

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**AZOT KATKILI GRAFENİN KOLON KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

ZELİHA YÜCEL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

NİSAN 2023

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**AZOT KATKILI GRAFENİN KOLON KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

ZELİHA YÜCEL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

NİSAN 2023

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AZOT KATKILI GRAFENİN KOLON KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

ZELİHA YÜCEL

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2021-5612 proje numarası ile desteklenmiştir.**

NİSAN 2023

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AZOT KATKILI GRAFENİN KOLON KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

ZELİHA YÜCEL
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 18/04/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Esra AYDEMİR

Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Doç. Dr. Edip BAYRAM

ÖZET

AZOT KATKILI GRAFENİN KOLON KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ZELİHA YÜCEL

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Esra AYDEMİR

NİSAN 2023; 49 sayfa

Nano boyutlarda tasarlanmış materyaller hücresel yapılar ile aynı boyuttadır. Dolayısıyla nano materyaller biyolojik açıdan uyum ve kontrol gibi avantajlar sunduğu için sağlık, tıp ve biyoloji alanlarında oldukça büyük öneme sahiptir. Karbon, organik moleküllerin iskeletini oluşturan bir ametaldir. En saf (katışıksız) allotropları elmas ve grafittir. Karbonun allotropu olan grafen ise henüz 2004 yılında keşfedilmiş üstün birçok fiziko kimyasal özelliğe sahip biyoyumlu bir malzemedir. Saf grafenin azot ile katılanması iletkenlik özelliğini mükemmel derecede iyileştirir. Grafen ve N-katkılı grafen özellikleri büyük ölçüde sentez yöntemine bağlıdır.

Günümüzde kanser hastalarına uygulanan en yaygın tedavi yöntemlerinden olan kemoterapi, kanser hücrelerine zarar verirken ne yazık ki spesifik bir hedefe yönelik tedavi boyutunda olmadığı için beraberinde sağlıklı hücrelere de zarar vererek kişinin yaşam kalitesini düşürmektedir. Hedefe yönelik tedavi çalışmaları, kemoterapinin aksine sağlıklı hücrelere zarar vermeden hastayı tedavi etmeyi mümkün kılabilir. Nano boyuttaki hücre ve/veya biyomoleküller hedef alınarak geliştirilmiş bir nanomalzeme; kanseri erken evrede teşhis etmeyi veya kemoterapi tedavilerinde spesifik olarak kanser hücrelerine odaklanmayı mümkün kılabilir. Böylece kemoterapik ilaçlar ile sağlıklı hücrelere zarar vermeden, kanserli hücre veya doku hedef alınarak hastayı tedavi etmek mümkün olabilir. Kolon kanseri dünya çapında ölüme sebep olan ilk üç kanser tipinden biridir. Bu bağlamda biyoyumlu azot katkılı grafenin kolon kanser hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi; tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve hatta erken teşhisi mümkün kılacak biyosensör tasarlama açısından oldukça önemlidir.

Yürütülen bu araştırma, Akdeniz Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonu Birimi tarafından desteklenen FBA- 2017-2205 kodlu “Grafen Tabanlı Elektrokatalizörlerin Üretilmesi” başlıklı proje sonucu spesifik olarak solvotermal yöntem ile sentezlenmiş azot katkılı grafenin (N-GN), kolon kanseri hücrelerindeki (HT- 29) ve insan göbek kordonu veni endotel hücrelerindeki (HUVEC) in vitro sitotoksik etkilerinin incelendiği literatürdeki ilk çalışmadır. N-GN 12 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda HT- 29 hücrelerinde 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL tüm dozlar için önemli bir sitotoksik etkiye sebep olmamıştır. Fakat N-GN 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda HT- 29 hücrelerinde 150 ve 100 µg/mL dozları için anlamlı bir sitotoksik etkiye sebep olmuştur. Kontrol pozitif grubu için kullanılan cisplatin ise HT- 29 hücrelerinde 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri içerisinde 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 mg/mL tüm dozlar için önemli bir sitotoksik etki göstermemiştir.

