamamen entalpi rehberliği ile karakterize edilir ve daha kararlı konformasyona yol açan iki durumlu bir reaksiyon içerir (588,589). Bu bulgular, DLG motifinin, çevresel stresi bir mandal olarak Nrf2 indüksiyonuna ileten bir dönüştürücü görevi gördüğü iddiasını desteklemektedir (590). Bazal koşul altında, iki Keap1 molekülü ve bir Nrf2 molekülü, bir trimer yapısı

oluşturur ve Nrf2, Keap1-Cul3 E3 ubikuitin ligazları tarafından poli-ubikuitinleştirilir ve daha sonra 26S proteazomu tarafından bozulur (591). İndüklenme koşulları altında, indükleyiciler (ROT/Elektrofiller), Keap1 sistein tiyollerini değiştirir ve Nrf2 ubikuitinasyonunu inhibe ederek Nrf2 aktivasyonuna ve indüksiyonuna neden olur (Şekil 43) (592-594).



Şekil 43. Nrf2-Keap1 menteşe ve mandal modeli

Nrf2'nin Keap1'e bağlanması, "sistein kodu" olarak bilinen, Keap1'in sistein rezidülerinin modifikasyonları ile bozulur (595-597). Bu modifikasyonlar, Nrf2'nin degradasyondan kaçmasına ve Nrf2 yukarı regülasyonuna yol açmasını sağlayan konformasyonel değişikliklere yol açar. DLG(mandal) motifi ile düşük afiniteli etkileşimin Keap1'e bağlanmasının kaybolması ve onun yerine yüksek afiniteli ETGE(menteşe) motifi ile bağlanmasının yolu açılır (558,595). Şekil 43'de belirtildiği gibi gösterilen her iki modelde de Nrf2 çekirdeğe doğru yer değiştirir, ARE'ye bağlanır ve NQO1, HO-1 ve GST gibi genlerin ekspresyonunu artırır (598,599).

Hem Oksijenaz 1 Enzimi

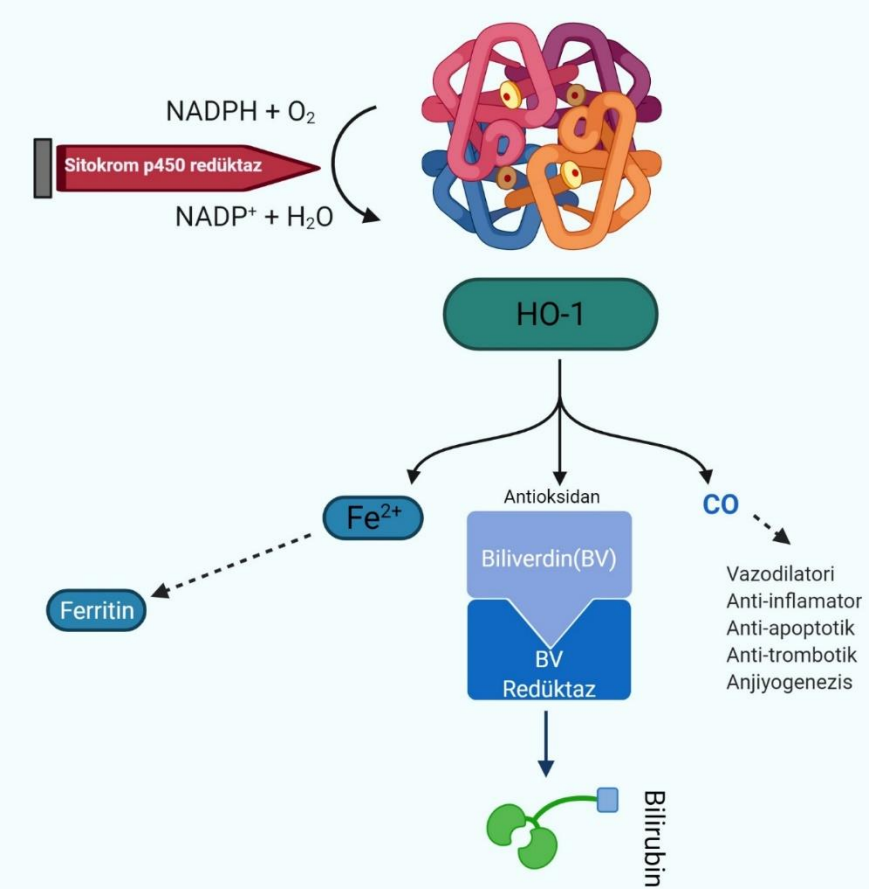
Hem oksijenaz(HO), etkileşim halinde olan çoklu metabolik sistemlerin merkezinde hızla yerini almaktadır. Sadece 25 yıl önce hem oksijenaz ve onun metabolik ürünleri sadece basit bir metabolik sistemin bir parçası olarak görünüyordu. Hem oksijenaz-1(HO-1), oksidatif stres, hücresel hasar ve hastalıklar gibi elektrofilik uyaranlara yanıt veren bir faz II enzimdir (600). Hem oksijenaz hem'in oksidatif katabolizmasındaki hız-sınırlayıcı adımını katalize eder. Hücre içi şelatlanabilir demir seviyeleri ayrıca prooksidatif veya hipoksik durumlarda HO-1 gen ekspresyonunu etkiler (601). HO-1'in, kemoterapötik ajanlar tarafından artırılmış oksidatif stres saldırısını yenmek için tümör hücrelerinde sitoprotektif bir rol oynadığı ve böylece kanser hücrelerinin apoptoz ve otofajiden korunmasını sağladığı yaygın olarak kabul edilmiştir ve hatta hücre proliferasyonunu ve metastazı teşvik eder (602,603). Hem oksijenaz (HO-1)'in hem'i biliverdin/bilirubin, karbon monoksit ve ferrüs demire metabolize ettiği bilinmektedir ve stresle ilgili çeşitli koşullara karşı hücre koruyucu etkiler gösterdiği öne sürülmüştür (604). Bu metabolitler özellikle nöronal hasar ve dejenerasyonda zararlı etkileride olduğu gösterilmiştir. Hem biliverdin hem de bilirubin, proteinlerle ROT'u süpürerek ve lipid peroksidasyonunu inhibe edebilir. Biliverdin ve bilirubinin bir başka koruyucu etkiside apoptotik sürece müdahale etmesidir.

HO-1 yaygın olarak bir hayatta kalma molekülü olarak kabul edilmesine rağmen, kanserin ilerlemesinde önemli bir rol oynar ve inhibisyonunun bazı kanserlerde faydalı olduğu düşünülür (605). Bununla birlikte, artan çalışmalar, HO-1'in ferroptoz indüksiyonunda kritik bir aracı olarak görev yaptığı ve çeşitli

hastalıkların ilerlemesi için etken bir faktör olarak rol aldığı için HO-1'in karanlık bir tarafını göstermiştir (606,607).

Ferroptoz, aşırı serbest hücresel demir birikimi ve şiddetli lipid peroksidasyonu ile karakterize, yeni tanımlanmış programlanmamış bir hücre ölümüdür (608). Hem yıkım yolağının son ürünü olan Bilirubin(BR), önemli bir endojen antioksidandır ve oksidatif strese karşı korumada çok önemli bir rol oynar. Hem, hem oksijenaz (HO) tarafından parçalanır, bu da biliverdin, karbon monoksit ve ferrüs demir oluşumuna yol açar. Biliverdin daha sonra biliverdin redüktaz tarafından bilirubine dönüştürülür.

Çoğu durumda, biliverdin ve bilirubin, reaktif oksijen türlerini (ROT) temizleyerek veya nötralize ederek antioksidan görevi görür (609). Gaz halinde bir ürün olan karbon monoksit, esas olarak kan damarlarının vazodilatasyonu, anti-inflamatuvar sitokinlerin üretimi, anti-apoptotik efektörlerin yukarı regülasyonu ve tromboz dahil olmak üzere sinyal iletiminde işlev görür (610,611). Ferrüslü demir, hem'in tüm metabolitlerinde ana pro-oksidandır. Bununla birlikte, hem oksijenaz-1 (HO-1) aktivasyonu, ferrüs demire bağlanabilen ve pro-oksidan etkisini detoksifiye edebilen ferritin ekspresyonunuda arttırır (Şekil 44) (612,613).



Şekil 44. HO-1 aktivitesi

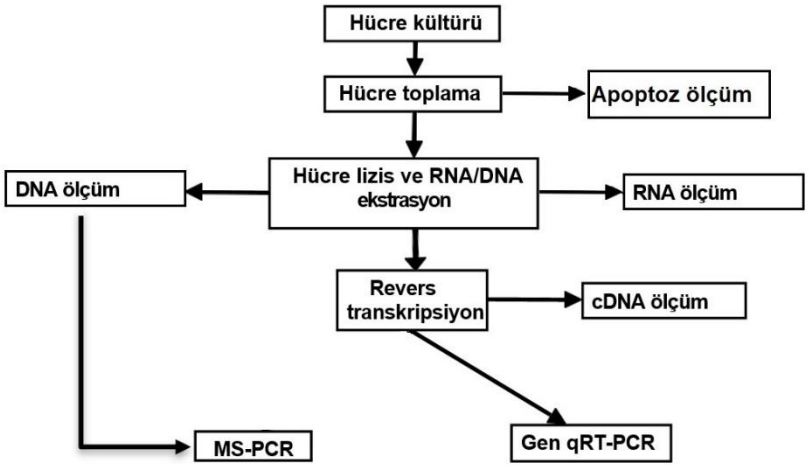
HO-1'in yukarı regülasyonu, hem yıkımını, ferritin sentezini artırabilir ve hücre içi demir dağılımını değiştirebilir (614). HO-1, hipoksi, hidrojen peroksit, ağır metaller, hem ve hücresel glutatyon tükenmesi gibi birçok faktör tarafından indüklenir (615-618). HO-1 ekspresyonunun bu faktörler tarafından düzenlenmesi sadece hücre tipine değil aynı zamanda türüne de bağlıdır. Örneğin hipoksi, kemirgen, sığır ve maymun hücrelerinde HO-1 ekspresyonunu indükler, ancak akciğer kanseri A549 hücreleri, göbek damarı endotel hücreleri ve glioblastoma hücreleri dahil olmak üzere birçok insan hücre hattında HO-1 ekspresyonunu baskılar ve bu faktörler sadece hücre tipine değil, aynı zamanda türünede bağlıdır (618-622). Ferrüslü demir, ROT üretmek için hücre oksidanları ile etkileşime girme yeteneği nedeniyle toksiktir (623).

HO-1 aktivitesi BR seviyelerini modüle eder (624,625). Pek çok çalışmada, HO-1'in, demir birikiminin aracılık ettiği ve artan lipid peroksidasyonu ve glutatyon tükenmesinin eşlik ettiği, ROT üretiminde meydana gelen bir artış yoluyla ferroptozu indüklediğini gösterdi (626,627). Aşırı lipid peroksidasyonu, hücresel membran akışkanlığını, geçirgenliğini ve hücresel bütünlüğü bozar ve sonunda hücre ölümüne yol açar (628). Ferroptotik hücreler, morfolojik olarak küçük mitokondriler, çökmüş mitokondriyal krista ve artan mitokondriyal membran yoğunluğu ile karakterize edilir (629). HO-1 modifiye edilmiş fareler ve HO-1 inhibitörü çinko protoporfirin IX'un kullanılmasıyla, HO-1'in erastin kaynaklı ferroptozu desteklediğini ve bunun biliverdin ve bilirubin ile yolağı ile yapmadığı gösterildi (607). HO-1'in genetik olarak modifiye edilmiş ve farmakolojik inhibisyonu, HO-1 aktivasyonunun aşırı demir yüklemesi ve ardından aşırı ROT üretimi ve lipid peroksidasyonu yoluyla ferroptozu tetiklediğini doğruladı. HO-1'in ferroptoz düzenlemesindeki ikili rolü, farklı patolojik koşullara bağlı olabilir. Bu proteinin kesin mekanizması daha fazla araştırılmalıdır. Demir bağımlı ve ROT destekli ferroptozis 2012'de yeniden tanımlanmış olmasına rağmen, HO-1 düzenlemesinin altında yatan mekanizmaların büyük bir kısmı, özellikle kanserlerde kemoterapi uygulamaları ile ilgili olarak, anlaşılması güç olmaya devam etmektedir (630).

GEREÇ ve YÖNTEMLER

LAMİNAR AKIM KABİNİ ve DİĞER EKİPMANLARIN HAZIRLANMASI

HepG2 hücrelerinin ekim, pasajlama işlemleri steril laminar akım kabini (Biobase Laminar Flow) içerisinde gerçekleştirildi. Tüm işlemlerin öncesinde laminar akım'ın (Biobase) kültür kaplarının yüzeyleri ile temas edecek çalışma alanı, 15 dakika boyunca ultraviyole(UV) ışığa maruz bırakılmak suretiyle sterilize edildi. Hücrelerin ekim işlemine geçmeden önce laminar flowun çalışma yüzeyi, inverted mikroskobun (Motic AE31) tablası ve diğer tek kullanımlık olmayan malzemeler %70'lik etil alkol ile dezenfekte edildi. HepG2 hücreleri -196ºC sıcaklıkta sıvı nitrojen tankı içerisinde bulunan 2 ml'lik kryo tüplerde (Greiner Bio-One GmbH, Almanya) muhafaza edilmiştir (609,631,632). Çalışama da izlenecek adımlar diyagram üzerinde gösterilmiştir (Şekil 45).



Şekil 45. Hücre kültürü, ekstraksiyon, RT ve PCR adımları şeması

Laboratuvar ekipmanları: Çoğu hücre hattı, aşağıdakileri sağlayan rutin bir hücre kültürü laboratuvarı kullanılarak büyütülebilir:

1) İnverted ve faz kontrastlı mikroskop.
2) Sınıf II laminer flow kabin.
3) İnkübatör (37°C ve %5 CO_2).
4) Çalkalamalı su banyosu ve çalkalamalı inkübatör.
5) Kişisel bilgisayar.
6) Ayarlanabilir otomatik pipetler (0-200 µl ve 200-1000 µl).
7) Otomatik pipet pompası.
8) Buzdolabı (2-8°C).
9) Beckman Coulter Vi-CELL (Beckman, High Wycombe, Birleşik Krallık).
10) Çeşitli dondurucular: -20°C ve -80°C.
11) Kapaklı 96 kuyulu steril polipropilen plakalar veya plateler.
12) Kriyojenik depolama raflarıyla donatılmış sıvı nitrojen (-196°C) içinde hücreleri depolamak için Dewar kabı.
13) Santrifüj (minimum: 400×g).
14) Plate çalkalayıcı (IKA schüttler MST4, Janke & Kunkel, Staufen, Almanya).
15) Buzdolabı (+4°C).
16) Vorteks.

Laboratuvar materyalleri: Hücre kültüründe normalde, çeşitli cam ve plastik malzemeler dahil olmak üzere aşağıdaki steril laboratuvar malzemeleri gerektirir:

1) Steril makas ve cımbız.
2) Tek kullanımlık neşterler (no. 11).
3) Tek kullanımlık kanüller (G16-G21).
4) Tek kullanımlık şırıngalar (1, 2, 5 ve 10 ml) (BD Biosciences).
5) Tek kullanımlık serolojik pipetler (1, 5, 20 ve 25 ml).
6) Otoklavlanabilir pastör pipetleri.
7) Otomatik pipetlerle kullanılmak üzere çeşitli boyutlarda pipet uçları.
8) Steril konik santrifüj tüpleri (15 ml, 50 ml) (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).
9) Geçme kapaklı mikrosantrifüj tüpleri (1.7 ml).
10) Yuvarlak tabanlı polipropilen kriyojenik tüpler (2 ml).
11) Çeşitli çaplarda steril polisteren petri kapları.

12) Filtre kapaklı (25 ml ve 75 ml) polisteren açılı boyunlu kültür flaskları.
13) Tek kullanımlık selüloz asetat filtreler (0.2 µm).
14) 70 µm ağ filtreli gazlı bez.
15) Çeşitli boyutlarda otoklavlanabilir cam tüpler, filtreler ve erlenmeyer flasklar.
16) Neubauer Hemositometresi ve tripan mavisi solüsyonu.
17) Disposable sayaç kapları (Beckman, High Wycombe, İngiltere).
18) Nitril eldiven.
19) Hücre kültürü medyumu ve tripsin/EDTA solüsyonu (%0.25 tripsin (Gibco); %0.01 EDTA (Sigma)).
20) Hücre kültürü flaskları/plakaları (Costar veya NEST).
21) Fosfat tamponlu salin(PBS) (Oxoid).
22) Oda sıcaklığında saklanacak Hank'in balans tuz çözeltisi(HBSS).
23) 2-8°C'de saklanacak Dulbecco'nun fosfat tamponlu salin (PBS) (Biochrom).
24) Fetal sığır serumu (FBS), -20°C. Fetal bovin serum: 45 dakika boyunca 56°C'lik bir su banyosunda kullanımdan önce FBS'deki toksik bileşenler inaktive edilir; maksimum 50 ml'lik plastik tüplerde -20 ila -30°C'de saklanır (Autogen Bioclear).
25) L-Glutamin solüsyonu (200 mM), -20°C'de saklanır.
26) Bovin insülin çözeltisi (25 mM HEPES içinde 10 mg/ml), 2-8°C'de saklanır.
27) Penisilin-Streptomisin (100x konsantrasyon); 10.000 IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin, -20°C.
28) Dimetil sülfoksit(DMSO), oda sıcaklığında saklanır.

HÜCRELERİN ÇÖZDÜRÜLMESİ

Bu hücre hattının seçilmesi ilk başta kanserli bir hücre hattı olması ve kanser hücresi gen regülasyonu çalışıldığı için, HepG2 hücre hattı seçilmiştir. Hazırlanan medyumdan tek kullanımlık steril pipetler yardımıyla 250 ml'lik hacme sahip olan T75 flask (Cell Star, Greiner Bio-One GmbH, Almanya) paketi laminar flow içerisinde açılıp kapakları açılmadan hazır bir şekilde bekletildi. Bunun yanı sıra 15 ml'lik bir falkon tüp içerisine taze medyumdan 9 ml aktarıldı. HepG2 hücrelerini ihtiva eden kryo tüp sıvı nitrojen tankı içerisinden alınarak sıcaklığı 37ºC'ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosunda (Termal Laboratuvar Aletleri, Türkiye) yarı sıvı yarı buz

haline gelinceye kadar ısıtıldı. Kryo tüp iç çeperi eriyince ısıtma işlemi sonlandırılarak ve tüpün etrafı %70'lik etil alkol ile silinerek laminar flow içerisine yerleştirildi.

Henüz yarı buz-yarı sıvı haldeyken kryo tüp içerisindeki sıvının tamamı daha önceden hazırlanan içerisinde 9 ml medyum bulunan 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Falkon tüp 800 rpm'de 5 dakika süreyle ve 20-23 ºC sıcaklıkta santrifüj (Beckman Coulter) edildi. Süpernatant hassas bir şekilde uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücreler üzerine 10 ml taze medyum eklendi. 20-25 kez hassas bir şekilde resüspensa edip hücrelerin homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Pipetaj işlemi bittikten sonra bu falkon tüp içerisindeki hücre-medyum süspansiyonu daha önceden hazırladığımız boş flasklara aktarıldı. Böylece hücrelerin çözme ve ekim işlemleri tamamlanmış olur. Bu flasklar daha sonra steril inkübatöre alınarak burada 24-48 saat inkübe (37ºC ve %5 CO_2) edildi (633,634).

Hücrelerin Çoğaltımı ve Grupların Oluşturulması

HepG2 (ATCC, ABD) hücrelerinin ekim ve pasajlanmasında ATCC'nin önerdiği şekilde medyumun (EMEM, Sigma Aldrich, ABD) belirtilen oranlarında karıştırıldı. HepG2 hücre hattı besi ortamı; %89 Medyum (EMEM), % 10 Fetal Bovine Serum (Autogen, Bioclear) ve %1'i Penisilin-Streptomisin (Sigma Aldrich, ABD) antibiyotik kombinasyonu olacak şekilde modifiye edildi. Hazırlanan bu karışım bundan sonraki bölümlerde sadece 'medyum' olarak kullanılacaktır (635). Hücreler T25 flasklara (Cell Star, Greiner Bio-One GmbH, Almanya) pasajlandı. Paketleri laminar flow içerisinde açılan flasklar kapakları açılmadan hazır bir şekilde bekletildi. T75 flasklarda 24-48 saat inkübe edilen hücrelerin üreme yoğunlukları (konfluens) inverted mikroskop yardımıyla tespit edilerek en az %80 konfluente sahip olan flasklar çalışmaya dâhil edildi. Ayrıca mikroskopta kontaminasyon olup olmadığı da değerlendirildikten sonra çalışmaya uygun flasklar laminar flow'a alındı. HepG2 hücreleri bulundukları kültür kaplarının zeminine tutunma özelliği göstermektedir. Deneysel çalışmaların yapılabilmesi için flask zemininden kaldırılmaları gerekmektedir. Hücrelerin büyütme medyumu atık toplama şişesine boşaltıldı. Her flaskın üzerine yaklaşık 2,5 ml 1X Phosphate Buffered Saline (PBS, Biochrom, Almanya) koyularak yavaş hareketlerle hücreler nazikçe yıkanıp flask içerisindeki PBS pipet yardımıyla hücrelerin bulunduğu flasktan uzaklaştırıldı. Böylelikle ölü hücre artıkları ve ekstraselüler ortamda bulunan toksik metabolitler ortamdan uzaklaştırılmış olundu. Hücrelerin üzerine %0,25'lik Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich,

ABD) çözeltisinden flask zeminini kaplayacak miktarda (yaklaşık olarak 1-2 ml) koyuldu. Hücrelerin inverted mikroskop ile tutundukları yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları mikroskop ile hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları tespit edilince flasklar laminar flow'a alınıp ve üzerlerine 8-9 ml taze medyum eklendi. Çok hassas bir şekilde 10-15 kez pipetaj işlemi uygulandı. Pipetaj işlemi bitince hücreler steril boş bir 15 ml'lik falkon tüpe alınıp 5 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantları atık toplama şişesine döküldü. Böylece hücreler %0,25'lik Tripsin-EDTA'dan arındırılmış oldular. Falkon tüpün dip kısmında biriken ve HepG2 hücre toplulukları üzerine yaklaşık 5 ml medyum eklenip ve tek kullanımlık steril bir pipetle hassas bir şekilde pipetaj işlemi yapıldı. Daha önceden hazırlanan ve içerisine 4'er ml medyum aktarılan T25 flasklara falkon tüpünde bulunan ve HepG2 hücre topluluğu medyum karışımından 1 ml alınarak her bir flaska eklendi. Flaskların kapağı kapatıldıktan sonra bulunduğu zemin üzerinde öne-arkaya ve sağa-sola doğru çok yavaş hareket ettirilerek hücrelerin flask içerisindeki medyumda homojen bir biçimde yayılması sağlandı. Böylece pasajlama işlemi tamamlanan hücreler bölündükten sonra inverted mikroskopta son kez kontrol edilerek tekrar inkübatöre alınıp ve 24-48 saat boyunca inkübe (37 ºC ve %5 CO_2) edildi. Süre sonunda hücrelerin %80 den fazla konfluente ulaşması durumunda; 'Hücrelerin Pasajlanması' altındaki adımlar takip edilerek yeniden pasajlama işlemi yapıldı. Pasajlama işlemi yaklaşık her 24-48 saate bir tekrarlanacaktır (631,636). Bütün çalışmalar 8. pasajdaki hücrelerde yapıldı.

1) Sınıf II flow kabinde, yeni bir 500 ml'lik EMEM şişesine 5 ml penisilin-streptomisin (10.000 IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin) eklendi. Şişeyi/şişeleri reaktifin adını, üreticinin adını ve adresini, hazırlama tarihini, lot numarasını ve son kullanma tarihini gösteren basılı etiketlerle etiketleyin.
2) Hücreler, flask başına $1x10^5$/ml hücre olacak şekilde on iki adet 25'lik flaska ekildi ve gece boyunca 37°C'de inkübatörde bağlanmaya bırakıldı.
3) Flasklar daha sonra kontrol flasklarındaki hücreler yaklaşık %80 konfluente ulaşana kadar 2-3 gün süreyle inkübe edildi. Bu noktada, medyum flasklardan çıkarıldı ve hücreler tripsinizasyona tabi tutuldu ve iki kopya halinde sayıldı.
4) Medyum atıldı ve hücreleri, flask yüzeyini eşit şekilde kaplayacak şekilde 1 ml tripsin ile yıkandı.

5) Aspire edildi ve 0,5 ml daha tripsin eklendi, flaskı 2-3 dakika veya flaska hafif vurarak yüzeyden ayrılmaya başlayana kadar bir inkübatöre yerleştirildi.
6) Tripsini nötralize etmek ve hücreleri flask yüzeyinden yıkamak için flaska 3-4 ml medyum eklendi. Hücre süspansiyonunu 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 200xg'de santrifüj edildi.
7) Hücre peletini bozmamaya dikkat ederek medyumu tüpten aspire edildi ve 5 ml PBS eklendi. Hücreleri tekrar süspanse hale getirmek için hafifçe karıştırıldı ve ardından 5 dakika boyunca 200xg'de santrifüj edildi (tek tekrar).

Hücre sayımı: Vi-CELL, hücre geçirimsiz boya olan tripan mavisine maruz kalmış canlı ve ölü hücrelerin görüntülerini belirleyerek ve saymak için algoritmalar kullanır. Yaklaşık 400 µl hücre süspansiyonunu tek bir sayım tüpüne koyuldu. Tüpü Vi-CELL karoseline yerleştirildi. Karosel konumunu ve seyreltme aralığını seçerek numuneyi sayım için Vi-CELL'e kaydedin. Her hücre hattı için ayarlar, farklı hücre hatları arasındaki farklılıkları yansıtacak şekilde dikkatlice seçilmelidir (örneğin; boyut aralığı ve yoğunluk gibi). Makinenin canlı ve ölü hücreleri doğru bir şekilde ayırt edip etmediğini ve elde edilen hücre sayısı önerilen aralıkta değilse işlemi alternatif bir seyreltme ile tekrarlayın.

Hücrelerin plakalara yüklenmesi

1) Hücre kültürü medyumunda $1x10^5$hücre/ml içeren hücre süspansiyonları hazırlandı.
2) Çok kanallı bir pipet yardımıyla, bu hücre süspansiyonlarından 180 µl/kuyu 96 kuyucuklu plakalara yüklendi.
3) Hücreler daha sonra gece boyunca 37°C'de ve %5 CO_2'de inkübe edildi.
4) Hücreler belirlenen inkübasyon süreleri boyunca 37°C'de ve %5 CO_2'de inkübe edildi.
5) Medyum kuyulardan aspire edilir ve 100 µl PBS ile 3 defa iyice yıkandı.

HepG2 kanser hücrelerin kültürleri, yetiştirilmesi ve fotoduyarlı madde uygulamaları

1) Biyogüvenlik kabini içinde steril teknikler kullanılarak 96 kuyucuklu(her koşul için altı tekrar) ve bir plakanın her oyuğuna 180 µl kültür ortamı içinde

20.000 hücre ekildi ve hücrelerin gece boyunca yapışmasına izin verilir. 18-24 saat CO_2 inkübatöründe herhangi bir fotoduyarlı ajan(fd) olmadan inkübe edildi ve hücrelerin plate yapışması sağlandı. Farklı zaman periyotlarında (zamana bağlı alım) için sabit fd'lerin(uygulanacak maddelerin hepsi yüksek saflıkta) konsantrasyonu ile veya sabit bir zaman periyodu (doza bağlı alım) artan fd'lerin konsantrasyonları ile inkübe edildi.

2) İlaç dilüsyonları, hücre kültürü medyumdaki son konsantrasyonlarının 2 katı olacak şekilde hazırlandı ve daha sonra çok kanallı bir pipet kullanılarak her bir kuyuya 20 µl ilave edildi.
3) Ekilen hücre sayısı her hücre deney için ayarlandı. Deney sırasında% 70-80 bir konfluente idealdir. Fd'lerin konsantrasyonlarının her biri için karşılık gelen karanlık toksisite kontrolünü eklemeyi unutmayın. Bunlar, seçilen fd'lerin konsantrasyonlarının yokluğunda veya varlığında inkübe edilen, ancak ışımaya maruz kalmayacak hücrelerdir.
4) Fotoduyarlı ajanlardan ALA, DEPC-H_2O çözülürken Zn ve Si Pc ajanları ise DMSO çözdürüldü ve deneyde kullanılmadan önce agrege olmamasına özen gösterildi. DMSO ve su çözelti olarak kullanıldı ve DMSO'nun konsantrasyonu çözücü olarak %0.05 altında kalacak şekilde ayarlandı. yaklaşık (0.1-0.2 ml) 0.1 M NaOH, ile seyreltin 1 ml'lik bir hacimde fosfat tamponlu salin (PBS) ve 0,22 mm'lik filtre ile filtrasyon ile sterilize edildi, ve -20°C'de 6 aya kadar halinde saklanabilir.
5) Fotoduyarlı ajanların çalışma solüsyonları çalışmadan önce hazırlanarak ve taze olması sağlandı.
6) 1 ml'lik hücre kültür ortamında belirtilen konsantrasyonlara denk gelecek şekilde stok solüsyonlar hazırlandı. Burada stok solüsyonların oranı hücre kültür ortamına göre en fazla %0.05 olabilir. Burada uygulanacak dozların serumsuz(FBS'siz) medyumlarla uygulanması esastır.
7) Belirli zamanlarda (0, 24 ve 48 saat) ve belirtilen fd'lerin konsantrasyonlar için hücreler inkübe edildi. **Not:** Bu çalışmada, hem HepG2 hücre hatları, aşağıda belirtilen süre ve dozlarda fd'ler ile inkübe edildi. Uygulanan zaman periyotları ve dozlar kullanılan hücre hattına bağlı olarak değişebilir. Hücrelerin doğrudan ışığa maruz kalmasını önlemek için daima karanlık ortam koşullarında çalışmayı unutmayın.

8) Fd'leri ekleyin (20 µl) hücrelere ve belirtilen sürelerde ve dozlarda maruz bırakıldı. Hücre konsantrasyonlarına bağlı olarak hücreleri aşağıda tabloda verilen farklı konsantrasyonlarda fd'ler ile inkübe edildi ve belirtilen saatler boyunca karanlıkta tutuldu.
9) %50 hücre ölümüne neden olan ilacın konsantrasyonu (ilacın IC50'si), sitotoksik ilaç konsantrasyonuna karşı hayatta kalma yüzdesinin (kontrol hücrelerine göre) program aracılığıyla(Graphpad v8) belirlendi (Tablo 2).
10) Fotoduyarlı ajan içermeyen hücre medyumu ile örnekleri üç kez yıkandı. Ardından fotoduyarlı biyomalzeme içermeyen hücre medyumunda 37°C'de 30 dk boyunca bekletildi. Bütün testler belirlenen süre dozları (0, 24 ve 48 saat inkübasyon maddelerle) uygulandıktan sonra, ışıma dozlarına maruz bırakıldı. Işımaların hepsi, belirtilen inkübasyon sürelerinden sonra, ışıma dozuna maruz bırakıldı. Her uygulama için ve uygulanan dozlarda tüm testler 1 saat sonrasında yapıldı. MTT testi, inkübasyon süreleri, madde konsantrasyonları ve ışıma dozlarının hepsi için yapıldı. 600 mW/cm^2 ışıma dozu ve 100 sn'lik ışıma süresi, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda IC50 konsantrasyonlarına bağlı olarak ise apoptoz ve genetik testler yapıldı.
11) Fd'lerin absorpsiyon spektrumuna uygun filtreli MAX-303(385-740 nm Asahi-Spectra, Japonya) ksenon ışık kaynağı ile hücreler maruz bırakıldı. Tablo 3'de belirtilen enerji dozu elde etmek için, hücrelerden 30 cm mesafe yükseklikte ışık kaynağının gücü power metre(TOPCON IM-1000, Japonya) aracılığıyla ölçüldü ve istenilen ışıma dozunda ışık kaynağından otomatik zamanlayıcı programlanarak kendini kapatması sağlandı. Karanlık toksisite için olan kontrol hücrelerini (fd'li veya fd'siz) aydınlatılmadı.
12) Yukarıdaki Asahi-Spectra MAX-303 (Japonya) ksenon ışık kaynağının altında olacak şekilde plastik difüzör tabakasının üstüne hücre kültür plakalarını ilgili ışımaya maruz kalacak şekilde (30 cm) yerleştirildi. Lambanın enerji akış oranı TOPCON IM-1000 powermetre aracılıyla ölçülerek yukarıda belirtilen ışıma dozlarının (mW/cm^2) süresi güç ile enerji arasındaki formülasyondan (ışık dozu (J/cm^2), enerji oranının ışıma zamanı ile çarpılmasıyla hesaplanır) hesaplanarak ışık kaynağının ışımayı durdurması (100 sn, 200 sn ve 300 sn) gereken süre ayarlandı (Tablo 2).

13) Örnekler uygun bir ışık kaynağı ile aşağıda belirtilen farklı ışık dozlarına maruz bırakıldı.
14) Işıma maruziyetten 0, 24 ve 48 saat sonrasında sitotoksisitesi için MTT canlılık testi yapıldı ve IC50 dozlarını belirlendi (Tablo 3).
15) MTT testi dışındaki gen ekspresyonu ve apoptoz analizleri için, IC50 dozlarında ölçümler yapıldı.

Tablo 2. Kullanılan gruplar

Gruplar	Hücre Hattı + FD
Grup 1	HepG2 (Kontrol)
Grup 2	HepG2+Işık
Grup 3	HepG2+ALA
Grup 4	HepG2+Işık+ALA
Grup 5	HepG2 +Zn
Grup 6	HepG2+Işık+Zn
Grup 7	HepG2 +Si
Grup 8	HepG2+Işık+Si

- Birinci olarak 0 saat inkübasyon akut uygulama aşağıda, belirtilen hem ışıma hem de madde dozlarına uygulandı ve 1 saat sonra MTT testleri yapıldı.
- İkinci olarak 24 saat madde inkübasyonundan sonra aşağıdaki ışıma dozları uygulandı ve 1 saat sonra MTT testleri yapıldı.
- Üçüncü olarak madde uygulaması 48 saat inkübasyon ve sonrasında ışıma uygulandıktan sonra 1 saat sonra MTT ve diğer testler yapıldı.

Tablo 3. Uygulanacak madde konsantrasyonları[*,t]

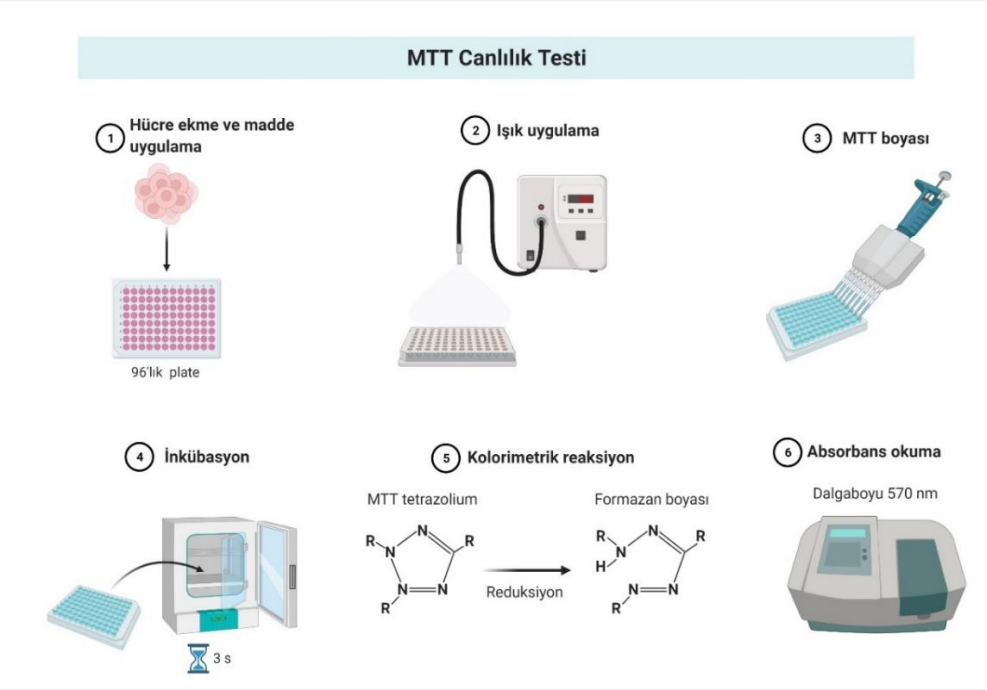
Zn fd	ALA	Si fd
45 µM	50 mM	45 µM
22,5 µM	25 mM	22,5 µM
11,25 µM	12,5 mM	11,25 µM
5,625 µM	6,25 mM	5,625 µM
2,81 µM	3,12 mM	2,81 µM
1,41 µM	1,56 mM	1,41 µM
0,70 µM	0,78 mM	0,70 µM

0,35 µM	0,39 mM	0,35 µM
0,17 µM	0,195 mM	0,17 µM
0,088 µM	0,0975 mM	0,088 µM

*600 mW/cm^2 ve ^{t}ışıma süreleri(100 sn, 200 sn ve 300 sn)

Hücre Canlılık Testi (MTT Testi)

MTT testi mitokondriyal fonksiyonu ölçer ve çoğunlukla bir ilaç veya toksin nedeniyle hücre hayatta kalma/hücre canlılığı kaybını tespit etmek için kullanılır (637). Hücre sağ kalımını ölçmek için diğer kolorimetrik testler, XTT ve WST-1'dir. Ancak bu metabolik testler sitotoksik ve sitostatik ilaçlar veya bileşikler arasında ayrım yapamaz ve düşük hücre sayılarıyla çalışırken duyarlılığı azdır (638). MTT testi, canlı hücrelerde mor renkli formazon tuzu oluşturması sonucu kolorimetrik yöntemle hücre canlılığına bakılır. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür) testi, MTT'nin mitokondriyal aktiviteyi belirleyen canlı hücreler tarafından formazan kristallerine dönüştürülmesine dayanır. Bu kapsamda her bir hücre hattı, 96-kuyucuklu kültür plakalarında (plate) 10.000-50.000 hücre/kuyu olacak şekilde otomatik multipipetler ile ekildi. Bir gece (yaklaşık 16 saat) süre sonunda fotoduyarlı maddelerin uygulamaları yapılarak 0, 24 ve 48 süresince inkübasyona bırakıldı. MTT canlılık analizlerinde aday molekül dozları 10 farklı konsantrasyonda kullanıldı, etkinlik durumuna göre daha düşük konsantrasyonlarıda analiz edilebilir. İnkübasyon sonrası hücre sağkalım (canlılık) analizleri için MTT testi yapıldı. Bunun için 5 mg/ml dozunda hazırlanan "Yellow tetrazolium MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)" test solüsyonu 20 µl/kuyu olacak şekilde tüm kuyucuklara pipetlendi (Şekil 46) (639,640).



Şekil 46. MTT testi adımları

MTT solüsyonu hazırlanışı:

1) 500 mg MTT tozunu (Goldbio, Kat. No:T-030-1) 10 ml PBS içinde çözüldü. Karanlıkta yaklaşık 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 0,22 µm'lik bir filtreyle (Millipore, Carrigtwohill, İrlanda) sterilize ederek filtre edilmeli ve -20°C'de 10 ml'lik tüplerde saklanmalı. MTT toksik ve zararlıdır. MTT ışığa duyarlıdır, dolayısıyla ışıktan korunmalıdır.
2) Formazan kristallerini çözmek için metanol, etanol ve DMSO gibi farklı solüsyonlar kullanılabilir. Bu çözeltiyi yapmak için 2,5 L izopropanole 50 ml 2 M HCl ekleyin. Çözeltiyi kullanmadan önce en az bir ay oda sıcaklığında saklanabilir. İzopropanol doğru şekilde asitleştirilmediğinde süspansiyon bulanıklaşır (641).

MTT boya inkübasyonu:

1) Uygun inkübasyon süresinden sonra 1:10 hacim MTT solüsyonu (5 mg/ml) eklendi; Örneğin; yuvarlak tabanlı 15 µl ve düz tabanlı 96 kuyulu plakalar için 20 µl kullanılmalı. Kullanılmayan MTT dondurulabilir ve yeniden kullanılabilir.
2) Çalkalama hızını maksimum 900 rpm getirildi ve yavaşça artırarak plakaları bir plate çalkalayıcı üzerinde 5 dakika boyunca çalkalandı.

3) Daha sonra hücre tipine bağlı olarak plate CO_2 inkübatöründe 37°C'de 4-6 saat daha inkübe edildi. 150 µl asitleştirilmiş izopropanol her kuyuya eklendi ve tüm kristaller çözülene kadar yeniden süspanse edildi.
4) Bu süre sonunda plateler Thermo Multiskan GO mikroplate reader 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu. Kontrol grubundan elde edilen değer % 100 canlılık olarak alınarak karşılaştırmalı ölüm oranı şeklinde belirlendi.

GENETİK TESTLER

RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu, sadece IC50 dozu uygulanan örneklerde yapıldı. Hücre kültürlerinden total RNA izolasyonu için RNeasy Mini Kit (QIAGEN Kat. No. 74104) kullanıldı ve RNA kit protokolüne göre izole edildi. Hücre kültürlerinden izole edilen RNA miktarları RNA'nın 2 µl'sinden analiz etmek için, Nanodrop 2000c Spektrofotometre (Invitrogen) ile belirlendi. Protokol, daha ileri analizlerde genomik DNA'nın kontaminasyonunu önlemek için bir DNaz I adımı gerekli olabilir (640,642-644).

Laboratuvar ekipmanları ve materyalleri

1) 2-Merkaptoetanol (2ME).
2) Macherey Nagel RA1 Lizis Tamponu.
3) 0.8 mm, 21 gauge, steril şırınga.
4) 1 ml steril polipropilen şırınga.
5) 1.5 ml tüpler için ısıtma blok(lar)ı (sıcaklık aralığı maks. 95°C).
6) NanoDrop 2000c Spektrofotometre(190-840 nm).
7) Moleküler Biyoloji Sınıfı %100 Etanol (BDH, 437433T).
8) Su, nükleaz içermez (Promega, P1193).
9) RNeasy Mini Kit (QIAGEN Kat. No. 74104)
10) Steril ince uçlu polipropilen pastörler.
11) 50 ml polipropilen tüpler.
12) 1.5 ml polipropilen ependorf tüpleri.
13) 2 ml polipropilen konik tüpler.
14) 0.6 ml polipropilen mikrofüj tüpleri.
15) 0.2 ml polipropilen PCR tüpleri.

16) Çeşitli steril filtreli ART mikropipet uçları.

17) 4°C'ye önceden soğutulmuş RLN tamponu, aşağıdaki gibi hazırlanışı:

50mM Tris-HCl, pH 8.0

140mM NaCl

1.5mM $MgCl_2$

%0,5(v/v) Nonidet P-40 (1.06 g/ml)

DEPC-H_2O

Kullanmadan hemen önce şunu ekleyin: 1000 U/ml Rnaz inhibitörü (isteğe bağlı), 1mM DTT (isteğe bağlı)

18) Tampon RLT hazırlanışı:

β-Merkaptoetanol (β-ME), kullanımdan önce buffer RLT'ye eklenmelidir. **Dikkat:** Bu çözelti çok toksiktir ve koruyucu ekipmanlı laminer akım kabini içinde ve uygun koruyucu gözlük, giysi ve eldivenler giyilerek dikkatli bir şekilde çalışılmalıdır.

1 mL Tampon RLT başına 10 µl β-ME eklendi.

Tampon RLT, β-ME eklendikten sonra 1 ay stabildir.

19) Tampon RLT, saklandıktan sonra, üzerinde bir çökelti oluşturabilir. Gerekirse, ısıtarak yeniden çözün ve ardından oda sıcaklığına yerleştirin.

20) Tampon RPE konsantre olarak sağlanır:

İlk kez kullanmadan önce, bir çalışma solüsyonu elde etmek için 4 hacim etanol (%96 ila %100) ekleyin, yani tampon hacmi başına 4 kat daha fazla etanol ekleyin.

21) Kauçuk hücre kazıyıcı (Fisher Kat. No. 08-773-2).

22) Tampon RLT ve Tampon RW1 bir guanidin tuzu içerir. **Not:** Bu çözelti çok toksiktir ve koruyucu ekipmanlı laminer akım kabini içinde ve uygun koruyucu gözlük, giysi ve eldivenler giyilerek dikkatli bir şekilde çalışılmalıdır.

23) Hücre lizizi, buz üzerinde ve 4°C'de santrifüjlemenin ardından gerçekleştirilir. Rneasy protokolündeki sonraki tüm adımlar oda sıcaklığında gerçekleştirilmelidir. Tampon RLN dışında, tamponlar önceden soğutulmamalıdır. Parçalama reaksiyonu buz kovası üzerinde gerçekleştirilirdi.

24) Tüm santrifüjleme adımları, standart bir mikrosantrifüjde 20-25°C'de gerçekleştirildi. Santrifüjün 20°C'nin altına soğumadığından emin olun.
25) Pipetler: 5 mL steril pipetler; p20, p200 ve p1000 pipetler ve steril uçlar: RNaseZap (Ambion Kat. No. 9780) ile püskürtün ve kullanmadan önce %70 etanol ile temizleyin. **Not:** Hücre kültürleri için: bu protokol, 6 kuyulu plaka için optimize edilmiştir, ancak RNeasy protokol kitabındaki talimatlara göre daha fazla sayıda hücre için değiştirelebilir.

DNaz I hazırlanışı:

1) RNase-Free DNase Seti (QIAGEN Kat. No. 79254).
   Katı DNase I'i, kitle birlikte sağlanan 550 µl Rnaz içermeyen suda çözerek DNaz I stok solüsyonunu hazırlayın.
2) Tüpü hafifçe ters çevirerek karıştırın, VORTEKS YAPMAYIN. DNaz, fiziksel denatürasyona karşı çok hassastır. Maksimum protein geri kazanımı için alikotlamadan önce aşağı doğru döndürün. Uzun süreli saklama için, flakondan yeni hazırlanmış stok solüsyonunu çıkarın ve tek kullanımlık alikotlara bölün.-20°C'de 9 aya kadar saklayın. Çözülmüş alikotlar 2-8°C'de 6 haftaya kadar saklanabilir. Alikotları çözdürdükten sonra tekrar dondurmayın.
3) Tampon RDD: Sulandırılarak hazırlanan DNaz, kullanımdan önce aşağıdaki şekilde RDD Tamponunda yeniden süspanse edilmelidir:
   10 µl DNaz/numune ve 10 µl DNaz:70 µl RDD Tamponu (ör; 6 numune; 60 µl DNaz + 420 µl RDD Tamponu)
   Tüpü ters çevirerek hafifçe karıştırın. Eklenmeye hazır olana kadar 4°C'de hazırlayın ve saklayın.

Protokol:

Kuyularda doğrudan lizis için:

1) 5 ml'lik bir pipet kullanarak kuyu 1'in hücre kültürü medyumunu tamamen aspire edin. 6 kuyulu plakayı hafifçe yana yatırın ve tabana dokunmadan steril pipeti daldırın. Tüm medyumu aspire ettiğinizden emin olun, bu çok önemlidir.
2) Plate'deki diğer tüm kuyucukların ortamlarını aynı şekilde aspire edin. Kuyuların dışında herhangi bir şeye dokunursanız pipet ucunu değiştirin.

Protokolün diğer adımıyla hemen devam edin. **Not:** Süpernatantın eksik aspire edilmesi, lizizi engelleyecek ve lizatı seyrelterek, RNA'nın Rneasy silika jel membranına bağlanma koşullarını etkiler. Her iki etki de RNA verimini azaltır.

3) Plazma zarını parçalamak için tampon RLN ekleyin (4°C'de tutulur).
4) Hücre kültürü kaplarında hücrelerin doğrudan lizizi için (her kuyucuğa 175 µl soğuk tampon RLN (4°C)) ekleyin.
5) Plakayı bir buz kovasına koyun ve 5-7 dakika inkübe edin.
6) İnkübasyon'dan sonra mikroskop altında kontrol edin. Çekirdek olan birçok siyah nokta görmelisiniz. Bu protokol yalnızca sitoplazmik zarı lizize eder.
7) Bir kauçuk hücre kazıyıcı kullanarak plakayı nazikçe kazıyın. Çok sert değil, çünkü çekirdekleri parçalayabilir ve RNA'ya zarar verebilirsiniz. Tek yönde, dairesel hareketlerle kazıyın. Tüm hücrelerin çıkarıldığını mikroskop altında kontrol edin.
8) p200 pipet kullanarak bir mikrosantrifüj tüpüne aktarın ve tüpü buz üzerine yerleştirin. **Not:** RNA'nın degrade olmasını önlemek için her seferinde bir plaka yapın.
9) Lizatı 4°C'de 2 dakika boyunca 300xg'de santrifüj edin.
10) Süpernatantı yeni bir santrifüj tüpüne aktarın ve peleti atın.
11) Süpernatant, sitoplazmik özü ve içindeki RNA'yı içerir. Kullanılan hücre tipine bağlı olarak genellikle hafif bulutlu ve sarı-beyazdır. Pelet, çekirdekleri ve hücre kalıntılarını içerir. Pelet beyazdır ve toplama sırasında elde edilen tüm hücre peletinden oldukça küçüktür. **Not:** Daha düşük bir organik faz, beyaz faz ve RNA içeren bir üst sulu faz olmak üzere üç faza açık bir şekilde ayrılmalıdır. RNA içeren faz normal olarak renksizdir, ancak hücre tipine ve miktarına bağlı olarak açık pembe bir görünüme sahip olabilir. İnterfazdan(ara faz) almamaya özen gösterek, En üstteki RNA içeren fazlı sulu çözelti bir mikrosantrifüj tüpüne aktarın. Tüm sulu fazı (RNA içeren) aktarmaya çalışmayın, organik faz veya interfaz ile RNA içeren sulu fazın potansiyel kontaminasyonunu önlemek için küçük bir miktar sulu fazı bırakın.

12) Sahip olduğunuz her numune için tüplere 600 µl tampon RLT ekleyin (başlamadan önce bunu hazırlayın) **Not:** Kullanmadan önce β-ME'nin tampon RLT'ye eklendiğinden emin olun.
13) Bir pipet kullanarak hücrelerin sitoplazmasını içeren süpernatantı (pellete dokunmamaya dikkat edin) tampon RLT içeren bir tüpe aktarın. Bunu her tüp için yapın.
14) Güçlü bir şekilde vorteksleyerek iyice karıştırın.
15) Genomik DNA serbest kalmadığı için daha fazla homojenizasyona gerek yoktur. **Not:** Bu adımda durabilir ve hücreleri -70°C'ye yerleştirebilirsiniz. 6 aya kadar stabil olarak kalabilir.
16) Bağlama koşullarını ayarlamak için etanol/izopropanol eklendi.
17) Homojenize lizata 430 µl etanol (%100 etanol) ekleyin. İsteğe bağlı olarak, çok az miktarda hücre kullanıldıysa, o zaman verimini artırmak ve RNA çökelmesini desteklemek için her örneğe 1 µl (5-10 µg) RNaz içermeyen glikojen ekleyin. **Not:** Glikojen, RNA'nın bir taşıyıcısı olarak işlev görür ve küçük miktarlarda RNA'nın tüpün kenarına yapışmasını önler.
18) Yukarı ve aşağı pipetleyerek iyice karıştırın ve santrifüj yok. Etanol eklendikten sonra bir çökelti oluşabilir, ancak bu Rneasy prosedürünü etkilemez.
19) 2 ml'lik hacme sahip (kitle verilir) ve Rneasy mini kolonundan oluşan koleksiyon tüpüne herhangi bir çökeltili veya çökeltisiz 700 µl örneği eklendi.
20) Tüpü nazikçe kapatın ve 30 saniye boyunca 11000 rpm'de santrifüjlendi.
21) Alta inen sıvı kısmı atıldı. Ardından, protokol tarafından aksi belirtilmedikçe kolonu tekrar tüpe yerleştirin.
22) Eğer numune kalmışsa hala, kalanını aynı kolona ekleyerek, santrifüjleyerek ve sıvıyı atarak kalan numune miktarıyla tekrarlayın ve Dnaz I aşamasına geçildi.

Dnaz I protokolü:

1) RNeasy mini kolonuna 350 µl Tampon RW1 pipetleyin ve yıkamak için 11000 rpm'de (> 8000xg) 30 saniye santrifüjleyin ve sıvıyı atın.
2) 80 µl DNase:RDD solüsyonu ekleyin (numune başına 10 µl DNase ila 70 µl tampon RDD). Tüpü hafifçe ters çevirerek karıştırın. **Not:** DNaz özellikle

fiziksel denatürasyona duyarlıdır. Karıştırma işlemi sadece tüp hafifçe ters çevrilerek yapılmalıdır ve vorteks yapmayın. Başlamadan önce DNase ve RDD karışımını hazırlanmış olmalı.