Cisplatin 12 saatlik inkübasyon süresi sonunda HUVEC hücrelerinde 250, 200, 150, 100 ,50 mg/mL dozları için sitotoksik etkiye sebep olmuştur. Yine cisplatin, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda HUVEC hücrelerinde 250, 200, 150, 100, 50, 25 mg/mL dozları için önemli bir sitotoksik etkiye sebep olmuştur. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda cisplatin, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda da HUVEC hücrelerinde 200, 150, 100, 50, 25 mg/mL dozları için önemli bir sitotoksik etkiye sebep olmuştur.

Elde edilen bulgular sonucunda belirlenen N-GN'nin IC₅₀ (93.4 mg/ml) dozu 24 saatlik inkübasyon süre sonucunda önemli bir kaspaz -3 enzimi miktarı artışına sebep olmuştur. 24 saatlik inkübasyona bırakılan IC₅₀ dozundaki N-GN, HT- 29 hücrelerinde DNA fragmentasyon miktarında anlamlı bir değişime sebep olmuştur. Cisplatin ise, HT- 29 hücrelerinde DNA fragmentasyon miktarında anlamlı bir değişime sebep olmamıştır.

ANAHTAR KELİMELE: Azot Katkılı Grafen, Kolon Kanseri, Nano Bilim, Nano materyal, Sitotoksisite

JÜRİ: Doç. Dr. Esra AYDEMİR

Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Doç. Dr. Edip BAYRAM

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF NITROGEN-DOUPED GRAPHENE ON COLON CANCER CELLS

Zeliha YÜCEL

MSc Thesis in Biology

Supervisor: Assoc. Dr. Esra AYDEMİR

APRIL 2023; 49 pages

Materials designed at nanoscale are the same size as cellular structures. Therefore, nanomaterials are of great importance in the fields of health, medicine and biology, as they offer advantages such as biological compatibility and control. The element carbon is a nonmetal that forms the skeleton of molecules. The purest (pure) allotropes are diamond and graphite. Graphene, the allotrope of carbon, is a biocompatible material with many superior physico-chemical properties that was discovered in 2004. Doping pure graphene with nitrogen improves its conductivity perfectly. The properties of graphene and N-doped graphene largely depend on the synthesis method.

Chemotherapy, which is one of the most common treatment methods applied to cancer patients today, while harming cancer cells, unfortunately decreases the quality of life of the person by damaging healthy cells as it is not in a specific targeted therapy dimension. Targeted therapy studies may make it possible to treat the patient without harming healthy cells, unlike chemotherapy. A nanomaterial developed by targeting nano-sized cells and/or biomolecules; It may make it possible to detect cancer at an early stage or to focus specifically on cancer cells in chemotherapy treatments. Thus, it may be possible to treat the patient with chemotherapeutic drugs by targeting the cancerous cell or tissue without damaging the healthy cells. Colon cancer is one of the top three types of cancer causing death worldwide. In this context, determining the cytotoxic effects of biocompatible nitrogen-doped graphene on colon cancer cells; It is very important in terms of developing treatment methods and even designing biosensors that can enable early diagnosis.

This research was carried out as a result of the project titled "Production of Graphene-Based Electrocatalysts" with the code FBA-2017-2205 supported by Akdeniz University Scientific Research Projects Coordination Unit, and the in vitro cytotoxic effects of nitrogen-doped graphene (N-GN) in colon cancer cells (HT- 29) It is the first study in the literature to examine its effects. N-GN did not cause a significant cytotoxic effect in HT-29 cells at all doses of 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 mg/mL after 12 and 48 hours of incubation period. However, N-GN caused a significant cytotoxic effect for 150 and 100 mg/mL doses in HT-29 cells at the end of the 24-hour incubation period. Cisplatin used for the control positive group, on the other hand, did not show a significant cytotoxic effect for all doses of 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 mg/mL in HT-29 cells during 12-, 24- and 48-hours incubation periods. Cisplatin caused a cytotoxic effect in HUVEC cells at doses of 250, 200, 150, 100, 50 mg/mL at the end of the 12

hour incubation period. Again, cisplatin caused a significant cytotoxic effect for 250, 200, 150, 100, 50, 25 mg/mL doses in HUVEC cells at the end of the 24-hour incubation period. According to the results obtained, cisplatin caused a significant cytotoxic effect for 200, 150, 100, 50, 25 mg/mL doses in HUVEC cells at the end of the 48 hour incubation period.

The IC₅₀ (93.4 mg/ml) dose of N-GN, determined as a result of the findings, caused a significant increase in the amount of caspase-3 enzyme as a result of the 24-hour incubation period. N-GN at IC₅₀ dose left to 24 hours incubation caused a significant change in the amount of DNA fragmentation in HT-29 cells. Cisplatin, on the other hand, did not cause a significant change in the amount of DNA fragmentation in HT-29 cells.

KEYWORDS: Nitrogen Doped Graphene, Colon Cancer, Nanoscience, Nanomaterial, Cytotoxicity

JURY: Assoc. Dr. Esra AYDEMİR

Assoc. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Assoc. Dr. Edip BAYRAM

ÖNSÖZ

Dünyada ve ülkemizde en fazla ölüme sebep olan ilk iki hastalıktan biri kanserdir. Kanser kişinin kendi sağlıklı hücrelerinin, bir dizi yeni özellikler kazanma biçimidir. Kazanılan bu yeni özelliklerin elde edilmesi sürecinde rol alan temel faktör, aktif gen çeşidi miktarındaki değişimdir. Bu değişim sağlıklı bir hücrenin birtakım sıralı olaylar sonucunda kanser hücresine dönüşmesine sebep olur. Kanser çağımızın en büyük mortalitesine sahip olan bir hastalıktır. Genomda biriken mutasyonlar kanser hücresine; büyüme sinyallerine ihtiyaç duymama, büyümeyi inhibe edici sinyallere karşı duyarsızlık kazanma, sınırsız replikasyon, genomik tutarsızlık, inflamasyon, immün sistemden kaçış ve enerji metabolizmasındaki farklılıklar gibi yeni yetenekler kazandırır. Bu özelliklerin kazanılma metodu ve sıralaması ise kanseri kendi içerisinde oldukça spesifik kılar. Yani bir hücrenin kanserleşme sürecinde izlediği yol, kanser çeşidini ve dolayısıyla tedavisini farklı kılar.

Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler tipik kanser tedavileridir. Ancak çağımızın gelişen bilimsel ve teknolojik imkanlarına rağmen 2020 yılında yaklaşık 19 milyon kişi kanser sebebi ile yaşamını yitirmiştir. Çünkü kanser meydana geliş hikayesindeki farklılıklar sebebi ile oldukça çeşitlilik sergileyen bir hastalıktır. Radyoterapi ve kemoterapi tedavileri ise spesifik tedavi imkânı sunamaz. Çünkü kanser hücresi ve sağlıklı hücre arasında ayırım yapamaz. Cerrahi yöntemde ise tümör kalıntısı dokuda varlığını sürdürebilmekte. Bu nedenle hastalığın erken teşhisi, tedavisi ve hatta tespiti için hücresel boyutta takip ve tedavi gerekmektedir. Hücre ve hücresel yapılar nanoboyutta olması sebebi ile nano bilim kanser araştırmaları için bir potansiyeldir.

Nano malzemeler arasında çevre dostu olan ve üzerinde en çok bilimsel araştırma yapılan karbon elementi yaşamın temelini oluşturur. Karbonun en saf allotropu ise elmas ve grafitir. Henüz 2004 yılında keşfedilmiş ayrıca dünyanın bilinen en esnek ve çelikten daha dayanıklı malzemesi olan iki boyutlu grafen ise; biyoyumluluk gösteren karbon temelli bir malzemedir. Azot ile katılanası sonucu iletkenlik gibi birtakım özellikleri daha da iyileştirilen grafen kanser araştırmalarında bir potansiyeldir. Hücrelerin, hücresel yapıların ve grafenin nano boyutta olması grafeni biyoyumlu hale getirir. Dolayısıyla kanser teşhis, tedavi ve önlemede hedefe yönelik spesifik çalışma imkânı sunmaktadır.