3) DNaz I inkübasyon karışımını (80 µl) doğrudan RNeasy silika jel membranı üzerine pipetleyin ve 15 dakika (20-30°C) boyunca tezgah üzerine yerleştirin. **Not:** DNase inkübasyon karışımını doğrudan RNeasy silika jel membranına pipetlediğinizden emin olun. Karışımın sıçramaması için bunu yavaşça yapın ve doğrudan O-ring'in ortasına ekleyin. Karışımın bir kısmı RNeasy kolonunun duvarlarına veya O-ring'e yapışırsa DNaz işlemi tamamlanmaz.
4) RNeasy mini kolonuna 350 µl tampon RW1 pipetleyin ve 11000 rpm'de 30 saniye santrifüjleyin ve sıvıyı atın.
5) İlgili protokoldeki tampon RPE yıkama adımıyla devam edin.

RNA izolasyon protokol devam

23) RNeasy kolonunu 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne (kitle verilir) yerleştirildi.

24) 500 µl tampon RPE'yi Rneasy sütununa pipetleyin. **Not:** Tampon RPE, konsantre olarak sağlanır. Kullanmadan önce tampon RPE'ye etanol eklendiğinden emin olun.

25) Yavaşça kapatın ve kolonu yıkamak için 11000 rpm'de 30 saniye santrifüjleyin ve sıvıyı atın. Koleksiyon tüpünü yeniden kullanıldı.

26) Tampon RPE ile ikinci yıkama RNeasy kolonuna yeniden 500 µl tampon RPE ekleyin.

27) Tüpü kapatın ve RNeasy silika jel membranını kurutmak için 11000 rpm'de 2 dakika santrifüjleyin. **Not:** RNeasy silika jel membranının kuru olması önemlidir, çünkü kolonda etanol kalıntısı olursa, elüsyon sırasında etanol taşınmasını sağlar ve kontaminasyon oluşturur. Bu santrifüjleme adımı çok önemlidir. Tampon RPE kalıntısı olmadığından emin olun.

28) RNeasy kolonunu yeni bir 2 ml'lik koleksiyon tüpüne (birlikte verilmez ise, 1,5 ml'lik ependorf tüpü kullanılabilir) yerleştirin ve eski koleksiyon tüpünü atın. Kolonu dikkatlice çıkarın, aksi takdirde etanol kalıntılarına neden olacağından, kolon alttaki sıvıyla temas etmemesine özen gösterin.

29) 1 dakika boyunca maksimum hızda bir mikrosantrifüjde santrifüjleyin.

30) RNeasy kolonunu yeni bir 1.5 ml'lik koleksiyon tüpüne (kitle verilir) aktarın.

30-50 µl RNaz içermeyen suyu doğrudan RNeasy silika jel membranına pipetleyin (RNaz içermeyen su kitle sağlanır). **Not:** RNA peletinin iyice yıkanması, hassas uygulamalarda çalışmayı sekteye uğratacak herhangi bir tuz veya kirletici maddeyi en aza indirecektir. RNA pelet oda sıcaklığında 5 ila 10 dakikadan daha uzun süre olmayacak şekilde havada kurutulabilir. RNaz içermeyen su, RNA peletini çözdürmek için 55-60°C'ye önceden ısıtılabilir.

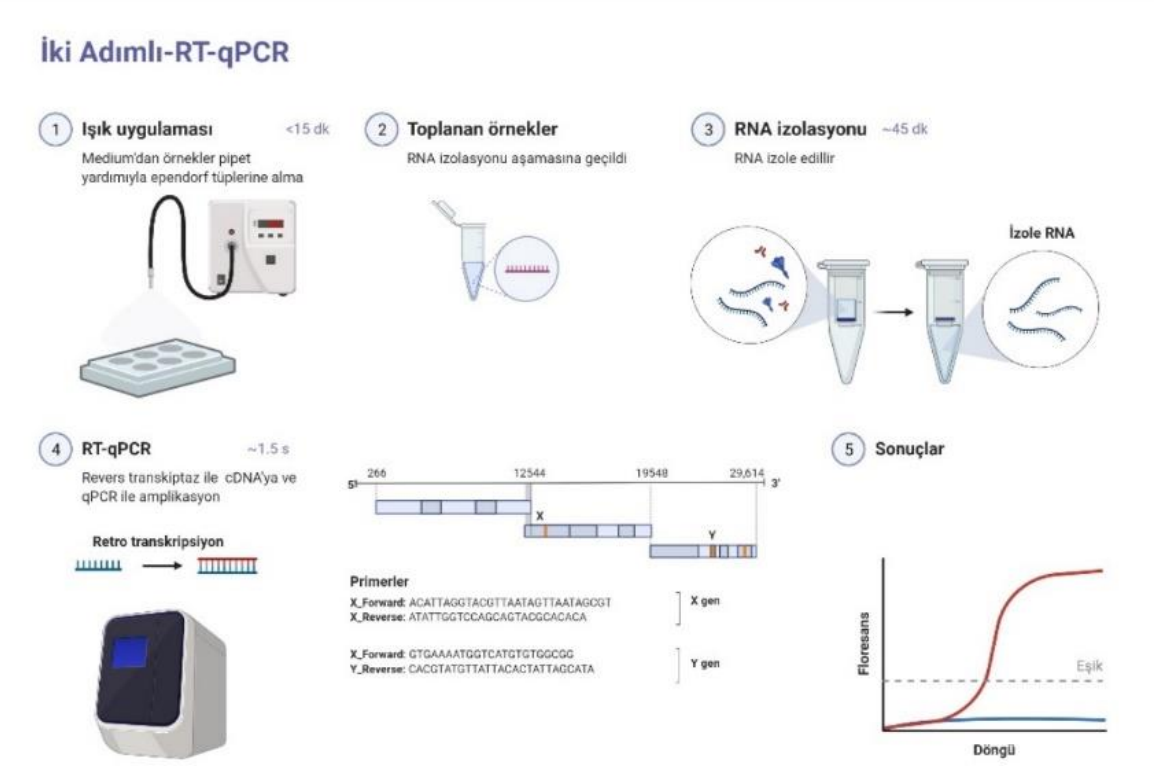
31) Tüpü kapatın ve ayrıştırmak için 11000 rpm'de 1 dakika santrifüjleyin ve -80°C'ye kaldırın. **Not:** 30-50 µl RNaz içermeyen su ekleyin.

Spektrofotometre ile RNA konsantrasyonunu ölçme

1) Spektrofotometrenin ayarlarını RNA'ya getirildi.
2) Blenk olarak 1-2 µl RNaz içermeyen su kullanıldı.
3) RNA miktarını değerlendirmek için her RNA örneğinden 2 µl kullanıldı.
4) Her örnek için 230 nm, 260 nm ve 280 nm'de okumalar kaydedildi.
5) RNaz içermeyen su kullanarak RNA'yı 30 ng/µl'ye seyreltildi.

cDNA Sentezi

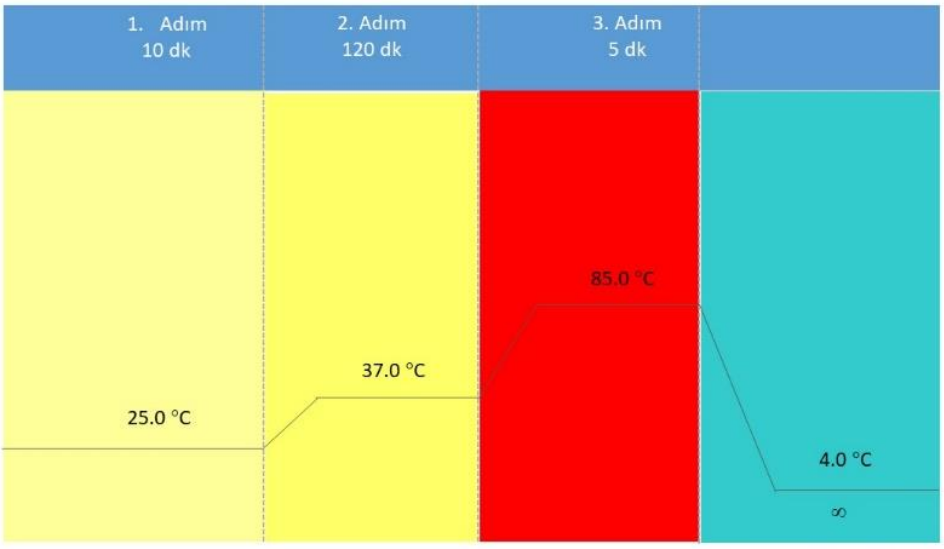
Bunun için test edilecek numune ve kontrol sayısına göre bir revers transkriptaz mastermiksi hazırlandı. Pipetleme ve ardından kısa santrifüj ile örnekler iyice karıştırıldı. İki aşamalı bir qPCR reaksiyonu gerçekleştirirken, total veya mRNA önce cDNA'ya transkripsiyonu sağlanmalı, revers transkripsiyon, total RNA miktarları (100 pg-2 µg) kullanılarak Applied Biosystems® High Capacity cDNA sentez kiti ile gerçekleştirildi. Hazırlama ön karışımını RNaz içermeyen bir reaksiyon tüpünde buz üzerinde hazırlanır, numune hariç tüm reaksiyon bileşenlerini içeren bir ana karışım elde edilir (Şekil 47).



Şekil 47. RT-qPCR protokol şeması

1) Kullanmadan önce solüsyonlar vortekslendi ve kısa ve hafif bir santrifüj yapıldı.
2) Örnekleri 65°C'de 5 dakika inkübe edin ve ardından 2 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Tüplerin altında tüm sıvıyı toplamak için örnekler kısaca santrifüj edildi.
3) 2 µl oligo (dT), 1x dNTP, 1xRT buffer, 200 U RT enzim ve nükleaz içermeyen su ile son hacmi 10 µl'ye getirildi. 10 µl RNA ekleyerek örnek başına son hacmi 20 µl'ye getirildi. Pipetleme ve ardından kısa bir santrifüj ile örnekleri iyice karıştırıldı.
4) Örnekleri 10 dakika boyunca 25°C'de, ardından 120 dakika boyunca 37°C'de ve 85°C'de 5 dakika inkübe edildi.
5) Uygun bir hacimde nükleaz içermeyen su ekleyerek sentezlenen cDNA'yı arzu edilen konsantrasyona kadar seyreltilebilir ve cDNA'yı hemen kullanmak için buz üzerine yerleştirin veya daha sonra kullanmak üzere -20°C'de saklayın.

6) Yalnızca tam uzunlukta cDNA verimi sağlayan değil, aynı zamanda yüksek sıcaklıklarda iyi aktiviteye sahip olan bir RT seçmek önemlidir. İkincil yapıya sahip RNA'nın denatürasyonu için yüksek sıcaklık performansıda çok önemlidir (Şekil 48).



Şekil 48. cDNA sentez ve PCR adımları

7) Oligo dT primerler, mRNA'ya özgüllükleri ve aynı cDNA havuzundan birçok farklı hedefin çalışılmasına izin vermeleri nedeniyle iki aşamalı qRT-PCR reaksiyonları için en iyi seçimdir. Random primerler, büyük cDNA havuzları için kullanışlıdır. FFPE örnekleri ve RNA içindeki ikincil yapı gibi bozulmuş transkriptler, random primerlerde, gen-spesifik primerler ve oligo dT primerlerde olduğu kadar büyük bir problem oluşturmaz. qRT-PCR çalışmalarında, random primerlerin kopya sayısını olduğundan fazla tahmin edebildiği gösterilmiştir. Random ve oligo dT primerlerinin kombinasyonunu kulanmak, bazen tek iplikli cDNA sentez reaksiyonunda kullanıldığında her ikisinin avantajlı tarafları birleştirerek veri kalitesini artırabilir. Random primerler yalnızca iki aşamalı qRT-PCR reaksiyonlarında kullanılır (Tablo 4).

Tablo 4. 20 µl RT reaksiyon karışımı içeriği

	1 reaksiyon	Master miks (20 reaksiyon için 10 % fazla)
Total RNA veya mRNA	10 µl	---

Primer: Oligo dT, Random Hekzamerler veya Gen spesifik primerler	2 µl		22 µl	
25x mM dNTP (100 mM)	0.8 µl		17.6 µl	
10X RT tamponu	2 µl		44 µl	
Ribosafe RNase inhibitör (10 U/µl)	1 µl	----	22 µl	---------
Applied Biosystems RT enzim (200 U/µl)	1 µl		22 µl	
DEPC-H_2O	3.2 µl	4.2 µl	70,4 µl	92,4 µl
Total hacim	20 µl		----	

Real Time-PCR (RT-PCR) çalışmaları

Bu protokol, SYBR Green kullanılarak gerçek zamanlı revers transkripsiyon (RT) PCR için ayrıntılı deneysel prosedürü açıklamaktadır. Prosedür, total RNA'nın revers transkripsiyonu ile başlandı. Daha sonra cDNA, random primerler ile gerçek zamanlı PCR için kalıp olarak cDNA kullanıldı. Gerçek zamanlı PCR için reaktiflere veya araçlara bağlı olarak optimizasyon yapılmak zorundadır. Kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR), hücre kültürü öncesinde veya sırasında hücreler içindeki herhangi bir gen için RNA seviyelerinin ölçüm yöntemidir. İki aşamalı bir qRT-PCR yöntemi (revers transkripsiyon ve PCR) tarafımızdan yapıldı. RNA ekstraksiyonunun temel unsurları açıklanmaktadır. Hücre hatlarında metilasyon, apoptozis ve detoksifikasyon ile ilgili Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Tet1, Tet2, Keap1, Nrf2, sitokrom c, HO-1, kaspaz-3, Apaf-1, p53, Bax ve Bcl-2 proteinlerinin sentezinden sorumlu gen ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile analiz edildi. Bu çalışmada en düşük ışıma dozu ve IC50 dozu için gen ekspresyon çalışmaları yapıldı. Gen ekspresyon çalışmalarında “RNA izolasyonu” bölümünde açıklandığı şekilde izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA’lar kullanıldı. Bu cDNA’lar RT-PCR’da SYBR Green qPCR mastermiks protokolüne uygun olarak çoğaltılarak ve aşağıda sıraladığımız primer dizileri kullanılarak gen ekspresyonları belirlendi (645,646).

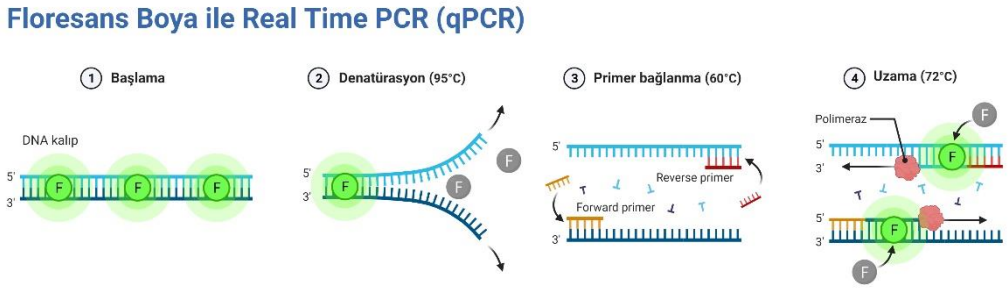
Laboratuvar ekipmanları ve materyalleri:

1) Oligonükleotid Primerler (Invitrogen™ ve Oligomer™).
2) Applied Biosystems® SYBR Green-ROX Kiti.
3) Applied Biosystems® High Capacity cDNA Sentez Kiti (4368814) (200 reaksiyonluk revers transkripsiyon 100 µl/reaksiyon). -15 ila -25°C saklanır.

4) RNaseZap® RNaz dekontaminasyonu (Ambion®).
5) RNaz A (stok solüsyon, 1 mg/ml). 1 mg RNase A'yı 1 ml distile su veya PBS'ye ekleyin ve karıştırmak için vortekslendi. Tüplerde ve -20°C'de saklanır.
6) DEPC-H_2O (Ambion®).
7) 1.5 ml tüpler, PCR için (Eppendorf).
8) ART® kendiliğinden kapanan bariyer pipet uçları (Sigma-Aldrich).
9) Applied Biosystems® PCR Cihazı (Applied Biosystems).
10) QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System™ Real-Time PCR (Applied Biosystems®).
11) MicroAmp® Hızlı Optik 96-Kuyucuklu Reaksiyon Plakası (Applied Biosystems®).
12) MicroAmp® 96 Kuyulu Optik Yapışkan Film (Applied Biosystems®).
13) Santrifüj
14) 96 kuyulu plate.
15) Yumuşak mendil.

Protokol:

1) Reaksiyonların 5 µl nükleaz içermeyen su, 0.5 µl forward primer, 0.5 µl reverse primer ve 10 µl 2x Syber Green mastermiksi olacak şekilde qPCR mastermiksi(MM), her örnek ve gen bölgesi için üç kez tekrarlanması gerektiği göz önünde bulundurarak tüm örnekler, standartlar ve kontroller hazırlandı. SYBR Green mastermiksini ışıktan koruyun (Şekil 49).



Şekil 49. Floresans boya ve RT-PCR'da çalışma prensibi

2) MM tüplerini hafif vortekslendi.

3) MM (16 µl), PCR plakasındaki uygun kuyuya pipetlendi, kuyunun duvarının bir tarafına pipetlemeye dikkat edin ve MM'yi cDNA negatif kuyularına pipetlemeyi unutmayın (Tablo 5).
4) qPCR ana tüplerine 16 µl mastermiksi qPCR strip tüplerine veya kullanılan qPCR makinesiyle uyumlu 96 kuyucuklu plakaya dağıtıldı. 96 kuyucuklu plakanın tüplerine veya kuyularına 4 µl cDNA şablonu eklendi.
5) qPCR tüplerini kapatın veya qPCR makinesi için uyumlu bir plaka yapıştırıcı bant ile kuyuları plakanın üst kısmını kapatıldı.

Tablo 5. qRT-PCR mastermiks içeriği

	1 reaksyion	Master miks (20 reaksyion için 10 % fazla)
Applied Biosystems SYBR green miks (2x)	10 µl	220 µl
Forward primer (10 µM)	0.5 µl	11 µl
Revers primer (10 µM)	0.5 µl	11 µl
Kalıp (DNA veya cDNA)	4 µl	-----
DEPC H_2O	5 µl	110 µl
Total hacim	20 µl	-----

6) Çözeltiyi karıştırmak için qPCR tüplerini hafifçe sallayın ve kuyuların altında tüm sıvıyı toplamak için bir santrifüj yapıldı. Plaka'yı 200×g'de 2 dakika santrifüj edildi.
7) RT-qPCR makinesinin kapağını açın ve qPCR plakasını belirlenen kuyucuklara yerleştirildi ve ardından kapağı kapatıldı.
8) qPCR'ı 95°C sıcaklıkta 3 dakika boyunca bir başlangıç denatürasyonu, ardından 40 döngü boyunca 10 saniye boyunca 95°C ve 30 saniye boyunca primer bağlama ve uzama için 60°C bitiminde ise 0.5°C/5sn artışlarla 65°C ila 95°C sıcaklık aralığında erime eğrisi adımı ile bitirmek üzere programlandı.
9) Florofor boyası olarak SYBR'yi seçildi, sonra örnek türü olarak bilinmeyen seçildi ve örnek adı kutusuna bir isim girildi.
10) Seçilen koşullarla RT-qPCR testi gerçekleştirildi. Kapak istenilen sıcaklığa ulaştıktan sonra makine çalışmaya başlayacaktır. **Not:** qPCR makinesi ve ilgili yazılım, testin tüm parametrelerini otomatik olarak hesaplayacak ve

amplifikasyon eğrilerini gerçek zamanlı olarak gösterecek, standart eğri ve erime eğrisi qPCR döngüsünün sonunda oluşturulacaktır. Düzeltme faktörü olarak GAPDH ve β-aktin primerleri kullanıldı (Tablo 6).

11) Önce her bir örnek ve standart için erime eğrilerinin amplikon için beklenen sıcaklıkta ve tek bir tepe noktasına sahip olmasını sağlayarak veri analizi gerçekleştirildi.
12) Örneklerin ve standartların amplifikasyon eğrilerini değerlendirin ve bir bölgede eşik değerini, cDNA'ların amplifikasyon oranı tüm numunelerde aynı olacak şekilde ayarlayın. Bu normalde yazılım tarafından otomatik olarak yapılır, ancak dikkatle kontrol edilmelidir. Standart eğriyi kullanarak kopya sayısı hesaplandı.
13) PCR tamamlandıktan sonra plate makineden çıkarıldı. Erime eğrilerini ve amplifikasyon grafiklerini inceleyin. StepOne™ yazılımındaki verileri dijital elektronik tabloya aktarın ve sonuçlar analiz edildi.
14) PCR özgüllüğü, uygun bir DNA ladder ile %2'lik agaroz jel üzerinde 5 µl PCR ürünü çalıştırılarak kontrol sağlanabilir.
15) Gerçek zamanlı RT-PCR ile elde edilen sonuçları değerlendirmek için yaygın olarak iki yöntem kullanılır; standart eğri yöntemi ve karşılaştırmalı eşik değer yöntemi.
16) Standart Eğri Yöntemi, bilinen konsantrasyondaki bir RNA'dan standart bir eğri oluşturmayı içerir. Bu eğri daha sonra bilinmeyen konsantrasyonlardaki mRNA hedefleri için referans standart olarak kullanılır.
17) Karşılaştırmalı Ct yöntemi ise, ilgilenilen numunelerin Ct değerlerinin, muamele edilmemiş bir numune veya normal dokudan alınan cDNA gibi bir kontrol ile karşılaştırmasını içerir. Hem kontrol hem de ilgili örneklerin Ct değerleri, uygun bir housekeeping gen'ine normalize edilir. Karşılaştırmalı Ct yöntemi, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi olarak da bilinir ve $\Delta\Delta Ct$ aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$\Delta\Delta C_t = (C_t^{Örnek} - C_t^{Örnekhousekeeping}) - (C_t^{Kontrol} - C_t^{Kontrolhousekeeping})$$

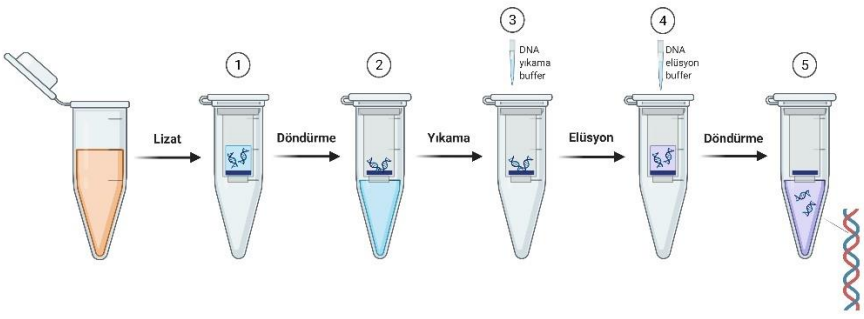
Tablo 6. Gen ekspresyonu için primer dizileri

Gen	Forward(5'-3')	Revers(5'-3')

Dnmt1	AGGTGGAGAGTTATGACGAGGC	GGTAGAATGCCTGATGGTCTGC
Dnmt3a	CCTCTTCGTTGGAGGAATGTGC	GTTTCCGCACATGAGCACCTCA
Dnmt3b	TAACAACGGCAAAGACCGAGGG	TCCTGCCACAAGACAAACAGCC
NFE2L2 (Nrf2)	CACATCCAGTCAGAAACCAGTGG	GGAATGTCTGCGCCAAAAGCTG
Tet1	CAGGACCAAGTGTTGCTGCTGT	GACACCCATGAGAGCTTTTCCC
Tet2	GCTTACCGAGACGCTGAGGAAA	AGAGAAGGAGGCACCACAGGTT
HMOX-1(HO-1)	CCAGGCAGAGAATGCTGAGTTC	AAGACTGGGCTCTCCTTGTTGC
Keap1	CAACTTCGCTGAGCAGATTGGC	TGATGAGGGTCACCAGTTGGCA
TP53 (p53)	CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC
Bcl-2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
Bax	TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG	TGTGTCCACGGCGGCAATCATC
Apaf-1	GCCAAGCAGGAGGTCGATAATG	GACCATCCTCAGAAAAGCAGGC
Sitokrom c (CYCS)	AAGGGAGGCAAGCACAAGACTG	CTCCATCAGTGTATCCTCTCCC
Kaspaz-3 (CASP3)	GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG	GCATCGACATCTGTACCAGACC
β-aktin(ACTB)	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

Total DNA İzolasyonu

Kullanmış olduğumuz Thermo Fisher Purelink® Genomic DNA Mini Kit DNA izolasyon kit protokolü şöyledir (647,648)(Şekil 50).



Şekil 50. DNA izolasyon adımları

1) 200 µl hücre lizatına 20 µl Proteinaz K (Amresco, Kat. No. 0706) ekleyin ve pipetle karıştırıldı.
2) Yapılmış olan karışıma 400 µl Lysis Buffer eklendi ve homojen oluncaya kadar vortekslendi.
3) Ardından hazırlanmış olan karışım 56°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi.
4) 200 µl etanol ekleyin ve otomatik pipet ile pipetleme yapıldı.
5) Hazırlanmış olan lizat Thermo Fisher Purelink® Genomic DNA Mini izolasyon kitinin içerisinde bulunan spin kolonlarına aktarılır ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edin. Santrifüjden sonra alttaki kolon atılarak yerine yeni alt kolon yerleştirin.
6) Kolona 500 µl Wash Buffer I ekleyin ve 10000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edin. Santrifüj işleminden sonra koleksiyon tüpünün içinde kalan sıvı kısmı boşaltın.
7) Üst kolona 500 µl Wash Buffer II ekleyin. Ardından 3 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüj edin. Santrifüj işlemi sonunda alttaki koleksiyon tüpü atın. Üstte kalan kolon kısmı ise yeni steril 1.5 ml tüpü içine yerleştirin.
8) Kolonun alt kısmının tam ortasına değecek şekilde 100 µl Elution Buffer ekleyin ve 2 dakika oda sıcaklığında bekleyin.
9) Hazırlanan karışımı 1 dakika 10000 rpm'de santrifüj edin. Bu kez üstte bulunan kolonu atın.
10) Alt kısımda kalan sıvı izole edilmiş DNA'lar bulunur ve -20°C'de saklayın.
11) Elde edilen bütün DNA'ların miktarları, NanoDrop™ 2000c spektrofotometresinde 2 µl hacim yüklenerek miktar ve saflık tayinleri yapılarak not edildi.

Bisülfit Dönüşüm Protokolü

Metilasyona özgü PCR (MS-PCR), bisülfit dönüştürülmüş (BD) DNA üzerinde metilasyon'un varlığını saptamak için kullanılan kalitatif bir tekniktir (649). Prosedür, analiz edilecek bölgede CpG dinükleotitlerini içeren dizilere bağlanmak üzere tasarlanmış iki set metilasyona özgü primer çiftini içerecek şekilde modifiye edilmiş

standart bir PCR protokolüne dayanır. Metillenmiş DNA'yı saptamak için tasarlanan primerler (M primerleri), bölgenin tamamen metilleneceği ve dolayısıyla CpG dinükleotidlerindeki dizi sitozinleri içereceği varsayımı altında tasarlanır. Tersine, metillenmemiş DNA'yı saptamak için tasarlanan primerler (U primerleri), bölgenin metillenmemiş olduğu varsayılarak tasarlanmıştır ve bu nedenle CpG dinükleotidlerinde sitozinler yerine timinler içermektedir (650). PCR'yi, SafeView™ Classic (Abmgood, Kat. No. G108) boyamasının ardından UV transillüminasyon altında bantların varlığının kalitatif olarak, kalıp DNA'da metilasyonun varlığını veya yokluğunu gösterdiği jel elektroforezi ile ortaya konuldu (651). Belirli bir aday gen için DNA metilasyonunun deneysel doğrulaması ve biyolojik (*in vitro*) olarak yeniden üretilebilirliği, genellikle metilasyona özgü PCR (MSP) gibi lokusa özgü DNA metilasyon deneyleri kullanılarak yapıldı (652). MSP, bisülfit-dönüştürülmüş DNA'nın PCR amplifikasyonunu kullanarak, lokusa özgü DNA metilasyonunun son derece hassas saptanmasına olanak tanır. MSP, promotör metilasyonu değerlendirmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. DNA degrade olursa, 1 kb'den büyük ürünlerin amplifikasyonu çok zor olur ve 500-1000 bp aralığındaki ürünlerin amplifikasyonu ise daha az verimli olur (650).

50 pg-2 µg genomik DNA'nın dönüştürülmesi için standart bir protokol aşağıda detaylı adımlarla açıklanmıştır. Bu reaksiyon koşulları, hemen hemen her hedef DNA dizisinin tam dönüşümüyle (%99,5-99,7) sonuçlanır (653). Thermo Scientific™ EpiJET™ Bisülfit Dönüşüm Kiti (Thermo Scientific EpiJET Bisulfite Conversion Kit, Kat. No. K1461), bisülfit dönüşüm reaksiyonunda metillenmemiş tüm sitozinler deamine edilir ve urasillere dönüştürülürken, metillenmiş sitozinler değişmeden kalır. Bisülfitle dönüştürülmüş metillenmemiş sitozinler, aşağıda gösterildiği gibi PCR'de timin olarak saptanır:

Kalıp	N-^{M}C-G-N-C-G-N
BD sonrası	N-^{M}C-G-N-U-G-N
PCR sonrası	N- C-G-N-T-G-N

EpiJET Bisülfit Dönüşüm Kiti, DNA denatürasyonunu ve bisülfit dönüşüm reaksiyonlarını tek bir adımda birleştirir. Bu adım, uzun (Protokol A, 160 dk) gerçekleştirilir. Dönüştürülen DNA daha sonra kolon üzerinde desülfonasyon ve devamında DNA saflaştırma adımları için bir mikro kolonun membranına bağlanır. Dönüştürülen DNA, düşük hacimli bir elüsyon tamponunda ayrıştırılır ve PCR, qPCR,

COBRA ve dizileme dahil olmak üzere metilasyon analizlerinde kullanılır. DNA saflığı, başarılı bisülfit dönüşümü için önemli faktörlerden biridir. En iyi sonuçlar, DNA miktarı 200 ng-500 ng arasında verir. Yüksek miktardaki DNA, bazı GC açısından zengin bölgeler için tamamlanmayan bisülfit dönüşümüne neden olabilir.

Laboratuvar ekipmanları ve materyalleri

1) Thermo Scientific™ EpiJET™ Bisülfit Conversion Kit.
2) Thermo Fisher Purelink® Genomic DNA Mini Kit.
3) Tris-Borat-EDTA tamponu (TBE): 0,089 M Tris-baz, 0,089 M borik asit, 0,002 M EDTA (BDH Chemicals, Kat. No. 100935V), pH 8,3.
4) Parafilm® M Barrier Film (SPI Supplies, West Chester, ABD).
5) Safeview™ Classic jel boya (100 reaksiyon) (Abmgood, Kanada).
6) 10x Orange G jel yükleme tamponunu 15 ml gliserol ve 100 mg Orange G tozunu 50 ml son hacme kadar suda çözün ve karıştırarak vorteksleyin ve 4°C'de saklayın.
7) 50 bp DNA Ladder, 1000 µg/ml (New England Biolabs, Ipswich, ABD).
8) GenePure LE Quick Dissolve Agaroz (elektroforez sınıfı) toz halde (ISC BioExpress, Kaysville, USA).
9) PCR (Techne 2000, Birleşik Krallık).
10) Jel döküm tepsisi ve yürütme haznesi.
11) DC güç kaynağı.
12) UV Transillüminatör (MiniBIS - DNR Bio Imaging Systems, İsrail).

Modifikasyon reaktifinin hazırlanması: Modifikasyon reaktifi kuru bir karışım halindedir ve kullanımdan önce çözülmesi gerekir. Her şişedeki modifikasyon reaktifi miktarı, 10 DNA'nın dönüşümü için yeterlidir. 10 dönüşümlük reaksiyonu için:

1) Bir tüp kuru modifikasyon reaktifine 0.9 ml moleküler biyoloji sınıfında su, 200 µl modifikasyon solüsyonu I ve 60 µl modifikasyon solüsyonu II ekleyin.
2) Modifikasyon reaktifini yaklaşık 10 dakika ters çevirerek çalkalıyıcı aracılığıyla çözün.
3) **Yıkama tamponunun hazırlanması**: Kullanmadan önce 9 ml yıkama tamponuna (konsantre) 25 ml %96-100 etanol (BDH Chemicals, Kat. No. 1017) ekleyin.

4) **Desülfonasyon tamponunun hazırlanması:** Kullanmadan önce 3.5 ml desülfonasyon tamponuna (konsantre) 10 ml %96-100 etanol ekleyin.

Bisülfit dönüşüm protokolü

1) Genomik DNA'yı bisülfit DNA Lizis Tamponu (2 µg tRNA(Sigma, Kat. No. R-4251), 280 ng/µl Proteinaz K, %1 SDS(BDH Chemicals, Kat. No. 442444H)) ile 37°C'de 1 saat boyunca 18 µl toplam hacimde inkübe ederek numuneler hazırlandı. **Not:** Bu, özellikle DNA ile ilişkili proteinlerin hala örnekte bulunabileceği ve klinik örneklerden izole edilen DNA ile maksimum bisülfit dönüşümü elde etme aşamasında yapılır.
2) 300 ng saflaştırılmış genomik DNA içeren 20 µl DNA örneğini bir PCR tüpüne ekleyin. DNA örneğinin hacmi 20 µl'den azsa, 20 µl'ye kadar DNA örneğine moleküler biyoloji sınıfında su ekleyin. Bu işlem yapılırken bütün örneklerdeki DNA miktarları 300 ng olacak şekilde eşitlemek için su ile ekleme işleme yapılmalıdır.
3) PCR tüpündeki 20 µl DNA örneğine 120 µl hazırlanmış modifikasyon reaktifi solüsyonu ekleyin. Numuneyi yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın, ardından tüpe kısa bir santrifüj işlemi yapılır.
4) PCR tüplerini bir termal döngüleyici'ye yerleştirin ve DNA'nın denatürasyonunu ve bisülfit dönüşümünü gerçekleştirmek için belirtilen döngü protokolünü uygulandı. Termal döngüleyici protokolü: 98°C/10 dk ve 60°C/150 dk.
5) 4.adımdan sonra PCR tüplerindeki örnekler koleksiyon tüplerinin içinde bulunan DNA saflaştırma kolon tüplerine aktarın ve 400 µl binding tamponu eklenir ve kolona dikkat edilerek pipetaj yapılır.
6) Koleksiyon tüpüne yerleştirilen mikro kolon tüpü, 12000 rpm'de 30 saniye santrifüjleyin. Altta toplanan sıvıyı atın. Mikro kolon tüpünü, aynı koleksiyon tüpüne yerleştirin.
7) Etanol ile hazırlanmış 200 µl yıkama tamponunu mikro kolona ekleyin ve 30 saniye 12000 rpm'de santrifüjleyin. Altta toplanan sıvıyı atın. Mikro kolon tüpünü, aynı koleksiyon tüpüne yerleştirin.
8) Etanol ile hazırlanmış 200 µl desülfonasyon tamponunu mikro kolona ekleyin ve kolonu oda sıcaklığında 20 dakika bekletin.

9) Koleksiyon tüpüne yerleştirilen mikro kolonu 12000 rpm'de 30 saniye santrifüjleyin. Altta toplanan sıvıyı atın. Mikro kolon tüpünü, aynı koleksiyon tüpüne yerleştirin.
10) 200 µl yıkama tamponunu mikro kolona ekleyin ve 30 saniye 12000 rpm'de santrifüjleyin. Altta toplanan sıvıyı atın. Mikro kolon tüpünü, aynı koleksiyon tüpüne yerleştirin.
11) 200 µl yıkama tamponunu mikro kolona ekleyin ve 60 saniye 12000 rpm'de santrifüjleyin. Altta toplanan sıvıyı atın. Mikro kolon tüpünü, aynı koleksiyon tüpüne yerleştirin.
12) Kolonu temiz bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirin. Mikro kolonu 20 µl elüsyon tamponu ekleyin ve 2 dk bekleyin. 12000 rpm'de 60 saniye santrifüjleyin.
13) Bisülfit dönüştürülmüş DNA zincirleri artık komplementari olmadığından, mevcut dönüşmüş DNA esas olarak tek zincirli formda kalır ve RNA'ya benzer. Dönüştürülen DNA konsantrasyonu ölçümleri için 260 nm=1.0'da absorbans için 40 µg/ml değeri ölçülerek kıyaslama yapılır.
14) PCR amplifikasyonu için hemen kullanılabilir veya DNA miktarına ve kalitesine bağlı olarak -20°C'de 1-10 yıl saklanabilir. Bisülfit dönüştürülmüş DNA (20 ng/µl) -80°C'de 6 aya kadar, -20°C'de 3 aya kadar ve 4°C'de 1-2 haftaya kadar stabildir.

PCR amplifikasyonu: Bisülfit dönüştürülmüş DNA'nın amplifikasyonu için AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (Kat. No. 4398881) kullanıldı. Her PCR için 2 µl elute edilmiş DNA kullanıldı. Optimum amplikon boyutu 100-300 bp olmalıdır, ancak PCR koşullarının optimizasyonundan sonra daha büyük amplikonlarda oluşturulabilir. Bisülfit dönüştürülmüş DNA'nın başarılı PCR amplifikasyonu için 35-45 döngü gereklidir.

Primer tasarımı: PCR bisülfit dönüşümüne özgü primerlerin tasarımı, tamamen dönüştürülmüş DNA'nın verimli ve amplifikasyonunun maksimum seviyede gerçekleşmesini sağlamak için çok önemlidir. Aşağıdaki, iyi bir primer tasarımında olması gerekenler:

1) Özgüllüğü sağlamak için primerler ~18-30 bp uzunluğunda olmalıdır.

2) Primerler, en az 50°C'nin üzerinde birbirlerine yakın Tm'ye sahip olmalı ve 1-2°C'den fazla farklılık göstermemelidir.
3) Primer dizilere genellikle 3-4 CpG bölgesi dahil edilmeli. Primerlerdeki CG bölgeleri, hem M (CG) hem de U (TG) primerleri için 3' ucuna mümkün olduğunca yakın yerleştirilerek, uygun primer bağlanmasının özgüllüğü artırılmış olur.
4) Primerler, dönüştürme özgüllüğünü sağlamak için birden fazla (~%25) C=T bazı içermelidir. Tamamen modifiye edilmiş DNA'nın özgüllüğünü artırmak için primer bağlama dizilerine mümkün olduğunca çok CG dışı sitozin dahil edilmelidir.
5) 3' ucundaki son baz dönüştürülmüş DNA'nın amplifikasyonunu artırmak için bir tane C→T olmalıdır. Metillenmiş primerlerde, forward bir C ile bitmeli ve revers bir G ile bitmelidir.
6) Amplikon uzunluğu, maksimum verimi sağlanması için ~450bp'den fazla olmamalıdır. (klinik örneklerden alınan formalin parafin gömülü DNA'dan alınan düşük kaliteli DNA'lar için amplikon uzunluğu <150bp olmalıdır).
7) Nested veya yarı nested primer setleri ile kullanılması, PCR reaksiyonunun özgüllüğüne veya hassasiyetine yardımcı olabilir.
8) Bir CpG adacığı minimum ve maksimum amplikon boyutu arasındaysa, primer çifti adacığın en az üçte ikisini kapsamalıdır. **Not:** MethPrimer, özellikle metilasyon çalışmaları için ücretsiz bir çevrimiçi primer tasarım aracıdır (http://www.urogene.org/methprimer adresinde mevcuttur) (654,655). Bu yazılım, hem MS-PCR hem de bisülfit diziliminde primer tasarımı için kullanıldı. Program ile seçilen genomik dizi, basit bir kopyala ve yapıştır işlevi ile aktarılır ve yazılım daha sonra bir *in silico* bisülfit dönüşümü gerçekleştirir ve primer dizileri ve konumlandırmaları ile ilgili öneriler sunar.

Termal Döngü

1) Metillenmiş ve metillenmemiş DNA'nın orantılı PCR amplifikasyonunu test etmek için 50:50 Metillenmiş (Serological DNA:CpGenome Universal methylated DNA;Chemicon International, Kat. No. S7821) ve Metillenmemiş (Human Genomic DNA; Roche, Kat. No. 11691 112 001) tamamen bisülfit dönüştürülmüş kontrol numunesi kullanıldı ve optimize

edilmiş PCR reaksiyon koşulları altında bisülfit dönüşümüne özgü primerlerle amplifiye edildi (Tablo 7).

2) 2 µl bisülfit dönüştürülmüş genomik DNA, 200 µM dNTP'ler (Invitrogen, Carlsbad, ABD), 0.5 µM primerler, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10mM Tris-Hcl, pH 8.3 ve 0.15 µl Hot Start Taq polimeraz içeren ya da 2X mastermiks'den 12.5 µl olacak şekilde, 25 µl'lik PCR amplifikasyon reaksiyon karışımları hazırlandı. **Not:** PCR verimliliğini artırmak veya metillenmiş ve metillenmemiş PCR fragmentlerinin orantılı PCR amplifikasyonunu sağlamak için $MgCl_2$ konsantrasyonu ve ısı döngü koşullarını içeren PCR reaksiyon karışımının ayarlanması gerekebilir.
3) Bir sıcaklık gradyentli PCR ile çalıştırma reaksiyonunu 12 tüp boyunca primerin tahmin edilen Tm değerinden +/- 3°C'lik bir gradyent içinde en uygun bağlanma sıcaklığı belirlendi (656).

PCR mastermiks hazırlanışı

1) Metillenmiş ve metillenmemiş bisülfit modifiye edilmiş DNA'lara özgü primer setleri ile PCR mastermiks'i hazırlandı. HotStarTaq PCR mastermiksi için, 25 µl PCR reaksiyonu için bir örnek aşağıda gösterilmiştir. Primerlerin (Ana stok:100 µM konsantrasyon) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) saflaştırılması, primerlerin tam uzunlukta olmasını sağlamaya yardımcı olur, böylece amaçlanan hedef dizi için primerlerin özgünlüğünü artırılmış olur (Tablo 7).
2) PCR mastermiks'i birkaç saniye vorteksleyerek iyice karıştırıldı.
3) Uygun miktarda PCR mastermiks'i (25 µl eksi eklenecek DNA hacmi) reaksiyon kuyularına aktarıldı (Tablo 8).

Tablo 7. MSP için primerler

Gen	Forward(5'-3')	Revers(5'-3')
Sit-c (M)	GTATAGAGGTTCGCGAGTGAC	ACGAACATATTAAAATATACGACG
Sit-c (U)	GTATAGAGGTTTGTGAGTGATG	TACTAACAAACATATTAAAATATACAA CAT

Nrf2 (M)	GGTAGTGGATTTTGAGGTCG	GAAAACTACTATAACGACCAACCGA
Nrf2 (U)	TAGTGGATTTTGAGGTTGGAG	GGAATGTCTGCGCCAAAAGCTG
Keap1 (M)	TCGCGAGGAGATATTTAGTAACG	CCAAAAACTACTATAACAACCAACCA
Keap1 (U)	TGTGAGGAGATATTTAGTAATGA	AAAAAATAAAACATCAAACAAAAAC

Tablo 8. MSP için mastermiks içeriği

Stok	Reaksiyon miks hacmi (µl)		Final konsantrasyonu
M-Forward Primer	1 µl	--------	100-500 nM
M-Revers Primer	1 µl	--------	100-500 nM
U-Forward Primer	--------	1 µl	100-500 nM
U-Revers Primer	--------	1 µl	100-500 nM
BD-DNA	2 µl	2 µl	10-50 ng
MM	12.5 µl	12.5 µl	1x
H_2O	8.5 µl	8.5 µl	
Total hacim	25 µl	25 µl	

4) Reaksiyon kuyularında mastermiks'e kalıp DNA eklendi.
5) Reaksiyon kuyularını kapatıldı. PCR karışımını birkaç saniye hafif şekilde vorteksle karıştırıldı.
6) PCR karışımı içeren reaksiyon kuyularını bir PCR'a aktarın ve PCR döngüsü aşağıdaki gibi ayarlandı:

95°C	5 dk	x1
95°C 50°C 72°C	1 dk 1.5 dk 1 dk	x10
95°C 50°C 72°C	1 dk 1 dk 1 dk	x30
72°C	5 dk	x1
4°C	□	

7) PCR reaksiyonları sırasında çalışmada hata payını önlemek için benzer bağlanma sıcaklıklarına sahip primerler denenmelidir.
8) Numuneler hemen analiz edilebilir veya kullanımdan önce -20 °C'de saklanabilir.

Jel elektroforezi

1) 8×10 cm, %2 agaroz jel için, bir cam beher içine 1 g agaroz ve 50 ml 1×TBE tamponu eklendi. Karıştırmak için hafifçe çalkalayın. Jeli hazırlamak için kullanılan TBE konsantrasyonu, yürütme tamponu olarak kullanılanla aynı konsantrasyonda olmalı. Jel 1×TBE ile hazırlanmışsa 1×TBE yürütme tamponunda çalıştırılmalıdır.
2) Tampon/jel karışımını, agaroz tamamen eriyene kadar (genellikle 1.5-2 dakika) mikrodalgada tutuldu.
3) Erimiş agaroz karışımına 5 µl Safeview classic boyasından ekleyin ve tamamen karışana kadar hafifçe çalkalayın.
4) Erimiş agarozu, tepsinin uçları bariyer kapatıcı ile kapatıp ve tarak(lar)ı yerleştirdikten sonra, jel döküm tepsisine dikkatlice dökün. 15-20 dakika katılaşmaya bırakıldı.
5) Jel tepsisinden uç bariyerleri çıkarın. Yürütme haznesine 1×TBE tamponu ile dolduruldu ve tarak(lar)ı, sürekli olarak hafif yukarı doğru basınç uygulayarak dikkatlice çıkarın.
6) Yürütülecek her numune sırası için istenen kuyulara 5 µl, 50 bp DNA ladder ekleyin.
7) Jel üzerinde yürütülecek numunelerin her biri için 1 µl Orange G jel yükleme tamponu, bir Parafilm® M bariyer film şeridi üzerine damlacıklar şeklinde pipetlendi.
8) 5 µl PCR ürününü Orange G damlalarından birine dikkatlice pipetleyin, karıştırmak için yukarı ve aşağı pipetleyin ve ardından numuneyi jelde kuyucuğa yavaşça yüklendi. Numunenin diğer kuyucuklara akmasını önlemek için numuneyi yükleme yaparken pipet ucunu kuyu içinde tuttuğunuzdan emin olun.
9) Jeli uygun voltajda istenilen süre boyunca çalıştırın. Tamponun ve jelin aşırı ısınmamasına dikkat edin.

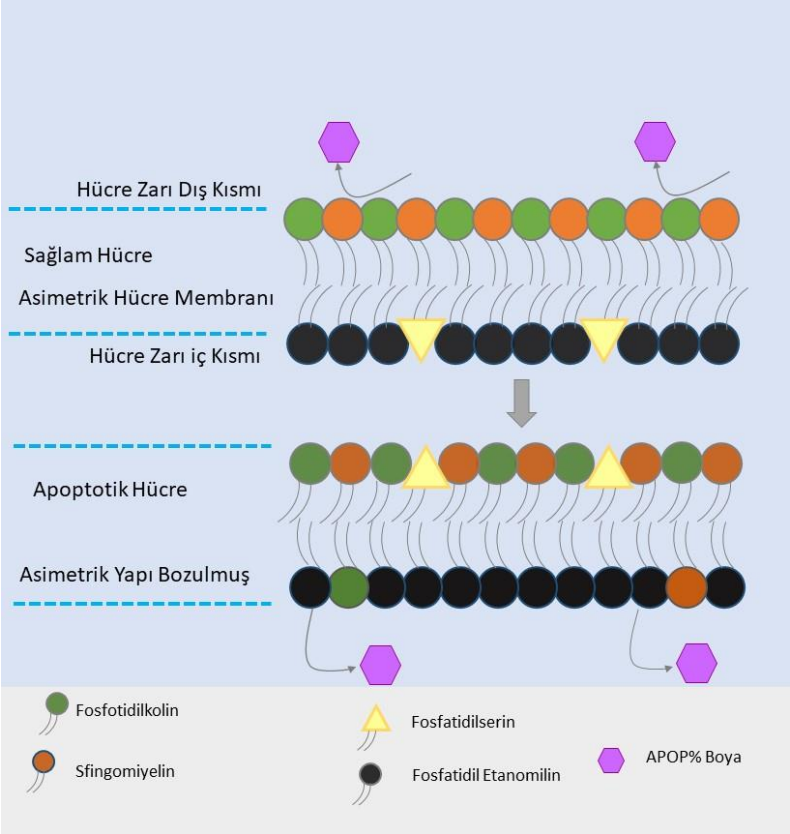
Jel görüntüleme ve analizi

1) Jel yürütmesi bittikten sonra, 1×TBE jel yürütme tamponunu lavaboya dökün.
2) Jeli tepsisinden dikkatlice çıkarın ve UV transillüminatör (MiniBIS-DNR Bio Imaging Systems, İsrail) üzerine yerleştirildi.

3) UV ışığını çalıştırın. PCR amplikonları, Safeview classic boyası, çift sarmallı DNA'ya bağlanması nedeniyle jel üzerinde görülebilir ve bu da floresan ışımaya neden olur. Kalıp DNA olmayan (negatif kontrol) yüklenen örneklerde görünür bantlar olmamalıdır. Bu kuyucuklarda beklenen boyutta bantlar mevcutsa, kontaminasyon vardır ve kontaminasyon'un kaynağını belirlemek için reaksiyonların yeniden yapılması gerekir. Pozitif kontrol metillenmiş DNA, yalnızca M primer seti için uygun boyutta bir amplikon göstermeli, pozitif kontrol metillenmemiş DNA ise sadece U primer seti için uygun boyutta bir amplikon göstermelidir.
4) Bant yoğunlukları ImageJ görüntü analiz programı ile hesaplanarak metilasyon yüzdeleri göreceli bant yoğunluklarından hesaplandı.

Apoptoz Testi

Cell-APOPercentage™ Apoptosis Assay (Birleşik Krallık), *in vitro* olarak memeli, ankraj bağımlı hücrelerde apoptoz oluşumunu izleme ve ölçüm kitidir. Kit, apoptoz geçiren hücreler tarafından seçici olarak alınan bir boya kullanır. Nekrotik hücreler boyayı tutamazlar ve bu nedenle boyanamazlar. 30 dakika içinde etiketlenen hücreler içinde biriken boya çözeltiye salınır ve salınan hücre içi boyanın konsantrasyonu bir mikroplate reader tarafından 550 nm dalgaboyunda ölçülür. Hücre zarı lipid çift tabakasındaki fosfolipidler, iç sekmede fosfatidilserin (PS), fosfatidiletanolamin (PE), dışta fosfatidilkolin (PC) ve sfingomyelin (SM) ile asimetrik olarak dağılmıştır. Fosfolipidlerin membran çift tabakası boyunca bu asimetrik dağılımı, translokaz ve flippaz gibi enzimler tarafından korunur (657). Apoptotik hücre ölümü sırasında, enzimatik değişikliğin bir sonucu olarak, hücre zarı içindeki normal fosfolipid asimetrisi kaybolur, bu da PS ve PE'nin eksteriyorizasyonuna neden olur (Şekil 51) (658,659).



Şekil 51. Hücre membranındaki apoptoz tepkisi

Apoptoz protokolü

1) 200 µl hücre medyumundan $2x10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde, 96 kuyucuklu hücre plakasına yüklenir ve (~ 24 saat) 37°C/%5 CO_2'de inkübe edildi.
2) Yukarıdaki şekli kullanarak seçilen konsantrasyonlarda test apoptotik ajan(lar)ı hazırlandı. Kontroller her deneye dahil edilmelidir.
3) Reaktif A iki katı kadar hazırlandı. Hazırlanan reaktifin yarısı kullanıldı (Tablo 9).
4) Kültür medyumunu inkübe edilmiş plakaların her bir kuyucuğundan aspire edin ve tüm kuyulara 200 µl Reaktif A eklendi.

Tablo 9. Apoptoz kit reaktiflerinin hazırlanışı

	Reaktif A (200 µl/kuyu)	**Reaktif B (200 µl/kuyu)**
Reaktif Blank	Kültür ortamı/serum	Reaktif A
Negatif Kontrol (%0 apoptoz)	Kültür ortamı/serum	Reaktif A + %5 v/v boya(10 µl)

Test Numuneleri (> %0, <%100)	Kültür ortamı/serum + referans apoptotik ajan	Reaktif A + %5 v/v boya

5) Apoptotik indükleyici/inhibitör için inkübasyon süresi, kullanılan apoptotik ajana bağlı olacaktır. Bu süreye ulaşılmadan 30 dakika önce Reaktif A çıkarıldı. Hemen 200 µl Reaktif B ile değiştirin ve kalan 30 dakika boyunca 37°C/%5 CO_2'de inkübe edildi. Hücrelere boyayı eklemeden önce boyayı medyumla önceden karıştırmalıdır. Bunun nedeni, hücrelerin veya hücrelerin üstüne 10 µl boya pipetlenirse ve seyreltilmemiş boyaya maruz kalırsa hücreler için zararlı olabilir.
6) Reaktif B bir pipet kullanarak her kuyudan aspire edildi. Hücrelere bağlanmayan boyayı çıkarmak için hücreler 200 µl/kuyu PBS ile iki kez yıkandı.
7) Her kuyucuğa tripsin (10 µl) ekleyin ve 37°C/%5 CO2'de 5 dakika inkübe edildi.
8) Her kuyucuğa 90 µl Dye Release reaktifi ekleyin ve plaka 10 dakika çalkalandı.
9) Her kuyunun (100 µl) içeriğini bir mikroplate reader kullanarak 550nm'de absorbans değerleri okundu.

İstatiksel Veri Analizi

Tüm deneyler en az üç kez tekrarlandı. Bar grafiklerindeki veriler, 3 bağımsız deneyden elde edilen ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. MTT testi sonuçlarında IC50 değeri verilerin özelliğine göre lineer regresyon eşitliği ya da probit analizi ile saptandı ($p \leq 0.05$) Real Time PCR çalışmalarında gruplar arasında gen ekspresyon farklarının belirlenmesinde $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanıldı, kalibrasyon eğrisi ve düzeltme faktörü olarak GAPDH ve β-aktin gen ekspresyonları kullanıldı. Kontrol grubu ve deneme gruplarının karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi yapıldı ve ortalamaların girdiği gruplar Tukey testi ($p \leq 0.05$) ile belirlendi. Deneysel verilerin istatistiksel anlamlılığı, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ ve $^{***}p < 0.001$ ile istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

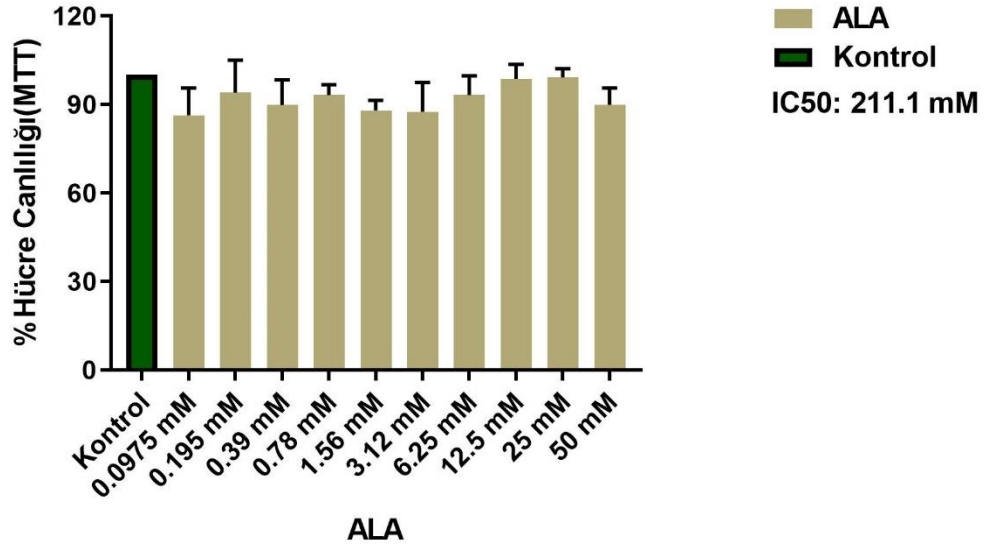
BULGULAR

HÜCRE CANLILIĞI(MTT) TEST SONUÇLARI

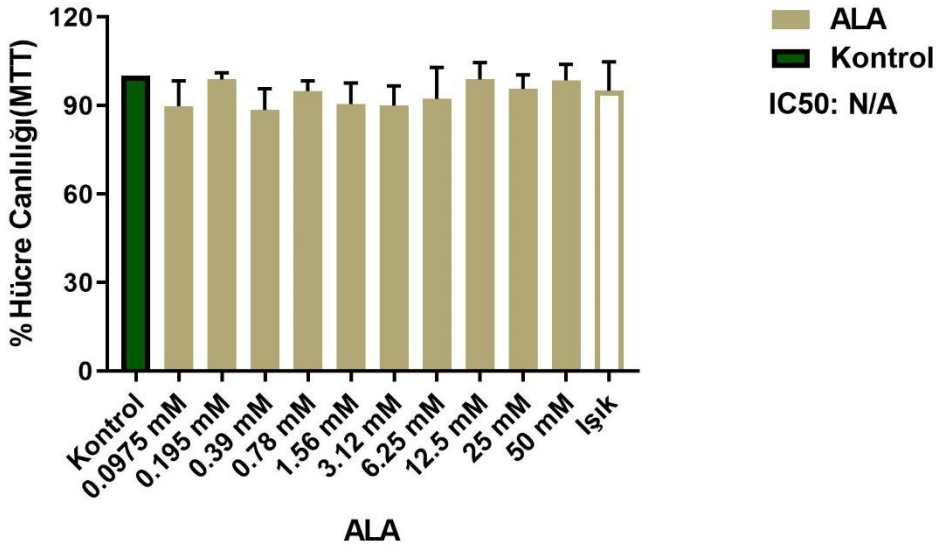
Çalışmamızda üç farklı fd kullandık bunlar sırasıyla ALA, Si ve Zn pc'lerdir 0 saat olarak verilen maddelerin sonuçlarına göre, uygulanan ALA'nın dozu arttıkça hücre canlılığında herhangi bir azalma olmadığını gözlemledik. 100 sn, 200 sn ve 300 sn ışık uyguladığımız hücrelerde canlılıklarında bir azalma olduğu gözlemlendi. Fakat, bu azalma, çok yüksek bir oranda canlılığı etkilemediği gözlemlendi. Hücre canlılığından elde edilen verilerle IC50 değerleri her bir ışıma dozu için hesaplanmıştır. Sonuç olarak verilen madde dozu arttıkça ajanın toksisiteye neden olmadığını 0 saat için çok ciddi bir etkisi olduğunu söyleyemeyiz. Kısa süreli uygulamaların hücreye herhangi bir zarar vermediği gözlendi. İnkübasyon süresi ve ışıma dozunun süresi ve dozu artıkça hücre canlılığında eksponansiyel ve bazı uygulamalarda çok daha hızlı bir toksisiteye neden oldu gözlenmiştir. Hücre canlılığına ALA için hücre hattında ALA'nın 24 saat ve 48 saat için hepatotoksik özellik gösterildiği bulundu. Keap1 ve Nrf2'nin epigenetik düzenleyici mekanizmaları üzerine araştırmalar yapılması gerekmektedir. Bu yeni bulgular, bu projenin genom ve fotodinamik terapi ile oluşturulan oksidatif stres tarafından ortaya konan moleküler başlangıç olayları (örneğin, oksidatif stress kaynaklı DNA metilasyonu) arasındaki bağlantıları ortaya çıkarılmasını hedefledik. Kemopreventif ilaçların çoklu hücresel hedefleri olduğundan, tümör baskılayıcı etkilerinin hücre canlılığına, doz ve ışıma bağımlılığı ile belirledik.

HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattına 0 Saat Boyunca Uygulanan ALA Fotoduyarlı Ajanı'nın Hücre Canlılığına Etkisi

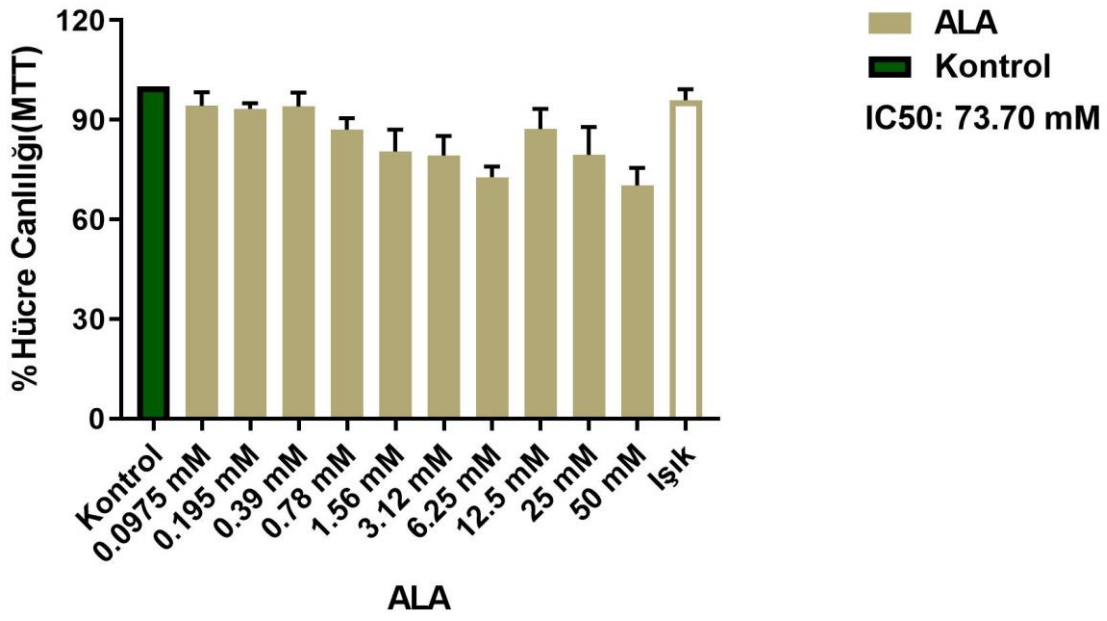
HepG2 hücrelerine 0 saatlik inkübasyon süresinde ve 100 sn, 200 sn ve 300 sn ışıma süreleri ile uyguladığımız ALA fd'nin için hücre canlılığı sonuçları, Şekil 52, 53, 54 ve 55'de gösterilmiştir.



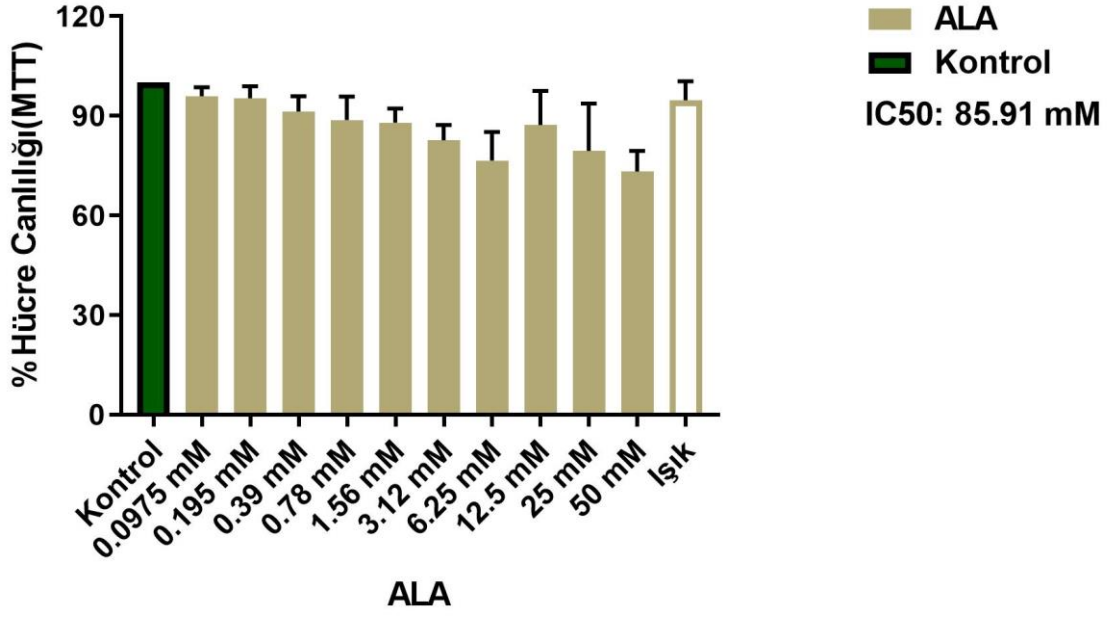
Şekil 52. HepG2 hücrelerinde, 0 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 53. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



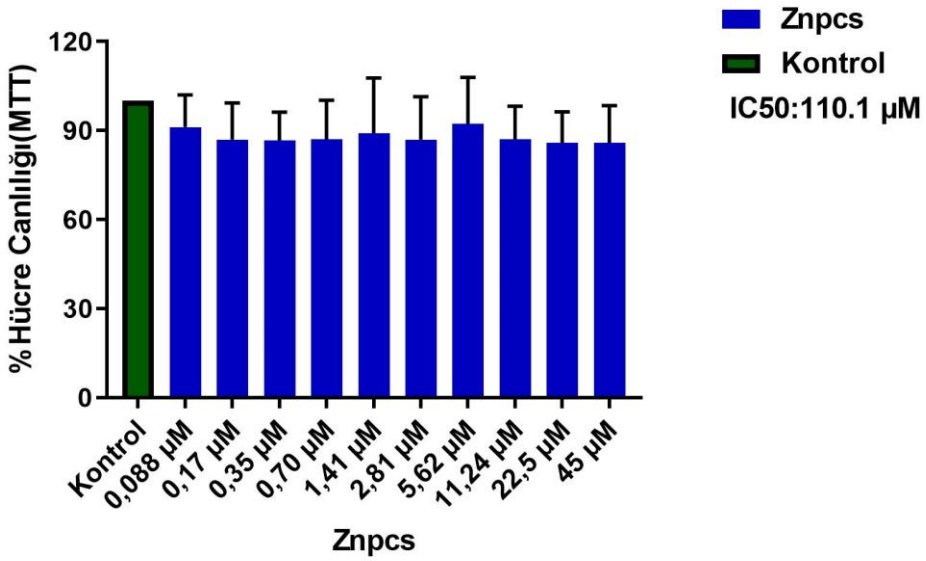
Şekil 54. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



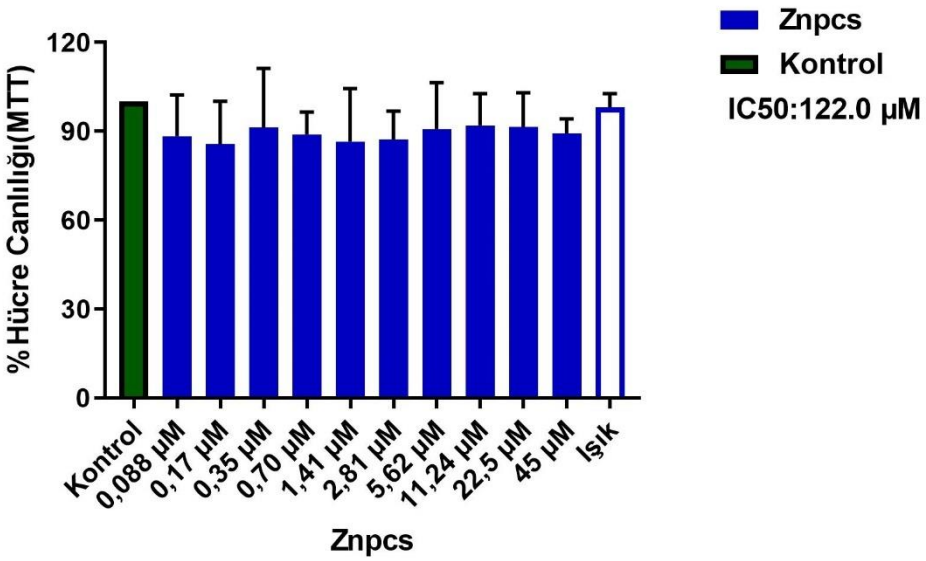
Şekil 55. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattına 0 Saat Boyunca Uygulanan Znpcs Fotoduyarlı Ajanı'nın Hücre Canlılığına Etkisi

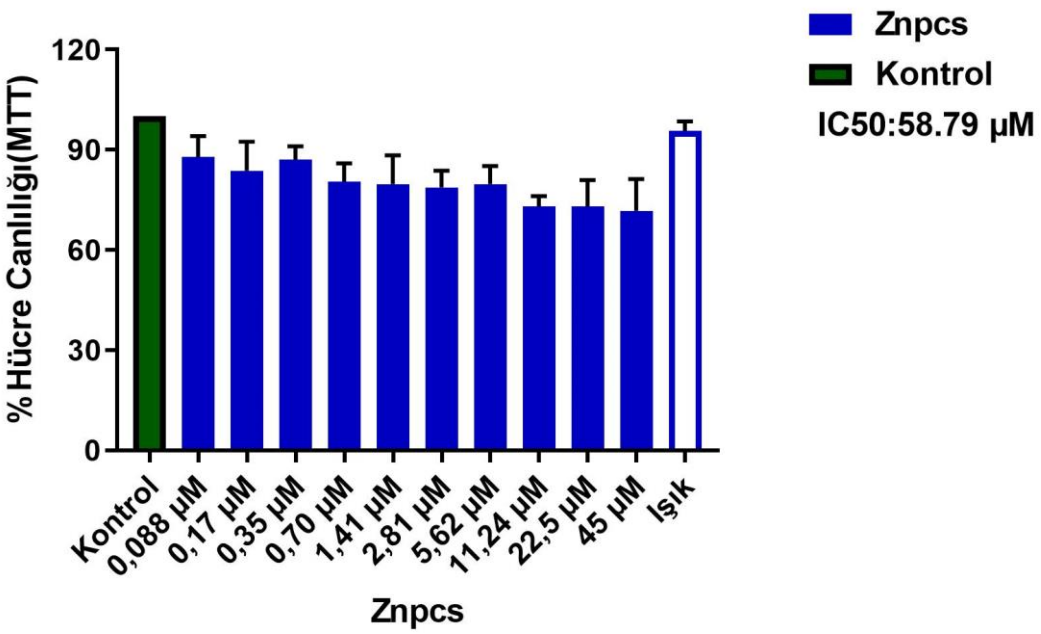
HepG2 hücrelerine 0 saatlik inkübasyon süresinde ve 100 sn, 200 sn ve 300 sn ışıma süreleri ile uyguladığımız Znpcs fd'nin için hücre canlılığı sonuçları, Şekil 56, 57, 58 ve 59'da gösterilmiştir.



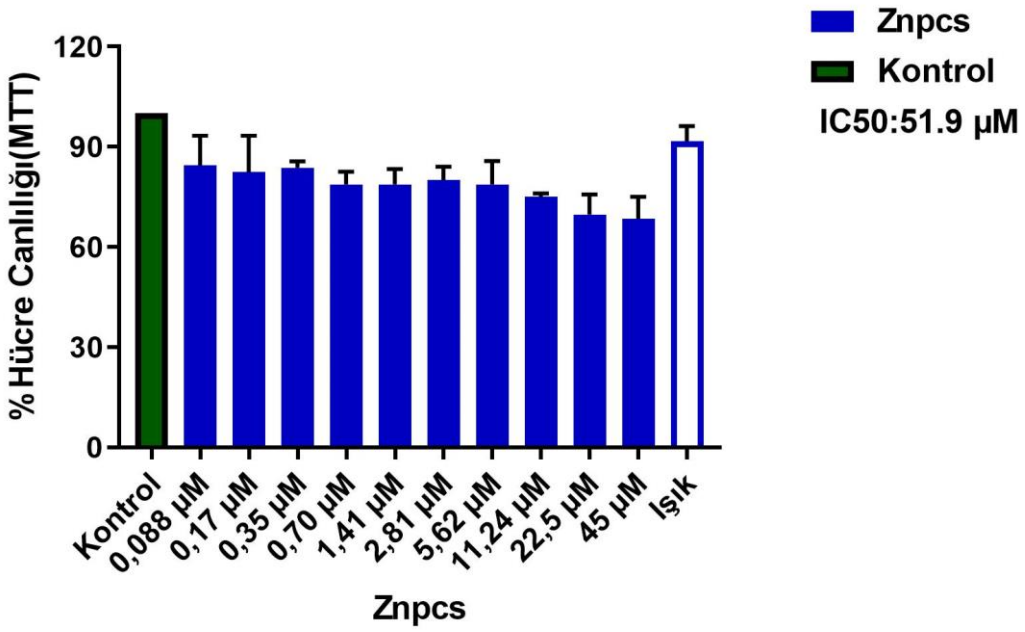
Şekil 56. HepG2 hücrelerinde, 0 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 57. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



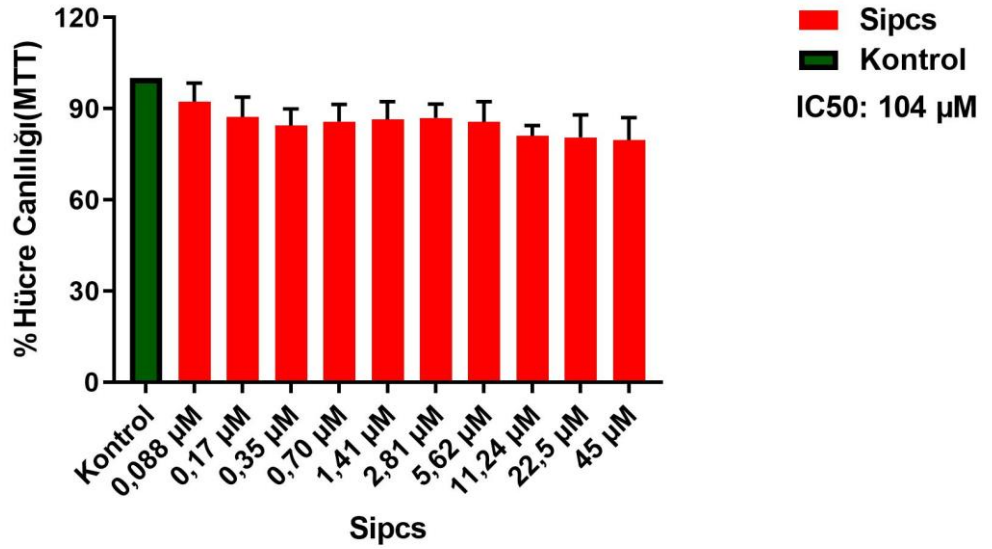
Şekil 58. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



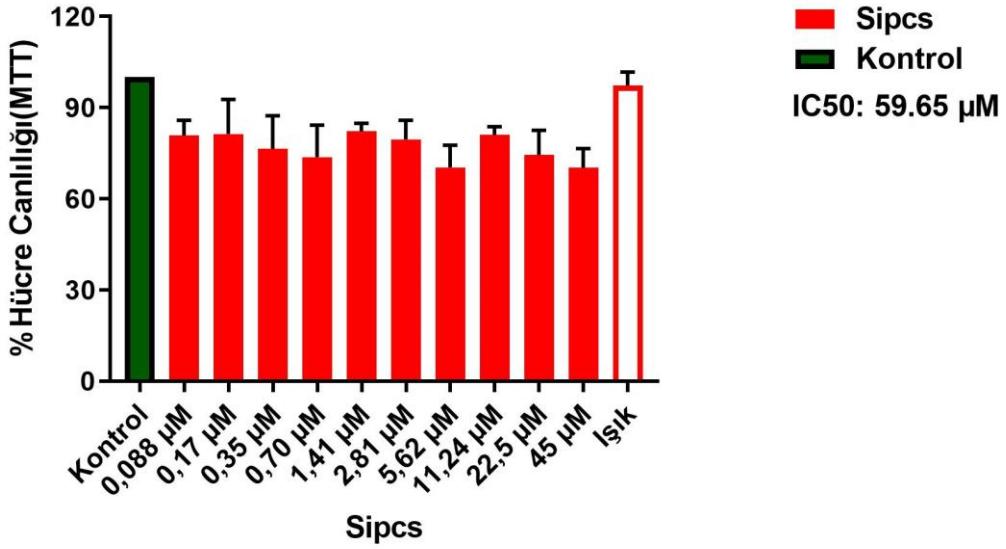
Şekil 59. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattına 0 Saat Boyunca Uygulanan Sipcs Fotoduyarlı Ajanı'nın Hücre Canlılığına Etkisi

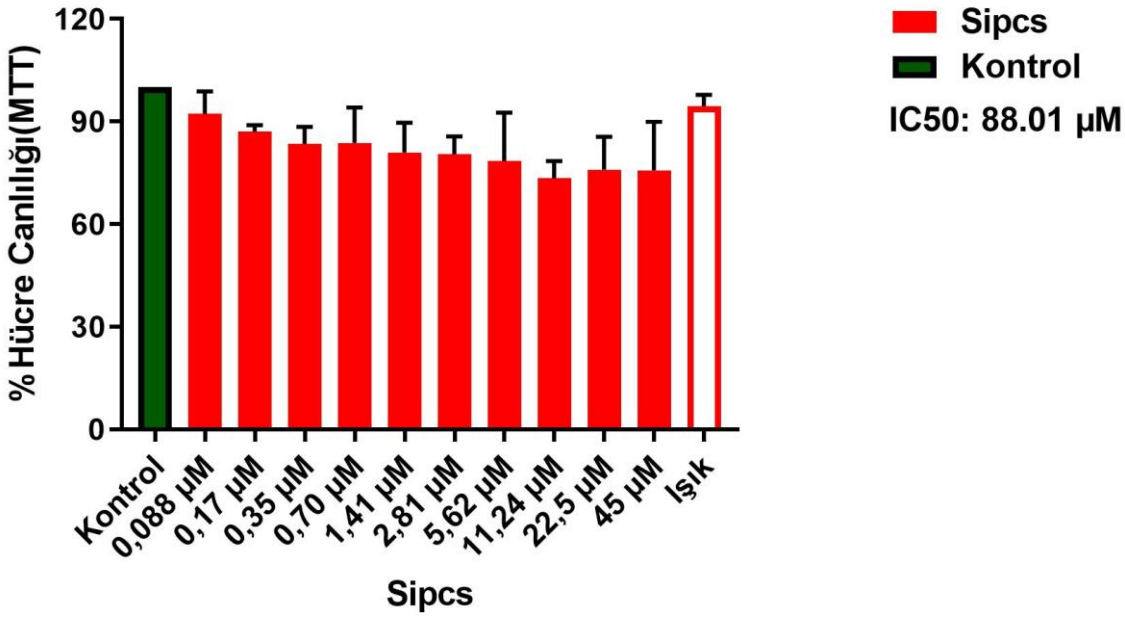
HepG2 hücrelerine 0 saatlik inkübasyon süresinde ve 100 sn, 200 sn ve 300 sn ışıma süreleri ile uyguladığımız Sipcs fd'nin için hücre canlılığı sonuçları, Şekil 60, 61, 62 ve 63'de gösterilmiştir.



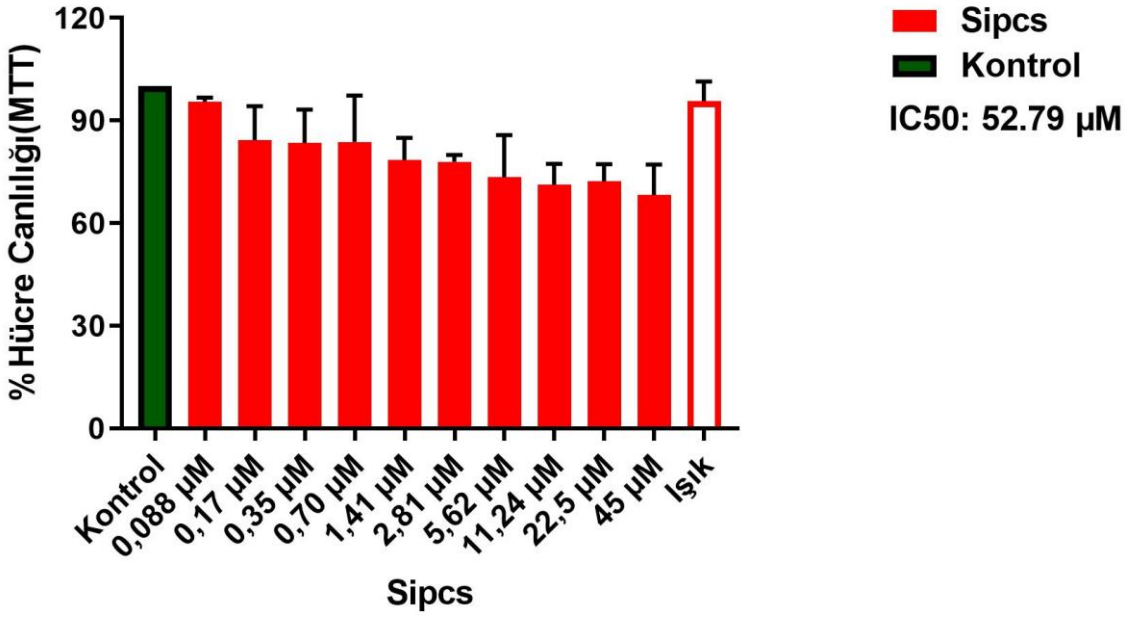
Şekil 60. HepG2 hücrelerinde, 0 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 61. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



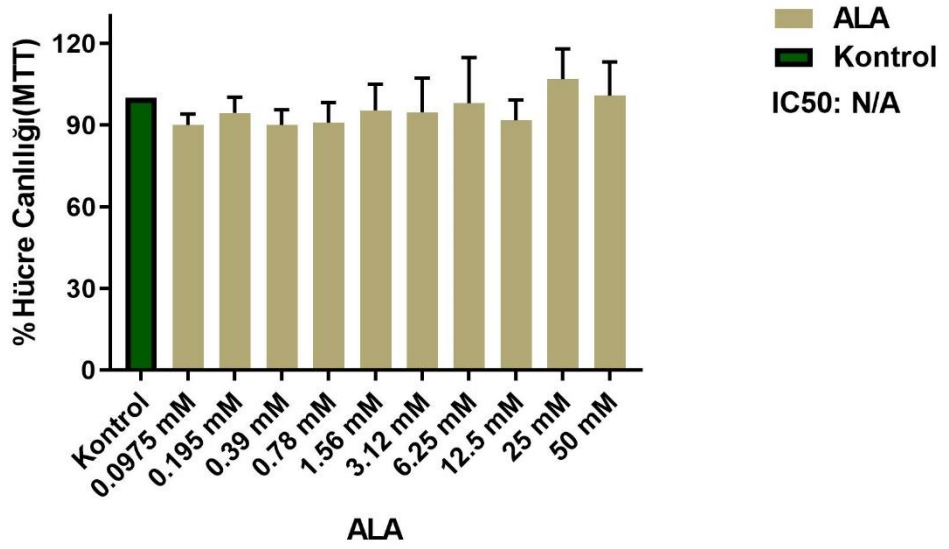
Şekil 62. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



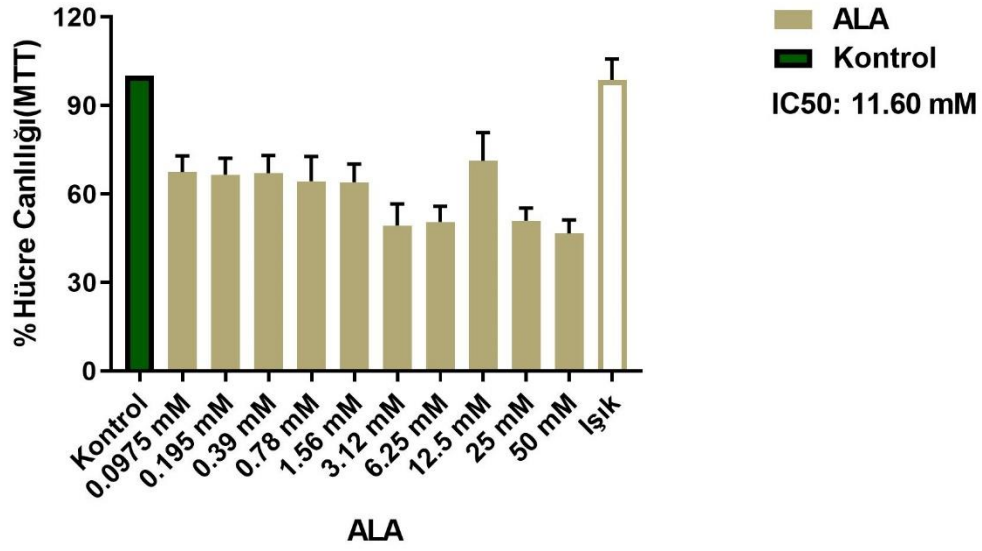
Şekil 63. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattına 24 Saat Boyunca Uygulanan ALA Fotoduyarlı Ajanı'nın Hücre Canlılığına Etkisi

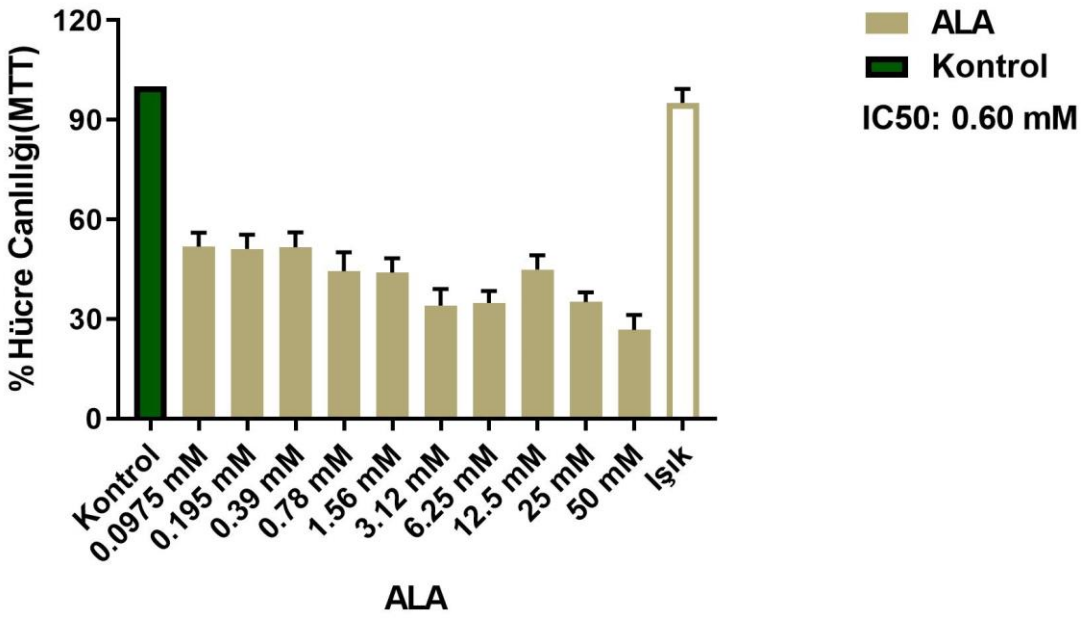
HepG2 hücrelerine 24 saatlik inkübasyon süresinde ve 100 sn, 200 sn ve 300 sn ışıma süreleri ile uyguladığımız ALA fd'nin için hücre canlılığı sonuçları, Şekil 64, 65, 66 ve 67'de gösterilmiştir.



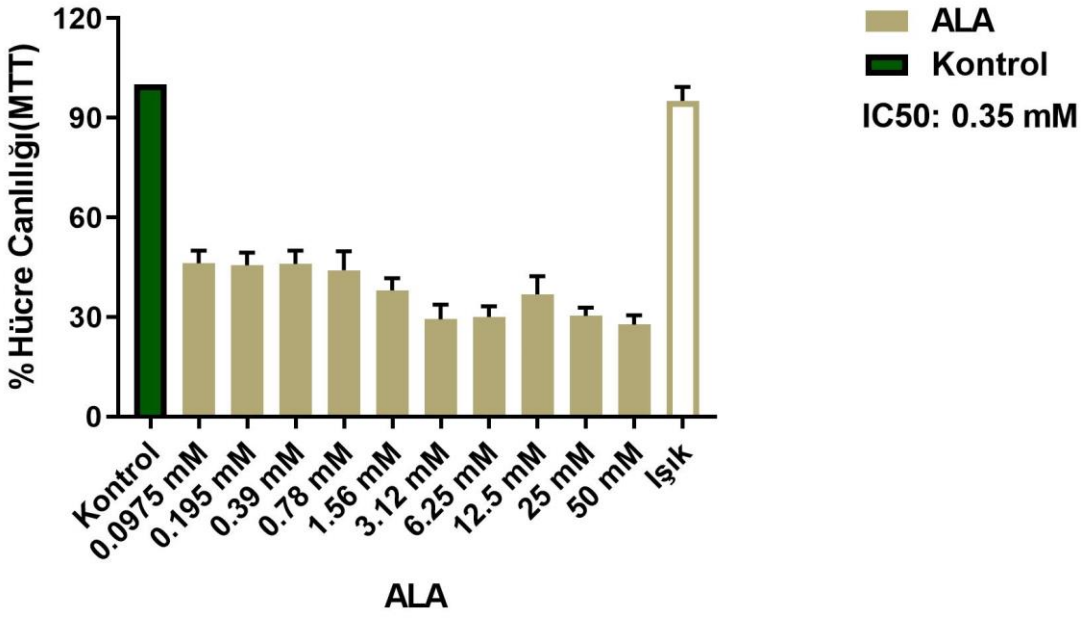
Şekil 64. HepG2 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 65. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



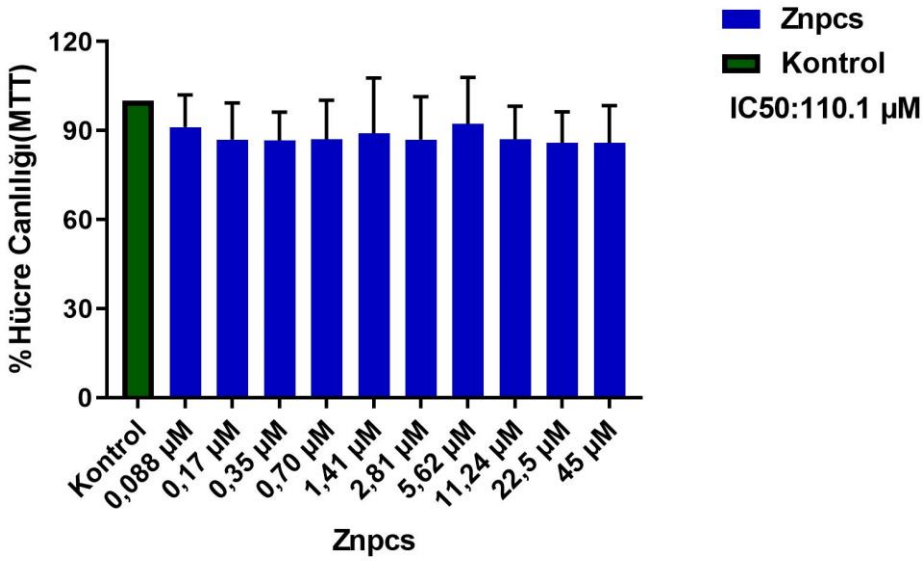
Şekil 66. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



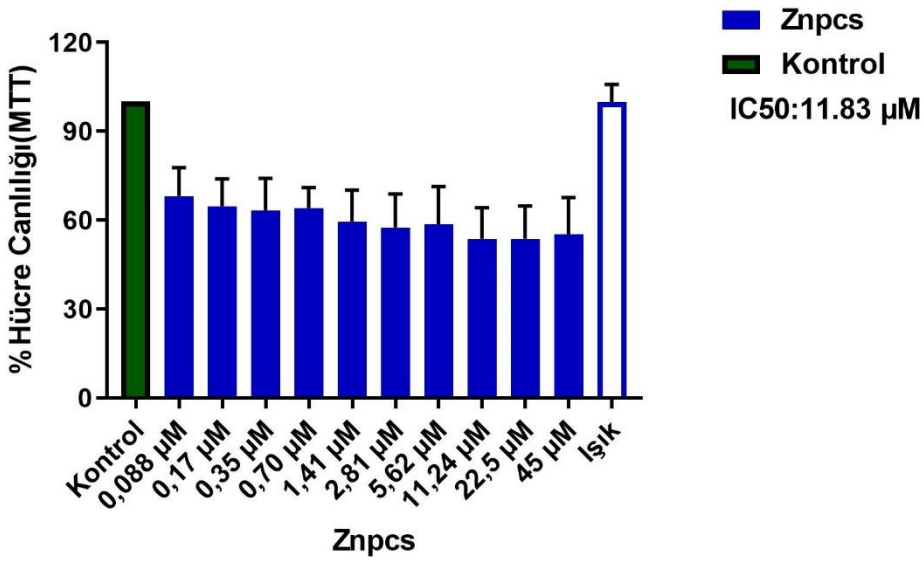
Şekil 67. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattına 24 Saat Boyunca Uygulanan Znpcs Fotoduyarlı Ajanı'nın Hücre Canlılığına Etkisi

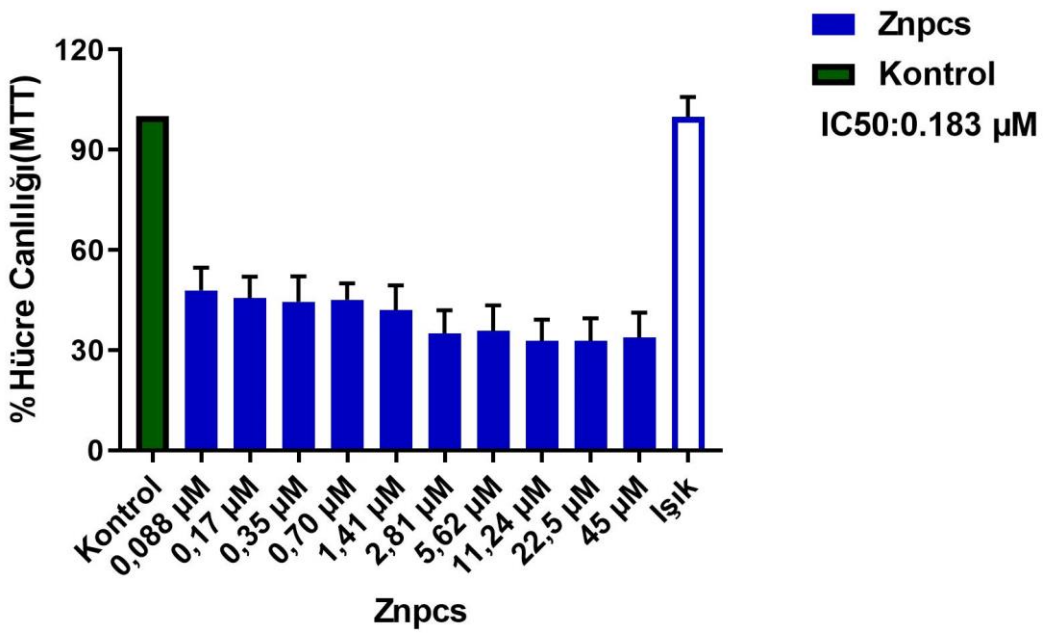
HepG2 hücrelerine 24 saatlik inkübasyon süresinde ve 100 sn, 200 sn ve 300 sn ışıma süreleri ile uyguladığımız Znpcs fd'nin için hücre canlılığı sonuçları, Şekil 68, 69, 70 ve 71'de gösterilmiştir.



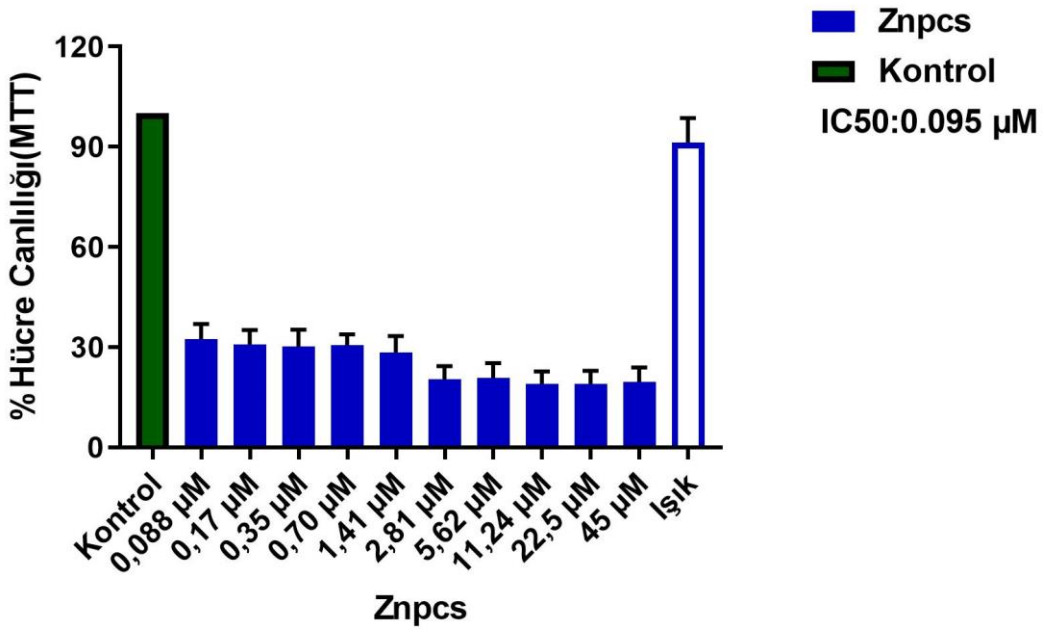
Şekil 68. HepG2 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 69. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



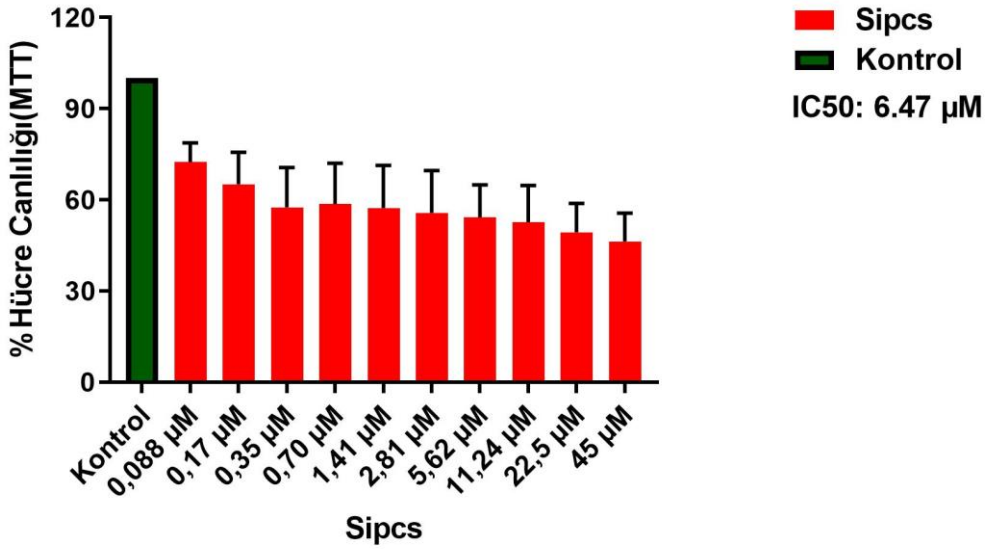
Şekil 70. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



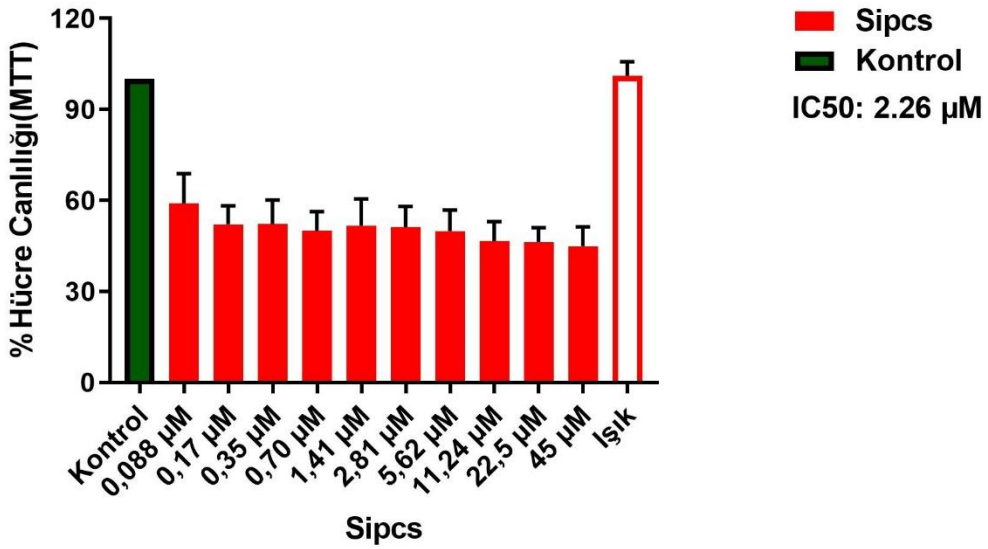
Şekil 71. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattına 24 Saat Boyunca Uygulanan Sipcs Fotoduyarlı Ajanı'nın Hücre Canlılığına Etkisi

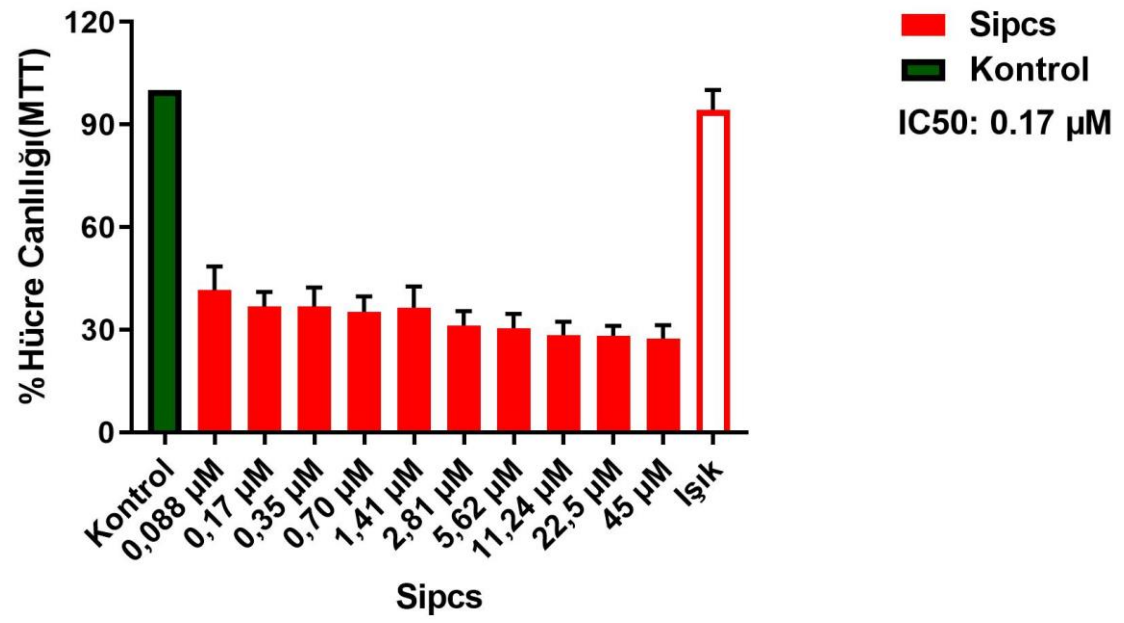
HepG2 hücrelerine 24 saatlik inkübasyon süresinde ve 100 sn, 200 sn ve 300 sn ışıma süreleri ile uyguladığımız Sipcs fd'nin için hücre canlılığı sonuçları, Şekil 72, 73, 74 ve 75'de gösterilmiştir.