Bu tez kapsamında azot katkılı grafenin, insan kolon kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, kaspaz-3 enzim aktivitesi ve DNA fragmentasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçların kanser teşhisi, tedavisi ve önlemesi için yapılan çalışmalara katkı sağlayacağını umut etmekteyiz.

“Hayattaki en hakiki mürşit ilimdir fendir” sözü ile bilimsel çalışmaların önemini bize anlatmaya çalışan Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK’e bana, bir cumhuriyet kadını olabilme, eğitim hakkı ve bilim araştırmacısı olabilme fırsatını sunduğu için,

Atatürk’ ün kurduğu bu uygarlığı kaldırmak adına ülkesine hizmet veren herkese sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

“İşini en iyi yapan vatanını en çok sevendir” bakış açısını benimsemiş, eğitim hayatım boyunca bana bir harf dahi öğretmeyen tüm öğretmenlerime sonsuz minnet duyuyorum ve teşekkür ediyorum. Yaşam felsefemi değiştiren biyoloji bilimi alanında bana eğitim veren tüm Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Omuzlarında yükseldiğimiz, bizlerden önce varolmuş ve bilim yolunu aydınlatmış tüm bilim devlerine teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans eğitimimde bana yol gösterici olan ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum kıymetli hocam Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN’a, bana bu zorlu süreçte inanan ve güvenen saygı değer danışmanım Doç. Dr. Esra AYDEMİR’e bana sunduğu imkanlar için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez konumu belirleme ve araştırma sürecimde benden desteğini esirgemeyen her daim bana bilgi ve imkanlarını sunan saygı değer hocam Doç. Dr. Edip BAYRAM’ a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda destek veren sayın hocam Dr. Ayşegül Cansu KİLİT’ e, Dr. Çağdaş KIZIL’ a ve ekip arkadaşlarım Serap ÖZKAYA GÜL’ e, Beyza BALKİS ŞİMŞEK’ e, Burak CİNGÖZ’ e ve Fidan YILDIZ’a,

Akademik kariyer serüveninde çalışkanlıklarını ve vizyonlarını örnek aldığım, beni ihtiyaç duyduğum her an destekleyen ve aydınlatan arkadaşlarım Gizem Gamze TAŞ ‘a ve Seray ŞAHİN SOLAKCI’ ya teşekkürlerimi sunarım.

Hayatıma anlam katan ailem;

Emeğinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim ve eğitim hayatımı koşulsuz destekleyen annem Yurdağül YÜCEL’ e bana verdiği güç için,

Sahip olduğum en büyük değer olan kardeşlerim Mertcan YÜCEL’e, Cuma Can YÜCEL’ e ve M. Yalın Yücel’ e yaşadığım en kıymetli hissi; ablalık duygusunu bana tattırdıkları için,

Kız kardeş sevgisini bana yaşatan Nihal Seda KARACAN’a ve en büyük destekçim Ali Eren BÖLME’ye hayatıma kattığı anlam ve gösterdiği anlayış için gönülden teşekkür ediyorum.