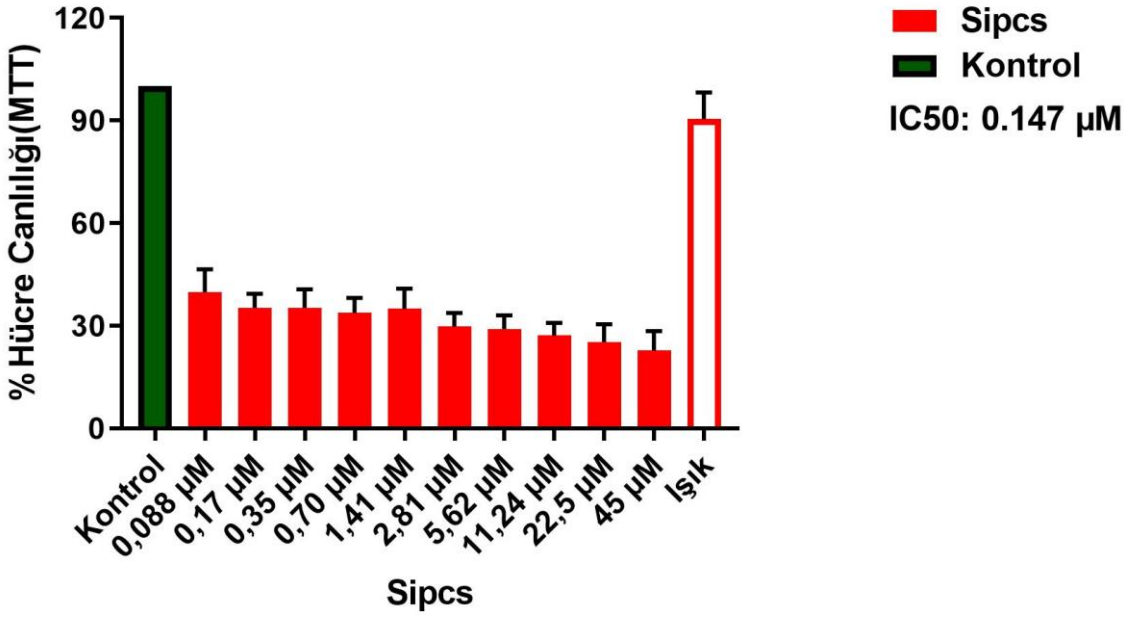
Şekil 72. HepG2 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 73. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



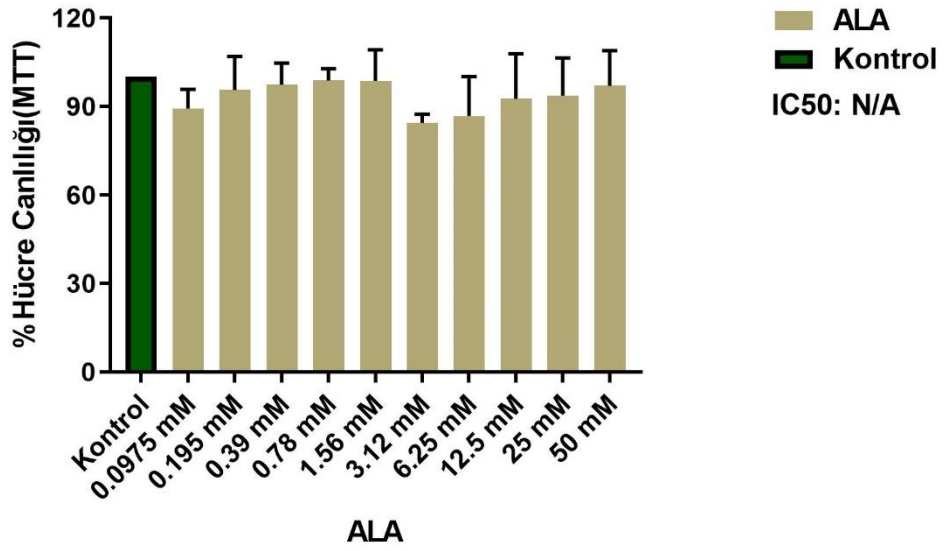
Şekil 74. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



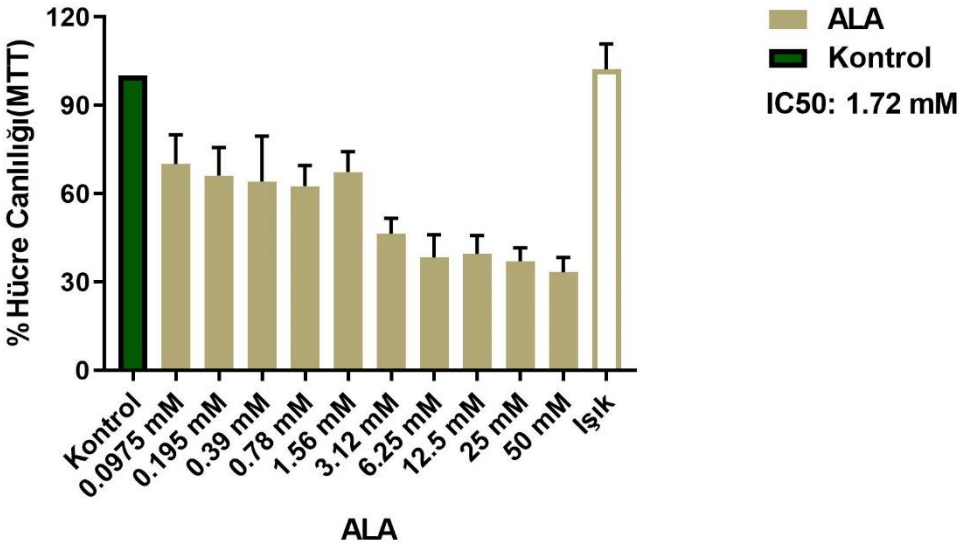
Şekil 75. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattına 48 Saat Boyunca Uygulanan ALA Fotoduyarlı Ajanı'nın Hücre Canlılığına Etkisi

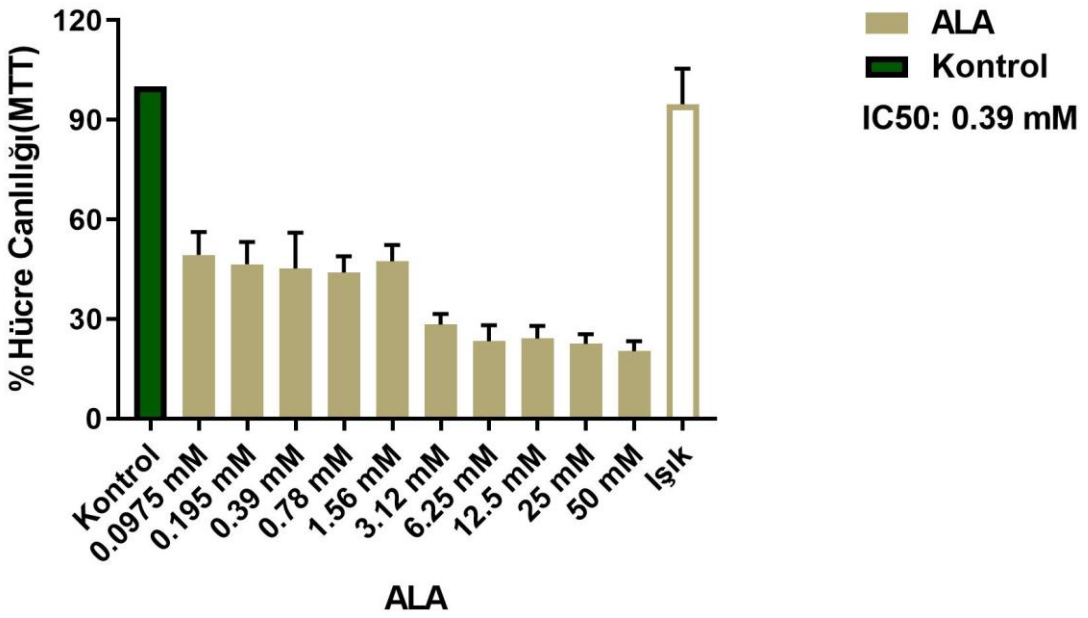
HepG2 hücrelerine 48 saatlik inkübasyon süresinde ve 100 sn, 200 sn ve 300 sn ışıma süreleri ile uyguladığımız ALA fd'nin için hücre canlılığı sonuçları, Şekil 76, 77, 78 ve 79'da gösterilmiştir.



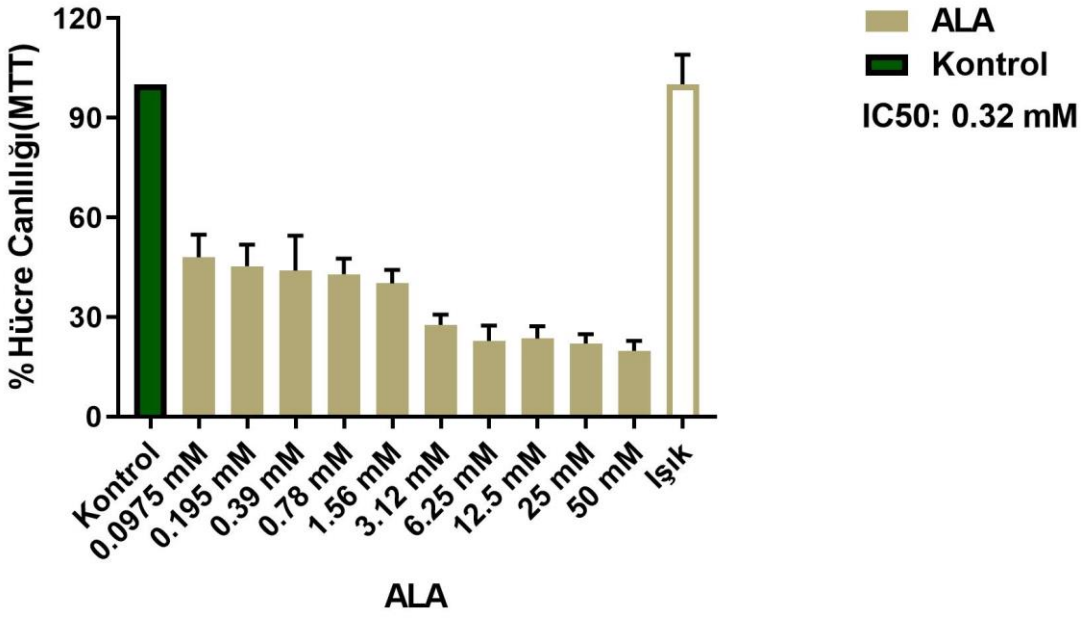
Şekil 76. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 77. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



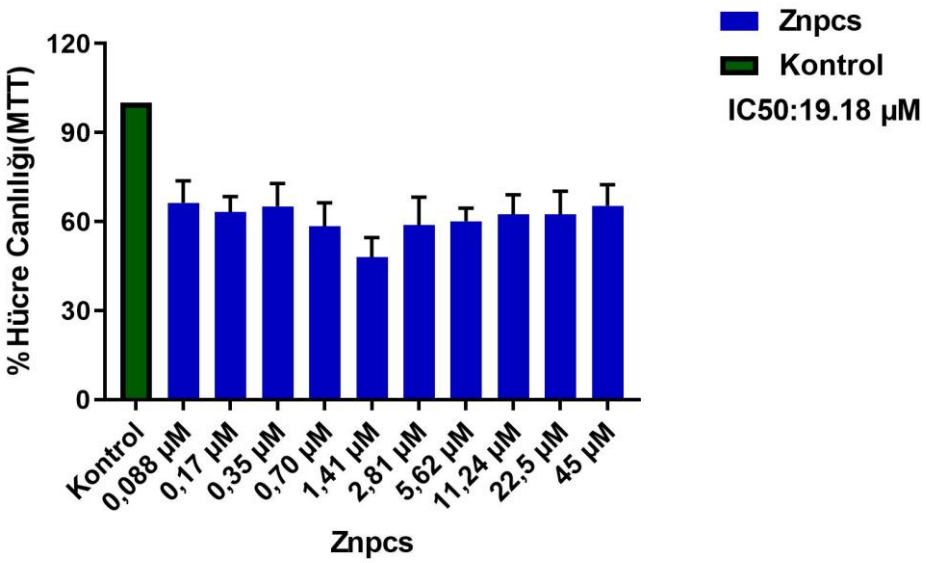
Şekil 78. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



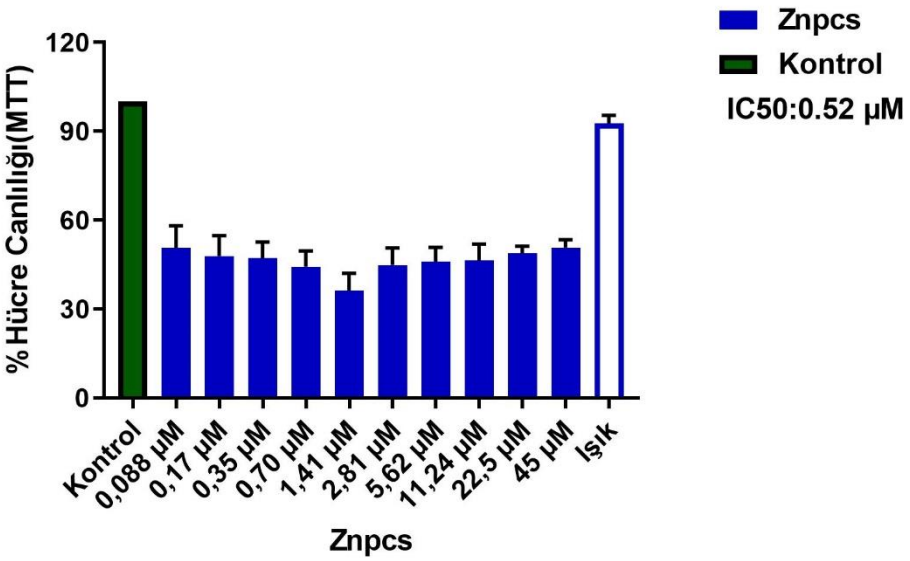
Şekil 79. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattına 48 Saat Boyunca Uygulanan Znpcs Fotoduyarlı Ajanı'nın Hücre Canlılığına Etkisi

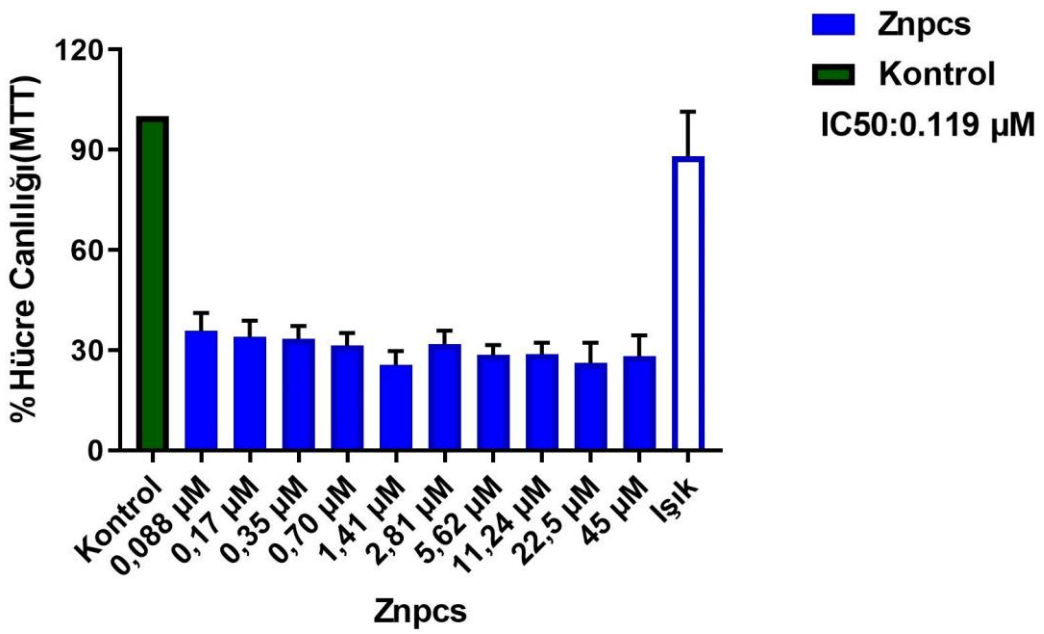
HepG2 hücrelerine 48 saatlik inkübasyon süresinde ve 100 sn, 200 sn ve 300 sn ışıma süreleri ile uyguladığımız Znpcs fd'nin için hücre canlılığı sonuçları, Şekil 80, 81, 82 ve 83'de gösterilmiştir.



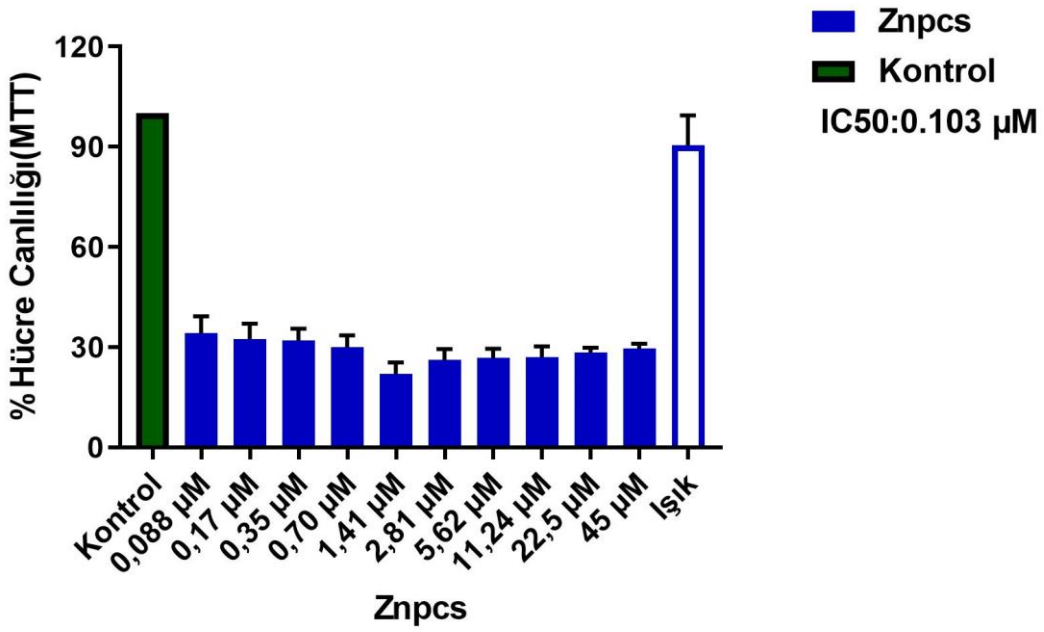
Şekil 80. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 81. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



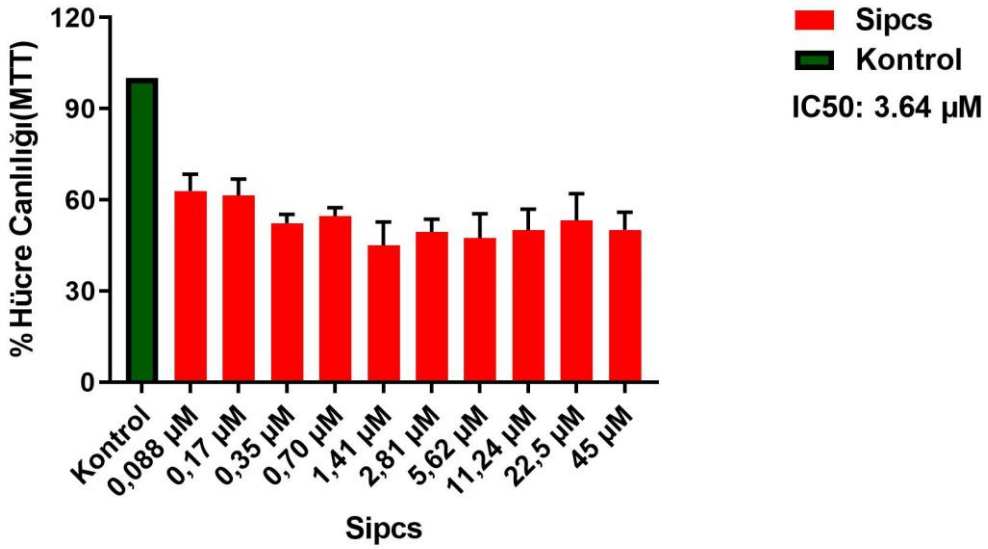
Şekil 82. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



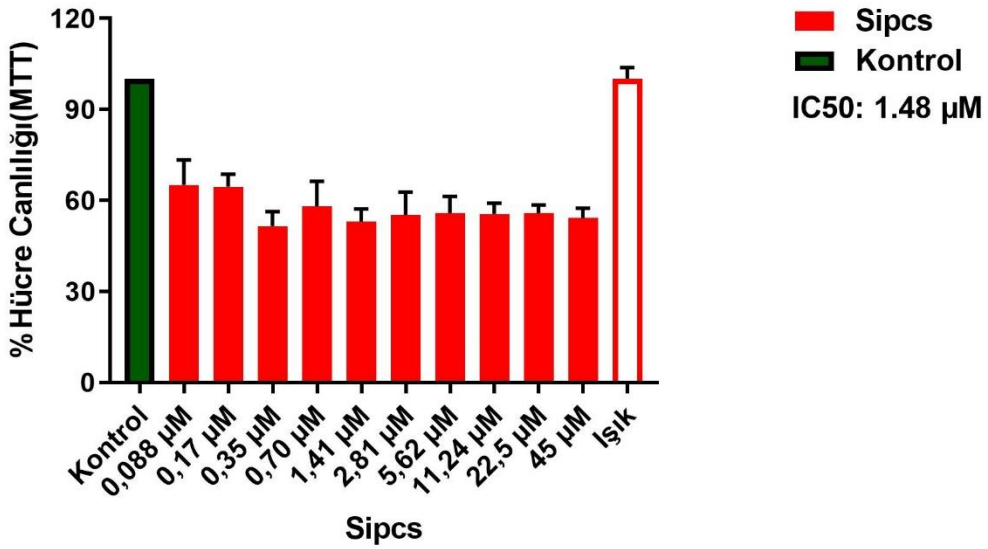
Şekil 83. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattına 48 Saat Boyunca Uygulanan Sipcs Fotoduyarlı Ajanı'nın Hücre Canlılığına Etkisi

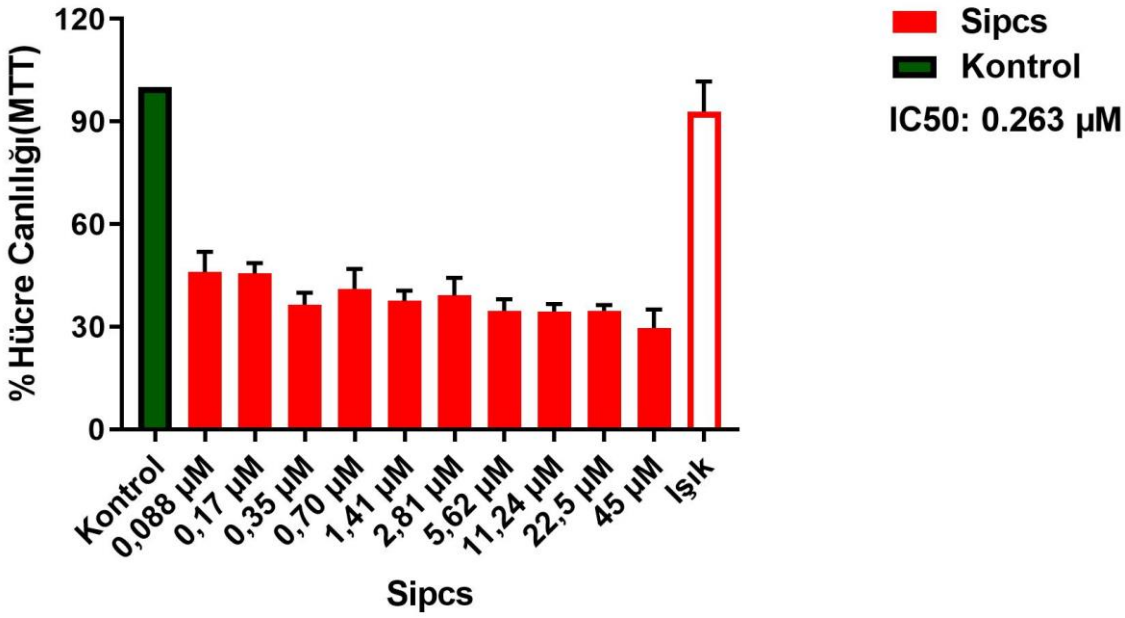
HepG2 hücrelerine 48 saatlik inkübasyon süresinde ve 100 sn, 200 sn ve 300 sn ışıma süreleri ile uyguladığımız Sipcs fd'nin için hücre canlılığı sonuçları, Şekil 84, 85, 86 ve 87'de gösterilmiştir.



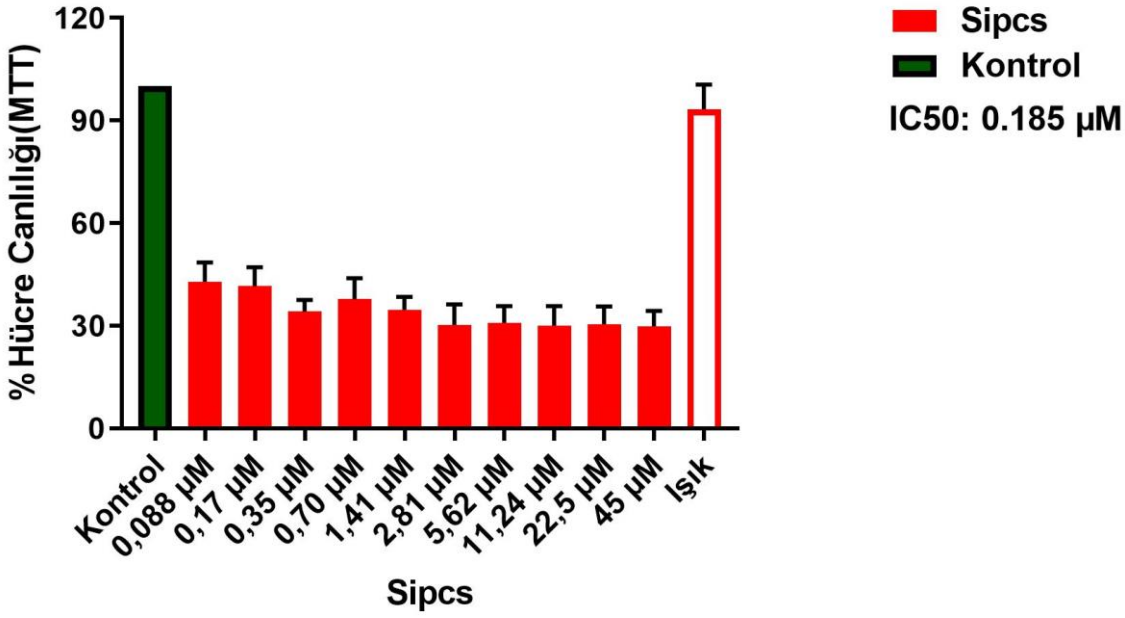
Şekil 84. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 85. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 86. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



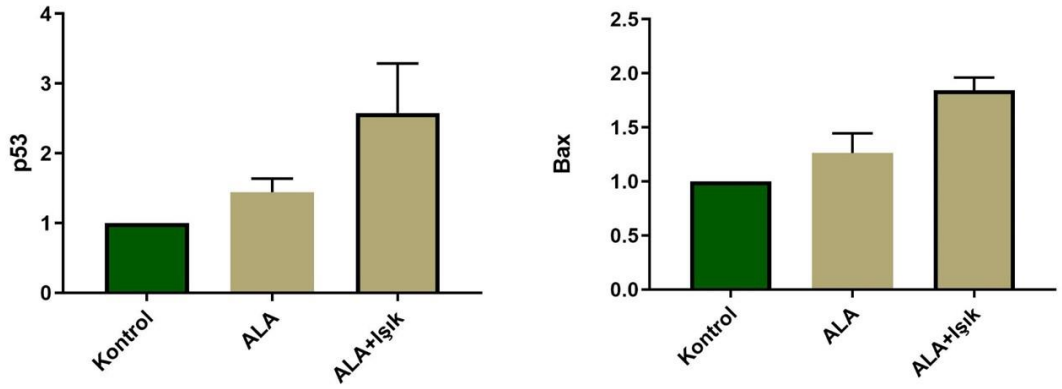
Şekil 87. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

GEN EKSPRESYON SONUÇLARI

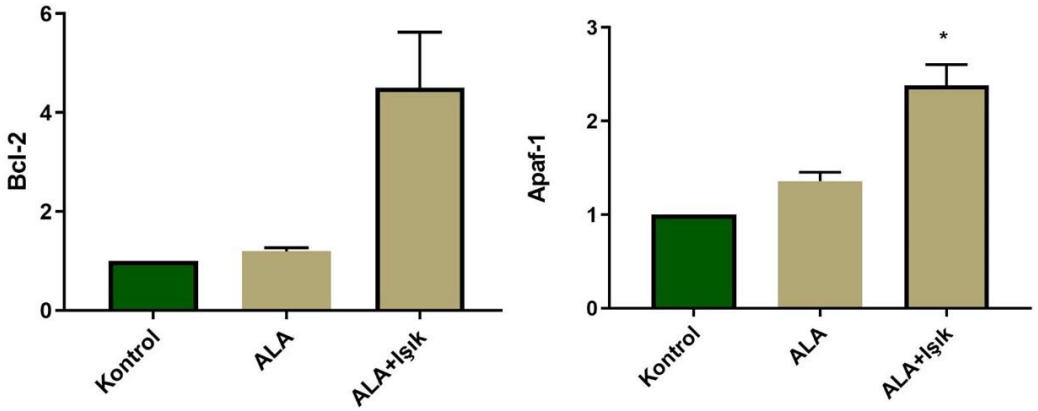
Üç adet fotoduyarlı ajan, MTT testlerinden belirlenen IC50 dozlarında, 48 saat inkübasyon süresi ve 100 sn ışıma dozuna maruz bırakıldı. HepG2 hücre hatlarında p53, Bax, Bcl-2, Apaf-1, Sitokrom c, Kaspaz 3, Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, HO-1, Nrf2, Keap1, Tet1 ve Tet2 genlerin ekspresyonuna kontrol ve deneme grupları olmak üzere ekspresyon analizleri yapılmıştır. Ekspresyon sonuçları GAPDH ve β-aktin referans genleri kullanılarak normalize edilerek belirlenmiştir.

HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattına 48 Saat ve 100 sn Işıma Dozu Boyunca Uygulanan ALA'nın Gen Ekspresyonları

HepG2 hücrelerinde hesaplanan IC50 konsantrasyonunda (ALA:1.72 mM) 48 saat süre ile 100 sn ışıma dozuyla inkübe edildikten sonra, p53 Bax, Bcl-2 ve Apaf-1 gen ekspresyon değerleri Şekil 88 ve 89'da gösterilmiştir.

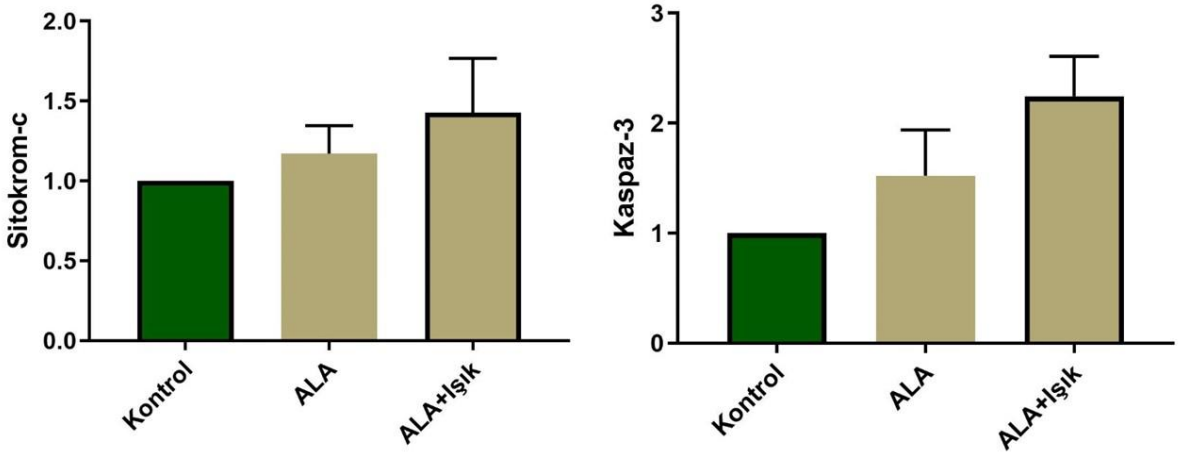


Şekil 88. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın p53 ve Bax ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

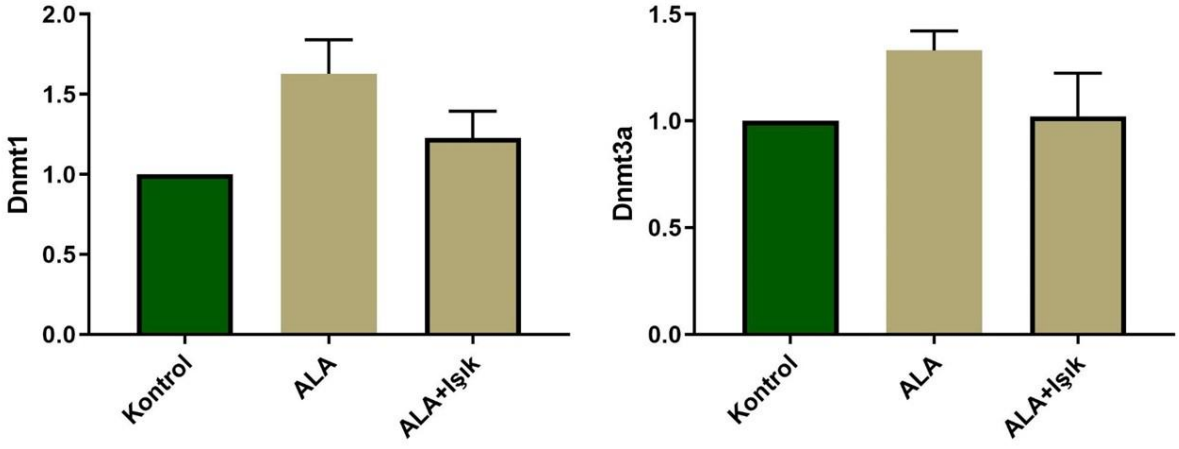


Şekil 89. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Bcl-2 ve Apaf-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 hücrelerinde hesaplanan IC50 konsantrasyonunda (ALA:1.72 mM) 48 saat süre ile 100 sn ışıma dozuyla inkübe edildikten sonra, sitokrom c, kaspaz-3, Dnmt1 ve Dnmt3a gen ekspresyon değerleri Şekil 90 ve 91'de gösterilmiştir.

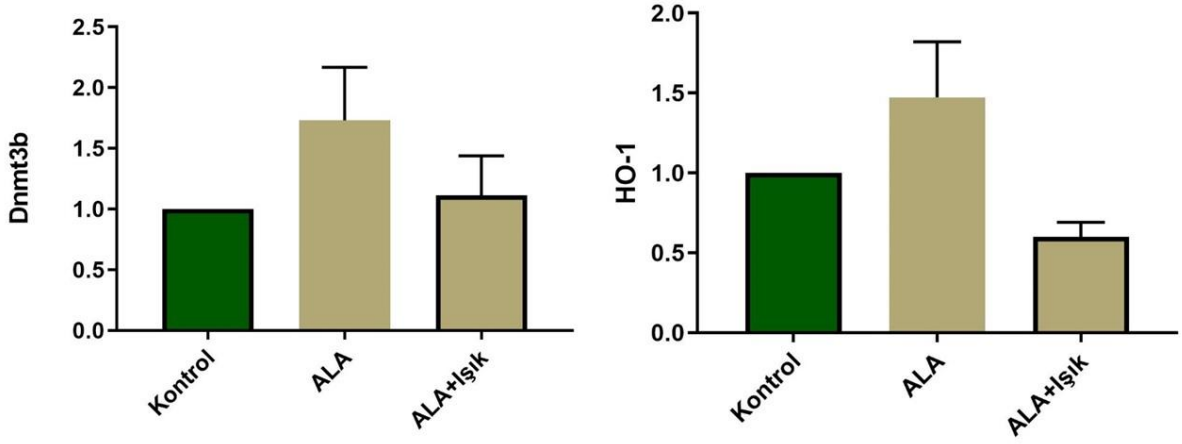


Şekil 90. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Sitokrom-c ve Kaspaz-3 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

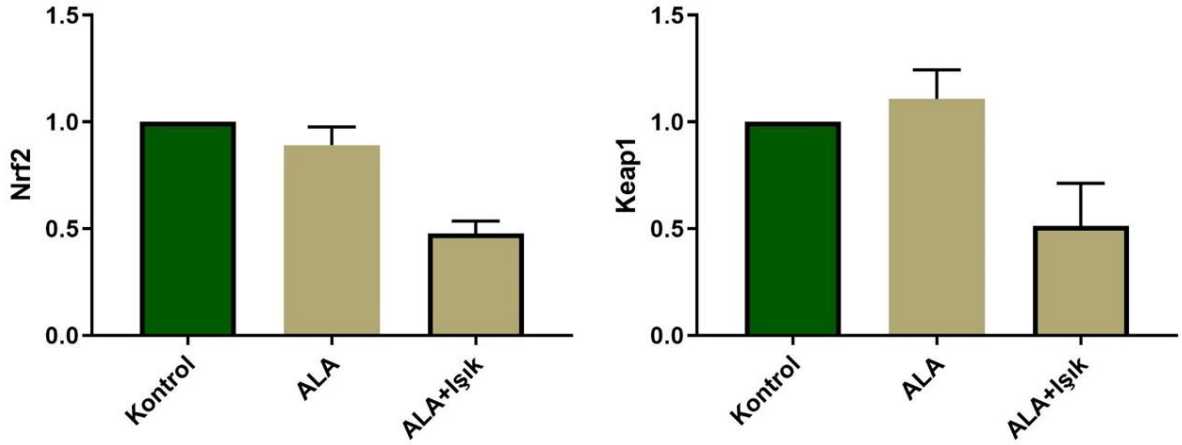


Şekil 91.HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Dnmt1 ve Dnmt3a ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

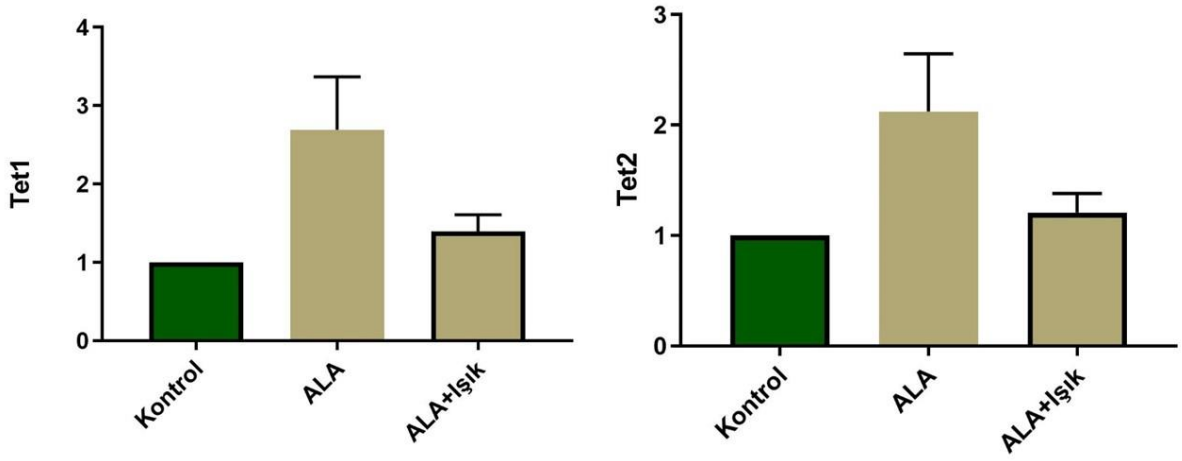
HepG2 hücrelerinde hesaplanan IC50 konsantrasyonunda (ALA:1.72 mM) 48 saat süre ile 100 sn ışıma dozuyla inkübe edildikten sonra, Dnmt3b, HO-1, Nrf2, Keap1, Tet1 ve Tet2 gen ekspresyon değerleri Şekil 92, 93 ve 94'de gösterilmiştir.



Şekil 92. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Dnmt3b ve HO-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)



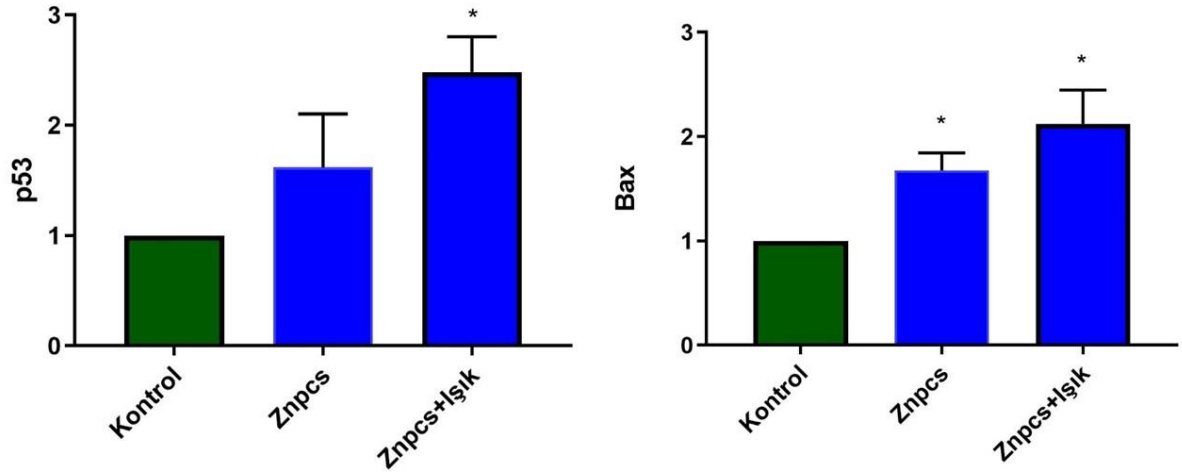
Şekil 93. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Nrf2 ve Keap1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)



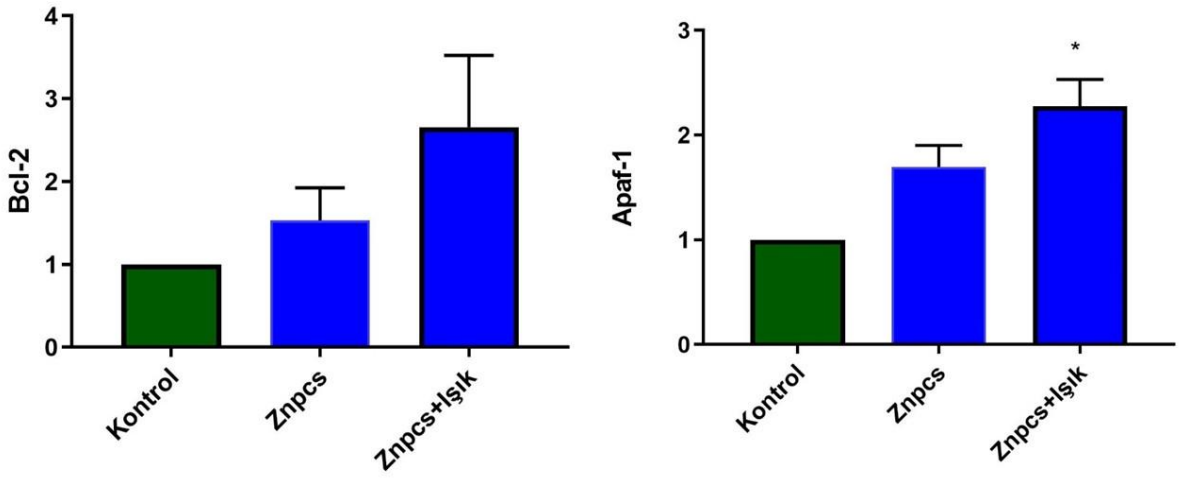
Şekil 94. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Tet1 ve Tet2 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattına 48 Saat ve 100 sn Işıma Dozu Boyunca Uygulanan Zn'nin Gen Ekspresyonları

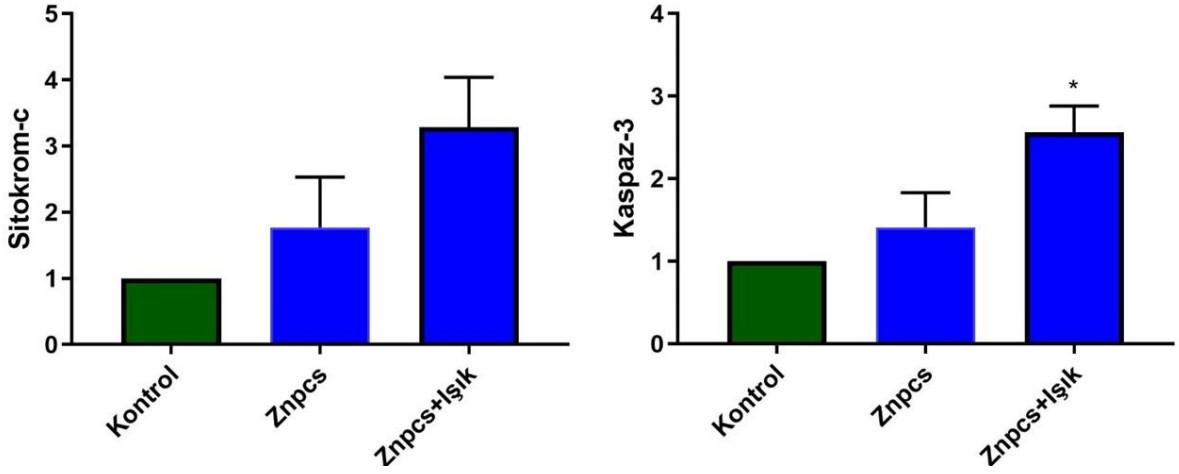
HepG2 hücrelerinde hesaplanan IC50 konsantrasyonunda (Znpcs:0.52 µM) 48 saat süre ile 100 sn ışıma dozuyla inkübe edildikten sonra, p53 Bax, Bcl-2, Apaf-1, sitokrom c ve kaspaz-3 gen ekspresyon değerleri Şekil 95, 96 ve 97'de gösterilmiştir.



Şekil 95. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin p53 ve Bax ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

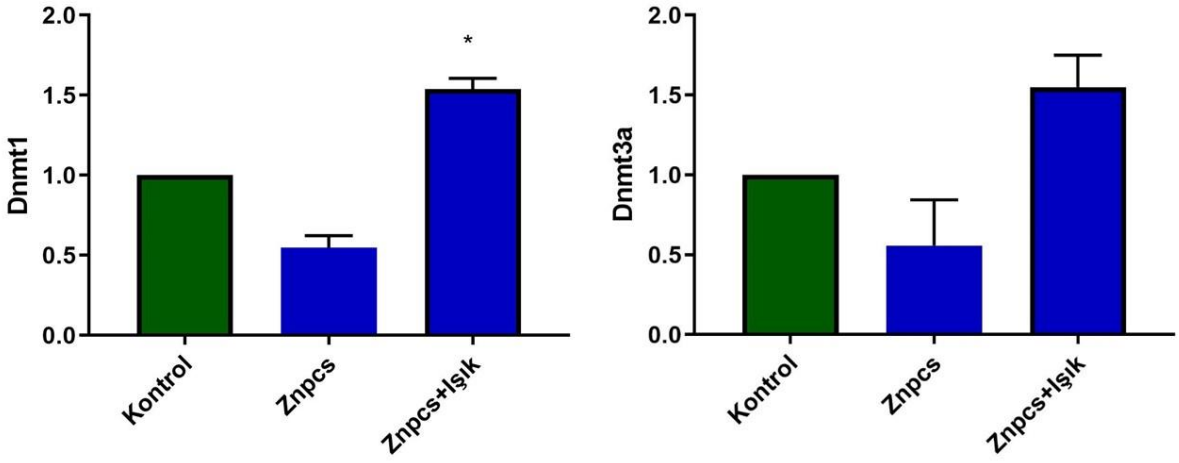


Şekil 96. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Bcl-2 ve Apaf-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

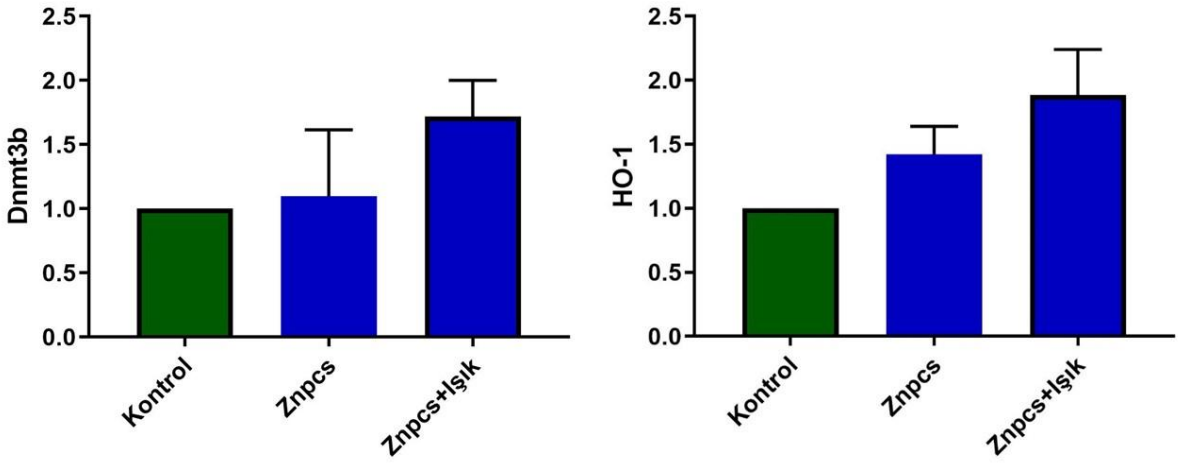


Şekil 97. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Sitokrom-c ve Kaspaz-3 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 hücrelerinde hesaplanan IC50 konsantrasyonunda (Znpcs:0.52 µM) 48 saat süre ile 100 sn ışıma dozuyla inkübe edildikten sonra, Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b ve HO-1 gen ekspresyon değerleri Şekil 98 ve 99'da gösterilmiştir.

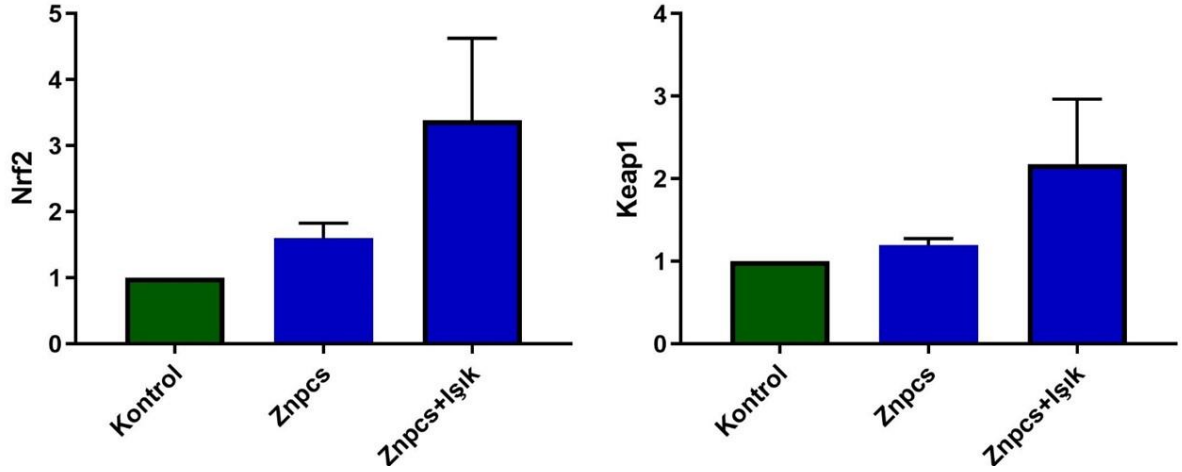


Şekil 98. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Dnmt1 ve Dnmt3a ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

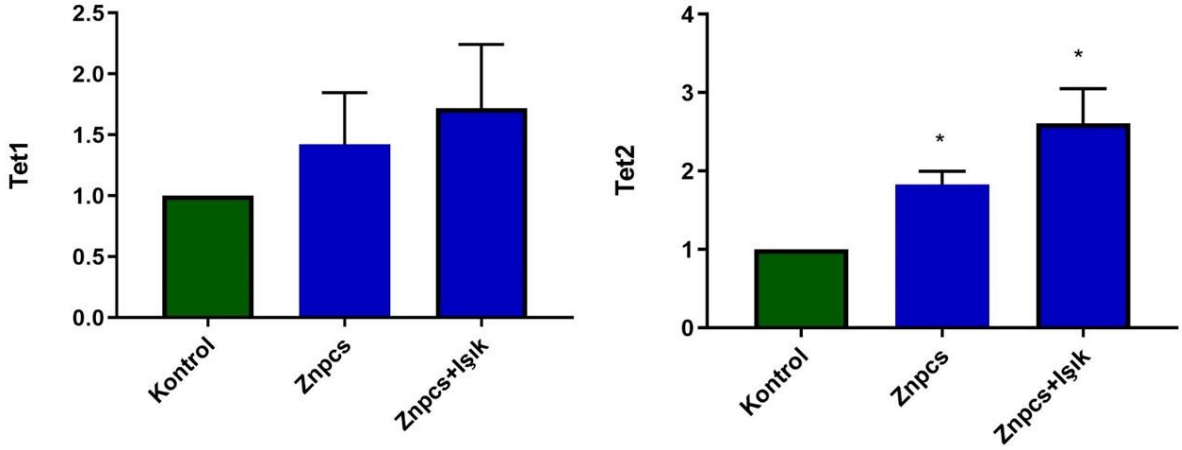


Şekil 99. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Dnmt3b veHO-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 hücrelerinde hesaplanan IC50 konsantrasyonunda (Znpcs:0.52 µM) 48 saat süre ile 100 sn ışıma dozuyla inkübe edildikten sonra, Nrf2, Keap1, Tet1 ve Tet2 gen ekspresyon değerleri Şekil 100 ve 101'de gösterilmiştir.



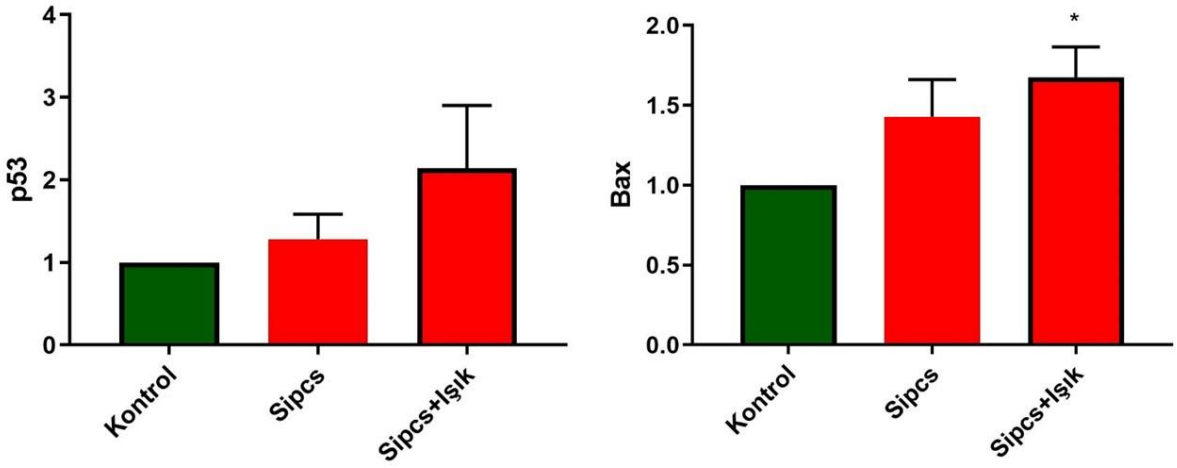
Şekil 100. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Dnmt3b ve HO-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)



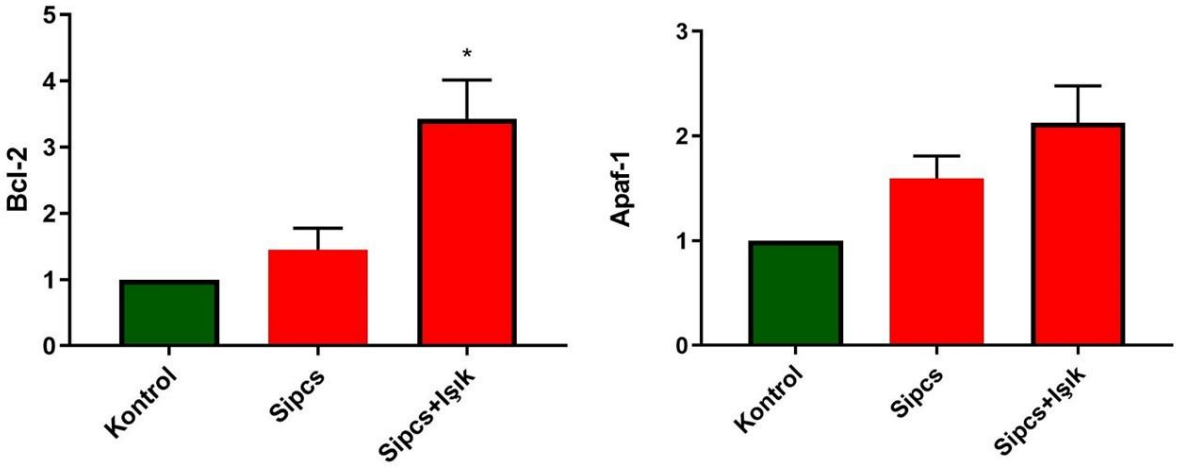
Şekil 101. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Tet1 ve Tet2 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 Karaciğer Kanseri Hücre Hattına 48 Saat ve 100 sn Işıma Dozu Boyunca Uygulanan Si'nin Gen Ekspresyonları

HepG2 hücrelerinde hesaplanan IC50 konsantrasyonunda (Sipcs:1.48 µM) 48 saat süre ile 100 sn ışıma dozuyla inkübe edildikten sonra, p53 Bax, Bcl-2 ve Apaf-1 gen ekspresyon değerleri Şekil 102 ve 103'de gösterilmiştir.

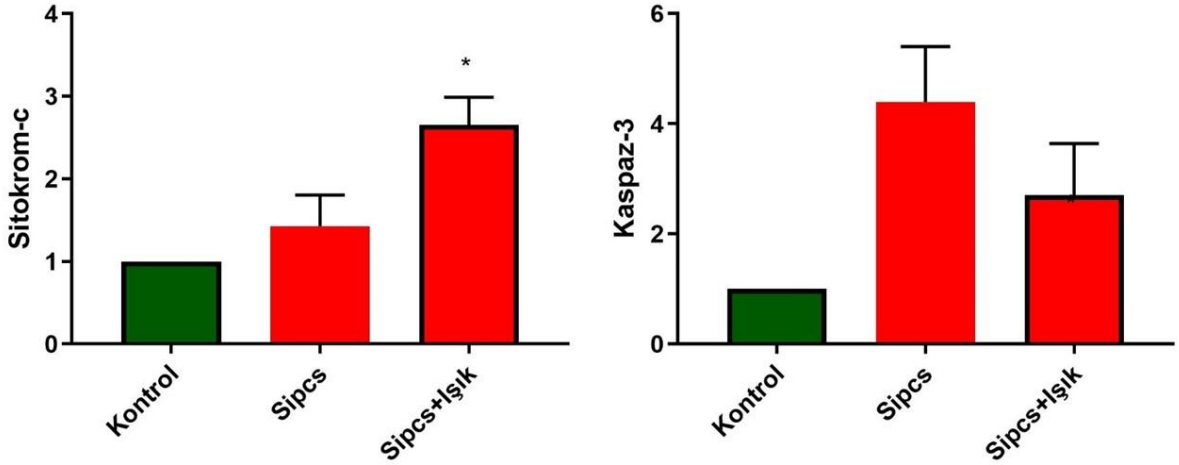


Şekil 102. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin p53 ve Bax ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

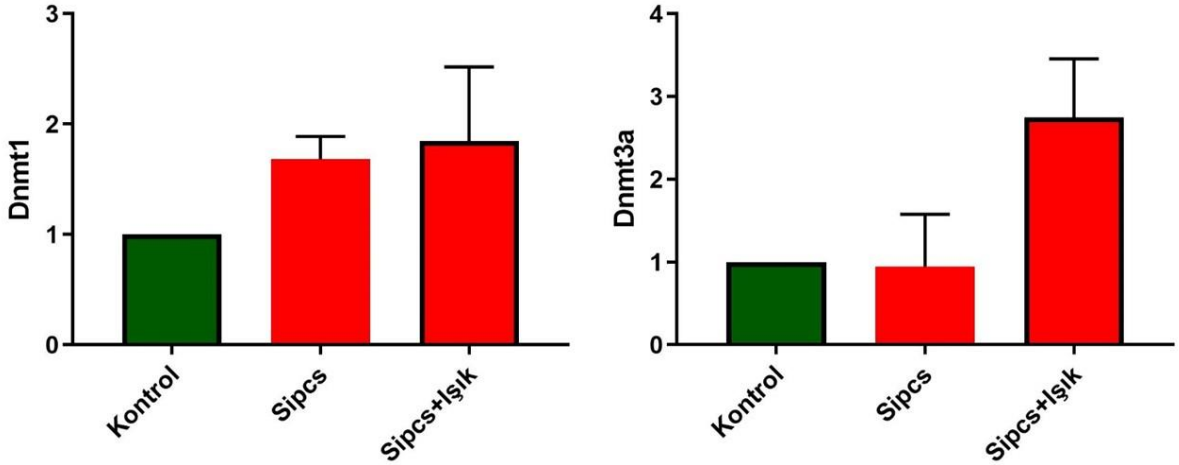


Şekil 103. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Bcl-2 ve Apaf-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 hücrelerinde hesaplanan IC50 konsantrasyonunda (Sipcs:1.48 µM) 48 saat süre ile 100 sn ışıma dozuyla inkübe edildikten sonra, sitokrom-c, kaspaz-3, Dnmt1 ve Dnmt3a gen ekspresyon değerleri Şekil 104 ve 105'de gösterilmiştir.

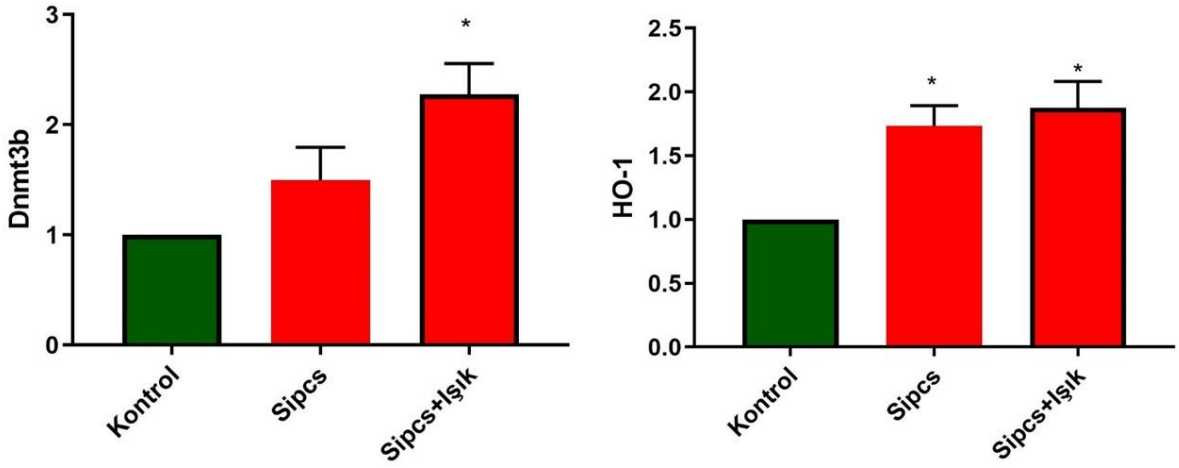


Şekil 104. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Sitokrom-c ve Kaspaz-3 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

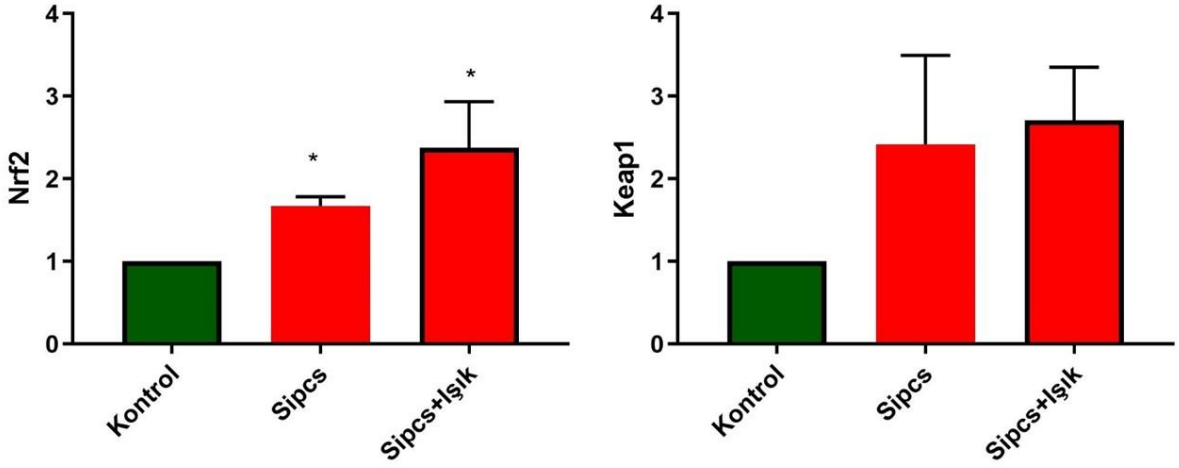


Şekil 105. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Dnmt1 ve Dnmt3a ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

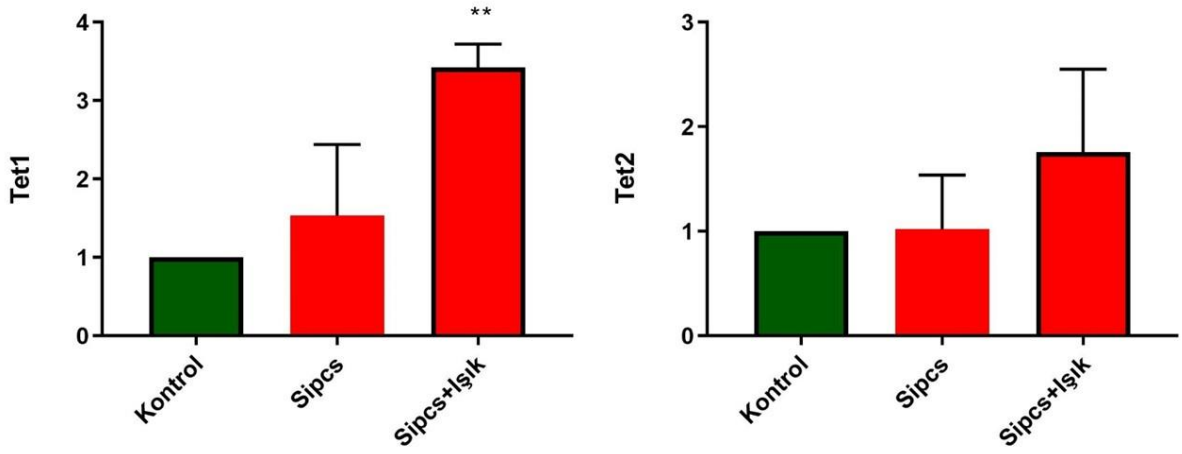
HepG2 hücrelerinde hesaplanan IC50 konsantrasyonunda (Sipcs:1.48 µM) 48 saat süre ile 100 sn ışıma dozuyla inkübe edildikten sonra, Dnmt3b, HO-1, Nrf2, Keap1, Tet1 ve Tet2 gen ekspresyon değerleri Şekil 106, 107 ve 108'de gösterilmiştir.



Şekil 106. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Dnmt3b ve HO-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)



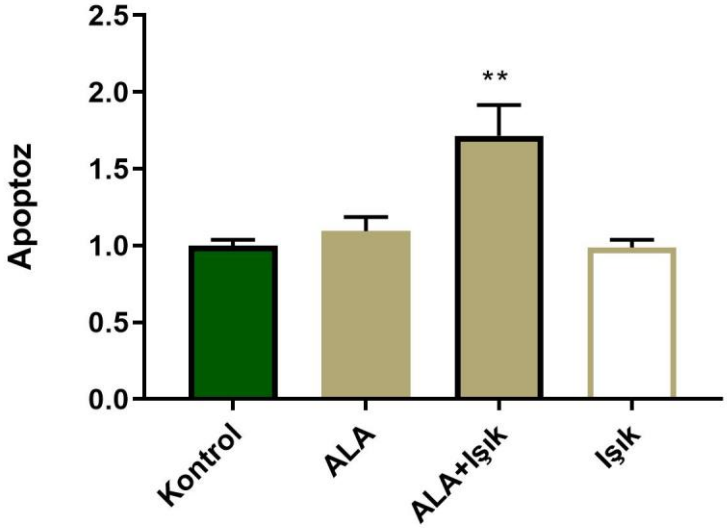
Şekil 107. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Nrf2 ve Keap1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)



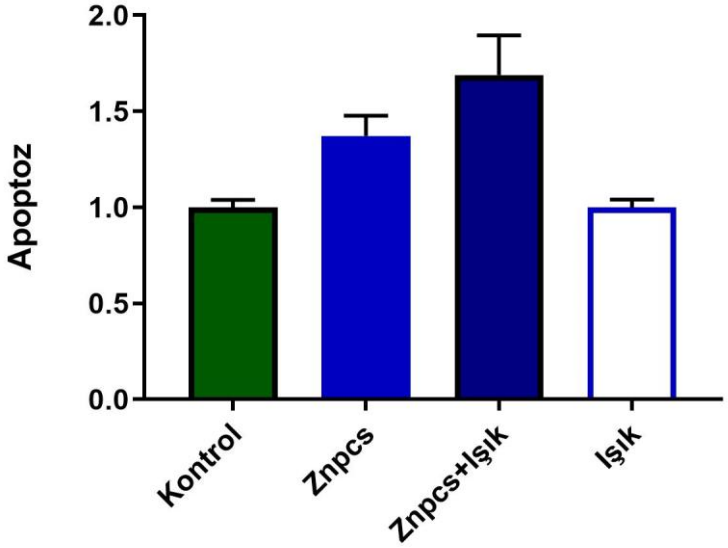
Şekil 108.HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Tet1 ve Tet2 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 Hücrelerinde 48 Saat ve 100 sn Işık ile İnkübasyon Sonrasında Fotoduyarlı Ajanların Apoptozis Üzerine Etkileri

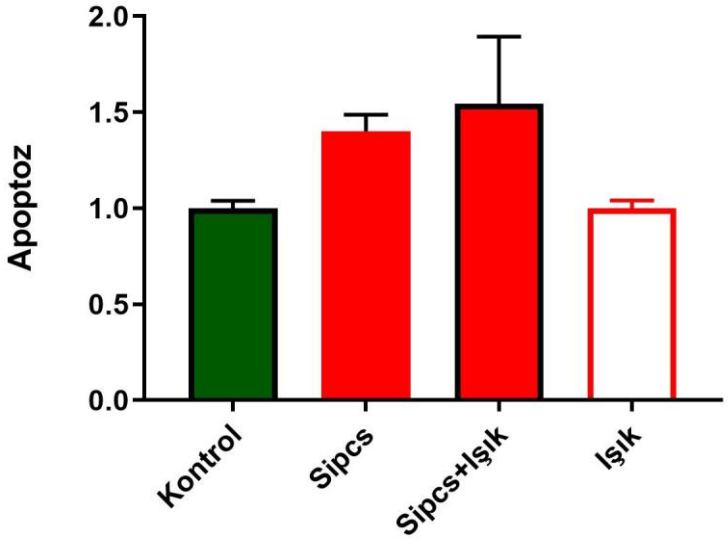
Üç adet fotoduyarlı ajanın 48 saat uygulaması sonucu apoptozis değerleri Şekil 109, 110 ve 111'de her bir fd için gösterilmiştir. Uygulanan maddelerin tümünün hücreleri apoptoza götürdüğü gözlenmiştir. ALA uyguladığımız hücreler diğer iki maddeye göre karşılaştırdığımızda ise daha fazla hücrenin apoptoza uğradığını gözlemledik. Karşılaştırmaların tümü kontrol grubuna göre yapılmıştır.



Şekil 109. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın apoptoz üzerine etkileri (ortalama±SD)



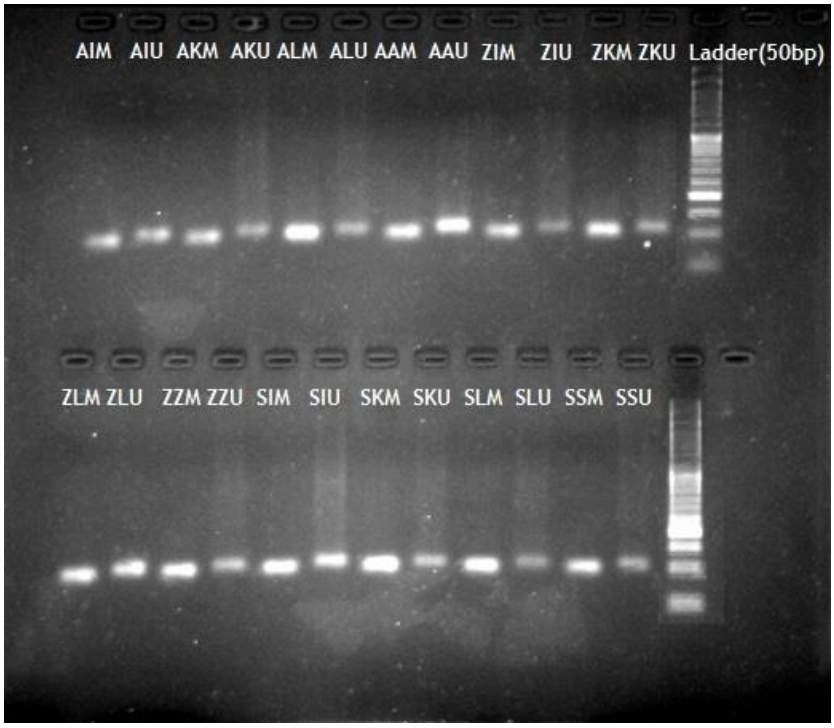
Şekil 110. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin apoptoz üzerine etkileri (ortalama±SD)



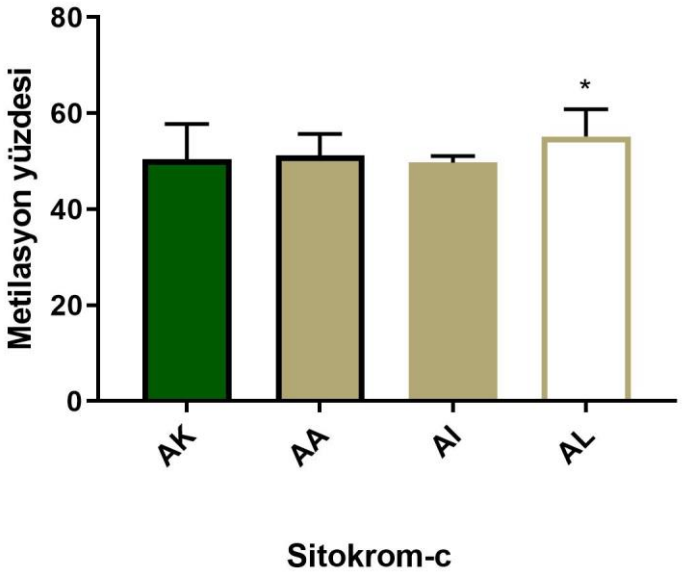
Şekil 111. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin apoptoz üzerine etkileri (ortalama±SD)

HepG2 Hücrelerinde 48 Saat Sonucunda Metilasyon Değişim Değerlerinin ALA'nın Etkileri

Uygulanan ALA fd'nin HepG2 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonunda 48 saat süre ile 100 sn ışık ile maruz bırakılarak inkübe edildikten sonra, sitokrom c'nin metilasyon (131bp) ve anmetilasyon (134bp) değişim değerleri Şekil 112 ve 113'de gösterilmiştir. Uygulanan ALA'nın Sitokrom-c, Nrrf2 ve Keap1 metilasyonlarına hem göreceli bant yoğunluğundan metilasyon yüzdeleri hesaplanmış hem de jel elektroforez görüntüleri aşağıda gösterilmiştir. Burada, M ifadesi metile, U ifadesi ise metile olmamayı ifade eder. AA; sadece ALA kullanılan, AI; ALA ve ışığın beraber kullanılan, AK; kontrol grubunu ve AL; sadece ışık kullanılan grubu temsil eder.

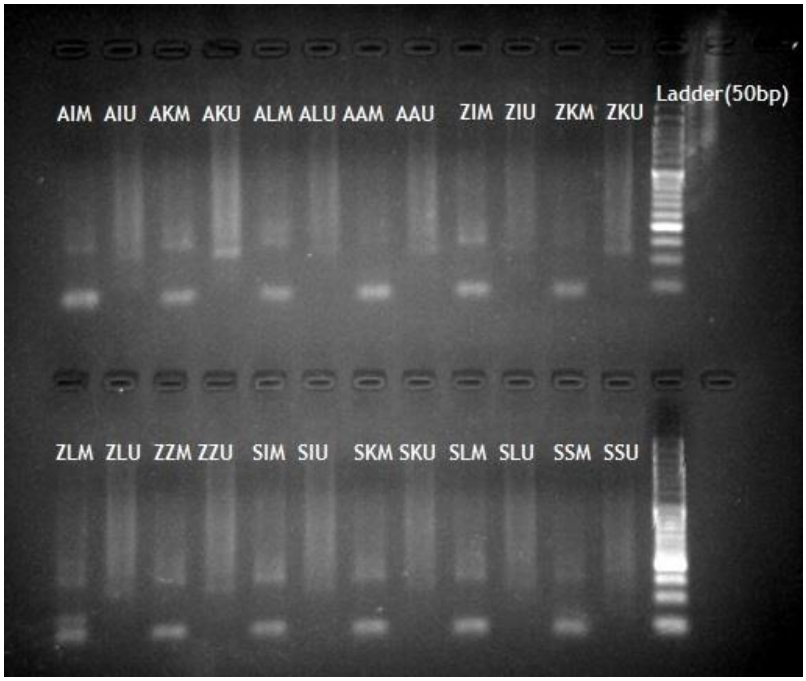


Şekil 112. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Sitokrom-c metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü

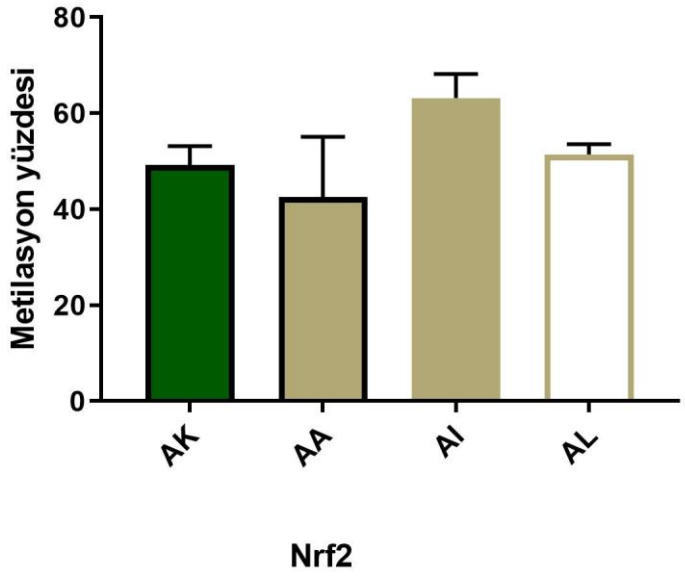


Şekil 113. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Sitokrom-c metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD)

Uygulanan ALA fd'nin HepG2 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonunda 48 saat süre ile 100 sn ışık ile maruz bırakılarak inkübe edildikten sonra, Nrf2'nin metilasyon (134bp) ve anmetilasyon (134bp) değişim değerleri Şekil 114 ve 115'de gösterilmiştir.

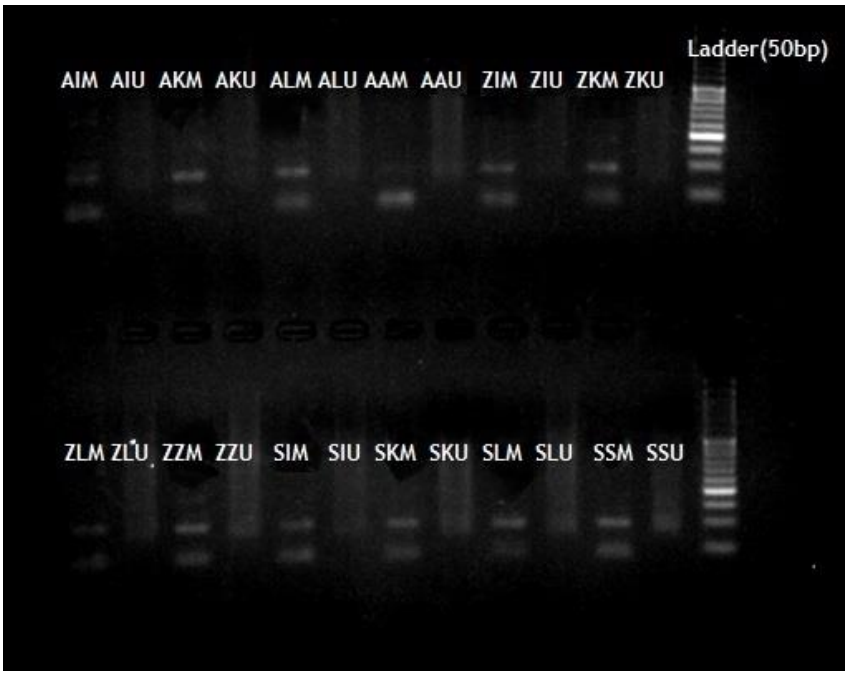


Şekil 114.HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Nrf2 metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü

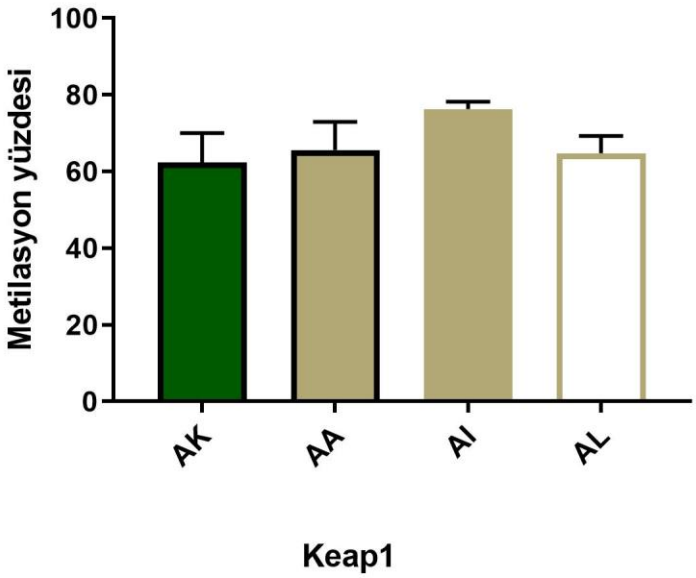


Şekil 115. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Nrf2 metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD)

Uygulanan ALA fd'nin HepG2 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonunda 48 saat süre ile 100 sn ışık ile maruz bırakılarak inkübe edildikten sonra, Keap1'in metilasyon (95bp) ve anmetilasyon (93bp) değişim değerleri Şekil 116 ve 117'de gösterilmiştir.



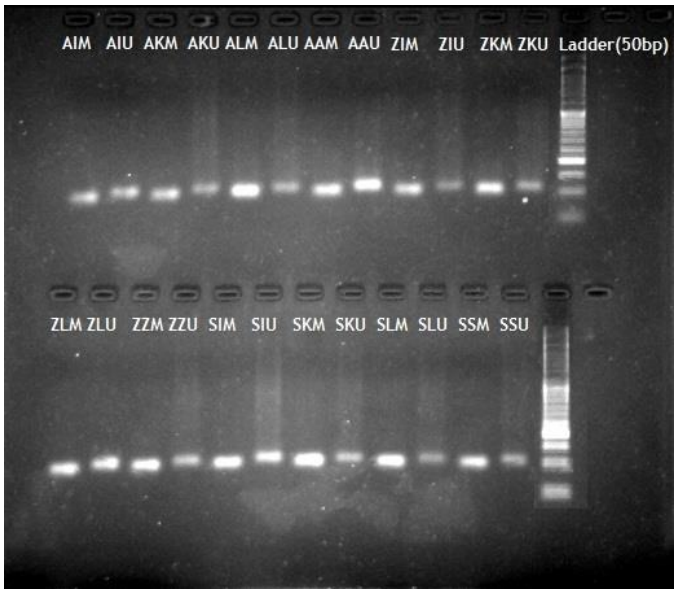
Şekil 116. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Keap1 metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü



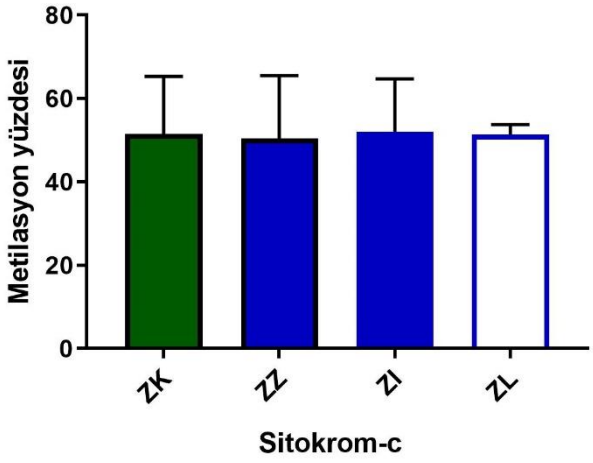
Şekil 117. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Keap1 metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD)

HepG2 Hücrelerinde 48 Saat Sonucunda Metilasyon Değişim Değerlerinin Zn'nin Etkileri

Uygulanan Zn fd'nin HepG2 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonunda 48 saat süre ile 100 sn ışık ile maruz bırakılarak inkübe edildikten sonra, sitokrom-c'nin metilasyon ve anmetilasyon değişim değerleri Şekil 118 ve 119'de gösterilmiştir. ZZ; sadece Zn kullanılan, ZI; Zn ve ışığın beraber kullanılan, ZK; kontrol grubunu ve ZL; sadece ışık kullanılan grubu temsil eder. Uygulanan Zn'nin sitokrom c, Nrrf2 ve Keap1 metilasyonlarına hem göreceli bant yoğunluğundan metilasyon yüzdeleri hesaplanmış hem de jel elektroforez görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

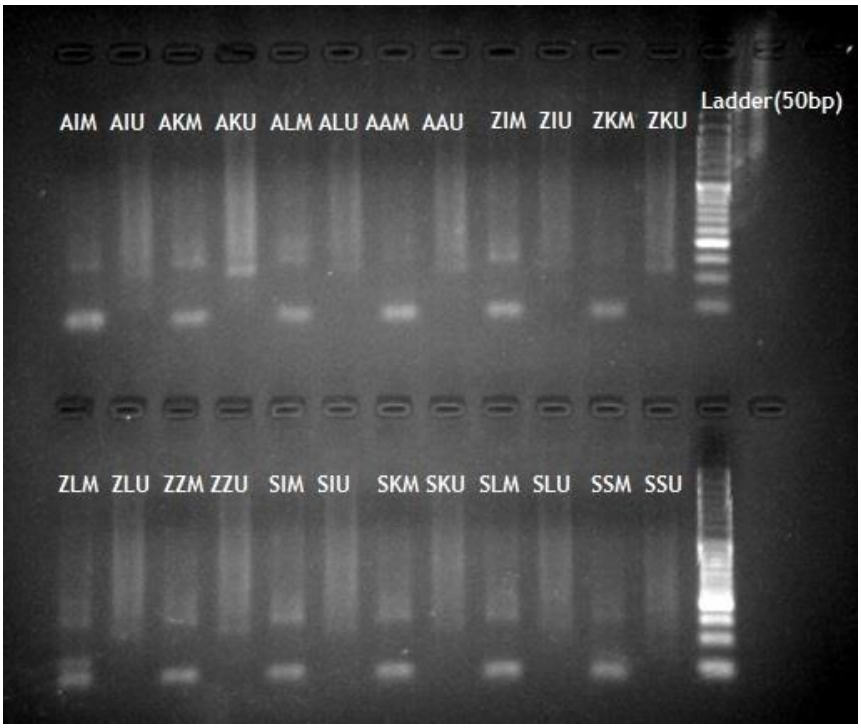


Şekil 118. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Sitokrom-c metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü

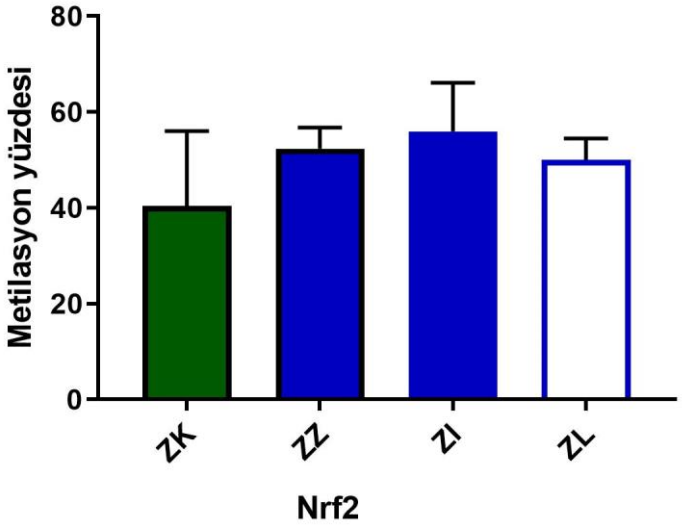


Şekil 119. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Sitokrom-c metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD)

Uygulanan Zn fd'nin HepG2 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonunda 48 saat süre ile 100 sn ışık ile maruz bırakılarak inkübe edildikten sonra, Nrf2'nin metilasyon ve anmetilasyon değişim değerleri Şekil 120 ve 121'de gösterilmiştir.

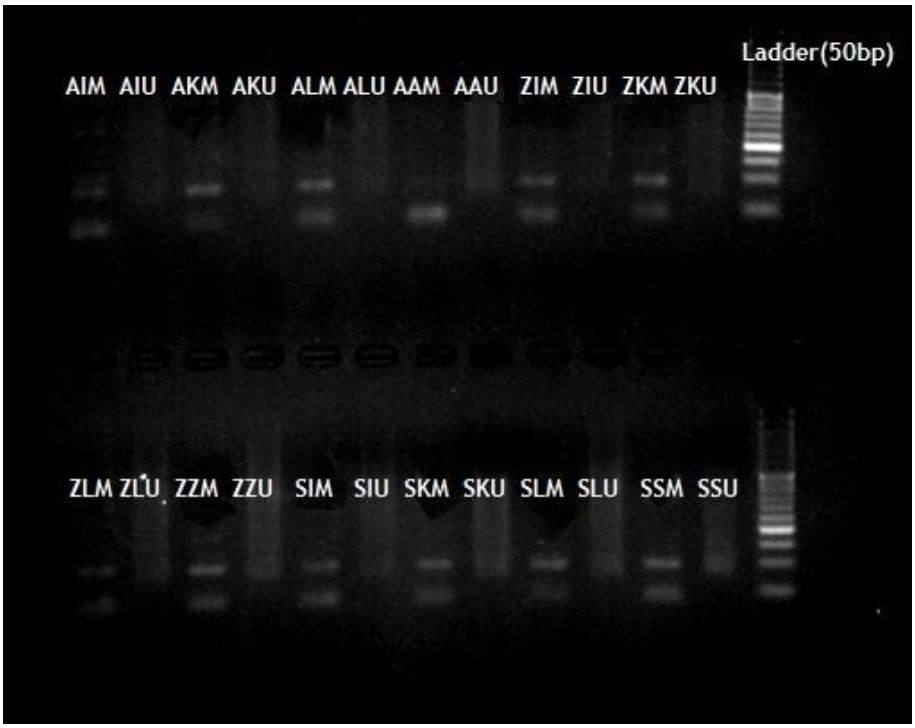


Şekil 120. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Nrf2 metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü

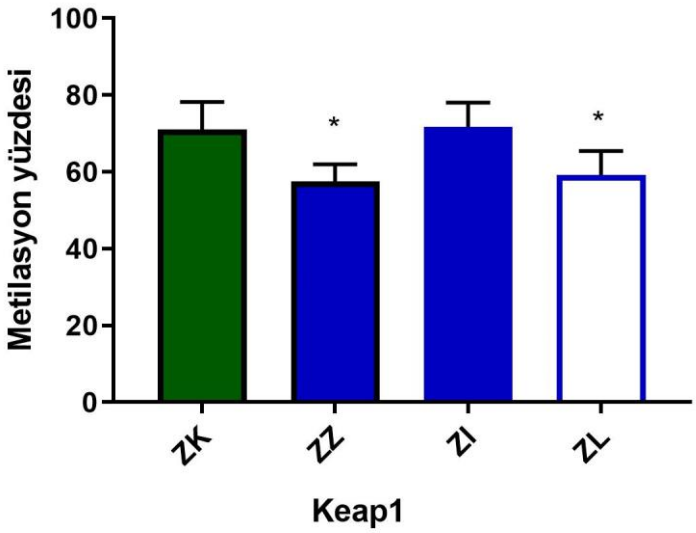


Şekil 121. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Sitokrom-c metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD)

Uygulanan Zn fd'nin HepG2 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonunda 48 saat süre ile 100 sn ışık ile maruz bırakılarak inkübe edildikten sonra, Keap1'in metilasyon ve anmetilasyon değişim değerleri Şekil 122 ve 123'de gösterilmiştir.



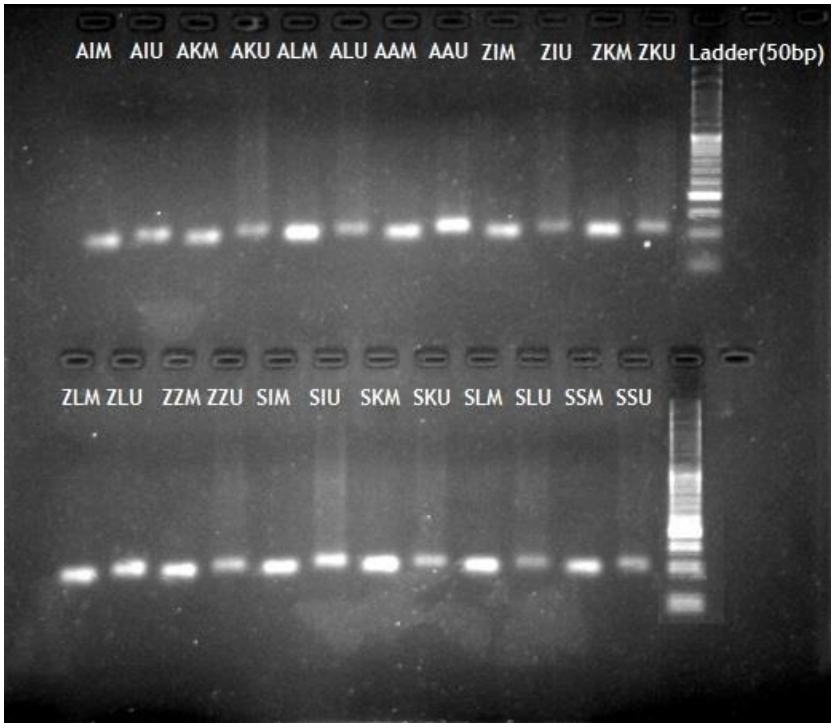
Şekil 122. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Keap1 metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü



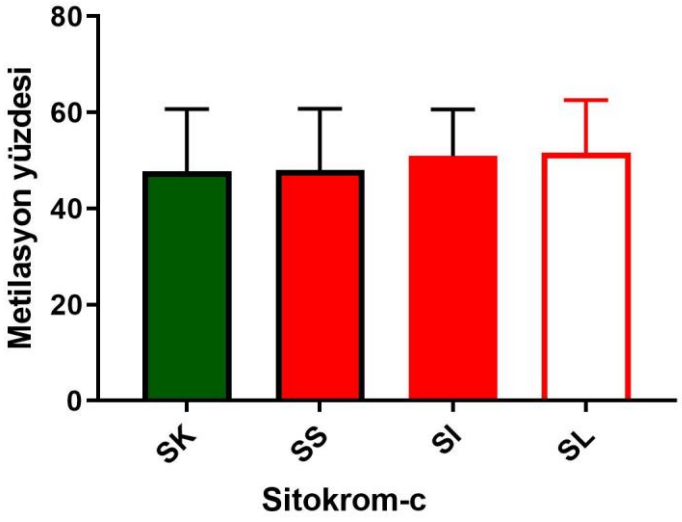
Şekil 123. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Keap1 metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD)

HepG2 Hücrelerinde 48 Saat Sonucunda Metilasyon Değişim Değerlerinin Si'nin Etkileri

Uygulanan Si fd'nin HepG2 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonunda 48 saat süre ile 100 sn ışık ile maruz bırakılarak inkübe edildikten sonra, sitokrom-c'nin metilasyon ve anmetilasyon değişim değerleri Şekil 124 ve 125'de gösterilmiştir. SS; sadece Si kullanılan, SI; Si ve ışığın beraber kullanılan, SK; kontrol grubunu ve SL; sadece ışık kullanılan grubu temsil eder. Uygulanan Si'nin sitokrom c, Nrrf2 ve Keap1 metilasyonlarına hem göreceli bant yoğunluğundan metilasyon yüzdeleri hesaplanmış hem de jel elektroforez görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

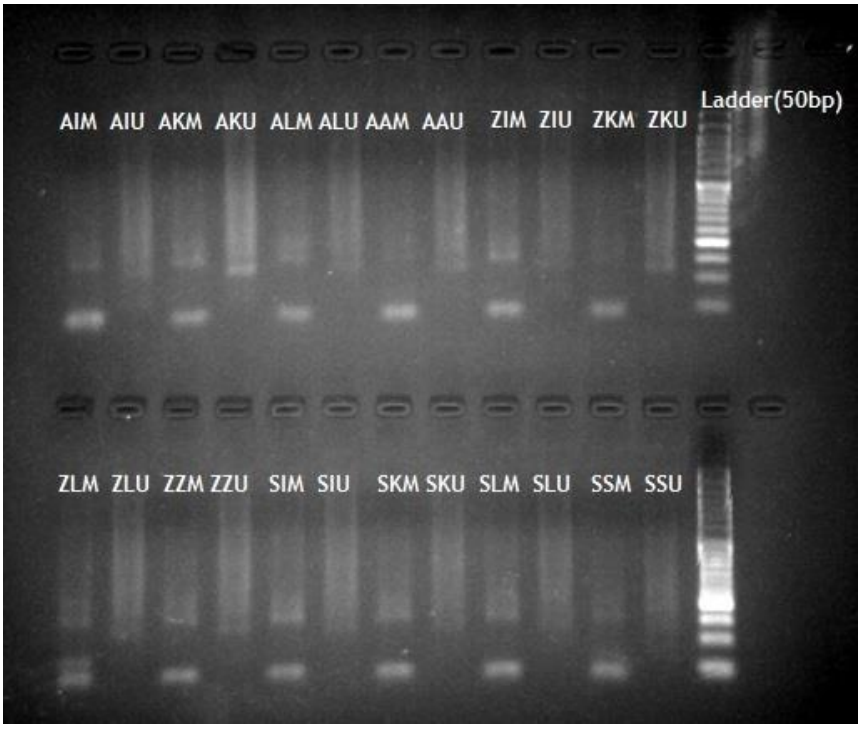


Şekil 124. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Sitokrom-c metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü

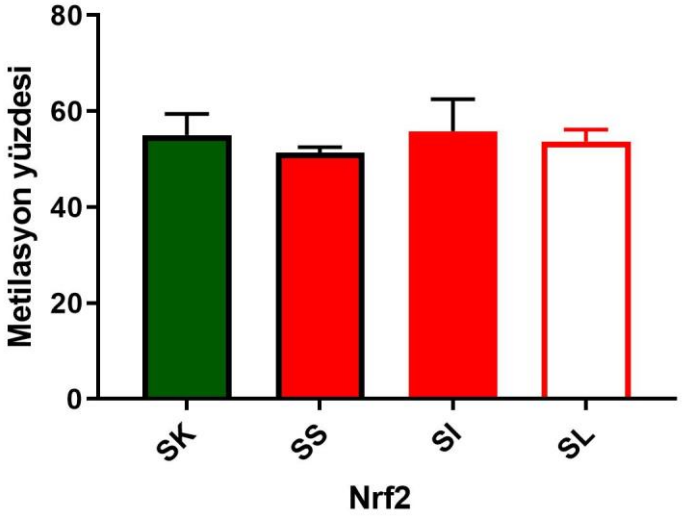


Şekil 125. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Sitokrom-c metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD)

Uygulanan Si fd'nin HepG2 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonunda 48 saat süre ile 100 sn ışık ile maruz bırakılarak inkübe edildikten sonra, Nrf2'nin metilasyon ve anmetilasyon değişim değerleri Şekil 126 ve 127'de gösterilmiştir.

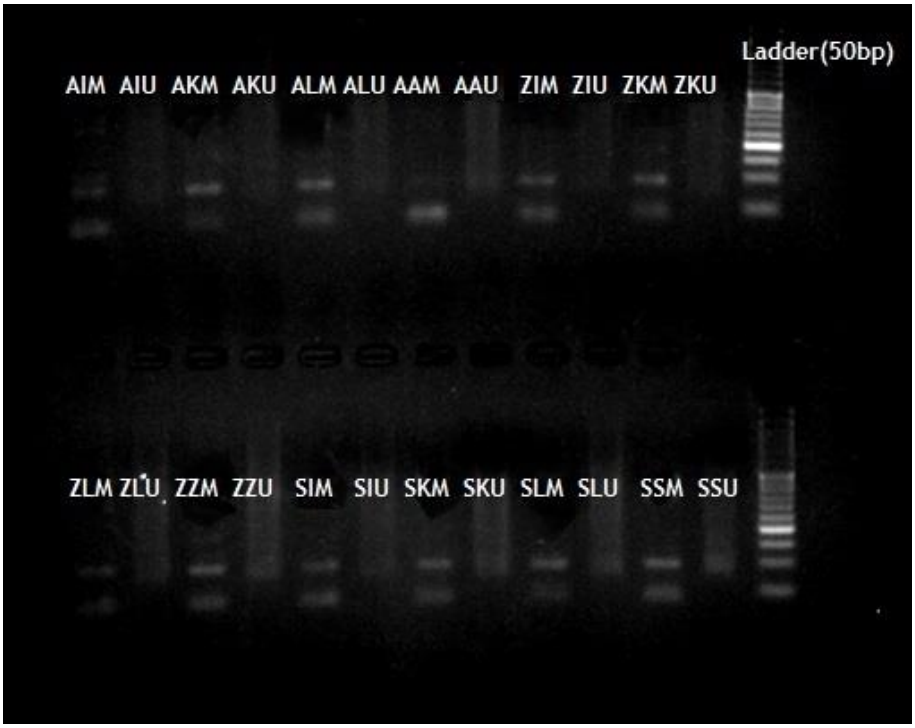


Şekil 126.HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Nrf2 metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü

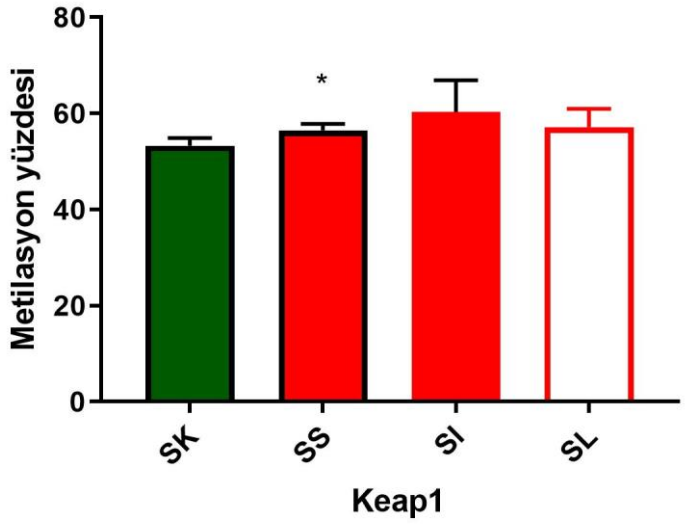


Şekil 127. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Nrf2 metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD)

Uygulanan Si fd'nin HepG2 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonunda 48 saat süre ile 100 sn ışık ile maruz bırakılarak inkübe edildikten sonra, Keap1'in metilasyon ve anmetilasyon değişim değerleri Şekil 128 ve 129'da gösterilmiştir.



Şekil 128. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Keap1 metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü



Şekil 129. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Keap1 metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD)

TARTIŞMA

Fotodinamik terapi, hedeflenen dokuda bir oksidatif stres ve hücre ölümü oluşturmak için fotoduyarlı bir ajan ile görünür bölgede ışık kullanarak, kanser ve bazı malign olmayan hastalıklar için yeni bir tedavidir. Fotoduyarlılaştırıcılar, en yaygın olarak, bir veya daha fazla hücre içi zarda lokalize olan ve uzun dalga boylu (kırmızı) görünür ışıkla aktive edilen porfirinler veya ilgili hidrofobik halkalı makromoleküllerdir. FDT, aktif olarak bir apoptoz indükleyicisidir; birçok hücre tipinde ve birçok farklı fd'ler ile gösterilmiştir. Bir kez uyaran ile tetiklendiğinde, apoptoz bilinen yolakları takip eder, ancak en yaygın olarak, aktif kaspazların aracılık ettiği ve DNA fragmantasyonu ve morfolojik apoptoz ile sonuçlanan içsel (mitokondriyal) yolağı izler. Oksijen varlığında, fotoduyarlılaştırıcının absorpsiyon spektrumuyla eşleşen uygun bir dalga boyu kullanılarak görünür ışık ile ışınlanması, sitotoksisiteyi indükleyen singlet oksijen, süperoksit anyonları veya hidroksil radikalleri dahil olmak üzere ROT üretir. Apoptotik uyaranlara veya diğer hücre ölümü biçimlerine FDT yanıtı hala tartışmalıdır. FDT sonrası kanser hücresi ölüm mekanizması, uyaran tipine ve hücresel hasara bağlı olarak, otofajik ve nekrotik hücre ölümü gibi apoptotik ve apoptotik olmayan olarak sınıflandırılabilir (660,661).

HepG2 hücreleri, fotodinamik terapi'nin gen regülasyonu üzerindeki etkisini incelemek için bir model sistem olarak kullanıldı. Çünkü HepG2 hücreleri hem endojen hem de eksojen ALA'dan porfirin sentezlediği gösterilmiştir (662).