İnsanlığa katkı sunması amacı ile gerçekleştirdiğim bu bilimsel tezimi, yüksek lisans eğitimim sırasında sonsuz yolculuğa uğurladığım; kızı olmaktan gurur duyduğum, kahramanım, biricik babam Osman YÜCEL’ e ve babamın ardından kaybettiğim manevi ağabeyim Eray BÖLME’ ye atfediyorum. Sizi sonsuza dek daha da çok sevecek ve özleyeceğim. O güzel kalpleriniz size her daim ışık olsun...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1. Nanoteknoloji ve Nanobiyoloji.....	4
2.1.1. Grafen	5
2.1.2. Katkılı grafen.....	8
2.1.3. Grafen ve türevlerinin biyolojik aktiviteleri.....	9
2.1.3.1. Grafen bazlı nanomalzemelerin biyolojik sistemlerle etkileşimi.....	9
2.1.3.2. Grafen ve türevlerinin sitotoksik etkileri.....	12
2.2. Kanser.....	13
2.2.1. Kolon kanseri ve tedavi yöntemleri.....	14
2.2.2. Apoptoz.....	15
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları	20
3.2. Azot katkılı grafenin ve pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatinin hücrelere uygulanması.....	20
3.3. Sitotoksisite testleri	20
3.3.1. WST-1 Hücre Proliferasyon Kiti.....	20
3.3.2. Tripan mavisi testi.....	21
3.4. Apoptoz testleri.....	21
3.4.1. Kaspaz- 3 enzim miktarının araştırılması.....	21
3.4.2. DNA fragmentasyonu.....	24
3.5. İstatistiksel analiz.....	24
4. BULGULAR.....	25

4.1. Azot katkılı grafenin sentezlenmesi.....	25
4.2. Azot Katkılı Grafenin HT- 29 ve HUVEC Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler.....	28
4.2.1. Azot katkılı grafenin HT-29 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin WST-1 testi ile gösterilmesi.....	28
4.2.2. Azot katkılı grafenin HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin WST-1 testi ile gösterilmesi.....	31
4.2.3. Azot katkılı grafenin HT-29 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin tripan mavisi testi ile gösterilmesi.....	32
4.3 Apoptoz testleri.....	33
4.3.1. Azot katkılı grafenin HT-29 hücrelerinde Kaspaz-3 Miktarı Üzerindeki Etkisi.....	33
4.3.2. Azot katkılı grafenin HT- 29 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin DNA fragmentasyon elisa kiti ile gösterilmesi.....	34
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇLAR.....	39
7. KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Azot Katkılı Grafenin Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