Fotodinamik terapi, diğer oksidatif streslere veya fizyolojik uyaranlara yanıt olarak karakterize edilen birçok sinyal reaksiyonunu aktive eder. Fotoduyarlı malzemelerin birçoğu mitokondriyi hedef alarak ve mitokondrinin geçişgen yapısını etkileyerek, apoptotik proteinler Bcl-2 ve sitokrom c'nin ekspresyonlarında değişikliklere neden olur. Tümör baskılayıcı bir protein olan p53, ajanla doğrudan etkileşim yoluyla porfirin-FDT aracılı hücre ölümünde önemli bir rol oynayabilir, bu da hem karanlıkta hem de ışınlama sonrasında p53'e bağımlı hücre ölümünün indüklenmesine yol açar. Aşırı ekspresyonu ise, tedaviye tümörün yanıt vermesini etkileyen birçok gen transkripsiyonuna yol açar.

Xue ve ark., başlangıçta apoptoza karşı protein koruması olarak bilinenlere göre, Bcl-2'yi aşırı eksprese eden hücrelerde apoptoz aktive edildiğinde hücrelerin yavaş yavaş öldüğünü gözlemlediler (663). Bcl-2 anti-apoptotik protein, hücreleri fototoksisiteden korumadı (664). Bir kanser hücresinin hangi mekanizma ile ortadan kaldırılacağına karar birkaç faktöre bağlıdır. Örneğin; ilacın tipi ve dozu, ışınlama için kullanılan ışık yoğunluğu(gücü), endojen oksijen konsantrasyonları, genetik arka plan bunlardan bazılarıdır.

Sipc'nin ile uygulanan FDT'nin hücrelere verdiği fotohasarı Bcl-2 ile iyi koreledir ve Bcl-2'nin membrana bağlanan bölgelerinin bu korelasyonda önemli olduğu bulunmuştur (665,666). Bcl-2'nin delesyonu ve nokta mutasyonları üzerine yapılan araştırmalarda, BH1 ve BH2 domeynleri arasında meydana gelen, α5 ve α6 sarmalları tarafından oluşturulan Bcl-2'nin ikincil bir membran ankraj bölgesinin, FDT ile indüklenen fotohasar için gerekli olduğu düşünülmektedir (667-670).

FDT'ye dirençli hücrelerdeki Bcl-2 ailesi proteinlerinin apoptozu düzenleyen genleri, Shen ve meslektaşları tarafından incelenmiştir ve ısı şoku proteini 27 (Hsp27) ile birlikte yukarı doğru düzenlendiği bulunmuştur (671). Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, FDT'nin neden olduğu kaspaz aktivasyonunun özgüllüğünü değiştirmedi, ancak DEVD-az aktivasyonunun kinetiğini yavaşlattı. Çalışmada bazı ajanlarda kaspaz-3 ekspresyonu ajanın tek başına uygulamasında daha fazla ekspre olmuştur. Bu sonuçlara benzer olarak bizim yaptığımız bütün uygulamalarda Bcl-2 ekspresyonları, FDT'nin hücreye verdiği fotohasar ile iyi koreledir. Kaspaz-3 ekspresyonlarıda benzer şekilde artmakta olup Si pc türevli olan ajanda ise ışıksız uygulamada bu enzimin daha fazla aktive olduğu bulundu.

Bcl-2, muhtemelen sitokrom c'nin erken sekestre edilmesi ve/veya dış membran yırtılmasını önleyerek sitokrom c'nin mitokondriyal akışını geciktirir (672). Bizim yaptığımız bulgularda sitokrom c ekspresyonu yukarı yönlü iken, bunu daha fazla yukarı regüle olmasını engelleyen iki faktör sitokrom-c genin HepG2 hücre hattında aşırı metile olması ve Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun buna neden olduğu düşünülmektedir.

Hematoporfirin monometil eter-FDT, oksidatif dengesizlik yoluyla meme kanseri hücre ölümünü indükler (673). Hematoporfirin monometil eter-FDT, mitokondriyal yapıya ve mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olan hasar yoluyla meme kanseri hücrelerinin ölümüne neden oldu (674). ALA-Si-Zn-FDT'nin Bcl-2 ve Bax ifadesini yukarı regüle ettiğini, Bcl-2'nin Bax'a oranını gösterdik. Bu bulgular, FDT'nin HepG2 hücrelerinin apoptozunu indüklediğini ve pro-apoptoz etkileri ile tedavi edilen gruplarda Bax ve Bcl-2 ile korelasyon gösterdiğini bulduk. Bcl-2, FDT'nin oldukça hassas bir hedefidir ve Bcl-2'ye verilen hasar, etkin apoptoz indüksiyonu sağlayabilir. HepG2 hücrelerinde Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu ayrıca FDT'nin neden olduğu pro-kaspaz-3 kesilmesini ve DNA parçalanmasını önlemeye yönelik olduğu düşünülmektedir.

PpIX'in (1-20 µg/ml), MTT proliferasyon testi ile değerlendirildiği bir çalışmada da, HeLa hücrelerinde sitotoksik bir etki sergilemiştir (675,676). Yaptığımız çalışmadaki canlılık ve sitotoksik etkiler üzerine elde ettiğimiz bulgularımız yukarıda verdiğimiz kaynaklar ile uyumluluk göstermektedir. HepG2 hatlarına 0, 24 ve 48 saat uyguladığımız, ALA için doz miktarı arttıkça hücre canlılığında herhangi bir değişiklik olmadığı, tam tersi olarak hücre canlılığını artırdığını gözlemlendi. Bu da ALA'nın tek başına uygulandığında hepatotoksik olduğu sonucuna benzer bir çıktı olarak karşımıza çıkmıştır. 0 saat uygulamalarında ise FDT'li veya FDT'siz uygulamaya bakılmaksızın hücre canlılığında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Bu da hücrelerin içine bu ajanların nüfuz etmesi için belirli bir süre beklenmesi ile daha etkin sonuçlar alınabileceğini gösterdi. Reaktif oksijen türleri, genomu etkileyen ve insan karsinogenezinde önemli bir rol oynayan epigenetik değişikliklere yol açabilir. Daha spesifik olarak, ROT üretimi, DNA metilasyonundaki değişikliklerle ilişkilidir. Aslında, birçok tümör baskılayıcı gen, CpG adasından zengin promotör bölgelerinin ROT aracılı anormal metilasyonu ile etkisiz hale getirilir (677-

679). Photofrin'e maruz kalma süresinin, bir hücre hattında hücre ölümü modunu etkilediği bildirilmiştir (680).

1.4-2.0 J/cm^2'de Er:YAG lazer ile yapılan bir uygulamada, uygulamadan 2 saat sonra BCC'ler içindeki PpIX konsantrasyonunu arttırdı. Öte yandan, lazer ve lazerle işlem görmemiş BCC'ler arasında 4. ve 6. saatte PpIX birikiminde anlamlı bir fark bulunamamıştır (681). Bizim çalışmamızda, ilaç dozu, ışıma dozu ve zamana bağlı olarak hücrelerin canlılığında sürekli bir azalma olduğu gözlenmiştir.

24 saat ve 48 saat sürelerde Zn ve Si ftalosiyaninlerin FDT'siz uygulamalarında hücrelerin canlılıklarına bir etkisinin olduğu gözlendi. Ama bu etkililiğin FDT'li olan uygulamalara göre daha az bir etkinliği olduğunu bulunmuştur. Hücre canlılıkları ışıma dozu artıkça FDT'li uygulamalarda hem 24 saat hem de 48 saat süreler sonunda hücre sağkalımını aşırı derecede aşağı çektiği gözlenmiştir. Işığın tek başına uygulandığı bütün çalışmalarda hücre canlılığına herhangi bir etkisinin olmadığı hatta katkısı bile olabileceği daha detaylı çalışmalarla ortaya konabilir. Hücre canlılığını etkileyen ana unsurlar hücreye verilen ajanın fotoreaktif özellik göstererek canlılığını aşırı derecede etkileyebileceğini gözlemledik. Buradan hücre tipine göre en iyi inkübasyon süresi ve ışıma dozu ile ilgili bir standart oluşturulabilir.

Bizim çalışmamızda kullanılan ışık kaynağı genel bir dalgaboyu aralığına (385-740 nm) sahip olup, hücrelere uygulanan ışık kaynağının dalgaboyu aralığı kullanılan ajanın dalgaboyuna göre filtrelenerek nasıl sonuçlar verebilir ve kıyaslanabilir. Bulgularımıza göre verilen madde fd'nin dozu arttıkça, fototoksisiteye neden olduğunu gözlemledik.

Mevcut veriler, bazı insan kanser hücre tiplerinin, porfobilinojen deaminazın artan aktivitesi ve ferroşelatazın azalan aktiviteleri tarafından, deregüle edilmiş bir hem metabolizmasına sahip olduğunu göstermektedir (258,682,683). Porfirinler, ALA'nın eksojen uygulamasında sadece kanser hücrelerinde birikir (684).

Koningsberger ve ark., PpIX'in (0.5-100 µg/ml) karanlıkta uygulanan bir çalışmasında insan hepatoselüler kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini belirtti (685). Porfirinlerin, sitokrom c oksidaz ve ATP sentaz gibi mitokondriyal membran enzimlerini inhibe edebilirler. ATP sentezinde bir azalma, apoptozun başlamasına yol açabilir (686,687).

Hiperisin bir fotoduyarlılaştırıcı olup yapılan çalışmada, doğrudan Bax protein aktivasyonu yoluyla apoptozu indükleyebilir (688,689). Sadece mutant p53'ü eksprese eden ölümsüzleştirilmiş Li-Fraumeni sendromu (LFS) hücrelerinin, vahşi tip p53 taşıyan normal insan fibroblastlarından Photofrin-FDT'ye daha dirençli olduğunu bildirdi (690). Proapoptotik aile üyesi Bax'ın farklı ekspresyonu ile vahşi tip p53 taşıyan kolon kanseri hücre hattında (HCT 116) yapılan bir çalışmada, ftalosiyanin 4 (pc 4) aracılı FDT ile uygulamadan sonra Bax pozitif (Bax(+/-)) ve Bax nakavt (Bax KO) hücrelerinin duyarlılığını karşılaştırdılar (691). Tedaviden hemen veya kısa bir süre sonra FDT ile indüklenen Bax aktivasyonunu gösterdi (692). Bax nakavt hücreleri de tedaviden sonra diğer Bax grubuna kıyasla daha yavaş bir oranda apoptoz geçirdi.

p53 ekspresyonu, hiperisin-FDT tarafından indüklenen hücre ölümünü etkilemediğini gösteren çalışma vardır (692). p53'ün kanser hücrelerinin FDT'ye tepkisindeki rolü, gen terapisine dayalı deneysel bir yaklaşımla araştırılmıştır. Lim ve ark. çalışmalarında, bir rekombinant adenovirüs p53 (AdCMVp53) ile birleştirilmiş Radachlorin®-FDT'nin insan servikal karsinoma CaSki hücrelerinde ve çıplak farelerde apoptozu ve büyüme durdurulmasını, indükleme kabiliyetini değerlendirdiler. FDT ve AdCMVp53 ile birlikte tedavi edildiğinde CaSki'nin hücre büyümesi, diğer gruba göre daha önemli ölçüde inhibe edildi. Birlikte tedavi, p53'e bağlı apoptozun indüklenmesine yol açabilecek yüksek p53 ekspresyonları ile sonuçlandı (693). Protoporfirin IX, vahşi tip p53 ile *in vitro* etkileşime girer ve p53'e bağımlı ve bağımsız bir şekilde kolon kanseri hücrelerinin hücre ölümünü indükler (694). FDT'nin neden olduğu ROT, DNA'dan ziyade sitoplazmik proteinlere ve mitokondriye zarar verir (695-697). ATX-S10Na(II)® aracılı fotodinamik terapi ile kolon kanseri hücrelerinde erken apoptoz ve hücre ölümünün indüklenmesi HCT 116 hücrelerinde, Bax'a ve p53'e bağlıdır ve lizozomlarda lokalize olur (668,698). FDT ile indüklenen p53'ün yukarı regülasyonu fd ile muamele edilen hücrelerde bulunmuştur. Tedavi edilmemiş veya sadece ALA ile inkübe edilmiş hücrelerle karşılaştırıldığında, p53 proteini seviyesi gerçekten de FDT ile beraber kayda değer ölçüde arttı (683,699). p53, kullanılan tüm ajan uygulamalarında artmış ve FDT ile uygulananlarda ise ekspresyonun daha fazla yukarıya regüle olduğu gözlenmiştir.

Dnmt1'in yukarı regülasyonunu, FDT ile muamele edilmiş hücrelerde p53'ün aktivasyonu ile ilişkili olup olmadığını ele aldık. FDT uygulanan ajanların bazılarında

Dnmt1 ekspresyonu sadece ajan uygulanan örneklerde ekspresyon artışına neden olurken, ışık ile uygulanan ALA-FDT aracılı uygulamalarda ekspresyonda bir değişim olmamıştır. Bu bulgularda gösteriyor ki, p53, apoptozu daha fazla olan ALA-FDT aracılı uygulamalarında, DNA metilasyonunu teşvik ederek Dnmt1 ekspresyonunun modüle edilmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

HepG2 hücrelerinde 48 saatlik ALA fd'lerle inkübasyonun sonucunda, p53, Bax, Bcl-2, sitokrom c, Apaf-1, Bcl-2 ve kaspaz-3 ekspresyonlarında artışlar gözlenmiştir. DNMT'lerde yapılan ekspresyon sonuçlarında ise DNMT ekspresyonları ışık ile uygulanan örneklerde değişmezken sadece ALA uygulanan örneklerde ekspresyonların arttığı gözlendi. ALA uygulamasında Nrf2, Keap1 ve HO-1 ekspresyonlarının FDT ile uygulananlarda ise ekspresyonları azalırken, sadece ALA uygulananlarda ise, bir artış olduğunu gözlemledik.

Akut hafif/orta stres durumunda, p53, birkaç antioksidan genin ekspresyonunu yönlendirerek ve hayatta kalma sinyallerini sağlayarak hücreleri korurken, şiddetli kalıcı strese yanıt olarak apoptozun aktivasyonunu destekler (700,701). FDT ile tedavi edilen hücrelerde bulunan bu tür senaryoların her ikisi de. Temoporfin-FDT tarafından indüklenen stresin aracılık ettiği p53 aktivasyonunun, hücre ölümünden güçlü bir şekilde koruduğu bulundu, çünkü bu hücrelerin öldürülmesi, p53'ün pifithrin-u 28 ile spesifik inhibisyonu ile önemli ölçüde arttırıldı. Klorin e6-FDT ile muamele edilmiş veya hiperisin FDT ile muamele edilmiş hücrelerin hayatta kalmasını azaltır (702,703). Bizim çalışmamızda da, ALA, Zn ve Si-FDT uygulamasında p53 ekspresyonları aşırı artmış olup, bu durumunda hücrelerin hayatta kalımını azalttığı gözlenmiştir.

HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Zn fd'lerle inkübasyonun sonucunda FDT ve FDT'siz, Bax, p53, sitokrom c, Apaf-1 ve kaspaz-3 ekspresyonlarında artışlar gözlenmiştir. FDT'li uygulamalarda bu ekspresyonların daha fazla yukarı regüle edildiği bulunmuştur. DNMT'lerin bu uygulamada sadece fd uygulanan ışıksız örneklerde ekspresyonların azaldığını bulduk. Fakat FDT ile uygulanan Zn fd'lerde ise, hücreler DNMT'lerin ekspresyon seviyelerinde yukarı yönlü bir artışa neden olduğunu bulduk. Nrf2, Keap1 ve HO-1 ekspresyonlarında ise, FDT uygulanan örneklerde bu genlerin ekspresyonlarında en az iki katlık bir artış olduğunu kaydettik.

Bcl-2, apoptotik yolakta bir yukarı artış efektör molekülüdür ve güçlü bir apoptoz baskılayıcı olarak tanımlanır. Bcl-2 tüm insan tümörlerinin yarısından

fazlasında olması ve istenmeyen şekilde yüksek seviyelerde bulunur (704). Bizim gözlemlerimizde, yapısal olarak yüksek Bcl-2 seviyelerinin, HepG2 hücrelerinin FDT karşı apoptoz mekanizması ile karşı direnç göstermesi olabileceğini öne sürebiliriz.

İmmünoblot analizi, A431 hücrelerinde zamana bağlı bir şekilde FDT'yi takiben Bcl-2 seviyelerinde bir düşüş olduğunu ortaya koydu. Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, normal vahşi tip hücrelere kıyasla A431 hücrelerinde apoptotik tepkinin artmasıyla sonuçlandı (705). Bax benzeri bir molekülde Bcl-2'nin kaspaz aracılı dönüşümününde apoptotik yanıtı artırabileceği daha önce bildirilmişti (706,707). Bizim çalışmamızda, Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun Bax proteinini stabilize edebileceğini ve bunun da mitokondriyal membranda gözenek oluşturma aktivitesini tetikleyerek apoptozu teşvik edebileceğini ve sitokrom c'nin mitokondriden salınmasını teşvik edebileceğini öne sürebiliriz. Verilerimiz ayrıca, FDT'nin, diğer Bcl-2 ailesi üyelerinin, proapoptotik ve anti-apoptotik üye proteinlerin toplam oranının pro-apoptotik proteinler lehine olacak şekilde sonuçlandığını da göstermiştir. FDT, apoptoza duyarlı hücre hattında Bcl-2'nin aşırı ekspresyon yanıtını daha da arttırır.

He ve ark., Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinin Bcl-2 transfeksiyonunun, FDT aracılı apoptoza karşı kısmi dirence yol açtığını bildirmiştir (708). Bu bulguyla uyumlu olarak, Granville ve ark. bildirdiği bir çalışmada Bcl-2 proteininin aşırı ekspresyonu, kaspazların aktivasyonunu ve FDT tarafından başlatılan apoptoz yolağını bloke eder (666).

Yakın tarihli bir raporda ise, Kim ve ark. tersi bulgular bildirmiştir. Bu çalışmada, bir insan göğüs hücre hattında Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, FDT tarafından geliştirilmiş apoptoz ile sonuçlanmıştır (709). Dnmt1 aracılı metilasyonun, p53 proteininin aktivasyonu ile uyarıldığı gösterilmiştir (392,710). Kullanılan üç fotoduyarlı ajanın, p53, sitokrom c, aktif kaspaz-3, Apaf-1 ve Bax seviyelerini artırarak ve anti-apoptotik Bcl-2'yi yukarı regüle ederek FDT kaynaklı hücre apoptozunu önemli ölçüde arttırdığını bulduk.

FDT ile indüklenen Nrf2, Keap1 ve HO-1 ekspresyonunun baskılanmasının DNA hipermetilasyonu ile ilişkili olup olmadığını daha fazla araştırmak için FDT ile tedavi edilen hücrelerde Nrf2, sitokrom c ve Keap1 promotör bölgesinin DNA metilasyon durumları incelendi. Promotör bölgesindeki CpG adalarının metilasyonu, metilasyon spesifik PCR (MSP) ile değerlendirildi. Çalışılan alandaki metillenmiş CpG adacıklarının yüzdesi, FDT ile tedavi edilen hücreler ve tedavi edilmeyen hücreler için

yukarıdaki şekillerde gösterilmiştir. ALA-FDT aracılı, Keap1 ve Nrf2'nin promotör bölgesinde DNA metilasyonunu indükler ve iki genin baskılanmış ifadesine katkıda bulunabilir. HO-1 geni ise bunlarla doğrudan ilişkili bir gen olduğu için bu gende de bir baskılanmanın olduğu gözlendi. Fakat Sipcs ve Znpcs uygulamalarında ise, bu genlerde herhangi bir baskılanma yerine ekspresyonlarında bir artış olduğu gözlenmiştir.

FDT, kaspaz 3'ü yukarı regüle ederek ve *in situ* skuamöz hücreli karsinomda Bcl-2 seviyelerini aşağı regüle ederek hücre apoptozunu arttırdı (711). Chen ve ark. ALA-FDT'nin özofagus kanserinde Bcl-2'yi aşağı regüle ederek ve Bax seviyelerini yukarı regüle ederek hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini ve apoptozu indüklediğini gösterdi (712). ALA-FDT ayrıca serviks kanseri hücreleri ve insan oral skuamöz hücreli karsinomu üzerinde hücre apoptozunu indükledi (713). Hela hücrelerinde, Bcl-2 aşırı ekspresyonunun mitokondriyal sitokrom c salınımını engelleyemediği, ancak canlılık kaybına karşı koruma sağlamadan kaspaz aktivasyonunu baskılayabilir. Benzer sonuçlarda bizim çalışmamızda bulundu. Genel olarak yapılan çalışmada kaspaz aktivasyonu olmasına rağmen, kaspazlar eşik değerleri diğer genlere göre daha yüksek değerlerde çıkmıştır. Bu da hücrelerin Bcl-2 ekspresyonunu artırarak kaspazları baskılamaya çalıştığı belirlendi (714). Bulgularımız bu çalışamalara benzerdi. Öyleyse, ALA-FDT'nin apoptozu indükleyerek HepG2 hücre proliferasyonunu inhibe edebileceğini kanıtlıyoruz.

FDT, histon asetiltransferaz p300'ün (p300HAT) ekspresyonunu ve aktivitesini düzenleyerek kromatin modifikasyonunu indükleyebilir, bu da epigenetik modifikasyonların FDT aracılı gen düzenlemesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürür (715). DNMT protein ailesi arasında, Dnmt1, yeni kopyalanmış DNA'nın metillenmesinde rol oynayan memeli hücrelerinde en çok bulunanıdır (716). Hidrojen peroksit ile muamele edilmiş hücrelerde oksidatif stres tarafından indüklenen Dnmt1 değişiklikleri gözlemlenmiştir (717,718). DNA metilasyonunun FDT aracılı değişiminin Dnmt1 aktivasyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığını incelemek için önce FDT ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde Dnmt1 mRNA ekspresyon seviyesini analiz ettik. Dnmt1 mRNA ekspresyon seviyesi, FDT uygulanan ajan ve ışıkla beraber uygulanıp uygulanmamasına göre bağlı bir şekilde önemli ölçüde yükselmiştir veya düşmüştür. Bu sonuçlar, FDT'nin neden olduğu oksidatif stresin, DNA metilasyonu

yoluyla Nrf2 ekspresyonunu daha da aşağı regüle edebilen, Dnmt1'in ekspresyonunu ve aktivitesini yukarı doğru düzenleyebileceğini gösterebilir.

ALA uygulanan örneklerin metilasyon indekslerine bakıldığında, sitokrom c metilasyon yüzdeleri ilgili promotör bölgede, hem metile hem de anmetile bantların olduğu gösterildi. Metilasyon yüzdelerinde ise metilasyon bantları anmetilelere göre daha yoğundur. Bant yoğunluklarından hesaplanan metilasyon yüzdelerinde ise sadece ışık uygulanan hücrelerde metilasyon yüzdeleri anlamlı olarak arttığı bulundu. Nrf2 metilasyon yüzdelerine bakıldığında ise sadece ALA fd uygulanan örneklerde metilasyon yüzdesinin aşağı düştüğü, ama FDT'li olan örneklerde ise bu yüzdenin artışa neden olduğu gözlendi. Keap1 metilasyon yüzdesine baktığımızda ise ışıklı olan uygulamanın metilasyon yüzdesinin %60'ları geçen bir değere ulaştığı bulunmuştur. Bu sonuçlarda metilasyon ve demetilasyon genlerindeki ekspresyon farklılıklarını açıklamaktadır.

Demyanenko ve ark., ALA-FDT'nin fare serebral korteksinde DNA metilasyonuna bağlı protein kaiso'nun ekspresyonunu indükleyebildiğini bildirdi. FDT aracılı Sipcs ve Znpcs türevleri ile oluşturulan oksidatif stresin Dnmt1 ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyebildiğini ve ayrıca promotör bölgesinde hipometilasyona yol açarak Nrf2 ve Keap1 ekspresyonunun baskılanmamasına yol açtığını bulduk. Ayrıca FDT'nin Dnmt1 ifadesini yukarı ve aşağı doğru düzenleyebileceğini ve bazı genlerin ifadesinin bastırılmasına veya yukarı regüle olmasına yol açabileceğini bulduk. Sipcs ve Znpcs aracılı FDT uygulamasında, Nrf2 ve Nrf2 ile ilişkili gen HO-1'in ekspresyonunun, muamele edilmemiş hücre hattına kıyasla muamele edilen hücre hattında yukarı doğru düzenlendiğini gösterdik. Bizim çalışmamızda, Hsp32 adlı HO-1 ekspresyonu, Si ve Zn aracılı FDT ve bu ajanlar tek başlarına kullanımında bu geninin ekspresyonunu artırırken, ALA-FDT ise ekspresyonun azaldığı gözlenmiştir.

ALA-FDT tarafından indüklenen K562 hücre ölümünün mekanizmasını karakterize etmeye çalışılan bir çalışmada, erken apoptozun birkaç işareti tespit edilmiş olup: Bcl-xL ekspresyonunun düşmesi ve sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması olarak gözlendi (719). Bizim çalışmamızda benzer şekilde bütün uyaranlarla hücre mitokondriden sitoplamazya sitokrom c salınması, ekspresyon analizi ile gözlendi. Farklı hücre dizilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, K562 hücrelerinin ALA-FDT'ye verdiği tepki, çalışılan diğer hücrelerden belirgin şekilde

daha az duyarlı olduğu bulundu. Bu bulgu, gözlemlenen daha yüksek ferroşelataz aktivitesine bağlandı.

Çin hamsteri yumurtalık hücre hattı CHO'da Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, DNA fragmantasyonunu ve apoptozu inhibe etti ve kullanılan ftalosiyanin'in deneylerde klonojenik testler ile hücreleri hücre ölümünden kısmen koruduğu belirlendi (720). İnsan akut miyeloid lösemi HL-60 hücrelerinde, fotoduyarlılaştırıcı olarak benzoporfirin türevi monoasit halkası A (BPD-MA) ile düşük FDT dozlarında da benzer sonuçlar elde edildi (666). Bcl-2 veya Bcl-xL'nin aşırı eksprese edilmesi, mitokondriden sitokrom c salımını etkilemedi; bu proteinlerin sitozolde sitokrom c'nin ortaya çıkmasından sonra bile kaspaz-3 aktivasyonuna direnç sağladığını gösterir (709). Bizim çalışmamızda kaspaz ekspresyonunun başladığı, ama yine de Bcl-2 ekspresyonunun aşırı yüksek olduğu bulundu.

Zn uygulamasının metilasyon yüzdelerine bakıldığında ise, sitokrom c açısından kontrol dahil standart sapmanın çok fazla olduğu gözlenmiştir. FDT'li veya FDT'siz uygulamalarda ise sitokrom c metilasyonunda herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Nrf2 metilasyon indeksine bakıldığında ise, FDT'li ve FDTsiz uygulamalarda metilasyon yüzdesinde artış olduğu bulunmuştur. Keap1 metilasyon oranlarında ise ALA'ya benzer şekilde, sadece Zn uygulanan örneklerde metilasyon yüzdeleri aşağı yönlü olarak azalmıştır. FDT'li uygulamada ise yüzde yukarı yönlü artmıştır.

HepG2 hücrelerinde kullanılan fd maruziyet seviyeleri için, ışıma dozuna ve zamana bağımlı olarak önemli ölçüde hücre canlılığında değişiklikler gözlendi ve Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Tet1 ve Tet2'nin ekspresyon seviyeleri etkilendi ve DNA metilasyonu ilişkili olduğu bulundu. DNMT ve TET enzimlerinin ekspresyonunu ve aktivitesini modüle ederek FDT'nin epigenetik değişikliklere nasıl aracılık ettiğine dair yeni bilgiler sağladık. Si fd uygulamasında FDT ile uygulanalarda Tet1 ve Tet2 ekspresyonları artarken, sadece Si fd uygulananlarda ise herhangi bir değişiklik bulunmamıştır. Zn türevli fd ise, bu ekspreyonlar FDT uygulama olan örneklerde artmış olup, FDT'siz örneklerdeki artış FDT'li olan uygulamalara göre daha az olmuştur. ALA uygulanan örneklerde ise, diğer iki ajana göre tam tersi bir sonuç ortaya çıkmıştır. FDT'siz uygulamalarda hem Tet1 hem de Tet2 ekspresyonları artarken, FDT'li olan örneklerde ise bu ajanlar, bu iki proteinin mRNA seviyesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

Si uygulamasının metilasyon yüzdeleri sitokrom c için, bütün uygulama gruplarında benzer bir sonuç ortaya koymuştur. Nrf2 için bakıldığında Zn ve ALA'ya benzer sonuçlarda olup, diğer iki gruba göre metilasyon yüzdesinde bir değişim gözlenmemiştir. Keap1'de ise yine Nrf2'ye benzer sonuçlar gözlenmiş olup bu sonuçlar yüzde olarak Nrf2'ninkinden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

DNA metilasyon durumunun FDT'yi etkilediği sonucuna varılabilir, ancak bu fd'nin inkübasyon süresine ve türüne bağlıdır. Hücreler çok uzun süre inkübasyona bırakılırsa, demetilasyonun FDT üzerinde etkisi vardır ve bu muhtemelen kısa süreli uygulamalardan dolayı, hücresel DNA onarım mekanizmalarının deaktive edilmesinden kaynaklanmaktadır. Fd ve FDT, HepG2 karaciğer kanserinde etkilidir, hipermetile sitokrom c ve FDT kullanımının daha fazla araştırılması gerekir.

İnsan karaciğer kanseri HepG2 hücresinde ALA, Zn ve Si pc bazlı FDT'nin etkinliğinin potansiyel bir moleküler belirleyici olan Nrf2 ve Keap1 üzerine etkilerini araştırdık. Çalışmamızda Nrf2 mRNA seviyesi, ALA bazlı FDT uygulamasında önemli ölçüde azaldı. Kanser hücrelerinde Nrf2 ve mitokondriyal apoptotik yolaktaki genler arasındaki bu bağlantıya dayanarak, Nrf2 ile ALA-FDT'nin etkinliğini arttırmak için yeni bir moleküler hedef olabilir. Hepatoselüler karsinom hücre hattında Nrf2 ve Keap1 gen ekspresyonunu ve metillenme oranları araştırıldı ve ROT'un Nrf2'yi epigenetik olarak yukarı regüle edip etmediğini, Keap1 geni inaktif hale getirip getirmediğini ve Hepatoselüler karsinom hücrelerinde agresifliği arttırıp artırmadığını soruları cevap bulmuş olduk.

FDT fototoksisitesinin altında yatan başka bir mekanizma nekrozdur. Nekroz pasif bir mekanizma olmasına rağmen, nekroptoz veya programlanmış nekroz son zamanlarda yeni bir hücre ölümü mekanizması olarak ortaya çıkmıştır (715). Oksidatif stres, nekroptotik hücre ölümünün bir uyarıcısı olarak önerilmiştir (721,722). HepG2 hücrelerinin, Zn ve Si-FDT ile uygulamasının HO-1 indüksiyonu ile sonuçlandığını bulduk. Nrf2'nin bir hedef geni olan HO-1'in ekspresyonunun, Si ve Zn-FDT toksisitesine karşı korumada yer aldığı ve HO-1'in FDT'nin anti tümör etkisini güçlendirdiği gözlendi. Bu çalışma, FDT'yi takiben HO-1 uyarımı ve apoptoza karşı bir direnç ortaya koyduğu gözlenmiştir. Zn ve Si ile FDT'li ve FDT'siz, HO-1 ekspresyonunu arttırdığını bulundu. ALA ile tek başına uygulamasının HO-1 ekspresyonunu artırdığını bulduk. ALA-FDT beraber uygulamasında HO-1 aşağı yönlü regüle edildiğini bulduk. ALA türevli uygulamada, Keap1'in promotör

hipermetilasyonu nedeniyle, Keap1 ekspresyonunun azalmış olduğu gözlendi. Keap1/Nrf2 protein-protein etkileşiminin bozulması ve bunun ekspresyon seviyelerindeki dengesizliği ve sonucunda hücresel detoksifiye edici proteinlerin yukarı regülasyonu ile sonuçlandı. Nrf2 için, her bir stresör için bağımlılığı aynı olmadığı sonucuna varıldı.

Çalışmamızda, FDT'ye maruz kalan HepG2 hücrelerinin çoğu, apoptoza uğradığı gösterilmiştir. FDT'siz uygulamalarda Zn ve Si, FDT uygulamasına göre daha az apoptoza uğradığı gözlendi. ALA-FDT'siz uygulamasında ise herhangi bir apoptoz yanıtının oluşmadığı gözlenmiştir.

HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Si fd'lerle inkübasyonun sonucunda FDT ve FDT'siz, Bax, p53, sitokrom c, Apaf-1 ve kaspaz-3 ekspresyonlarında artışlar gözlenmiştir. FDT'li uygulamalarda bu ekspresyonların daha fazla yukarı regüle olduğu bulunmuştur. Sadece Sipcs için, kaspaz-3 ekspresyonunda FDT'siz uygulamada FDT'li uygulamaya göre daha fazla ekspresyon gözlenmiş olup bunun nedeni olarak Sipcs agrege olma yatkınlığından dolayı hücrede kaspaz-3 yanıtının daha hızlı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. DNMT'lerin bu uygulamada sadece fd uygulanan ışıksız örneklerde ekspresyonlarını artırırken, Dnmt3a için bu seviyenin çok değişmediğini bulduk. Fakat FDT ile uygulanan Si fd için, hücrelerde DNMT'lerin ekspresyon seviyelerinin yukarı yönlü artışa neden olduğunu bulduk. Nrf2, Keap1 ve HO-1 ekspresyonlarında ise, FDT uygulanan ve uygulanmayan örneklerde bu genlerin ekspresyonlarının en az iki katlık bir artışı olduğunu bulduk. Dnmt1 düzenlemesinin, p53 ve Nrf2'nin oksidatif homeostazdaki önemi ile ilgili önceki bulguları göz önünde bulundurarak, hücrenin hücresel strese tepkisinde DNMT'lerin ve TET'lerin yukarı ya da aşağı regülasyonunun bir parçası olup olmadığını sorusuna her bir fd malzeme için cevap verildi.

SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, *in vitro* olarak 3 farklı tipte porfirin türevli ajan kullanıldı. FDT'nin, karaciğer kanseri hücresinde apoptotik etkileri gösterilmiştir. Bu ajanlar FDT ile sitokrom c'yi serbest bırakabilir, Bcl-2'yi, Apaf-1, Bax ve p53'ü yukarı regüle edebilir ve kaspaz-3'ü aktive edebilir. Böylece mitokondriyal apoptoz yolağıyla HepG2 hücresinde apoptozu indükleyebilir. Bu birleşik gözlemler, karaciğer kanseri tedavisinde mevcut ajanlar FDT için büyük bir potansiyel olabileceklerini gösterdi. Bununla birlikte, bu bulguların klinik önemi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bcl-2 ailesi proteinlerinin hücre ölümünü teşvik ettiği veya antagonize ettiği mekanizmalar hala belirsizdir ve araştırmaların sürüdürülmesi gerekmektedir. Kanser hücreleri, Bcl-2 ailesi proteinlerinin aracılık ettiği anti-apoptotik adaptasyon yoluyla tedaviye direnç gösterebilir. Bu, çoğu araştırmacının sorunu ele almanın olası yollarını bulmaya ve kanser tedavisi direncine kalıcı bir çözüm getirmeye olan ilgisini artırmaktadır.

Genel olarak, fd ve FDT tarafından indüklenen yanıt, hem hücre tipine hem de tedavinin yoğunluğuna (örneğin; ışınlama dozuna, zamana ve ajan dozuna) bağlıdır. Oldukça sık olarak, tedavi edilen hücreler mitokondride tetiklenen yolak aracılığıyla apoptoza uğrar. Kaspaz kaskad aktivasyonu yoluyla ilerler ve bu süreç DNA fragmantasyonu ile sonlandırılır. Apoptoz ve nekroz aynı zamanda eş zamanlı olarak da aktive edilebilir, hakim hücre ölümü mekanizması kullanılan ajan ve FDT'nin dozlama koşulları tarafından belirlenir.

Fotoninamik terapi uygulanan gruplarda proapoptotik genler kaspaz-3, Apaf-1, Bax ve sitokrom c ekspresyonunun artması ve anti-apoptotik genlerin Bcl-2 ve p53

ekspresyonlarının artması bütün uygulamalarda gözlenirken, Nrf2 ve HO-1 ekspresyonunun ALA aracılığı FDT ile azalmıştır. Yukarıda ifade edilen sonuçlar, fd ve FDT ile tedaviyi takiben zamana bağlı bir şekilde çok yüksek oranda hücre ölümünün meydana geldiği gözlemine dayanmaktadır.

Epigenetik varyasyonlar, kanser gibi ölümcül hastalıkların ortaya çıkmasında ve bu hastalığın devamında rol oynayan gen ekspresyonundaki değişikliklerin kaynağıdır. Epigenetik araştırmalara yenilenen ilgi ile epigenetik olarak kanserin özelliklerini tersine çeviren farmakolojik müdahalelere odaklanmaktadır. DNMT ve HDAC inhibisyonunda, ajanlar olarak epigenetik değiştiriciler veya çeşitli yerleşik tedavilerle birleştirilebilir. Bu nedenle, kanserin hem adjuvanlığını hem de antijenikliğini artıran epigenetik değiştiricilerle birlikte FDT'den oluşan kombinasyon terapileri, kansere karşı apoptozis tepkisini yeniden etkinleştirmek için umut verici yaklaşımlardır. ALA-FDT uygulamasında güçlü bir antioksidan ve sitoprotektif gen olan HO-1'in ekspresyonunu baskılamasından dolayı, FDT'de çekici bir terapötik hedef olabilir.

HepG2 hücrelerinde 48 saatlik ALA, Si ve Zn fd'lerle inkübasyonun sonucunda, fotoduyarlaştırıcıların apoptozu indüklediği bulunmuştur. Bu indükleme mekanizmasının çalışması mitokondriyal apoptotik yolak üzerinden gerçekleşmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız fd'ler birbiri ile karşılaştırıldığında, inkübasyon süresi ve neden olduğu fototoksisite, metilasyon değişimleri, apoptoz, gen ekspresyonu ve jel elektroforezi yöntemleriyle bu kanser hücre hattında kanser genetiği ve oksidatif stres ajanlarına karşı verilen tepkiyle alakalı ve bu ajanların biyouyumluluklarını test etmesi ile daha önce yapılan benzer bir çalışma olmadığı için bu alanda özgün bir çalışma olduğunu düşünmekteyiz.

Bu çalışma, ALA-FDT'den sonra Nrf2 ve Keap1'in aşağı regülasyonunun, promotör bölgesinin hipermetilasyonunun aracılığı ile yapıldığını göstermiştir. Regülasyon mekanizması, Nrf2 ve Keap1'in promotör bölgesinde hipermetilasyonu tarafından indüklenen p53'ün ve Dnmt1'in artan ekspresyonlarının artışını gösterdi. Malign karaciğer kanseri ve kontrol grubunda, Nrf2, Keap1 ve sitokrom c'nin promotörünün metilasyon durumunun ve kopyalanan mRNA seviyesinin araştırılması, mRNA seviyelerini ifade eden malign hücrelerde yüksek oranda metillenmiş durumda olduğu ortaya koyuldu. ALA, Zn ve Si fd türevli stresörler oksidatif stresi verilen yanıta

karşı oluşturduğu mekanizma'nın anlaşılmasına katkı sunarak, yeni türevli maddelerin geliştirilmesine katkı sunacağını düşünmekteyiz.

ÖZET

Fotodinamik terapi ile indüklenen, akut oksidatif strese maruz kalan hücrelerin, bu strese vereceği yanıtta genetik ve epigenetik değişikliklerin olası bağlantısına odaklandık. Fotoduyarlaştırıcı aracılı apoptozda yer alan mekanizmaları anlamak, terapötik etkinliğini artırmak bu yöntemin daha etkin kullanımını sağlayabilir. Bu çalışmanın amacı, HepG2 kanser hücrelerinde, ışık kaynağının farklı dozları kullanılarak, *in vitro* fotodinamik terapi uygulamasının mitokondriyal apoptoz genlerinin göreceli ekspresyonlarındaki değişim ve apoptoz yanıtından sorumlu moleküler, epigenetik mekanizmaları ve ajanların biyouyumlukları araştırıldı. Çalışmamızda üç farklı tipte fotoduyarlı ajandan elde ettiğimiz sonuçların fotodinamik terapi alanına biyomalzeme olarak katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmanın ilk kısmında, fotoduyarlı ajanların hücre canlılığına olan fototoksik etkisi test edildi. Ksenon ışık kaynağını kullanarak, ALA, Çinko ve Silisyum fotuduyarlaştırıcılar 600 mW/cm^2'lik ışıma dozunda sırasıyla, 100 sn, 200 sn ve 300 sn süreler ile 0 saat, 24 saat ve 48 saat inkübasyon süreleri boyunca 10 farklı fotoduyarlı madde dozunda inkübe edilerek her bir zaman ve ışıma dozu için IC50 değerleri hesaplandı. Belirlenen bu IC50 değerlerinden 48 saat süre ile 100 sn ışıma dozu için hücrelerin apoptoz, genetik ve metilasyon ile ilgili gen analizleriyle ajanların biyomalzeme olup olmayacakları ilgili değerledirmelerde bulunuldu. Sitokrom c, Nrf2 ve Keap1'in epigenetik düzenlenmesinin, oksidatif stres veya ilaç metabolizması ile ilgili hastalıkların tedavisinde olası bir terapötik hedef olacağı düşünülmektedir.

Bu malzemelerin, metilasyon inhibitör veya aktivatör adayları olup olamayacağı değerlendirildi. Bu malzemelerin ışıklı ve ışıksız olarak HepG2 hücrelerinde önemli miktarda apoptozu indüklediği gözlendi. Işıklı uygulamalarda apoptoz genlerinin ekspresyonunda, kontrol grubuna göre belli bir artış yaşandı. Sonuç olarak, tüm kullanılan fotoduyarlı biyomalzemelerin fototoksik, apoptotik ve epigenetik bir etkiye sahip olduklarını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Fotodinamik Terapi, Apoptoz, Ftalosiyanin, Aminolevulinik Asit ve Metilasyon

EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY WITH APPLIED PHOTOSENSITIVE BIOMATERIALS ON EPIGENETIC MECHANISMS

SUMMARY

We focused on the possible link between genetic and epigenetic changes in the response of cells exposed to acute oxidative stress induced by photodynamic therapy. Understanding the mechanisms involved in photosensitizer mediated apoptosis and increasing its therapeutic efficacy may enable more effective use of this method. The aim of this study was to investigate changes in relative expression of mitochondrial apoptosis genes and molecular, epigenetic mechanisms and bioavailability of drugs responsible for this apoptosis response in HepG2 cancer cells by using different doses of light source *in vitro*. We think that results obtained from three different types of photosensitive agents in our study may contribute to field of photodynamic therapy as a biomaterial. In the first part of the study, phototoxic effect of photosensitive agents on cell viability was tested. Using a xenon light source with ALA, Zinc and Silicon photosensitizers were incubated at an irradiation dose of 600 mW/cm^2 for 100 s, 200 s, and 300 s, respectively, for 0 hour, 24 hours, and 48 hours incubation times, with 10 different doses of photosensitive drugs. IC50 values were calculated for each time and each irradiation dose. From these determined IC50 values, it was evaluated whether the agents would be biomaterials with gene analyzes related to apoptosis, genetics and methylation for 48 hours and 100 sec irradiation dose. Epigenetic regulation of Cytochrome c, Nrf2 and Keap1 is thought to be a possible therapeutic target in the

treatment of diseases related to oxidative stress or drug metabolism. It was evaluated whether these materials could be methylation inhibitor or activator candidates. It was observed that these materials induced a significant amount of apoptosis in HepG2 cells with and without light. There was a certain increase in the expression of apoptosis genes in light treatments compared to control group. In conclusion, we think that all used photosensitive biomaterials have a phototoxic, apoptotic, and epigenetic effect.

Keywords: Photodynamic Therapy, Apoptosis, Phthalocyanine, Aminolevulinic Acid and Methylation

KAYNAKLAR

1. Benov L. Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions. Medical Principles and Practice. 2015;24:14-28.

2. van Straten D, Mashayekhi V, de Bruijn HS, Oliveira S, Robinson DJ. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. Cancers (Basel). 2017;9(2):19.

3. Braathen LR, Morton CA, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Gerritsen MJ, Gilaberte Y, et al. Photodynamic therapy for skin field cancerization: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012;26(9):1063-6.

4. DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. Coordination Chemistry Reviews. 2002;233:351-71.

5. Lovell JF, Liu TW, Chen J, Zheng G. Activatable photosensitizers for imaging and therapy. Chem Rev. 2010;110(5):2839-57.

6. Langevin SM, Kratzke RA, Kelsey KT. Epigenetics of lung cancer. Translational Research. 2015;165(1):74-90.

7. Hamblin MR, Huang Y. Handbook of photomedicine. 1 ed. New York: Taylor & Francis; 2013. 1-87.

8. Arndt M, Juffmann T, Vedral V. Quantum physics meets biology. HFSP J. 2009;3(6):386-400.

9. Atkins P, De Paula J. Quantum theory: introduction and principles. Physical chemistry. 2002:243-70.

10. Simpson CR, Kohl M, Essenpreis M, Cope M. Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique. Phys Med Biol. 1998;43(9):2465-78.

11. Wainwright M. Photosensitisers in biomedicine: John Wiley & Sons; 2009.

12. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. Photochem Photobiol. 2001;74(5):656-69.

13. Chantorn R, Lim HW, Shwayder TA. Photosensitivity disorders in children: part I. J Am Acad Dermatol. 2012;67(6):1093-111.

14. Stern RS. Psoralen and ultraviolet a light therapy for psoriasis. N Engl J Med. 2007;357(7):682-90.

15. Edelson RL. Light-activated drugs. Sci Am. 1988;259(2):68-75.

16. Spikes JD. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in the health sciences. Primary photo-processes in biology and medicine: Springer; 1985. p. 209-27.

17. Mozoåowski W. Jäccaron; drzej Sniadecki (1768-1838) on the cure of rickets. Nature. 1939;143(3612):121.

18. Raab O. Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien 1900.

19. Prime J. Des accidents toxique produits par l'éosinate de sodium: Verlag nicht ermittelbar; 1900.

20. Finsen NR. Phototherapy, London: Edward Arnold. 1901:70.

21. Von Tappeiner H, Jesionek A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. Münch Med Wochenschr. 1903;47:2042-44.

22. von Tappeiner HE, Jodlbauer A. Die sinsibilisierende Wirkung fluorescierender Substanzen: gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung, aus dem Pharmakologischen Institute der K. Universität München1907.

23. Figge FH, Weiland GS, Manganiello LO. Cancer detection and therapy; affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. Proc Soc Exp Biol Med. 1948;68(3):640.

24. Cremer RJ, Perryman PW, Richards DH. Influence of light on the hyperbilirubinaemia of infants. Lancet. 1958;1(7030):1094-7.

25. Ronchese F. The fluorescence of cancer under the Wood light. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1954;7(9):967-71.

26. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. J Thorac Cardiovasc Surg. 1961;42(5):623-9.

27. Schwartz S, Ikeda K. Studies of porphyrin synthesis and interconversion, with special reference to certain green porphyrins in animals with experimental hepatic porphyria. Porphyrin Biosynthesis and Metabolism. 1955:209-26.

28. Schultz J, Schwartz S. The chemistry of experimental chloroma. II. Isolation of crystalline protoporphyrin, its origin and relation to other porphyrins. Cancer Res. 1956;16(7):565-8.

29. Lipson R, Pratt J, Baldes E. Dockerty MB Hematoporphyrine Derivative for Detection of Cervical Cancer. Obstet Gynecol. 1964;24:78-84.

30. Lipson RL, Baldes EJ. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. Arch Dermatol. 1960;82(4):508-16.

31. Herd RM, Dover JS, Arndt KA. Basic laser principles. Dermatol Clin. 1997;15(3):355-72.

32. Carroll L, Humphreys TR. LASER-tissue interactions. Clin Dermatol. 2006;24(1):2-7.

33. Mitton D, Ackroyd R. History of photodynamic therapy in Great Britain. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2005;2(4):239-46.

34. Diamond I, Granelli SG, McDonagh AF, Nielsen S, Wilson CB, Jaenicke R. Photodynamic therapy of malignant tumours. Lancet. 1972;2(7788):1175-7.

35. Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. J Natl Cancer Inst. 1975;55(1):115-2.

36. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res. 1978;38(8):2628-35.

37. Dougherty TJ, Lawrence G, Kaufman JH, Boyle D, Weishaupt KR, Goldfarb A. Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. J Natl Cancer Inst. 1979;62(2):231-7.

38. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci. 2004;3(5):436-50.

39. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. Lasers Surg Med. 2006;38(5):468-81.

40. Wang Q, Zhang D, Feng J, Sun T, Li C, Xie X, et al. Enhanced photodynamic inactivation for Gram-negative bacteria by branched polyethylenimine-containing nanoparticles under visible light irradiation. J Colloid Interface Sci. 2021;584:539-50.

41. Layer G, Reichelt J, Jahn D, Heinz DW. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. Protein Sci. 2010;19(6):1137-61.

42. Teng L, Nakada M, Zhao SG, Endo Y, Furuyama N, Nambu E, et al. Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. Br J Cancer. 2011;104(5):798-807.

43. Netzer T. European Union centralised procedure for marketing authorisation of oncology drugs: an in-depth review of its efficiency. Eur J Cancer. 2006;42(4):446-55.

44. Ethirajan M, Chen Y, Joshi P, Pandey RK. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. Chem Soc Rev. 2011;40(1):340-62.

45. Pushpan SK, Venkatraman S, Anand VG, Sankar J, Parmeswaran D, Ganesan S, et al. Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. Curr Med Chem Anticancer Agents. 2002;2(2):187-207.

46. Lobel J, MacDonald IJ, Ciesielski MJ, Barone T, Potter WR, Pollina J, et al. 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (HPPH) in a nude rat glioma model: implications for photodynamic therapy. Lasers Surg Med. 2001;29(5):397-405.

47. Greco W, Loewen G, Bellnier D, Nava H, Oseroff A, Pandey R, et al. Population pharmacokinetcs of the photodynamic therapy agent 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a in cancer patients. Cancer Res. 2003;63(1806):1813.

48. Simoes JCS, Sarpaki S, Papadimitroulas P, Therrien B, Loudos G. Conjugated Photosensitizers for Imaging and PDT in Cancer Research. J Med Chem. 2020;63(23):14119-50.

49. Chen J, Keltner L, Christophersen J, Zheng F, Krouse M, Singhal A, et al. New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy. Cancer J. 2002;8(2):154-63.

50. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. J Natl Cancer Inst. 1998;90(12):889-905.

51. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? Photochemistry and photobiology. 1992;55(1):145-57.

52. Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. Technol Cancer Res Treat. 2005;4(3):283-93.

53. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. CA Cancer J Clin. 2011;61(4):250-81.

54. Algorri JF, Ochoa M, Roldan-Varona P, Rodriguez-Cobo L, Lopez-Higuera JM. Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews. Cancers (Basel). 2021;13(17):4447.

55. Hamblin MR, Mróz P. Advances in photodynamic therapy : basic, translational, and clinical. Boston, Mass.: Artech House; 2008. xx, 559:20.

56. Huang Y-Y, Sharma SK, Dai T, Chung H, Yaroslavsky A, Garcia-Diaz M, et al. Can nanotechnology potentiate photodynamic therapy? Nanotechnology reviews. 2012;1(2):111-46.

57. Niculescu AG, Grumezescu AM. Photodynamic Therapy-An Up-to-Date Review. Applied Sciences-Basel. 2021;11(8):3626.

58. Christensen T, Feren K, Moan J, Pettersen E. Photodynamic effects of haematoporphyrin derivative on synchronized and asynchronous cells of different origin. Br J Cancer. 1981;44(5):717-24.

59. Fingar VH, Wieman TJ, Wiehle SA, Cerrito PB. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. Cancer Res. 1992;52(18):4914-21.

60. Verma S, Watt GM, Mai Z, Hasan T. Strategies for enhanced photodynamic therapy effects. Photochem Photobiol. 2007;83(5):996-1005.

61. Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B. 2002;66(2):89-106.

62. Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. J Natl Cancer Inst. 1993;85(6):443-56.

63. Firey PA, Rodgers MA. Photo-properties of a silicon naphthalocyanine: a potential photosensitizer for photodynamic therapy. Photochem Photobiol. 1987;45(4):535-8.

64. Meyer-Betz F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut-und Gallenfarbstoffs. Dtsch Arch Klin Med. 1913;112(476-450):366.

65. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. Biochem J. 2016;473(4):347-64.

66. Grin M, Mironov A. Synthetic and natural bacteriochlorins: synthesis, properties and applications. ChemInform. 412010. p. 5-66.

67. Fukuzumi S, Ohkubo K, Zheng X, Chen Y, Pandey RK, Zhan R, et al. Metal bacteriochlorins which act as dual singlet oxygen and superoxide generators. J Phys Chem B. 2008;112(9):2738-46.

68. Tsukatani Y, Tamiaki H. In vitro and In vivo Synthesis of Bacteriochlorophyll Absorbing Near-Infrared Light. Bioinspired Chemistry: From Enzymes to Synthetic Models: World Scientific; 2019. p. 1-17.

69. Prince RC. Bacterial photosynthesis: from photons to Ap. Bacterial Energetics: A Treatise on Structure and Function. 2012;12:111.

70. Seherer J. Chemisch-physiologische Untersuchungen. Justus Liebigs Annalen der Chemie. 1841;40(1):1-64.

71. Schwartz S, Absolon K, Vermund H. Some relationships of porphyrins, X-rays and tumors. Univ Minn Med Bull. 1955;27(Oct. 15):1-37.

72. Ball DJ, Mayhew S, Wood SR, Griffiths J, Vernon DI, Brown SB. A comparative study of the cellular uptake and photodynamic efficacy of three novel zinc phthalocyanines of differing charge. Photochem Photobiol. 1999;69(3):390-6.

73. Bonnett R, Martinez G. Photobleaching of compounds of the 5,10,15,20-Tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin Series (m-THPP, m-THPC, and m-THPBC). Org Lett. 2002;4(12):2013-6.

74. Kessel D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. Photochem Photobiol Sci. 2002;1(11):837-40.

75. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. Int J Biochem Cell Biol. 2002;34(3):221-41.

76. Berlanda J, Kiesslich T, Oberdanner CB, Obermair FJ, Krammer B, Plaetzer K. Characterization of apoptosis induced by photodynamic treatment with hypericin in A431 human epidermoid carcinoma cells. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2006;25(1-2):173-88.

77. St. Denis TG, Huang Y-Y, Hamblin MR. Cyclic tetrapyrroles in photodynamic therapy: the chemistry of porphyrins and related compounds in medicine. Handbook of Porphyrin Science (Volume 27) With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine—Volume 27: Erythropoiesis, Heme and Applications to Biomedicine: World Scientific; 2014. p. 255-301.

78. Firczuk M, Winiarska M, Szokalska A, Jodlowska M, Swiech M, Bojarczuk K, et al. Approaches to improve photodynamic therapy of cancer. Front Biosci (Landmark Ed). 2011;16(1):208-24.

79. Krammer B, Verwanger T. Photodynamic therapy. Applied Photochemistry: Springer; 2016. p. 377-96.

80. Niemz MH. Laser-tissue interactions. 3 ed. Heidelberg: Springer; 2007. p.1-305.

81. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2010;7(2):61-75.

82. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu XH, Childs CJ, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2004;1(1):27-42.

83. Bonnett R, Charlesworth P, Djelal BD, Foley S, McGarvey DJ, Truscott TG. Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin-(m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (m-THPBC): a comparative study. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2. 1999(2):325-28.

84. Pogue BW, Redmond RW, Trivedi N, Hasan T. Photophysical properties of tin ethyl etiopurpurin I (SnET2) and tin octaethylbenzochlorin (SnOEBC) in solution and bound to albumin. Photochem Photobiol. 1998;68(6):809-15.

85. Vakrat-Haglili Y, Weiner L, Brumfeld V, Brandis A, Salomon Y, McLlroy B, et al. The microenvironment effect on the generation of reactive oxygen species by Pd-bacteriopheophorbide. J Am Chem Soc. 2005;127(17):6487-97.

86. Yang E, Diers JR, Huang YY, Hamblin MR, Lindsey JS, Bocian DF, et al. Molecular electronic tuning of photosensitizers to enhance photodynamic therapy: synthetic dicyanobacteriochlorins as a case study. Photochem Photobiol. 2013;89(3):605-18.

87. Arnaut LG. Design of porphyrin-based photosensitizers for photodynamic therapy. Advances in Inorganic Chemistry. 63: Elsevier; 2011. p. 187-233.

88. Ashur I, Goldschmidt R, Pinkas I, Salomon Y, Szewczyk G, Sarna T, et al. Photocatalytic generation of oxygen radicals by the water-soluble bacteriochlorophyll derivative WST11, noncovalently bound to serum albumin. J Phys Chem A. 2009;113(28):8027-37.

89. Berlanda J, Kiesslich T, Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. J Photochem Photobiol B. 2010;100(3):173-80.

90. Charlesworth P, Truscott TG. The Use of 5-Aminolevulinic Acid (Ala) in Photodynamic Therapy (Pdt). Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology. 1993;18(1):99-100.

91. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. J Photochem Photobiol B. 1997;39(1):1-18.

92. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. Lasers Med Sci. 2009;24(2):259-68.

93. Preise D, Scherz A, Salomon Y. Antitumor immunity promoted by vascular occluding therapy: lessons from vascular-targeted photodynamic therapy (VTP). Photochem Photobiol Sci. 2011;10(5):681-8.

94. Richter AM, Waterfield E, Jain AK, Sternberg ED, Dolphin D, Levy JG. In vitro evaluation of phototoxic properties of four structurally related benzoporphyrin derivatives. Photochem Photobiol. 1990;52(3):495-500.

95. Chatterjee SR, Srivastava TS, Kamat JP, Devasagayam TP. Lipid peroxidation induced by a novel porphyrin plus light in isolated mitochondria: possible implications in photodynamic therapy. Mol Cell Biochem. 1997;166(1-2):25-33.

96. Margaron P, Gregoire MJ, Scasnar V, Ali H, van Lier JE. Structure-photodynamic activity relationships of a series of 4-substituted zinc phthalocyanines. Photochem Photobiol. 1996;63(2):217-23.

97. Arnaut LG, Formosinho SJ. From elementary reactions to chemical relevance in the photodynamic therapy of cancer. Pure and Applied Chemistry. 2013;85(7):1389-403.

98. Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. Seminars in cutaneous medicine and surgery. 2008;27(4):227-38.

99. Kim MM, Darafsheh A. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. Photochem Photobiol. 2020;96(2):280-94.

100. Tuchin VV. Tissue optics and photonics: light-tissue interaction. Journal of Biomedical Photonics & Engineering. 2015;1(2):98-134.

101. Krishnaswamy A, Baranoski GV, editors. A biophysically-based spectral model of light interaction with human skin. Computer graphics forum; 2004: Wiley Online Library.

102. Brancaleon L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. Lasers Med Sci. 2002;17(3):173-86.

103. Mang TS. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2004;1(1):43-8.

104. Prasad PN. Introduction to biophotonics: John Wiley & Sons; 2003.

105. Krassovka J, Borgschulze A, Sahlender B, Logters T, Windolf J, Grotheer V. Blue light irradiation and its beneficial effect on Dupuytren's fibroblasts. PLoS One. 2019;14(1):e0209833.

106. Duadi H, Fixler D. Full scattering profile for detecting physiological tissue properties. Nanoscale Imaging, Sensing, and Actuation for Biomedical Applications Xiv. 2017;10077:1007703-10.

107. Amos-Tautua BM, Songca SP, Oluwafemi OS. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. Molecules. 2019;24(13):2456.

108. Mussttaf RA, Jenkins DFL, Jha AN. Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. Int J Radiat Biol. 2019;95(2):120-43.

109. Oldenburg AL, Xu CY, Boppart SA. Spectroscopic optical coherence tomography and microscopy. Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. 2007;13(6):1629-40.

110. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2004;1(4):279-93.

111. Juzeniene A, Nielsen KP, Moan J. Biophysical aspects of photodynamic therapy. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2006;25(1-2):7-28.

112. Keiser G. Light-tissue interactions. Biophotonics: Springer; 2016. p. 147-96.
113. Parrish JA, Deutsch TF. Laser Photomedicine. Ieee Journal of Quantum Electronics. 1984;20(12):1386-96.

114. Vo-Dinh T. Biomedical photonics handbook: biomedical diagnostics: CRC press; 2014.
115. Tuchin VV. Handbook of photonics for biomedical science: CRC Press; 2010.

116. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. Biotechnol Annu Rev. 2005;11:227-56.

117. Sauer M, Hofkens J, Enderlein J. Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from ensemble to single molecules: John Wiley & Sons; 2010.

118. Xu Y, Lin Y, Gao S, Shen J. Study on mechanism of release oxygen by photo-excited hemoglobin in low-level laser therapy. Lasers Med Sci. 2018;33(1):135-39.

119. Mobley J, Vo-Dinh T, Tuchin VV. Optical properties of tissue. Biomedical photonics handbook: CRC press; 2014. p. 46-145.

120. Kollias N, Gratzer W. Tabulated molar extinction coefficient for hemoglobin in water. Wellman Laboratories, Harvard Medical School, Boston. 1999;5:150-61.

121. Rury AS, Wiley TE, Sension RJ. Energy cascades, excited state dynamics, and photochemistry in cob(III)alamins and ferric porphyrins. Acc Chem Res. 2015;48(3):860-7.

122. Tromberg BJ, Shah N, Lanning R, Cerussi A, Espinoza J, Pham T, et al. Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. Neoplasia. 2000;2(1-2):26-40.

123. Parker S. Laser/Light 4 Procedures. Lasers in Dermatology and Medicine: Dental and Medical Applications. 2018:53.

124. Menzel R. Photonics: linear and nonlinear interactions of laser light and matter. Heidelberg: Springer Science & Business Media; 2013. P.1-89.

125. Sandell JL, Zhu TC. A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT. J Biophotonics. 2011;4(11-12):773-87.

126. Welch AJ, Van Gemert MJ. Optical-thermal response of laser-irradiated tissue: Springer; 2011.

127. Kulikov K. Overview of Theoretical Approaches to the Analysis of Light Scattering. Laser Interaction with Biological Material: Springer; 2014. p. 9-25.

128. Zhu C, Palmer GM, Breslin TM, Harter J, Ramanujam N. Diagnosis of breast cancer using diffuse reflectance spectroscopy: Comparison of a Monte Carlo versus partial least squares analysis based feature extraction technique. Lasers Surg Med. 2006;38(7):714-24.

129. Kennedy S, Geradts J, Bydlon T, Brown JQ, Gallagher J, Junker M, et al. Optical breast cancer margin assessment: an observational study of the effects of tissue heterogeneity on optical contrast. Breast Cancer Res. 2010;12(6):91.

130. Mohanty SK, Ghosh N, Majumder SK, Gupta PK. Depolarization of autofluorescence from malignant and normal human breast tissues. Appl Opt. 2001;40(7):1147-54.

131. Ghosh N, Mohanty SK, Majumder SK, Gupta PK. Measurement of optical transport properties of normal and malignant human breast tissue. Appl Opt. 2001;40(1):176-84.

132. Wang HW, Zhu TC, Putt ME, Solonenko M, Metz J, Dimofte A, et al. Broadband reflectance measurements of light penetration, blood oxygenation, hemoglobin concentration, and drug concentration in human intraperitoneal tissues before and after photodynamic therapy. J Biomed Opt. 2005;10(1):14004.

133. Hu JJ, Lei Q, Zhang XZ. Recent advances in photonanomedicines for enhanced cancer photodynamic therapy. Progress in Materials Science. 2020;114:100685.

134. Allison RR. Photodynamic therapy: oncologic horizons. Future Oncol. 2014;10(1):123-4.

135. Starkey JR, Rebane AK, Drobizhev MA, Meng F, Gong A, Elliott A, et al. New two-photon activated photodynamic therapy sensitizers induce xenograft tumor regressions after near-IR laser treatment through the body of the host mouse. Clin Cancer Res. 2008;14(20):6564-73.

136. Welsher K, Sherlock SP, Dai H. Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(22):8943-8.

137. Hong GS, Antaris AL, Dai HJ. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. Nature Biomedical Engineering. 2017;1(1):1-22.

138. Ding F, Zhan Y, Lu X, Sun Y. Recent advances in near-infrared II fluorophores for multifunctional biomedical imaging. Chem Sci. 2018;9(19):4370-80.

139. Schmitt M, Mayerhöfer T, Popp J, Kleppe I, Weisshart K. Light-Matter Interaction. Handbook of Biophotonics2013. p. 87-261.

140. Lenz P. In vivo excitation of photosensitizers by infrared light. Photochem Photobiol. 1995;62(2):333-8.

141. Heinemann F, Karges J, Gasser G. Critical overview of the use of Ru (II) polypyridyl complexes as photosensitizers in one-photon and two-photon photodynamic therapy. Accounts of chemical research. 2017;50(11):2727-36.

142. Kim M, Ghogare A, Greer A, Zhu T. On the in vivo photochemical rate parameters for PDT reactive oxygen species modeling. Physics in Medicine and Biology. 2017;62(5):1-48.

143. Li X, Zheng BD, Peng XH, Li SZ, Ying JW, Zhao YY, et al. Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. Coordination Chemistry Reviews. 2019;379:147-60.

144. Zheng BD, Ye J, Zhang XQ, Zhang N, Xiao MT. Recent advances in supramolecular activatable phthalocyanine-based photosensitizers for anti-cancer therapy. Coordination Chemistry Reviews. 2021;447:214155.

145. Foote C. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. Photochemistry and Photobiology. 1991;54(5):659.

146. Winterbourn CC. Reactive Oxygen Species in Biological Systems. Vitamin E: Chemistry and Nutritional Benefits. 2019;11:98-117.

147. Gaunt LF, Beggs CB, Georghiou GE. Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: A review. Ieee Transactions on Plasma Science. 2006;34(4):1257-69.

148. Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. Curr Pharm Des. 2004;10(14):1611-26.

149. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc. 1988;63(4):381-9.

150. Halliwell B. Manganese ions, oxidation reactions and the superoxide radical. Neurotoxicology. 1984;5(1):113-7.

151. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of iron in oxygen radical reactions. Methods Enzymol. 1984;105:47-56.

152. Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. Phys Med Biol. 2008;53(9):61-109.

153. Valenzeno DP. Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. Photochem Photobiol. 1987;46(1):147-60.

154. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. Drug Discovery Today. 1999;4(11):507-17.

155. Ricchelli F. Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. J Photochem Photobiol B. 1995;29(2-3):109-18.

156. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. Cancers (Basel). 2011;3(2):2516-39.

157. Zampetti A, Minotto A, Squeo BM, Gregoriou VG, Allard S, Scherf U, et al. Highly efficient solid-state near-infrared organic light-emitting diodes incorporating ADA dyes based on α, β-unsubstituted “BODIPY” moieties. Scientific reports. 2017;7(1):1-7.

158. Castano AP, Mroz P, Wu MX, Hamblin MR. Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(14):5495-500.

159. Kee HL, Bhaumik J, Diers JR, Mroz P, Hamblin MR, Bocian DF, et al. Photophysical Characterization of Imidazolium-Substituted Pd(II), In(III), and Zn(II) Porphyrins as Photosensitizers for Photodynamic Therapy. J Photochem Photobiol A Chem. 2008;200(2-3):346-55.

160. Mirkovic T, Ostroumov EE, Anna JM, van Grondelle R, Govindjee, Scholes GD. Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms. Chem Rev. 2017;117(2):249-93.

161. Kalinowski J, Fattori V, Cocchi M, Williams JAG. Light-emitting devices based on organometallic platinum complexes as emitters. Coordination Chemistry Reviews. 2011;255(21-22):2401-25.

162. Tuchin V. Tissue optics and photonics: Light-tissue interaction II. J. Biomed. Photonics Eng. 22016. p. 030201.

163. Hamblin MR, Huang Y-Y. Imaging in photodynamic therapy. New York: Taylor & Francis; 2017.

164. Sternberg ED, Dolphin D, Bruckner C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. Tetrahedron. 1998;54(17):4151-202.

165. Turro NJ, Ramamurthy V, Scaiano JC. Modern molecular photochemistry of organic molecules. Sausalito, Calif.: University Science Books; 2010. p.1-1084.

166. Valeur B, Berberan-Santos MN. Molecular fluorescence: principles and applications: John Wiley & Sons; 2012.

167. Bonnett R. Chemical aspects of photodynamic therapy: CRC Press; 2000. p.30-50.

168. Peng Q, Juzeniene A, Chen J, Svaasand LO, Warloe T, Giercksky KE, et al. Lasers in medicine. Reports on Progress in Physics. 2008;71(5):056701.

169. Kim D-J, Kim H-J, Eom S-H, Lee K-J, Cho W-K, Chung S-H, editors. Haze acceleration system for photo mask application by using high repetition ArF excimer laser. Photomask and Next-Generation Lithography Mask Technology XV; 2008: SPIE.

170. Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. Phys Med Biol. 2013;58(11):37-61.

171. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. Dose Response. 2009;7(4):358-83.

172. Walkenhorst O, Luther J, Reinhart C, Timmer J. Dynamic annual daylight simulations based on one-hour and one-minute means of irradiance data. Solar Energy. 2002;72(5):385-95.

173. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. Lasers Med Sci. 2008;23(3):217-28.

174. Jin CS. Porphyrin-based nanostructure-dependent photodynamic and photothermal therapies(Dissertation). Toronto: University of Toronto (Canada); 2015.

175. Thomsen S. Pathologic analysis of photothermal and photomechanical effects of laser-tissue interactions. Photochem Photobiol. 1991;53(6):825-35.

176. Selting W. Laser Operating Parameters for Hard and Soft Tissue, Surgical and PBM Management. Lasers in Dentistry—Current Concepts: Springer; 2017. p. 57-86.

177. Valvano JW, Cochran JR, Diller KR. Thermal-Conductivity and Diffusivity of Biomaterials Measured with Self-Heated Thermistors. International Journal of Thermophysics. 1985;6(3):301-11.

178. Vujaskovic Z, Song CW. Physiological mechanisms underlying heat-induced radiosensitization. Int J Hyperthermia. 2004;20(2):163-74.

179. Wright NT, Humphrey JD. Denaturation of collagen via heating: an irreversible rate process. Annu Rev Biomed Eng. 2002;4(1):109-28.

180. Tadir Y, Gaspar A, Lev-Sagie A, Alexiades M, Alinsod R, Bader A, et al. Light and energy based therapeutics for genitourinary syndrome of menopause: Consensus and controversies. Lasers Surg Med. 2017;49(2):137-59.

181. Hamblin MR. Photobiomodulation or low-level laser therapy. J Biophotonics. 2016;9(11-12):1122-24.

182. Heiskanen V, Hamblin MR. Photobiomodulation: lasersvs.light emitting diodes? Photochemical & Photobiological Sciences. 2018;17(8):1003-17.

183. Dompe C, Moncrieff L, Matys J, Grzech-Lesniak K, Kocherova I, Bryja A, et al. Photobiomodulation-Underlying Mechanism and Clinical Applications. J Clin Med. 2020;9(6):1724.

184. Ailioaie LM, Litscher G. Molecular and Cellular Mechanisms of Arthritis in Children and Adults: New Perspectives on Applied Photobiomodulation. Int J Mol Sci. 2020;21(18):6565.

185. Whelan HT, Houle JM, Whelan NT, Donohoe DL, Cwiklinski J, Schmidt MH, et al., editors. The NASA light-emitting diode medical program—progress in space flight and terrestrial applications. AIP Conference Proceedings; 2000: American Institute of physics.

186. Wang J, Wang X, Sun Z, Wang X, Yang H, Shi S, et al. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. Stem Cells Dev. 2010;19(9):1375-83.

187. Hamblin MR. Photobiomodulation for traumatic brain injury and stroke. J Neurosci Res. 2018;96(4):731-43.

188. Ohshiro T, Calderhead RG. Development of low reactive-level laser therapy and its present status. J Clin Laser Med Surg. 1991;9(4):267-75.

189. Splinter R. An introduction to biomedical optics. New York: CRC press; 2006. p.-100.

190. Mester E, Ludany G, Selyei M, Szende B. The stimulating effect of low power laser rays on biological systems. 1968:1-99.

191. Mester E, Szende B, Gärtner P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. Radiobiologia, radiotherapia. 1968;9(5):621-6.

192. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. Am J Surg. 1971;122(4):532-5.

193. Xuan K, Li B, Guo H, Sun W, Kou X, He X, et al. Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. Sci Transl Med. 2018;10(455):eaaf3227.

194. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. IEEE J Sel Top Quantum Electron. 2016;22(3):348-64.

195. Ferreira LS, Diniz IMA, Maranduba CMS, Miyagi SPH, Rodrigues M, Moura-Netto C, et al. Short-term evaluation of photobiomodulation therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental pulp stem cells. Lasers Med Sci. 2019;34(4):659-66.

196. Kulkarni S, Meer M, George R. The effect of photobiomodulation on human dental pulp-derived stem cells: systematic review. Lasers Med Sci. 2020;35(9):1889-97.

197. Harris DM. Editorial comment biomolecular mechanisms of laser biostimulation. Journal of clinical laser medicine & surgery. 1991;9(4):277-80.

198. Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. Photochem Photobiol. 2008;84(5):1091-9.

199. Karu T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. Photomedicine and Laser Surgery. 2010;28(2):159-60.

200. Palacios-Callender M, Quintero M, Hollis VS, Springett RJ, Moncada S. Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(20):7630-5.

201. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. FEBS Lett. 1994;345(1):50-4.

202. Greco M, Guida G, Perlino E, Marra E, Quagliariello E. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. Biochem Biophys Res Commun. 1989;163(3):1428-34.

203. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. Photomed Laser Surg. 2005;23(4):355-61.

204. Tanigawa M, Shinohara T, Nishimura K, Nagata K, Ishizuka M, Nagata Y. Purification of Helicobacter pylori NCTC 11637 cytochrome bc1 and respiration with D-proline as a substrate. J Bacteriol. 2010;192(5):1410-5.

205. Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M, Baumler W. Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. Biophys J. 2006;91(4):1452-9.

206. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. Ann Biomed Eng. 2012;40(2):516-33.

207. Hashmi JT, Huang YY, Sharma SK, Kurup DB, De Taboada L, Carroll JD, et al. Effect of pulsing in low-level light therapy. Lasers Surg Med. 2010;42(6):450-66.

208. Zein R, Selting W, Hamblin MR. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. J Biomed Opt. 2018;23(12):1-17.

209. Viliani T, Carrabba C, Mangone G, Pasquetti P. High intensity pulsed Nd: YAG laser in painful knee osteoarthritis: the biostimulating protocol. Energy for Health. 2012;9:18-22.

210. Paltauf G, Dyer PE. Photomechanical processes and effects in ablation. Chem Rev. 2003;103(2):487-518.

211. Gupta PK, Patel H. Biomedical applications of lasers. Laser physics and technology: Springer; 2015. p. 301-31.

212. Bernstein EF, editor Laser tattoo removal. Seminars in plastic surgery; 2007: © Thieme Medical Publishers.

213. Butler T. Laser tattoo removal: an overview of ink fragmentation and elimination. Journal of Aesthetic Nursing. 2015;4(Sup8):12-7.

214. Dretler SP. Laser lithotripsy: a review of 20 years of research and clinical applications. Lasers Surg Med. 1988;8(4):341-56.

215. Wollin TA, Denstedt JD. The holmium laser in urology. J Clin Laser Med Surg. 1998;16(1):13-20.

216. Itkin A, Gilchrest BA. delta-Aminolevulinic acid and blue light photodynamic therapy for treatment of multiple basal cell carcinomas in two patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome. Dermatol Surg. 2004;30(7):1054-61.

217. Malik Z, Lugaci H. Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. Br J Cancer. 1987;56(5):589-95.

218. Gheewala T, Skwor T, Munirathinam G. Photosensitizers in prostate cancer therapy. Oncotarget. 2017;8(18):30524-38.

219. Celli JP, Spring BQ, Rizvi I, Evans CL, Samkoe KS, Verma S, et al. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. Chem Rev. 2010;110(5):2795-838.

220. Biel MA. Photodynamic therapy and the treatment of head and neck neoplasia. Laryngoscope. 1998;108(9):1259-68.

221. Kormeili T, Yamauchi PS, Lowe NJ. Topical photodynamic therapy in clinical dermatology. Br J Dermatol. 2004;150(6):1061-9.

222. Bitter Jr PH. Noninvasive rejuvenation of photodamaged skin using serial, full-face intense pulsed light treatments. Dermatologic surgery. 2000;26(9):835-43.

223. Goldberg DJ. Photodynamic therapy in skin rejuvenation. Clin Dermatol. 2008;26(6):608-13.

224. Kohl E, Karrer S. Photodynamic therapy for photorejuvenation and non-oncologic indications: overview and update. G Ital Dermatol Venereol. 2011;146(6):473-85.

225. Kubler A, Haase T, Rheinwald M, Barth T, Muhling J. Treatment of oral leukoplakia by topical application of 5-aminolevulinic acid. Int J Oral Maxillofac Surg. 1998;27(6):466-9.

226. Santos MA, Belo VG, Santos G. Effectiveness of photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid and intense pulsed light versus intense pulsed light alone in the treatment of acne vulgaris: comparative study. Dermatol Surg. 2005;31(8 Pt 1):910-5.

227. Fritsch C, Lang K, Schulte K-W, Neuse WH, Ruzicka T, Lehmann P. Fluorescence Diagnosis with δ-Aminolevulinic Acid-Induced Porphyrins in Dermatology. Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods: Springer; 2001. p. 344-67.

228. Buchczyk DP, Klotz LO, Lang K, Fritsch C, Sies H. High efficiency of 5-aminolevulinate-photodynamic treatment using UVA irradiation. Carcinogenesis. 2001;22(6):879-83.

229. Reinhold U. A review of BF-200 ALA for the photodynamic treatment of mild-to-moderate actinic keratosis. Future Oncol. 2017;13(27):2413-28.

230. Clementoni MT, M BR, Munavalli GS. Photodynamic photorejuvenation of the face with a combination of microneedling, red light, and broadband pulsed light. Lasers Surg Med. 2010;42(2):150-9.

231. Gold MH, Goldman MP. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy: where we have been and where we are going. Dermatol Surg. 2004;30(8):1077-83.

232. Anstey AV, Hift RJ. Liver disease in erythropoietic protoporphyria: insights and implications for management. Postgraduate Medical Journal. 2007;83(986):739-48.

233. Smith AG, Foster JR. The association between chemical-induced porphyria and hepatic cancer. Toxicol Res (Camb). 2018;7(4):647-63.

234. Egger NG, Lee C, Anderson KE. Disorders of heme biosynthesis. Inborn Metabolic Diseases: Springer; 2006. p. 451-64.

235. Kuijpers DI, Thissen MR, Thissen CA, Neumann MH. Similar effectiveness of methyl aminolevulinate and 5-aminolevulinate in topical photodynamic therapy for nodular basal cell carcinoma. J Drugs Dermatol. 2006;5(7):642-5.
236. Lehmann P. Methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy: a review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. Br J Dermatol. 2007;156(5):793-801.

237. Kasche A, Luderschmidt S, Ring J, Hein R. Photodynamic therapy induces less pain in patients treated with methyl aminolevulinate compared to aminolevulinic acid. J Drugs Dermatol. 2006;5(4):353-6.

238. Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. Biosynthesis of heme in mammals. Biochim Biophys Acta. 2006;1763(7):723-36.

239. Ferreira GC, Kadish KM, Smith KM, Guilard R. The Handbook of Porphyrin Science: World Scientific; 2013.

240. Sano S, Inoue S, Tanabe Y, Sumiya C, Koike S. Significance of mitochondria for porphyrin and heme biosynthesis. Science. 1959;129(3344):275-6.

241. Granick S. The induction in vitro of the synthesis of delta-aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals. J Biol Chem. 1966;241(6):1359-75.

242. Watanabe N, Hayashi N, Kikuchi G. delta-Aminolevulinate synthase isozymes in the liver and erythroid cells of chicken. Biochem Biophys Res Commun. 1983;113(2):377-83.

243. Karim Z, Gouya L, Deybach J-C, Puy H. Heme biosynthesis and pathophysiology of porphyrias. Handbook of Porphyrin Science (Volume 29) With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine—Volume 29: Porphyrias and Sideroblastic Anemias: World Scientific; 2014. p. 89-118.

244. Mense SM, Zhang L. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. Cell Res. 2006;16(8):681-92.

245. Vlasits J, Jakopitsch C, Bernroitner M, Zamocky M, Furtmuller PG, Obinger C. Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. Arch Biochem Biophys. 2010;500(1):74-81.

246. Gillam ME, Hunter GA, Ferreira GC. The ultimate step of heme biosynthesis: orchestration between iron trafficking and porphyrin synthesis. Handbook of Porphyrin Science (Volume 26) With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine—Volume 26: Heme Biochemistry: World Scientific; 2014. p. 129-89.

247. Neuwirt J, Poňka P. Haem synthesis. Regulation of Haemoglobin Synthesis: Springer; 1977. p. 55-86.

248. Shemin D, Wittenberg J. The mechanism of porphyrin formation; the role of the tricarboxylic acid cycle. J Biol Chem. 1951;192(1):315-34.
249. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Howard-Jones AR. Biological formation of pyrroles: nature's logic and enzymatic machinery. Nat Prod Rep. 2006;23(4):517-31.

250. Boateng MO, Corrigall AV, Sturrock E, Meissner PN. Characterisation of the flavin adenine dinucleotide binding region of Myxococcus xanthus protoporphyrinogen oxidase. Biochem Biophys Rep. 2015;4:306-11.

251. Hao GF, Zuo Y, Yang SG, Yang GF. Protoporphyrinogen oxidase inhibitor: an ideal target for herbicide discovery. Chimia (Aarau). 2011;65(12):961-9.

252. Kennedy JC, Pottier RH. New trends in photobiology: endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1992;14(4):275-92.

253. Murray RK. Porphyrins & Bile Pigments a LANGE medical book2003. p. 270.
254. Heinemann IU, Jahn M, Jahn D. The biochemistry of heme biosynthesis. Arch Biochem Biophys. 2008;474(2):238-51.

255. Gou EW, Phillips JD, Anderson KE. The porphyrias. Metabolic Diseases: IOS Press; 2017. p. 543-75.

256. Granick S, Urata G. Increase in activity of δ-aminolevulinic acid synthetase in liver mitochondria induced by feeding of 3, 5-dicarbethoxy-1, 4-dihydrocollidine. Journal of Biological Chemistry. 1963;238(2):821-27.

257. Tomita Y, Ohashi A, Kikuchi G. Induction of δ-aminolevulinate synthetase in organ culture of chick embryo liver by allylisopropylacetamide and 3, 5-dicarbethoxy-l, 4-dihydrocollidine. The Journal of Biochemistry. 1974;75(5):1007-15.

258. Fotinos N, Campo MA, Popowycz F, Gurny R, Lange N. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives. Photochem Photobiol. 2006;82(4):994-1015.

259. Moan J, Berg K, Gadmar OB, Iani V, Ma L, Juzenas P. The temperature dependence of protoporphyrin IX production in cells and tissues. Photochem Photobiol. 1999;70(4):669-73.

260. Rud E, Gederaas O, Høgset A, Berg K. 5-aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters. Photochemistry and photobiology. 2000;71(5):640-47.

261. Gerritsen MJ, Smits T, Kleinpenning MM, van de Kerkhof PC, van Erp PE. Pretreatment to enhance protoporphyrin IX accumulation in photodynamic therapy. Dermatology. 2009;218(3):193-202.

262. Heuck G, Lange N. Exogenously Induced Endogenous Photosensitizers. Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security: Springer; 2011. p. 391-431.
263. Taketani S, Mohri T, Hioki K, Tokunaga R, Kohno H. Structure and transcriptional regulation of the mouse ferrochelatase gene. Gene. 1999;227(2):117-24.

264. Bagdonas S, Ma LW, Iani V, Rotomskis R, Juzenas P, Moan J. Phototransformations of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in vitro: a spectroscopic study. Photochem Photobiol. 2000;72(2):186-92.

265. Marks G, Hunter E, Terner U, Schneck D. Studies of the relationship between chemical structure and porphyria-inducing activity. Biochemical pharmacology. 1965;14(7):1077-84.

266. De Matteis F, Lim CK. Porphyrins as “nondestructive” indicators of exposure to environmental pollutants. Nondestructive biomarkers in vertebrates. 2020:93-128.

267. Phillips JD. Heme biosynthesis and the porphyrias. Mol Genet Metab. 2019;128(3):164-77.

268. Nath KA, Haggard JJ, Croatt AJ, Grande JP, Poss KD, Alam J. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. Am J Pathol. 2000;156(5):1527-35.

269. Balla G, Vercellotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. Lab Invest. 1991;64(5):648-55.

270. Olsson MG, Olofsson T, Tapper H, Åkerström B. The lipocalin α 1-microglobulin protects erythroid K562 cells against oxidative damage induced by heme and reactive oxygen species. Free radical research. 2008;42(8):725-36.

271. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. Toxicol Lett. 2005;157(3):175-88.

272. Krammer B, Plaetzer K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside. Photochem Photobiol Sci. 2008;7(3):283-9.

273. Gize A. The analysis of organic matter in ore deposits. Bitumens in ore deposits: Springer; 1993. p. 28-52.

274. Winkelman J, Slater G, Grossman J. The concentration in tumor and other tissues of parenterally administered tritium-and 14C-labeled tetraphenylporphinesulfonate. Cancer Research. 1967;27(11 Part 1):2060-64.

275. Berg K, Steen HB, Winkelman JW, Moan J. Synergistic effects of photoactivated tetra(4-sulfonatophenyl)porphine and nocodazole on microtubule

assembly, accumulation of cells in mitosis and cell survival. J Photochem Photobiol B. 1992;13(1):59-70.

276. Neumann J, Brandsch M. Delta-aminolevulinic acid transport in cancer cells of the human extrahepatic biliary duct. J Pharmacol Exp Ther. 2003;305(1):219-24.
277. Evensen JF, Moan J. A test of different photosensitizers for photodynamic treatment of cancer in a murine tumor model. Photochem Photobiol. 1987;46(5):859-65.

278. Huang P, Wang D, Su Y, Huang W, Zhou Y, Cui D, et al. Combination of small molecule prodrug and nanodrug delivery: amphiphilic drug-drug conjugate for cancer therapy. J Am Chem Soc. 2014;136(33):11748-56.

279. Dietz EM. Chlorophyll and hemoglobin—Two natural pyrrole pigments. Journal of Chemical Education. 1935;12(5):208.

280. Stern AJ. Hans Fischer (1881-1945). Ann N Y Acad Sci. 1973;206(1):752-61.

281. Dailey HA, Smith A. Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. Biochem J. 1984;223(2):441-5.

282. Kemmner W, Wan K, Ruttinger S, Ebert B, Macdonald R, Klamm U, et al. Silencing of human ferrochelatase causes abundant protoporphyrin-IX accumulation in colon cancer. FASEB J. 2008;22(2):500-9.

283. Banfi S, Caruso E, Buccafurni L, Murano R, Monti E, Gariboldi M, et al. Comparison between 5,10,15,20-tetraaryl- and 5,15-diarylporphyrins as photosensitizers: synthesis, photodynamic activity, and quantitative structure-activity relationship modeling. J Med Chem. 2006;49(11):3293-304.

284. Wainwright M. Therapeutic applications of near-infrared dyes. Coloration Technology. 2010;126(3):115-26.

285. Shan X, Wang T, Li S, Yang L, Fu L, Yang G, et al. Photophysical properties of diphenyl-2,3-dihydroxychlorin and diphenylchlorin. J Photochem Photobiol B. 2006;82(2):140-5.

286. Leznoff CC, Lever ABP. Phthalocyanines: properties and applications: VCH New York; 1989. p.75-100.

287. Stilman M, Leznoff C, Lever A. Phthalocyanines: Properties and Applications: 3VCH Publishers, New York; 1993.

288. Schmidt A, Chau L, Back A, Armstrong N, Leznoff C, Lever A. Phthalocyanines: Properties and Applications. VCH, New York. 1996;4:83-181.

289. Berezin BD. Coordination compounds of porphyrins and phthalocyanine. Chichester Eng. ; New York: Wiley; 1981. p.180-6.

290. Wagner JR, Ali H, Langlois R, Brasseur N, Lier JE. Biological Activities of Phthalocyanines—Vi. Photooxidation of L-Tryptophan By Selectively Sulfonated Gallium Phthalocyanines: Singlet Oxygen Yields And Effect Of Aggregation. Photochemistry and photobiology. 1987;45(5):587-94.

291. Darwent JR, Douglas P, Harriman A, Porter G, Richoux MC. Metal Phthalocyanines and Porphyrins as Photosensitizers for Reduction of Water to Hydrogen. Coordination Chemistry Reviews. 1982;44(1):83-126.

292. Ali H, van Lier JE. Metal complexes as photo- and radiosensitizers. Chem Rev. 1999;99(9):2379-450.

293. Johnson A, Northcote-Smith J, Suntharalingam K. Emerging Metallopharmaceuticals for the Treatment of Cancer. Trends in Chemistry. 2021;3(1):47-58.

294. Lang K, Mosinger J, Wagnerova DM. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. Coordination Chemistry Reviews. 2004;248(3-4):321-50.

295. Verdree VT, Pakhomov S, Su G, Allen MW, Countryman AC, Hammer RP, et al. Water soluble metallo-phthalocyanines: the role of the functional groups on the spectral and photophysical properties. J Fluoresc. 2007;17(5):547-63.

296. Lo PC, Huang JD, Cheng DY, Chan EY, Fong WP, Ko WH, et al. New amphiphilic silicon(IV) phthalocyanines as efficient photosensitizers for photodynamic therapy: synthesis, photophysical properties, and in vitro photodynamic activities. Chemistry. 2004;10(19):4831-8.

297. Oleinick NL, Antunez AR, Clay ME, Rihter BD, Kenney ME. New phthalocyanine photosensitizers for photodynamic therapy. Photochemistry and photobiology. 1993;57(2):242-47.

298. Zaidi SI, Agarwal R, Eichler G, Rihter BD, Kenney ME, Mukhtar H. Photodynamic effects of new silicon phthalocyanines: in vitro studies utilizing rat hepatic microsomes and human erythrocyte ghosts as model membrane sources. Photochemistry and photobiology. 1993;58(2):204-10.

299. Ben-Hur E, Zuk M, Kenney M, Oleinick N, Mulvihill J, Horowitz B. Action spectra (660-700 nm) for virus inactivation and red cell damage photosensitized by the silicon phthalocyanine Pc 4. Lasers in medical science. 1996;11(4):221-25.

300. He J, Larkin HE, Li YS, Rihter BD, Zaidi SIA, Rodgers MAJ, et al. The synthesis, photophysical and photobiological properties and in vitro structure-activity relationships of a set of silicon phthalocyanine PDT photosensitizers. Photochemistry and Photobiology. 1997;65(3):581-86.

301. Brasseur N, Ali H, Langlois R, Lier JE. Biological Activities of Phthalocyanines-Ix. Photosensitization Ofv-79 Chinese Hamster Cells Andemt–6 Mouse

Mammary Tumor By Selectively Sulfonated Zinc Phthalocyanines. Photochemistry and photobiology. 1988;47(5):705-11.

302. Paquette B, Ali H, Langlois R, LIER JE. Biological Activities of Phthalocyanines—Viii. Cellular Distribution Inv–79 Chinese Hamster Cells and Phototoxicity Of Selectively Sulfonated Aluminum Phthalocyanines. Photochemistry and photobiology. 1988;47(2):215-20.

303. He J, Horng MF, Deahl JT, Oleinick NL, Evans HH. Variation in photodynamic efficacy during the cellular uptake of two phthalocyanine photosensitizers. Photochem Photobiol. 1998;67(6):720-8.

304. Butler JM. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. 2 ed. London: Elsevier; 2005. p.1-85.

305. Wagner TE, Yun JS. Fine structure of human sperm chromatin. Arch Androl. 1979;2(4):291-4.

306. Rothbart SB, Strahl BD. Interpreting the language of histone and DNA modifications. Biochim Biophys Acta. 2014;1839(8):627-43.

307. Ferri E. Selective Bromodomain Inhibition of Fungal Transcriptional Activator BDF1(Dissertation). California: University of Southern California; 2016.

308. Blakey CA, Litt MD. Epigenetic gene expression—an introduction. Epigenetic gene expression and regulation: Elsevier; 2015. p. 1-19.

309. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. Nature. 2003;421(6921):448-53.

310. Bierne H. Cross talk between bacteria and the host epigenetic machinery. Epigenetics of Infectious Diseases: Springer; 2017. p. 113-58.

311. Weissbach A. A chronicle of DNA methylation (1948-1975). EXS. 1993;64:1-10.

312. Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. J Biol Chem. 1948;175(1):315-32.

313. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. Cytogenet Cell Genet. 1975;14(1):9-25.

314. Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurerfogy I, Jeppesen P, Klein F, et al. Purification, Sequence, and Cellular-Localization of a Novel Chromosomal Protein That Binds to Methylated DNA. Cell. 1992;69(6):905-14.

315. Bird AP, Taggart MH, Smith BA. Methylated and unmethylated DNA compartments in the sea urchin genome. Cell. 1979;17(4):889-901.

316. Paigen K. Genetic factors in developmental regulation. Physiological genetics: Elsevier; 1979. p. 1-61.

317. Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. Cpg Islands as Gene Markers in the Human Genome. Genomics. 1992;13(4):1095-107.
318. Varley KE, Gertz J, Bowling KM, Parker SL, Reddy TE, Pauli-Behn F, et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. Genome Res. 2013;23(3):555-67.

319. Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. Nat Protoc. 2006;1(5):2353-64.

320. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nature reviews genetics. 2008;9(6):465-76.

321. Song K, Li L, Zhang G. The association between DNA methylation and exon expression in the Pacific oyster Crassostrea gigas. PloS one. 2017;12(9):e0185224.

322. Tompkins JD, Jung M, Chen C-y, Lin Z, Ye J, Godatha S, et al. Mapping human pluripotent-to-cardiomyocyte differentiation: methylomes, transcriptomes, and exon DNA methylation “memories”. EBioMedicine. 2016;4:74-85.

323. Duruisseaux M, Esteller M. Lung cancer epigenetics: from knowledge to applications. Seminars in cancer biology. 2017;51:116-28.

324. Gunthert U, Schweiger M, Stupp M, Doerfler W. DNA methylation in adenovirus, adenovirus-transformed cells, and host cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1976;73(11):3923-7.

325. Prives C, Gilboa E, Revel M, Winocour E. Cell-free translation of simian virus 40 early messenger RNA coding for viral T-antigen. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(2):457-61.

326. Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. Bioessays. 1998;20(8):615-26.

327. Ardiel EL, Rankin CH. The importance of touch in development. Paediatr Child Health. 2010;15(3):153-6.

328. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. Nat Neurosci. 2004;7(8):847-54.

329. Cheng Y, He C, Wang M, Ma X, Mo F, Yang S, et al. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. Signal Transduct Target Ther. 2019;4(1):1-39.

330. Jones PA, Issa JP, Baylin S. Targeting the cancer epigenome for therapy. Nat Rev Genet. 2016;17(10):630-41.

331. Shen L, Wu H, Diep D, Yamaguchi S, D'Alessio AC, Fung HL, et al. Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. Cell. 2013;153(3):692-706.

332. Nawy T. Dynamics of DNA demethylation. Nat Methods. 2013;10(6):466.
333. Hansel-Hertsch R, Simeone A, Shea A, Hui WWI, Zyner KG, Marsico G, et al. Landscape of G-quadruplex DNA structural regions in breast cancer. Nat Genet. 2020;52(9):878-83.

334. Zhang X, Spiegel J, Martinez Cuesta S, Adhikari S, Balasubramanian S. Chemical profiling of DNA G-quadruplex-interacting proteins in live cells. Nat Chem. 2021;13(7):626-33.

335. Raiber EA, Portella G, Martinez Cuesta S, Hardisty R, Murat P, Li Z, et al. 5-Formylcytosine organizes nucleosomes and forms Schiff base interactions with histones in mouse embryonic stem cells. Nat Chem. 2018;10(12):1258-66.

336. Lane D, Crawford L. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. Nature. 1979;278(5701):261-63.

337. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell. 1979;17(1):43-52.

338. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(5):2420-4.

339. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res. 1994;54(18):4855-78.

340. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Goodrow TL, Palmer JL, Nichols WW, et al. p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 1993;85(20):1657-69.

341. Pfeifer GP, Denissenko MF. Formation and repair of DNA lesions in the p53 gene: relation to cancer mutations? Environmental and molecular mutagenesis. 1998;31(3):197-205.

342. Hainaut P. TP53: Coordinator of the processes that underlie the hallmarks of cancer. p53 in the Clinics: Springer; 2013. p. 1-23.

343. Hupp T, Meek D, Midgley C, Lane D. Regulation of the specific DNA binding function of p53. Cell. 1992;71(5):875-86.

344. Ronen A, Glickman BW. Human DNA repair genes. Environ Mol Mutagen. 2001;37(3):241-83.

345. Meek DW. The p53 response to DNA damage. DNA Repair (Amst). 2004;3(8-9):1049-56.

346. Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. Biochem Biophys Res Commun. 2005;331(3):851-8.

347. Linke SP, Clarkin KC, Di Leonardo A, Tsou A, Wahl GM. A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. Genes & development. 1996;10(8):934-47.

348. De Souza R, Costa Ayub L, Yip K. Mitotic catastrophe. Apoptosis and Beyond Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. 2018:475-510.

349. Lee JT, Gu W. The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. Cell Death Differ. 2010;17(1):86-92.

350. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. Cancer Lett. 2013;332(2):237-48.

351. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. Nature. 1993;362(6423):849-52.

352. Komarova EA, Chernov MV, Franks R, Wang K, Armin G, Zelnick CR, et al. Transgenic mice with p53-responsive lacZ: p53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity in vivo. The EMBO journal. 1997;16(6):1391-400.

353. Gudkov AV, Komarova EA. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. Nat Rev Cancer. 2003;3(2):117-29.

354. Momand J, Wu H-H, Dasgupta G. MDM2—master regulator of the p53 tumor suppressor protein. Gene. 2000;242(1-2):15-29.

355. Marchenko ND, Zaika A, Moll UM. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria: a potential role in apoptotic signaling. Journal of Biological Chemistry. 2000;275(21):16202-12.

356. Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, Moll UM. Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria: detection by immunofluorescence on whole cells. FEBS letters. 2001;488(3):110-5.

357. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. Molecular cell. 2003;11(3):577-90.

358. Schuler M, Green D. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. Biochemical Society Transactions. 2001;29(6):684-88.

359. Hock AK, Vousden KH. Tumor suppression by p53: fall of the triumvirate? Cell. 2012;149(6):1183-85.

360. LeBoeuf M, Terrell A, Trivedi S, Sinha S, Epstein JA, Olson EN, et al. Hdac1 and Hdac2 act redundantly to control p63 and p53 functions in epidermal progenitor cells. Developmental cell. 2010;19(6):807-18.

361. Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. 2009;1787(5):414-20.

362. Kirkin V, Joos S, Zörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2004;1644(2-3):229-49.

363. Gupta S, Kass GE, Szegezdi E, Joseph B. The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases. J Cell Mol Med. 2009;13(6):1004-33.

364. Hikisz P, Kiliańska Z. PUMA, a critical mediator of cell death—one decade on from its discovery. Cellular and Molecular Biology Letters. 2012;17(4):646-69.

365. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. Curr Opin Cell Biol. 2009;21(6):871-7.

366. Shamas-Din A, Brahmbhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. Biochim Biophys Acta. 2011;1813(4):508-20.

367. Marchenko N, Moll U. Mitochondrial death functions of p53. Molecular & cellular oncology. 2014;1(2):e955995.

368. Fortin A, Cregan SP, MacLaurin JG, Kushwaha N, Hickman ES, Thompson CS, et al. APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. Journal of Cell Biology. 2001;155(2):207-16.

369. Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Schwartzkroin PA, Morrison RS. Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. J Neurosci. 1998;18(4):1363-73.

370. Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB, Harris CC. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. Cancer Research. 2001;61(18):6660-64.

371. Kannan K, Kaminski N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Amariglio N, Givol D. DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. Oncogene. 2001;20(26):3449-55.

372. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. Eur J Biochem. 2001;268(10):2764-72.

373. Ivanov GS, Ivanova T, Kurash J, Ivanov A, Chuikov S, Gizatullin F, et al. Methylation-acetylation interplay activates p53 in response to DNA damage. Molecular and cellular biology. 2007;27(19):6756-69.

374. Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. Cell. 1997;90(4):595-606.

375. Jang JH, Surh YJ. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. Biochem Pharmacol. 2003;66(8):1371-9.

376. Hetz C. Bcl-2 protein family : essential regulators of cell death. New York: Springer Science; 2010. p. 145.

377. Hetz C, Glimcher L. The daily job of night killers: alternative roles of the Bcl-2 family in organelle physiology. Trends Cell Biol. 2008;18(1):38-44.

378. Vo TT, Letai A. BH3-Only Proteins and Their Effects on Cancer. Bcl-2 Protein Family: Essential Regulators of Cell Death. 2010;687:49-63.

379. Cotter T, Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Güner D. Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. Essays in biochemistry. 2003;39:73-88.

380. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic Bcl-2 family members. Cancer Cell. 2006;9(5):351-65.

381. Van Delft MF, Huang D. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. Cell research. 2006;16(2):203-13.

382. Akl H, Vervloessem T, Kiviluoto S, Bittremieux M, Parys JB, De Smedt H, et al. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum. Biochim Biophys Acta. 2014;1843(10):2240-52.

383. Yin XM. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. Gene. 2006;369:7-19.

384. Belka C, Rudner J, Wesselborg S, Stepczynska A, Marini P, Lepple-Wienhues A, et al. Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. Oncogene. 2000;19(9):1181-90.

385. Fricker M, O'Prey J, Tolkovsky AM, Ryan KM. Phosphorylation of Puma modulates its apoptotic function by regulating protein stability. Cell Death Dis. 2010;1(7):e59.

386. L Hartman M, Czyz M. Pro-apoptotic activity of BH3-only proteins and BH3 mimetics: from theory to potential cancer therapy. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). 2012;12(8):966-81.

387. Pécot J, Maillet L, Le Pen J, Vuillier C, de Carné Trécesson S, Fétiveau A, et al. Tight sequestration of BH3 proteins by Bcl-xL at subcellular membranes contributes to apoptotic resistance. Cell reports. 2016;17(12):3347-58.

388. Juin P, Geneste O, Raimbaud E, Hickman JA. Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research. 2004;1644(2-3):251-60.
389. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell. 1997;91(2):231-41.

390. Roufayel R, Younes K, Al-Sabi A, Murshid N. BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. Life. 2022;12(2).

391. Han CW, Lee HN, Jeong MS, Park SY, Jang SB. Structural basis of the p53 DNA binding domain and PUMA complex. Biochem Biophys Res Commun. 2021;548:39-46.

392. Choi K HR, Luo Y, Li G, Kessel D. Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. Cancer Res. 1999;59(14):3429-32.

393. Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. Oncogene. 2001;20(26):3420-7.

394. Reiners Jr J, Caruso J, Mathieu P, Chelladurai B, Yin X, Kessel D. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. Cell death and differentiation. 2002;9(9):934.

395. Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? Cancer Res. 2006;66(6):2885-8.

396. Andrzejak M, Price M, Kessel DH. Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells. Autophagy. 2011;7(9):979-84.

397. Logue SE, Martin SJ. Mammalian caspase activation pathways in apoptosis and inflamation. design of caspase inhibitors as potential clinical agents. 2008:1-13.

398. Bao Q, Riedl SJ, Shi Y. Structure of Apaf-1 in the auto-inhibited form: a critical role for ADP. Cell Cycle. 2005;4(8):1001-3.

399. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell. 1997;90(3):405-13.

400. Hu Y, Ding L, Spencer DM, Nunez G. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. J Biol Chem. 1998;273(50):33489-94.

401. van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. Biochem Biophys Res Commun. 2003;304(3):487-97.

402. O'Brien T, Linton SD. Design of caspase inhibitors as potential clinical agents. 1 ed. Florida: CRC press; 2008. p.1-308.

403. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. Biochimie. 2002;84(2-3):203-14.

404. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. Mol Cell. 2002;9(2):423-32.

405. Clark AC. Caspase Allostery and Conformational Selection. Chem Rev. 2016;116(11):6666-706.

406. MacKenzie SH, Clark AC. Death by caspase dimerization. Adv Exp Med Biol. 2012;747:55-73.

407. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell. 1997;91(4):479-89.

408. Kang BH, Ko E, Kwon O-K, Choi KY. The structure of procaspase 6 is similar to that of active mature caspase 6. Biochemical Journal. 2002;364(3):629-34.

409. Talanian RV, Dang LC, Ferenz CR, Hackett MC, Mankovich JA, Welch JP, et al. Stability and oligomeric equilibria of refolded interleukin-1beta converting enzyme. J Biol Chem. 1996;271(36):21853-8.

410. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. J Cell Biol. 1999;144(2):281-92.

411. Kim H-E, Du F, Fang M, Wang X. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005;102(49):17545-50.

412. Shi Y. Mechanical aspects of apoptosome assembly. Curr Opin Cell Biol. 2006;18(6):677-84.

413. Bao Q, Lu W, Rabinowitz JD, Shi Y. Calcium blocks formation of apoptosome by preventing nucleotide exchange in Apaf-1. Mol Cell. 2007;25(2):181-92.

414. Khosravi-Far R. Programmed cell death. Part A, General principles for studying cell death. San Diego, Calif: Academic Press/Elsevier; 2008. xlviii, p. 493.

415. Zhou M, Li Y, Hu Q, Bai XC, Huang W, Yan C, et al. Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. Genes Dev. 2015;29(22):2349-61.