18/04/2023

Zeliha YÜCEL

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C : Santigrat Derece

% : Yüzde

mL : Mililitre

µl : Mikrolitre

µm : Mikrometre

µM : Mikromolar

µg : Mikrogram

nm : Nanometre

rpm : Dakikadaki devir sayısı

Kisaltmalar

AIF: Apoptoz İndükleyici Faktör

Apaf-1: Apoptotik Proteaz Aktivite Edici Faktör

APC: Adenomatöz Polipozis Koli Geni

A549: İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı

HT- 29 : İnsan Kolorektal Kanseri Hücre Hattı

HUVEC: İnsan Göbek Kordonu Veni Endotel Hücre Hattı

ATCC : Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu

Bax : Bcl-2 İlişkili X Proteini

Bcl-2 : B Hücre Lenfoma 2

Bcl-XL : B-Hücre Lenfoma-Ekstra-Large

BRAF: Fare Sarkomu Viral Onkogen Homolog B

C: Karbon

CAD : Kaspazla Aktive Edilen DNaz

CARD: Kaspaz Alım Alanı

CO₂ : Karbondioksit

COOH: Karboksil

DED : Ölüm Effektör Alanı

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik Asit

DNAz : Deoksiribonükleaz

DR : Ölüm Reseptörü

DIABLO: Doğrudan IAP Bağlayıcı Protein

DISC : Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi

EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetik asit

FADD: Fas İlişkili Ölüm Bölgesi

FAP: Adenomatöz polipozis

Fas: (Apo-1, CD95) Apoptoz Hücre Ölüm Reseptörü

FasL: Fas Ligand

FBS : Fetal Bovin Serum

Fe₃O₄: Manyatit

FeSO₄: Demir II Sülfat

GFN: Grafen Ailesi Nanomalzeme

GO: Grafen Oksit

Gran B : Granzim B

GTPaz: Guanozin Trifosfat Enzimi

GQD: Grafen Kuantum Noktaları

HepG2: İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı

HUVEC: İnsan Göbek Kordonu Veni Endotel Hücre Hattı

H₃PO₄: Fosforik Asit

IAP :Apoptoz Protein İnhibitörü

H₂SO₄: Sülfürik Asit

IC₅₀ : Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu

ICAD : CAD İnhibitörü

IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IL : İnterlökin

Kaspaz : Sistein Aspartat Spesifik Proteazları

KMnO₄: Potasyum Permanganat

KRAS: Kirsten Sıçan Karsinoma Virüs

LDH: Laktat Dehidrojenaz

M.Ö. : Milattan Önce

MAPK (ERK1/2): Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz

MEM-NEAA : Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acid

MDA-MB-231: Östrojen Reseptör Negatif İnsan Meme Kanseri

MLH1: MutL Homolog 1 Geni

MSH2: MutS Homolog 2 Geni

MSH6: MutS Homolog 6 Geni

MtMP- MMP: Mitokondriyal Membran Potansiyeli

N: Azot

N-GN :Azot Katkılı Grafen

NH₂: Amin

N₂H₄: Hidrazin

NH₄OH: Amonyum Hidroksit

NRGO: Azot Katkılı İndirgenmiş Grafen Oksit

NF-κB : Nükleer Faktör kappa B

OD : Optik Dansite Değeri

Omi- HtrA2 : Mitokondriyal Serin Proteaz

PARP: Poli ADP- Riboz Polimeraz

PBS : Fosfat Tamponlu Salin

PEG-GO: Polietilen Glikol- Grafen Oksit

PMS2: Protein Uyuşmazlığı Onarımı Sistem Bileřeni

PDK1: Protein 3-Fosfoinositide Bağımlı Protein Kinaz-1

PKB: Protein Kinaz B

PI3K: Fosfoinositid 3- Kinaz

PTEN: Protein Tirozin Fosfataz Ve Tensin Homoloęu

Rac1: Ras İle İlişkili C3 Botulinum Toksin Substratı -1

RGO: İndirgenmiş Grafen Oksit

RhoA: Ras Homoloji Ailesinin A üyesi

RIP: Reseptör Etkileşim Proteini

ROS : Reaktif Oksijen Türevleri

Smac: İkinci Mitokondri Kökenli Kaspaz Aktivatörü

SMAD4: Dekapentaplejik Karşıtı Anneler Homoloęu-4 proteini

TEM: Transmisyon Elektron Mikroskopu

TGFBR2: Transforme Edici Büyüme Reseptörü-Beta 2

THP-1: İnsan Monositer Lösemi Hücre Hattı

TNM : Primer Tümör, Bölgesel Lenf Düğümleri, Uzak Metastaz

T0 : Başlangıç zamanı

TP53: Tümör Protein 53

TRAF : TNF Reseptörü Bağımlı Faktör

TNF : Tümör Nekroz Faktörü

TRADD : Tümör Nekroz Faktör İle İlişkili Ölüm Alanlarına

TSG : Tümör Baskılayıcı Genler

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

V- rGO: Vanilinin İndirgenmiş Grafen Oksit

WHO : Dünya Sağlık  rg t 

WST: Tetrazolyum boya



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nanoteknolojinin kimyasal biyolojiye potansiyel katkılarının ana sınıfları....	5
Şekil 2.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{RGO}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{NRGO}$ nanokompozitlerinin sentez şeması	9
Şekil 2.3. Grafenin klatrin aracılı endositoz mekanizması ile hücre içine alınması.....	10
Şekil 2.4. Grafen ailesi nanomalzemelerin plazma zarı ile olası etkileşimleri ve sitotoksik etkileri.....	11
Şekil 2.5. Kaspazların yapısı ve sınıflandırılması	17
Şekil 2.6. Apoptozun içsel ve dışsal yolu	19
Şekil 4.1. N-GN' nin x20000 büyütme ile elde edilmiş transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü	25
Şekil 4.2. N-GN' nin x100000 büyütme ile elde edilmiş transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü	26
Şekil 4.3. N-GN' nin x50000 büyütme ile edilmiş taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü.....	26
Şekil 4.4. N-GN' nin x100000 büyütme ile edilmiş taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü	27
Şekil 4.5. N-GN Raman spektrumu.....	27
Şekil 4.6. N-GN XPS spektrumu.....	28
Şekil 4.7. Azot katkılı grafen ve cisplatinin 250- 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arasında denenen dozlarının 12 saatlik inkübasyon süresinde HT-29 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	29
Şekil 4.8. Azot katkılı grafen ve cisplatinin 250- 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arasında denenen dozlarının 24 saatlik inkübasyon süresinde HT-29 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	30
Şekil 4.9. Azot katkılı grafen ve cisplatinin 250- 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arasında denenen dozlarının 48 saatlik inkübasyon süresinde HT-29 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	30
Şekil 4.10. Azot katkılı grafen ve cisplatinin 250- 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arasında denenen dozlarının 12 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik.....	31
Şekil 4.11. Azot katkılı grafen ve cisplatinin, 250- 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arasında denenen dozlarının 24 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	32