416. Scott CL, Schuler M, Marsden VS, Egle A, Pellegrini M, Nesic D, et al. Apaf-1 and caspase-9 do not act as tumor suppressors in myc-induced lymphomagenesis or mouse embryo fibroblast transformation. The Journal of cell biology. 2004;164(1):89-96.

417. Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. Science. 1999;284(5411):156-9.

418. Moroni MC, Hickman ES, Denchi EL, Caprara G, Colli E, Cecconi F, et al. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. Nature cell biology. 2001;3(6):552-58.

419. Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. Biochimie. 2017;135:111-25.

420. Watanabe T, Hirota Y, Arakawa Y, Fujisawa H, Tachibana O, Hasegawa M, et al. Frequent LOH at chromosome 12q22-23 and Apaf-1 inactivation in glioblastoma. Brain pathology. 2003;13(4):431-39.

421. Baldi A, Santini D, Russo P, Catricala C, Amantea A, Picardo M, et al. Analysis of APAF-1 expression in human cutaneous melanoma progression. Exp Dermatol. 2004;13(2):93-7.

422. Fujimoto A, Takeuchi H, Taback B, Hsueh EC, Elashoff D, Morton DL, et al. Allelic imbalance of 12q22-23 associated with APAF-1 locus correlates with poor disease outcome in cutaneous melanoma. Cancer Res. 2004;64(6):2245-50.

423. Hervouet E, Cheray M, Vallette FM, Cartron PF. DNA methylation and apoptosis resistance in cancer cells. Cells. 2013;2(3):545-73.

424. Zermati Y, Mouhamad S, Stergiou L, Besse B, Galluzzi L, Boehrer S, et al. Nonapoptotic role for Apaf-1 in the DNA damage checkpoint. Mol Cell. 2007;28(4):624-37.

425. Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, et al. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. J Biol Chem. 2000;275(9):6067-70.

426. Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(8):4386-91.

427. Moriishi K, Huang DC, Cory S, Adams JM. Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999;96(17):9683-88.

428. Karki P, Seong C, Kim J, Hur K, Shin S, Lee J, et al. Intracellular K+ inhibits apoptosis by suppressing the Apaf-1 apoptosome formation and subsequent downstream pathways but not cytochrome c release. Cell Death & Differentiation. 2007;14(12):2068-75.

429. Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programed cell death. cell. 1993;74(4):609-19.

430. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN, editors. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. Seminars in cancer biology; 1993.

431. Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulators of cell death. Annu Rev Immunol. 1998;16(1):395-419.

432. Hara A, Hirose Y, Wang A, Yoshimi N, Tanaka T, Mori H. Localization of Bax and Bcl-2 proteins, regulators of programmed cell death, in the human central nervous system. Virchows Arch. 1996;429(4-5):249-53.

433. Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, et al. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic Bcl-2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(21):11357-62.

434. Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. Nat Cell Biol. 2000;2(8):553-5.

435. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. Cell. 2000;103(4):645-54.

436. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020;21(4):204-24.

437. Hsu Y-T, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997;94(8):3668-72.

438. Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, et al. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. J Cell Biol. 2002;159(6):931-8.

439. Estaquier J, Arnoult D. Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. Cell Death Differ. 2007;14(6):1086-94.

440. Gonzalvez F, Schug ZT, Houtkooper RH, MacKenzie ED, Brooks DG, Wanders RJ, et al. Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. J Cell Biol. 2008;183(4):681-96.

441. Renault TT, Floros KV, Elkholi R, Corrigan KA, Kushnareva Y, Wieder SY, et al. Mitochondrial shape governs BAX-induced membrane permeabilization and apoptosis. Mol Cell. 2015;57(1):69-82.

442. Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D, Cheng EH, Antonsson B, Manon S, et al. A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. J Cell Biol. 2001;155(5):725-31.

443. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. Science. 1997;277(5324):370-2.

444. Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of Bcl-2 family proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(2):a008722.

445. Volkmann N, Marassi FM, Newmeyer DD, Hanein D. The rheostat in the membrane: Bcl-2 family proteins and apoptosis. Cell Death Differ. 2014;21(2):206-15.

446. Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(7):532-42.

447. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science. 1997;275(5303):1132-6.

448. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science. 1997;275(5303):1129-32.

449. Pellegrini L, Scorrano L. A cut short to death: Parl and Opa1 in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis. Cell Death Differ. 2007;14(7):1275-84.

450. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell. 1996;86(1):147-57.

451. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. Trends Biochem Sci. 2001;26(6):390-7.

452. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407(6805):770-6.

453. Von Ahsen O, Waterhouse N, Kuwana T, Newmeyer D, Green D. The 'harmless' release of cytochrome c. Cell Death & Differentiation. 2000;7(12):1192-99.

454. Lee JK. Multi-marker real-time optical imaging of live cell population under controlled stress: Apoptosis in retinal ganglion cells(Dissertation). California: University of Southern California; 2011.

455. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. Cell Death Differ. 2006;13(9):1423-33.

456. Hüttemann M, Pecina P, Rainbolt M, Sanderson TH, Kagan VE, Samavati L, et al. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. Mitochondrion. 2011;11(3):369-81.

457. Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a Xenopus cell-free apoptosis system. EMBO J. 1997;16(15):4639-49.

458. Keilin D. On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Containing Papers of a Biological Character. 1925;98(690):312-39.

459. Salgueiro CA, Dantas JM. Multiheme cytochromes. Multiheme Cytochromes: Springer; 2016. p. 1-39.

460. Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I. Structure and chemistry of cytochrome P450. Chem Rev. 2005;105(6):2253-77.

461. Loew GH, Harris DL. Role of the heme active site and protein environment in structure, spectra, and function of the cytochrome p450s. Chem Rev. 2000;100(2):407-20.

462. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. Nat Cell Biol. 2000;2(3):156-62.

463. Uren RT, Dewson G, Bonzon C, Lithgow T, Newmeyer DD, Kluck RM. Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/Diablo to mitochondrial membranes. Journal of Biological Chemistry. 2005;280(3):2266-74.

464. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev. 2007;87(1):99-163.

465. Mootha VK, Wei MC, Buttle KF, Scorrano L, Panoutsakopoulou V, Mannella CA, et al. A reversible component of mitochondrial respiratory dysfunction in apoptosis can be rescued by exogenous cytochrome c. Embo Journal. 2001;20(4):661-71.

466. Zhao YG, Wang ZB, Xu JX. Effect of cytochrome c on the generation and elimination of O-2(center dot-) and H2O2 in mitochondria. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(4):2356-60.

467. Muñoz-Pinedo C, Guío-Carrión A, Goldstein JC, Fitzgerald P, Newmeyer DD, Green DR. Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006;103(31):11573-78.

468. NunÄez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. Oncogene. 1998;17:3237-45.

469. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. Curr Opin Cell Biol. 2004;16(6):663-9.

470. Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? Cell death & disease. 2012;3(7):e338.

471. Yan N, Chai J, Lee ES, Gu L, Liu Q, He J, et al. Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in Caenorhabditis elegans. Nature. 2005;437(7060):831-7.

472. Pop C, Timmer J, Sperandio S, Salvesen GS. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. Mol Cell. 2006;22(2):269-75.

473. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2008;151(1):10-27.

474. Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death. Curr Opin Struct Biol. 2000;10(6):649-55.

475. D'Amelio M, Sheng M, Cecconi F. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. Trends Neurosci. 2012;35(11):700-9.

476. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. Cell. 1998;94(6):739-50.

477. Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. Cell. 1998;94(3):325-37.

478. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. Nature. 1996;384(6607):368-72.

479. Yoshida H. The role of Apaf-1 in programmed cell death: from worm to tumor. Cell Struct Funct. 2003;28(1):3-9.

480. Plopper G, Sharp D, Sikorski E. Lewin's CELLS. Massachusetts: Jones & Bartlett Publishers; 2013. p.1-1000.

481. Edara VVC. Identification of Amino Acid Residues Responsible for the Pro-Apoptotic Activity of BMRP by Functional Analysis of Alanine Substitution Mutants and Chimeras(Dissertation). Texas: Texas A&M University-Kingsville; 2014.

482. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. CA Cancer J Clin. 2005;55(3):178-94.

483. Green DR. A Matter of Life and Death. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2022;14(1):1-9.

484. Martin AG, Nguyen J, Wells JA, Fearnhead HO. Apo cytochrome c inhibits caspases by preventing apoptosome formation. Biochem Biophys Res Commun. 2004;319(3):944-50.

485. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. EMBO Rep. 2006;7(10):988-94.

486. Moldoveanu T, Grace CR, Llambi F, Nourse A, Fitzgerald P, Gehring K, et al. BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. Nat Struct Mol Biol. 2013;20(5):589-97.

487. Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, et al. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. Mol Cell. 2003;11(2):519-27.

488. Edison N, Zuri D, Maniv I, Bornstein B, Lev T, Gottfried Y, et al. The IAP-antagonist ARTS initiates caspase activation upstream of cytochrome C and SMAC/Diablo. Cell Death Differ. 2012;19(2):356-68.

489. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. Oncogene. 2004;23(16):2861-74.

490. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. Genes Dev. 1999;13(24):3179-84.

491. Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. J Biol Chem. 2000;275(40):31199-203.

492. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. EMBO J. 1997;16(23):6914-25.

493. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. Nature. 1997;388(6639):300-4.

494. Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. Cell. 2001;104(5):781-90.

495. Du CY, Fang M, Li YC, Li L, Wang XD. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell. 2000;102(1):33-42.

496. Gao Z, Shao Y, Jiang X. Essential roles of the Bcl-2 family of proteins in caspase-2-induced apoptosis. J Biol Chem. 2005;280(46):38271-5.

497. Li Z, Jo J, Jia JM, Lo SC, Whitcomb DJ, Jiao S, et al. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. Cell. 2010;141(5):859-71.

498. Alnemri ES. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. J Cell Biochem. 1997;64(1):33-42.

499. Ricci JE, Gottlieb RA, Green DR. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. J Cell Biol. 2003;160(1):65-75.

500. Sanchez-Alcazar JA, Ault JG, Khodjakov A, Schneider E. Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells. Cell Death Differ. 2000;7(11):1090-100.

501. Toyota H, Yanase N, Yoshimoto T, Moriyama M, Sudo T, Mizuguchi J. Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax. Cancer letters. 2003;189(2):221-30.

502. Liang H, Salinas RA, Leal BZ, Kosakowska-Cholody T, Michejda CJ, Waters SJ, et al. Caspase-mediated apoptosis and caspase-independent cell death induced by irofulven in prostate cancer cells. Mol Cancer Ther. 2004;3(11):1385-96.

503. Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. Cell. 2000;101(4):389-99.

504. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, et al. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. Cell. 1998;94(3):339-52.

505. Behl C. Apoptosis and Alzheimer's disease. J Neural Transm (Vienna). 2000;107(11):1325-44.

506. Waterhouse N, Trapani J. CTL: C aspases T erminate L ife, but that's not the whole story. Tissue antigens. 2002;59(3):175-83.

507. Odake S, Kam CM, Narasimhan L, Poe M, Blake JT, Krahenbuhl O, et al. Human and murine cytotoxic T lymphocyte serine proteases: subsite mapping with peptide thioester substrates and inhibition of enzyme activity and cytolysis by isocoumarins. Biochemistry. 1991;30(8):2217-27.

508. Poe M, Blake JT, Boulton DA, Gammon M, Sigal NH, Wu JK, et al. Human cytotoxic lymphocyte granzyme B. Its purification from granules and the characterization of substrate and inhibitor specificity. J Biol Chem. 1991;266(1):98-103.

509. Martin SJ, Amarante-Mendes GP, Shi L, Chuang TH, Casiano CA, O'Brien GA, et al. The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. EMBO J. 1996;15(10):2407-16.

510. Darmon AJ, Ley TJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. J Biol Chem. 1996;271(36):21709-12.

511. Adrain C, Murphy BM, Martin SJ. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. J Biol Chem. 2005;280(6):4663-73.

512. Chen T, Li E. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;301:179-201.

513. Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(25):8905-9.

514. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet. 2000;9(16):2395-402.

515. Lande-Diner L, Cedar H. Silence of the genes—mechanisms of long-term repression. Nature Reviews Genetics. 2005;6(8):648-54.

516. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends Biochem Sci. 2006;31(2):89-97.

517. Trerotola M, Relli V, Simeone P, Alberti S. Epigenetic inheritance and the missing heritability. Hum Genomics. 2015;9(1):17.

518. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. Nature. 2013;502(7472):472-9.

519. Bestor TH, Bourc'his D. Transposon Silencing and Imprint Establishment in Mammalian Germ Cells. Epigenetics. 2004;69:381-87.

520. Rottach A, Leonhardt H, Spada F. DNA methylation-mediated epigenetic control. J Cell Biochem. 2009;108(1):43-51.

521. Du J, Johnson LM, Jacobsen SE, Patel DJ. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2015;16(9):519-32.

522. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell. 1992;69(6):915-26.

523. Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia. 2011;25(7):1153-8.

524. Guijarro-Hernandez A, Vizmanos JL. A Broad Overview of Signaling in Ph-Negative Classic Myeloproliferative Neoplasms. Cancers (Basel). 2021;13(5):984.

525. Szyf M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2009;49:243-63.

526. Doherty AS, Bartolomei MS, Schultz RM. Regulation of stage-specific nuclear translocation of Dnmt1o during preimplantation mouse development. Dev Biol. 2002;242(2):255-66.

527. Tatton-Brown K, Rahman N, editors. The NSD1 and EZH2 overgrowth genes, similarities and differences. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics; 2013: Wiley Online Library.

528. Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(20):11606-11.

529. Gong H, Li Y, Yuan Y, Li W, Zhang H, Zhang Z, et al. EZH2 inhibitors reverse resistance to gefitinib in primary EGFR wild-type lung cancer cells. BMC Cancer. 2020;20(1):1189.

530. Agrawal K, Das V, Vyas P, Hajduch M. Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs - A comprehensive review from discovery to clinic. Pharmacol Ther. 2018;188:45-79.

531. Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabunciyan S, Langmead B, McDonald OG, et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. Nat Genet. 2011;43(8):768-75.

532. Sueoka T, Koyama K, Hayashi G, Okamoto A. Chemistry-Driven Epigenetic Investigation of Histone and DNA Modifications. Chem Rec. 2018;18(12):1727-44.

533. Ehrlich M, Lacey M. DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer. Adv Exp Med Biol. 2013;754:31-56.

534. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science. 2009;324(5929):930-5.

535. Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. Science. 2009;324(5929):929-30.

536. Lorsbach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). Leukemia. 2003;17(3):637-41.

537. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. Nature. 2010;466(7310):1129-33.

538. Ono R, Taki T, Taketani T, Taniwaki M, Kobayashi H, Hayashi Y. LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). Cancer Research. 2002;62(14):4075-80.

539. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. Science. 2011;333(6047):1300-3.

540. Hu X, Chen Y, Zhao ZJ. Structure, regulation, and function of TET family proteins. Epigenetic Gene Expression and Regulation: Elsevier; 2015. p. 379-95.

541. Clifton IJ, McDonough MA, Ehrismann D, Kershaw NJ, Granatino N, Schofield CJ. Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded beta-helix fold proteins. J Inorg Biochem. 2006;100(4):644-69.

542. Shen L, Song CX, He C, Zhang Y. Mechanism and function of oxidative reversal of DNA and RNA methylation. Annu Rev Biochem. 2014;83:585-614.

543. Sun W, Guan M, Li X. 5-hydroxymethylcytosine-mediated DNA demethylation in stem cells and development. Stem Cells Dev. 2014;23(9):923-30.

544. Hu L, Lu J, Cheng J, Rao Q, Li Z, Hou H, et al. Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation. Nature. 2015;527(7576):118-22.

545. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. Blood. 2009;114(1):144-7.

546. Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, Zepeda-Martinez JA, Goyal P, Mahapatra S, et al. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. Nature. 2013;500(7461):222-6.

547. Minor EA, Court BL, Young JI, Wang G. Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. J Biol Chem. 2013;288(19):13669-74.

548. Song SJ, Ito K, Ala U, Kats L, Webster K, Sun SM, et al. The oncogenic microRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation. Cell Stem Cell. 2013;13(1):87-101.

549. Song SJ, Poliseno L, Song MS, Ala U, Webster K, Ng C, et al. MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. Cell. 2013;154(2):311-24.

550. Cheng J, Guo S, Chen S, Mastriano SJ, Liu C, D'Alessio AC, et al. An extensive network of TET2-targeting MicroRNAs regulates malignant hematopoiesis. Cell Rep. 2013;5(2):471-81.

551. Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, McWalter GK, McLellan LI, Elcombe CR, et al. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. Biochem J. 2002;365(Pt 2):405-16.

552. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. J Biol Chem. 2003;278(10):8135-45.

553. Chen QM. Nrf2 for cardiac protection: pharmacological options against oxidative stress. Trends Pharmacol Sci. 2021;42(9):729-44.

554. Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H, Itoh K, Tanaka T, Yamamoto M. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. Mol Cell Biol. 2006;26(8):2887-900.

555. Nam LB, Keum YS. Binding partners of NRF2: Functions and regulatory mechanisms. Arch Biochem Biophys. 2019;678:108184.

556. Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. Genes Cells. 2001;6(10):857-68.

557. Rojo AI, Medina-Campos ON, Rada P, Zuniga-Toala A, Lopez-Gazcon A, Espada S, et al. Signaling pathways activated by the phytochemical nordihydroguaiaretic acid contribute to a Keap1-independent regulation of Nrf2 stability: Role of glycogen synthase kinase-3. Free Radic Biol Med. 2012;52(2):473-87.

558. Keum YS, Choi BY. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway. Molecules. 2014;19(7):10074-89.

559. Nioi P, Nguyen T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. Biochem Biophys Res Commun. 2007;362(4):816-21.

560. Jiang T, Chen N, Zhao F, Wang XJ, Kong B, Zheng W, et al. High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer. Cancer Res. 2010;70(13):5486-96.

561. Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, Nakamura Y, Scharlock M, Ohtsuji M, et al. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. Mol Cell. 2006;21(5):689-700.

562. Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. Plos Medicine. 2006;3(10):1865-76.

563. Kim YR, Oh JE, Kim MS, Kang MR, Park SW, Han JY, et al. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. J Pathol. 2010;220(4):446-51.

564. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. Int J Mol Sci. 2020;21(13):4777.

565. Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji M, et al. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. Cancer Res. 2008;68(5):1303-9.

566. Shibata T, Kokubu A, Gotoh M, Ojima H, Ohta T, Yamamoto M, et al. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. Gastroenterology. 2008;135(4):1358-68.

567. Yoo NJ, Kim HR, Kim YR, An CH, Lee SH. Somatic mutations of the KEAP1 gene in common solid cancers. Histopathology. 2012;60(6):943-52.

568. Cheng D, Wu R, Guo Y, Kong AN. Regulation of Keap1-Nrf2 signaling: The role of epigenetics. Curr Opin Toxicol. 2016;1:134-38.

569. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. Trends Mol Med. 2004;10(11):549-57.

570. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. Nature. 2011;475(7354):106-9.

571. Leinonen HM, Kansanen E, Polonen P, Heinaniemi M, Levonen AL. Dysregulation of the Keap1-Nrf2 pathway in cancer. Biochem Soc Trans. 2015;43(4):645-9.

572. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. Mol Cell Biol. 2004;24(16):7130-9.

573. Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 System as a Molecular Target of Cancer Treatment. Cancers (Basel). 2020;13(1):46.

574. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. Genes Cells. 2003;8(4):379-91.

575. Harris IS, Treloar AE, Inoue S, Sasaki M, Gorrini C, Lee KC, et al. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. Cancer Cell. 2015;27(2):211-22.

576. Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer: a dance with the devil. Cancer Cell. 2015;27(2):156-7.

577. Janssen-Heininger YM, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, et al. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. Free Radic Biol Med. 2008;45(1):1-17.

578. Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, Dinkova-Kostova AT. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. Antioxid Redox Signal. 2010;13(11):1713-48.

579. Kobayashi M, Li L, Iwamoto N, Nakajima-Takagi Y, Kaneko H, Nakayama Y, et al. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. Mol Cell Biol. 2009;29(2):493-502.

580. Tong KI, Kobayashi A, Katsuoka F, Yamamoto M. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. Biol Chem. 2006;387(10-11):1311-20.

581. Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, Wakabayashi J, Maher J, Motohashi H, et al. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. Mol Cell Biol. 2008;28(8):2758-70.

582. Kopacz A, Kloska D, Forman HJ, Jozkowicz A, Grochot-Przeczek A. Beyond repression of Nrf2: An update on Keap1. Free Radic Biol Med. 2020;157:63-74.

583. Shibata T, Ohta T, Tong KI, Kokubu A, Odogawa R, Tsuta K, et al. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105(36):13568-73.

584. Baird L, Lleres D, Swift S, Dinkova-Kostova AT. Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(38):15259-64.

585. Itoh K, Mimura J, Yamamoto M. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. Antioxid Redox Signal. 2010;13(11):1665-78.

586. Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. Trends Biochem Sci. 2009;34(4):176-88.

587. Martin-Montalvo A, Villalba JM, Navas P, de Cabo R. NRF2, cancer and calorie restriction. Oncogene. 2011;30(5):505-20.

588. Suzuki T, Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. Free Radic Biol Med. 2015;88(Pt B):93-100.

589. Fukutomi T, Takagi K, Mizushima T, Ohuchi N, Yamamoto M. Kinetic, thermodynamic, and structural characterizations of the association between Nrf2-DLGex degron and Keap1. Mol Cell Biol. 2014;34(5):832-46.

590. Baird L, Swift S, Lleres D, Dinkova-Kostova AT. Monitoring Keap1-Nrf2 interactions in single live cells. Biotechnol Adv. 2014;32(6):1133-44.

591. Sivinski J, Zhang DD, Chapman E. Targeting NRF2 to treat cancer. Semin Cancer Biol. 2021;76:61-73.

592. Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 System in Cancer. Front Oncol. 2017;7:85.

593. Zhou J, Zheng Q, Chen Z. The Nrf2 Pathway in Liver Diseases. Front Cell Dev Biol. 2022;10:826204.

594. Shin SM, Yang JH, Ki SH. Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases. Oxid Med Cell Longev. 2013;2013:763257.

595. Panieri E, Telkoparan-Akillilar P, Suzen S, Saso L. The NRF2/KEAP1 Axis in the Regulation of Tumor Metabolism: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. Biomolecules. 2020;10(5):1-28.

596. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. Genes Cells. 2011;16(2):123-40.

597. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 2013;1:45-9.

598. Singh S, Vrishni S, Singh BK, Rahman I, Kakkar P. Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. Free Radic Res. 2010;44(11):1267-88.

599. Tossetta G, Fantone S, Montanari E, Marzioni D, Goteri G. Role of NRF2 in Ovarian Cancer. Antioxidants. 2022;11(4).

600. Chun KS, Raut PK, Kim DH, Surh YJ. Role of chemopreventive phytochemicals in NRF2-mediated redox homeostasis in humans. Free Radic Biol Med. 2021;172:699-715.

601. Morse D, Lin L, Choi AM, Ryter SW. Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. Free Radic Biol Med. 2009;47(1):1-12.

602. Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Carbon Monoxide. Heme Oxygenase in Biology and Medicine: Springer; 2002. p. 19-29.

603. Chiang SK, Chen SE, Chang LC. The Role of HO-1 and Its Crosstalk with Oxidative Stress in Cancer Cell Survival. Cells. 2021;10(9):1-22.

604. Nitti M, Piras S, Marinari UM, Moretta L, Pronzato MA, Furfaro AL. HO-1 Induction in Cancer Progression: A Matter of Cell Adaptation. Antioxidants. 2017;6(2):1-20.

605. Chiang SK, Chen SE, Chang LC. A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Cells. Int J Mol Sci. 2018;20(1):1-18.

606. Hjortso MD, Andersen MH. The expression, function and targeting of haem oxygenase-1 in cancer. Curr Cancer Drug Targets. 2014;14(4):337-47.

607. Yan HF, Zou T, Tuo QZ, Xu S, Li H, Belaidi AA, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):49.

608. Song X, Long D. Nrf2 and Ferroptosis: A New Research Direction for Neurodegenerative Diseases. Front Neurosci. 2020;14:267.

609. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 2012;149(5):1060-72.

610. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Redox Functions of Heme Oxygenase-1 and Biliverdin Reductase in Diabetes. Trends Endocrinol Metab. 2018;29(2):74-85.

611. Ryter SW. Heme Oxygenase-1: An Anti-Inflammatory Effector in Cardiovascular, Lung, and Related Metabolic Disorders. Antioxidants. 2022;11(3):1-15.

612. Ryter SW, Otterbein LE. Carbon monoxide in biology and medicine. Bioessays. 2004;26(3):270-80.

613. Gozzelino R, Soares MP. Coupling heme and iron metabolism via ferritin H chain. Antioxid Redox Signal. 2014;20(11):1754-69.

614. Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009;41(3):251-60.

615. Lanceta L, Li C, Choi AM, Eaton JW. Haem oxygenase-1 overexpression alters intracellular iron distribution. Biochem J. 2013;449(1):189-94.

616. Farombi EO, Surh YJ. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2006;39(5):479-91.

617. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. Physiol Rev. 2006;86(2):583-650.

618. Zhang L, Sessoms R. Heme biosynthesis and degradation: What happens when it goes haywire. Heme Biology. 2020:7-31.

619. Udono-Fujimori R, Takahashi K, Takeda K, Furuyama K, Kaneko K, Takahashi S, et al. Expression of heme oxygenase-1 is repressed by interferon-gamma and induced by hypoxia in human retinal pigment epithelial cells. Eur J Biochem. 2004;271(14):3076-84.

620. Takahashi S, Takahashi Y, Yoshimi T, Miura T. Oxygen tension regulates heme oxygenase-1 gene expression in mammalian cell lines. Cell Biochem Funct. 1998;16(3):183-93.

621. Shibahara S, Nakayama M, Kitamuro T, Udono-Fujimori R, Takahashi K. Repression of heme oxygenase-1 expression as a defense strategy in humans. Exp Biol Med (Maywood). 2003;228(5):472-3.

622. Kitamuro T, Takahashi K, Ogawa K, Udono-Fujimori R, Takeda K, Furuyama K, et al. Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. J Biol Chem. 2003;278(11):9125-33.

623. Takahashi T, Morita K, Akagi R, Sassa S. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries. Curr Med Chem. 2004;11(12):1545-61.

624. Nitti M, Piras S, Brondolo L, Marinari UM, Pronzato MA, Furfaro AL. Heme Oxygenase 1 in the Nervous System: Does It Favor Neuronal Cell Survival or Induce Neurodegeneration? International Journal of Molecular Sciences. 2018;19(8):2260.

625. Origassa CS, Camara NO. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury. World J Hepatol. 2013;5(10):541-9.

626. Consoli V, Sorrenti V, Grosso S, Vanella L. Heme Oxygenase-1 Signaling and Redox Homeostasis in Physiopathological Conditions. Biomolecules. 2021;11(4):1-23.

627. Helal MG, El-Kashef DH. Krill oil alleviates oxidative stress, iron accumulation and fibrosis in the liver and spleen of iron-overload rats. Environ Sci Pollut Res Int. 2020;27(4):3950-61.

628. Malfa GA, Tomasello B, Acquaviva R, Genovese C, La Mantia A, Cammarata FP, et al. Betula etnensis Raf. (Betulaceae) Extract Induced HO-1 Expression and Ferroptosis Cell Death in Human Colon Cancer Cells. Int J Mol Sci. 2019;20(11):1-12.

629. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:5080843.

630. Kwon MY, Park E, Lee SJ, Chung SW. Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death. Oncotarget. 2015;6(27):24393-403.

631. Dellinger M. Apoptosis or necrosis following Photofrin(R) photosensitization: Influence of the incubation protocol. Photochemistry and Photobiology. 1996;64(1):182-87.

632. Marchal S, Fadloun A, Maugain E, D'Hallewin M-A, Guillemin F, Bezdetnaya L. Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan® photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. Biochemical pharmacology. 2005;69(8):1167-76.

633. Chiarelli-Neto O, Ferreira AS, Martins WK, Pavani C, Severino D, Faiao-Flores F, et al. Melanin photosensitization and the effect of visible light on epithelial cells. PLoS One. 2014;9(11):e113266.

634. Seibenhener ML, Wooten MW. Isolation and culture of hippocampal neurons from prenatal mice. Journal of Visualized Experiments. 2012(65):e3634.

635. Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, et al. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. Oncogene. 2005;24(36):5552.

636. Pacifici M, Peruzzi F. Isolation and culture of rat embryonic neural cells: a quick protocol. JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2012(63):e3965.

637. Yang F, Jove V, Chang S, Hedvat M, Liu L, Buettner R, et al. Bortezomib induces apoptosis and growth suppression in human medulloblastoma cells, associated with inhibition of AKT and NF-κB signaling, and synergizes with an ERK inhibitor. Cancer biology & therapy. 2012;13(6):349.

638. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65(1-2):55-63.

639. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer research. 1988;48(17):4827-33.

640. Meerloo JV, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Cancer cell culture: Springer; 2011. p. 237-45.

641. Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. Polyamine protocols: Springer; 1998. p. 179-84.

642. Nagel S, Drexler HG. Expression Analysis of Homeobox Genes in Leukemia/Lymphoma Cell Lines. Cancer Cell Culture: Springer; 2011. p. 371-80.

643. Turner DH, Mathews DH. RNA structure determination : methods and protocols. New York: Humana Press; 2016. p.1-283.

644. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987;162(1):156-9.

645. Gjerde DT, Hoang L, Hornby D. RNA purification and analysis: sample preparation, extraction, chromatography. 1 ed: John Wiley & Sons; 2009. p.1-99.

646. Eggert A, Brodeur GM, Ikegaki N. Relative quantitative RT-PCR protocol for TrkB expression in neuroblastoma using GAPD as an internal control. Biotechniques. 2000;28(4):681.

647. Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. Plant methods. 2007;3(1):12.

648. Lesuffleur T, Roche F, Hill AS, Lacasa M, Fox M, Swallow DM, et al. Characterization of a mucin cDNA clone isolated from HT-29 mucus-secreting cells. The 3′ end of MUC5AC? Journal of Biological Chemistry. 1995;270(23):13665-73.

649. Shiff SJ, Qiao L, Tsai L, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. The Journal of clinical investigation. 1995;96(1):491-503.

650. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proceedings of the national academy of sciences. 1996;93(18):9821-26.

651. Huang Z, Bassil CF, Murphy SK. Methylation-specific PCR. Ovarian Cancer: Springer; 2013. p. 75-82.

652. Khuda-Bukhsh AR, Sikdar S. Condurango 30C induces epigenetic modification of lung cancer-specific tumour suppressor genes via demethylation. Complementary Medicine Research. 2015;22(3):172-79.

653. Ramalho-Carvalho J, Henrique R, Jerónimo C. Methylation-specific PCR. DNA Methylation Protocols: Springer; 2018. p. 447-72.

654. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. Nucleic Acids Res. 2001;29(13):E65.

655. Li L-C, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. Bioinformatics. 2002;18(11):1427-31.

656. Li L-C. Designing PCR primer for DNA methylation mapping. PCR Primer Design. 2007:370-83.

657. Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. Journal of Visualized Experiments. 2011(56):e3170.

658. Chaudhry F, Kawai H, Johnson KW, Narula N, Shekhar A, Chaudhry F, et al. Molecular Imaging of Apoptosis in Atherosclerosis by Targeting Cell Membrane Phospholipid Asymmetry. J Am Coll Cardiol. 2020;76(16):1862-74.

659. Fadeel B, Xue D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2009;44(5):264-77.

660. Murakami T, Yumoto R. Role of phosphatidylserine binding in tissue distribution of amine-containing basic compounds. Expert opinion on drug metabolism & toxicology. 2011;7(3):353-64.

661. Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. Journal of cellular and molecular medicine. 2013;17(1):12-29.

662. Tan C-P, Lu Y-Y, Ji L-N, Mao Z-W. Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds. Metallomics. 2014;6(5):978-95.

663. Vonarx-Coinsman V, Foultier MT, de Brito LX, Morlet L, Gouyette A, Patrice T. HepG2 human hepatocarcinoma cells: an experimental model for photosensitization by endogenous porphyrins. J Photochem Photobiol B. 1995;30(2-3):201-8.

664. Xue Ly, Chiu Sm, Azizuddin K, Joseph S, Oleinick NL. The death of human cancer cells following photodynamic therapy: Apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy. Photochemistry and photobiology. 2007;83(5):1016-23.

665. Li X, Marani M, Yu J, Nan B, Roth JA, Kagawa S, et al. Adenovirus-mediated Bax overexpression for the induction of therapeutic apoptosis in prostate cancer. Cancer Res. 2001;61(1):186-91.

666. He J, Agarwal ML, Larkin HE, Friedman LR, Xue LY, Oleinick NL. The induction of partial resistance to photodynamic therapy by the protooncogene Bcl-2. Photochem Photobiol. 1996;64(5):845-52.

667. Usuda J, Chiu S-m, Murphy ES, Lam M, Nieminen A-L, Oleinick NL. Domain-dependent photodamage to Bcl-2: a membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photosensitization. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(3):2021-9.

668. Mitsunaga M, Tsubota A, Nariai K, Namiki Y, Sumi M, Yoshikawa T, et al. Early apoptosis and cell death induced by ATX-S10Na (II)-mediated photodynamic therapy are Bax-and p53-dependent in human colon cancer cells. World Journal of Gastroenterology: WJG. 2007;13(5):692.

669. Usuda J, Hirata T, Ichinose S, Ishizumi T, Inoue T, Ohtani K, et al. Tailor-made approach to photodynamic therapy in the treatment of cancer based on Bcl-2 photodamage. Int J Oncol. 2008;33(4):689-96.

670. Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. Differential responses of Mcl-1 in photosensitized epithelial vs lymphoid-derived human cancer cells. Oncogene. 2005;24(46):6987-92.

671. Matsuyama S, Schendel SL, Xie Z, Reed JC. Cytoprotection by Bcl-2 requires the pore-forming alpha5 and alpha6 helices. J Biol Chem. 1998;273(47):30995-1001.

672. Shen XY, Zacal N, Singh G, Rainbow AJ. Alterations in Mitochondrial and Apoptosis-regulating Gene Expression in Photodynamic Therapy-resistant Variants of HT29 Colon Carcinoma Cells¶. Photochemistry and photobiology. 2005;81(2):306-13.

673. Vantieghem A, Xu Y, Declercq W, Vandenabeele P, Denecker G, Vandenheede JR, et al. Different pathways mediate cytochrome c release after photodynamic therapy with hypericin. Photochemistry and Photobiology. 2001;74(2):133-42.

674. Li HT, Tong JJ, Bao J, Tang DM, Tian WR, Liu Y. Hematoporphyrin monomethyl ether combined with He-Ne laser irradiation-induced apoptosis in canine breast cancer cells through the mitochondrial pathway. Journal of Veterinary Science. 2016;17(2):235-42.

675. Li H, Song X, Yang C, Li Q, Tang D, Tian W, et al. Effect of hematoporphyrin monomethyl ether-mediated PDT on the mitochondria of canine breast cancer cells. Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2013;10(4):414-21.

676. Jankowska A, Wiecek P, Burczynska B. Effect of photodynamic therapy on proliferation and apoptosis of 3T3 fibroblasts and HeLa cells. Photomed Laser Surg. 2008;26(4):343-7.

677. Bednarz N, Zawacka-Pankau J, Kowalska A. Protoporphyrin IX induces apoptosis in HeLa cells prior to photodynamic treatment. Pharmacol Rep. 2007;59(4):474-9.

678. Donkena KV, Young CY, Tindall DJ. Oxidative stress and DNA methylation in prostate cancer. Obstet Gynecol Int. 2010;2010:302051.

679. Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. Mutat Res. 2011;711(1-2):167-73.

680. Ushijima T, Okochi-Takada E. Aberrant methylations in cancer cells: where do they come from? Cancer Science. 2005;96(4):206-11.

681. Dellinger M. Apoptosis or necrosis following photofrin® photosensitization: influence of the incubation protocol. Photochemistry and photobiology. 1996;64(1):182-7.

682. Shen SC, Lee WR, Fang YP, Hu CH, Fang JY. In vitro percutaneous absorption and in vivo protoporphyrin IX accumulation in skin and tumors after topical 5-aminolevulinic acid application with enhancement using an erbium : YAG laser. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006;95(4):929-38.

683. Zawacka-Pankau J, Krachulec J, Grulkowski I, Bielawski KP, Selivanova G. The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: recent advances. Toxicol Appl Pharmacol. 2008;232(3):487-97.

684. Mock HP, Grimm B. Reduction of Uroporphyrinogen Decarboxylase by Antisense RNA Expression Affects Activities of Other Enzymes Involved in Tetrapyrrole Biosynthesis and Leads to Light-Dependent Necrosis. Plant Physiol. 1997;113(4):1101-12.

685. Manivasager V, Heng PWS, Hao J, Zheng W, Soo KC, Olivo M. A study of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester used in in vitro and in vivo systems of human bladder cancer. International journal of oncology. 2003;22(2):313-8.

686. Koningsberger JC, Rademakers LH, van Hattum J, de la Faille HB, Wiegman LJ, Italiaander E, et al. Exogenous protoporphyrin inhibits Hep G2 cell proliferation, increases the intracellular hydrogen peroxide concentration and causes ultrastructural alterations. J Hepatol. 1995;22(1):57-65.

687. Hilf R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. J Bioenerg Biomembr. 2007;39(1):85-9.

688. Börsch M, editor Targeting cytochrome C oxidase in mitochondria with Pt (II)-porphyrins for photodynamic therapy. Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XIX; 2010: SPIE.

689. Balogová L, Maslanakova M, Dzurová L, Miskovsky P, Stroffekova K. Bcl-2 proapoptotic proteins distribution in U-87 MG glioma cells before and after hypericin photodynamic action. Gen Physiol Biophys. 2013;32:179-87.

690. Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, Missiaen L, et al. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. FASEB J. 2006;20(6):756-8.

691. Tong Z, Singh G, Rainbow AJ. The role of the p53 tumor suppressor in the response of human cells to photofrin-mediated photodynamic therapy. Photochem Photobiol. 2000;71(2):201-10.

692. Chiu S-M, Xue L-Y, Azizuddin K, Oleinick N. Photodynamic therapy-induced death of HCT 116 cells: Apoptosis with or without Bax expression. Apoptosis. 2005;10(6):1357-68.

693. Lee H, Ho A, Teo S. p53 Status does not affect photodynamic cell killing induced by hypericin. Cancer chemotherapy and pharmacology. 2006;58(1):91-8.

694. Lim DS, Bae SM, Kwak SY, Park EK, Kim JK, Han SJ, et al. Adenovirus-mediated p53 treatment enhances photodynamic antitumor response. Hum Gene Ther. 2006;17(3):347-52.

695. Zawacka-Pankau J, Issaeva N, Hossain S, Pramanik A, Selivanova G, Podhajska AJ. Protoporphyrin IX interacts with wild-type p53 protein in vitro and induces cell death of human colon cancer cells in a p53-dependent and -independent manner. J Biol Chem. 2007;282(4):2466-72.

696. Woods J, Traynor N, Brancaleon L, Moseley H. The Effect of Photofrin on DNA Strand Breaks and Base Oxidation in HaCaT Keratinocytes: A Comet Assay Study¶. Photochemistry and photobiology. 2004;79(1):105-13.

697. Qi S, Guo L, Yan S, Lee RJ, Yu S, Chen S. Hypocrellin A-based photodynamic action induces apoptosis in A549 cells through ROS-mediated mitochondrial signaling pathway. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2019;9(2):279-93.

698. Ding X, Xu Q, Liu F, Zhou P, Gu Y, Zeng J, et al. Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation. Cancer Lett. 2004;216(1):43-54.

699. Mori M, Kuroda T, Obana A, Sakata I, Hirano T, Nakajima S, et al. In vitro plasma protein binding and cellular uptake of ATX-S10(Na), a hydrophilic chlorin photosensitizer. Jpn J Cancer Res. 2000;91(8):845-52.

700. Gracia-Cazana T, Mascaraque M, Lucena SR, Vera-Alvarez J, Gonzalez S, Juarranz A, et al. Biomarkers of basal cell carcinoma resistance to methyl-aminolevulinate photodynamic therapy. PLoS One. 2019;14(4):e0215537.

701. Bensaad K, Vousden KH. Savior and slayer: the two faces of p53. Nature medicine. 2005;11(12):1278-9.

702. Dioufa N, Chatzistamou I, Farmaki E, Papavassiliou AG, Kiaris H. p53 antagonizes the unfolded protein response and inhibits ground glass hepatocyte development during endoplasmic reticulum stress. Experimental Biology and Medicine. 2012;237(10):1173-80.

703. Barberi-Heyob M, Védrine P-O, Merlin J-L, Millon R, Abecassis J, Poupon M-F, et al. Wild-type p53 gene transfer into mutated p53 HT29 cells improves sensitivity to photodynamic therapy via induction of apoptosis. International journal of oncology. 2004;24(4):951-8.

704. Mikeš J, Koval J, Jendželovský R, Sačková V, Uhrinova I, Kello M, et al. The role of p53 in the efficiency of photodynamic therapy with hypericin and subsequent long-term survival of colon cancer cells. Photochemical & Photobiological Sciences. 2009;8(11):1558-67.

705. Reed JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. Curr Opin Oncol. 1995;7(6):541-6.

706. Ahmad N, Feyes DK, Agarwal R, Mukhtar H. Photodynamic therapy results in induction of WAF1/CIP1/P21 leading to cell cycle arrest and apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(12):6977-82.

707. Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, et al. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. Science. 1997;278(5345):1966-8.

708. Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. Nature. 1998;391(6666):496-9.

709. Granville DJ, Jiang H, An MT, Levy JG, McManus BM, Hunt DW. Bcl-2 overexpression blocks caspase activation and downstream apoptotic events instigated by photodynamic therapy. Br J Cancer. 1999;79(1):95-100.

710. Esteve PO, Chin HG, Pradhan S. Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(4):1000-5.

711. Qin W, Leonhardt H, Pichler G. Regulation of DNA methyltransferase 1 by interactions and modifications. Nucleus. 2011;2(5):392-402.

712. Fantini F, Greco A, Cesinaro AM, Surrenti T, Peris K, Vaschieri C, et al. Pathologic changes after photodynamic therapy for Basal cell carcinoma and Bowen disease: a histologic and immunohistochemical investigation. Arch Dermatol. 2008;144(2):186-94.

713. Chen X, Zhao P, Chen F, Li L, Luo R. Effect and mechanism of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in esophageal cancer. Lasers Med Sci. 2011;26(1):69-78.

714. Moon YH, Park JH, Kim SA, Lee JB, Ahn SG, Yoon JH. Anticancer effect of photodynamic therapy with hexenyl ester of 5-aminolevulinic acid in oral squamous cell carcinoma. Head Neck. 2010;32(9):1136-42.

715. Carthy CM, Granville DJ, Jiang H, Levy JG, Rudin CM, Thompson CB, et al. Early release of mitochondrial cytochrome c and expression of mitochondrial epitope 7A6 with a porphyrin-derived photosensitizer: Bcl-2 and Bcl-xL overexpression do not prevent early mitochondrial events but still depress caspase activity. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1999;79(8):953-65.

716. Tsai Y-J, Tsai T, Peng P-C, Li P-T, Chen C-T. Histone acetyltransferase p300 is induced by p38MAPK after photodynamic therapy: the therapeutic response is increased by the p300HAT inhibitor anacardic acid. Free Radical Biology and Medicine. 2015;86:118-32.

717. Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. Cell. 1992;71(5):865-73.

718. Lim SO, Gu JM, Kim MS, Kim HS, Park YN, Park CK, et al. Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. Gastroenterology. 2008;135(6):2128-40.

719. Zhang R, Kang KA, Kim KC, Na SY, Chang WY, Kim GY, et al. Oxidative stress causes epigenetic alteration of CDX1 expression in colorectal cancer cells. Gene. 2013;524(2):214-9.

720. Kuzelova K, Grebenova D, Pluskalova M, Marinov I, Hrkal Z. Early apoptotic features of K562 cell death induced by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B. 2004;73(1-2):67-78.

721. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. Immunity. 2013;38(2):209-23.

722. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. Cell Death & Differentiation. 2012;19(1):75-86.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Elektromanyetik spektrum 4
Şekil 2. FDT'de 1900'lerde kullanılan fd'ler A- psoralen; B- akridin; C- eosin 5
Şekil 3. Fotodinamik Terapi'nin tarihi 8
Şekil 4. Fotodinamik Terapi'nin temel bileşenleri 9
Şekil 5. Scopus veritabanında, arama sonuçlarında yıllık makale sayısı 11
Şekil 6. Porfirin bazlı fd'ler A- Porfirin makromolekülü ve B- Hematoporfirin.....13
Şekil 7. FDT için kullanılan tetrapirol yapıları ve absorpsiyon spektrumları 15
Şekil 8. FDT'de kullanılan bakterioklorinler. A- Paladyum bakteriyofeoforbit (TOOKAD). B- Gem-dimetil grupları ile sentetik stabil bakteriklorin 22
Şekil 9. Fototoksisite şematik gösterim.....23
Şekil 10. Optik penetrasyon derinliği 25
Şekil 11. Işık-doku etkileşimi kanunları 26
Şekil 12. Birincil doku bileşenlerinin sönümleme katsayıları 28
Şekil 13. Deoksihemoglobin ve oksihemoglobin spektrumları 30
Şekil 14. Lazer türleri ve penetrasyon derinlikleri.....31
Şekil 15. Tip 1 ve Tip 2 reaksiyonları 33
Şekil 16. Tip 1 ve Tip 2 reaksiyonlarının şematik gösterimi 33
Şekil 17. Jablonski diyagramı 36
Şekil 18. Işık-doku etkileşim modlarının doz ve süreye bağlı gösterimi 38
Şekil 19. Farklı sıcaklık seviyelerinde dokular üzerindeki etkiler 41

Şekil 20. Fotobiyomodülasyon çalışma mekanizması 42
Şekil 21. İnsan hem biyosentetik enzimleri, genleri ve porfirileri 46
Şekil 22. Hem biyosentezinin son adımı 47
Şekil 23. Hem biyosentetik yolak enzimleri ve ara ürünleri 48
Şekil 24. Ferroşelataz: insan ferroşelataz geni ve promotör yapısı 50
Şekil 25. A-Tetrahidroksi porfirinler ve B- ve C- florlu türevler 51
Şekil 26. A- Diarilporfirinlerin ve B- ve C- Mono yapılar 52
Şekil 27. FDT'de kullanılan ftalosiyaninler 53
Şekil 28. Asetilasyon ve Metilasyon mekanizmaları 55
Şekil 29. p53 yolağı 59
Şekil 30. p53'ün translasyonu 61
Şekil 31. Bcl-2 ailesi üyeleri 62
Şekil 32. Yalnız-BH3 protein oligomerlerinin bağlanma özgüllüğü 63
Şekil 33. Apaf-1 yapısı ve apoptozom oluşumu 65
Şekil 34. Bax'ın yapısı 67
Şekil 35. Apoptozis yolakları 69
Şekil 36. Hem ve karşılık gelen polipeptid bağlama motifi 70
Şekil 37. Kaspazlar'ın genel yapısı 72
Şekil 38. DNMT'lerin yapıları 76
Şekil 39. Metilsitozinin TET aracılı demetilasyonu 79
Şekil 40. TET'lerin domeyn yapısı 80
Şekil 41. Nrf2'nin domeyn yapısı 81
Şekil 42. Keap1 domeyn yapısı 82
Şekil 43. Nrf2-Keap1 menteşe ve mandal modeli 85
Şekil 44. HO-1 aktivitesi 87
Şekil 45. Hücre kültürü, ekstraksiyon, RT ve PCR adımları şeması 88
Şekil 46. MTT testi adımları 98
Şekil 47. RT-qPCR protokol şeması 106
Şekil 48. cDNA sentez ve PCR adımları 107
Şekil 49. Floresans boya ve RT-PCR'da çalışma prensibi 109
Şekil 50. DNA izolasyon adımları 113
Şekil 51. Hücre membranındaki apoptoz tepkisi 123

Şekil 52. HepG2 hücrelerinde, 0 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 127
Şekil 53. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD).....127
Şekil 54. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD).....128
Şekil 55. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD).....128
Şekil 56. HepG2 hücrelerinde, 0 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 129
Şekil 57. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 129
Şekil 58. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 130
Şekil 59. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 130
Şekil 60. HepG2 hücrelerinde, 0 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 131
Şekil 61. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 131
Şekil 62. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 132
Şekil 63. HepG2 hücrelerinde, 0 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 132
Şekil 64. HepG2 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 133
Şekil 65. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD).....133
Şekil 66. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD).....134
Şekil 67. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD).....134

Şekil 68. HepG2 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 135
Şekil 69. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 135
Şekil 70. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 136
Şekil 71. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 136
Şekil 72. HepG2 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 137
Şekil 73. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 137
Şekil 74. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 138
Şekil 75. HepG2 hücrelerinde, 24 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 138
Şekil 76. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 139
Şekil 77. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD).....139
Şekil 78. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD).....140
Şekil 79. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan ALA fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD).....140
Şekil 80. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 141
Şekil 81. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 141
Şekil 82. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 142
Şekil 83. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Zn fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 142

Şekil 84. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 143
Şekil 85. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 100 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 143
Şekil 86. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 200 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 144
Şekil 87. HepG2 hücrelerinde, 48 saat ve 300 sn boyunca farklı dozlarda uygulanan Si fotoduyarlı ajanın hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 144
Şekil 88. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın p**53** ve Bax ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....145
Şekil 89. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Bcl-2 ve Apaf-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD) 145
Şekil 90. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Sitokrom-c ve Kaspaz-3 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....146
Şekil 91.HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Dnmt1 ve Dnmt3a ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....146
Şekil 92. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Dnmt3b ve HO-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....147
Şekil 93. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Nrf2 ve Keap1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....147
Şekil 94. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Tet1 ve Tet2 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....148
Şekil 95. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin p**53** ve Bax ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....148
Şekil 96. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Bcl-2 ve Apaf-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD) 149
Şekil 97. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Sitokrom-c ve Kaspaz-3 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....149
Şekil 98. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Dnmt1 ve Dnmt3a ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....150
Şekil 99. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Dnmt3b veHO-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....150

Şekil 100. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Dnmt3b ve HO-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....151
Şekil 101. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Tet1 ve Tet2 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....151
Şekil 102. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin p53 ve Bax ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....152
Şekil 103. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Bcl-2 ve Apaf-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD) 152
Şekil 104. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Sitokrom-c ve Kaspaz-3 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....153
Şekil 105. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Dnmt1 ve Dnmt3a ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....153
Şekil 106. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Dnmt3b ve HO-1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....154
Şekil 107. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Nrf2 ve Keap1 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....154
Şekil 108.HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Tet1 ve Tet2 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD).....155
Şekil 109. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın apoptoz üzerine etkileri (ortalama±SD) 156
Şekil 110. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin apoptoz üzerine etkileri (ortalama±SD) 156
Şekil 111. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin apoptoz üzerine etkileri (ortalama±SD) 156
Şekil 112. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Sitokrom-c metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü 157
Şekil 113. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Sitokrom-c metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD).....158
Şekil 114.HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Nrf2 metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü.....159
Şekil 115. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Nrf2 metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD).....159

Şekil 116.HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Keap1 metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü 160
Şekil 117. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan ALA'nın Keap1 metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD) 160
Şekil 118. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Sitokrom-c metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü 161
Şekil 119. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Sitokrom-c metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD).....162
Şekil 120. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Nrf**2** metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü.....162
Şekil 121. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Sitokrom-c metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD).....162
Şekil 122. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Keap1 metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü 163
Şekil 123. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Zn'nin Keap1 metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD) 164
Şekil 124. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Sitokrom-c metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü 164
Şekil 125. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Sitokrom-c metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD).....165
Şekil 126.HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Nrf**2** metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü 166
Şekil 127. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Nrf**2** metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD).....166
Şekil 128. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Keap1 metile ve anmetile durumunun jel elektroforez görüntüsü 167
Şekil 129. HepG2 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozunda uygulanan Si'nin Keap1 metilasyon yüzdeleri (ortalama±SD) 167

TABLOLAR

Tablo 1. Klinik kullanımı, temel molekül yapısı ve önemli özellikleri olan fotoduyarlılaştırıcıların listesi 16
Tablo 2. Kullanılan gruplar.....96

Tablo 3. Uygulanacak madde konsantrasyonları 96
Tablo 4. 20 µl RT reaksiyon karışımı içeriği 107
Tablo 5. qRT-PCR mastermiks içeriği.....110
Tablo 6. Gen ekspresyonu için primer dizileri 111
Tablo 7. MSP için primerler.....119
Tablo 8. MSP için mastermiks içeriği 120
Tablo 9. Apoptoz kit reaktiflerinin hazırlanışı 123

ÖZGEÇMİŞ

Mustafa YILDIZ

Doğum yeri ve tarihi: Zara-1988

Eğitim:

2002-2005: Ümraniye Atakent Lisesi

2005-2009: Sakarya, Sakarya Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü

2014-2016: Edirne, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik AD YL

2016-2022: Edirne, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik AD DR

EKLER