Şekil 4.12. Azot katkılı grafenin ve cisplatinin, 250- 5 µg/ml arasında denenilen dozlarının 48 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	32
Şekil 4.13. Azot katkılı grafenin 24 saatlik inkübasyon süresinde IC ₅₀ dozunun (93.4 µg/ml) HT- 29 hücre hattında hücre canlılığına etkisi %.....	33
Şekil 4.14. 24 saat inkübasyon sonunda azot katkılı grafenin IC ₅₀ dozunun HT- 29 hücrelerindeki kaspaz-3 miktarı üzerine etkisi.....	33
Şekil 4.15. 24 saat inkübasyon sonunda azot katkılı grafenin IC ₅₀ dozunun ve cisplatinin HT- 29 hücrelerindeki DNA fragmentasyon miktarı üzerine etkisi.....	34



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Nanomalzemelerin sınıflandırılması	6
Çizelge 2.2. Karbon allotroplarının özelliklerinin kıyaslanması.....	7
Çizelge 2.3. Kolon kanseri ile ilişkili tümör baskılayıcı genler ve onkogenler.....	15



1. GİRİŞ

Kanser, genomdaki dinamik değişimler sonucu biriken mutasyonların oluşturduğu sistemik bir hastalıktır (Hanahan vd. 2000). Hanahan ve Weinberg (2000)'in belirttiği üzere kanser hücrelerinin; büyüme sinyallerinin varlığına mecbur kalmama, büyümeyi inhibe edecek sinyalleri göz ardı edebilme, metastaz ve invazyon, anjiyogenez, apoptozu atlatabilme, sınırsız replikasyon gibi zamanla edindiği altı özelliği bulunmaktadır (Hanahan vd. 2000). Kanser bu mevcut altı özelliğinin yanı sıra 2000-2010 yılları arasında kanser çalışmalarından elde edilen veriler sonucunda kanser hücrelerinin ortak özellikleri arasına genomik tutarsızlık, inflamasyon, immün sistemden kaçış ve enerji metabolizmasındaki farklılıklar da eklenmiştir (Hanahan vd. 2011). Kanser, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) belirttiği üzere; sebep olduğu ölüm sayısı neticesinde günümüzün en dikkat çeken hastalıklardan biridir ve 2020'de yaklaşık 19 milyon ölüme neden olduğu Globocan (2022) tarafından belirtilmiştir. Globocan verilerine göre ise 2040 senesinde bu sayının yaklaşık 30.200.000 bulması beklenmektedir. En sık görülen kanser çeşitlerinin ise; meme, akciğer ve kolon kanseri olduğu belirtilmektedir (Globocan 2022; WHO 2022).

Nanoteknoloji metrenin milyarda biri ölçeğinde maddeyi ölçme, işleme, birleştirme, kontrol etme ve üretme yeteneğidir. Fizik, kimya, malzeme bilimi ve biyoloji gibi bilim dallarının maddeyi atomik ve moleküler ölçekte işlemesine ise nanobilim denir (Bayda 2019). Atomun, molekülün ya da kütsel malzemenin sahip olduğu özellikler nanoboyutta farklılık göstermektedir. Dolayısıyla mühendislik, tıp, sağlık, temel bilimler gibi alanlarda nanomalzemeler birçok çalışmada araştırma konusu olmaktadır (National Nanotechnology Initiative 2019; Bayda 2019). Biyomoleküller ve hücre nano ölçektedir. Dolayısıyla tasarlanmış nano malzemeler, biyo yapılar ile aynı boyuta sahip olduğu için sağlık, tıp ve biyoloji alanlarında uyum ve kontrol gibi birçok açıdan avantajlar sağlar (Allhoff 2009; National Nanotechnology Initiative 2019).

Karbon, moleküllerin iskeletini oluşturması sebebi ile yaşamın içinde yer alan dolayısıyla birçok araştırmaya konu olmuş ametal bir elementtir. Karbonun allotropu olan grafen ise henüz 2004 yılında keşfedilmiş üstün birçok fiziko kimyasal özelliğe sahip biyoyumlu bir malzemedir (Arseven 2010; Chen vd. 2015; Kılıç 2019). Grafen, bilinen en dayanıklı tek tabakalı malzemedir. Grafen geniş yüzey alanı barındırır. Bu özelliği, kovalent ve kovalent olmayan yüzey modifikasyonunu mümkün kılar böylece biyolojik fonksiyonelleştirme çalışmaları için mükemmel bir aday kabul edilir. Grafenin in vivo olarak sergilediği özellikler ve biyolojik yapılarla olan ilişkisi üzerine çeşitli alanlarda çalışmalar yapılmaktadır. Hastalık teşhisi, ilaç taşıyıcı sistemler, doku mühendisliği, biyosensörler ve kanser tedavisi gibi birçok çalışma güncel olarak devam ettirilmektedir (Dikin 2007; Zhang vd. 2010; Zhu vd. 2012; Yang vd. 2013; Li vd. 2012; Goenka vd. 2014; Chatterjee vd. 2014; Singh vd. 2014; Kılıç 2019).

Saf grafen band boşluğu olan bir yarı iletkenidir. Kimyasal katkılama grafenin yarı iletkenlik özelliğinin kontrol edilmesini mümkün kılar. Kimyasal katkılama değerlik bandı ve iletkenlik bandı arasındaki boşluk bandında değişime sebep olarak saf grafeni daha kontrollü bir nanomalzeme haline getirir. (Wu vd. 2012; Kılıç 2019). Yüzey transfer ve yer değiştirme katkılaması olarak iki çeşit kimyasal katkılama tipi mevcuttur. Yer değiştirme katkılamasında; karbon atomu haricinde grafenin moleküler yapısında mevcut olan atomlar, grafenin iskeletinde konumlanmış karbon atomları ile

yer değiştirirler (Wang vd. 2015). Benzer atomik boyutları ve sahip olduğu değerlik elektronları sebebi ile azot, grafen katkılanmasında öne çıkan bir atomdur (Tian vd. 2016). Grafen ve N-katkılı grafen özellikleri büyük ölçüde sentez yöntemine bağlıdır (Bundaleska 2018; Baldea 2020). Saf grafenin azot ile katkılanması iletkenlik özelliğini mükemmel derecede iyileştirir. Dolayısıyla azot ile katkılanmış grafen; hücre kültürü çalışmalarında ve biyosensörlerin oluşturulmasında ideal bir substrat olma özelliği kazanmıştır (Cohen vd. 2010; Nguyen vd. 2012; Cohen vd. 2012; Artiles vd. 2011; Goenka 2014). Nanoparçacıkların biyolojik yapılarla etkileşimini yöneten üç özellik; boyutu, şekli ve yüzey kimyasıdır (Gonçalves vd. 2014). Aynı zamanda grafenin sahip olduğu yüzey ve fonksiyonel gruplar sayesinde biyolojik moleküller fonksiyonel gruplara bağlanabilirken, grafenin yüzeyi de hücre zarı ile etkileşim kurabilir (Jaworski vd. 2015).

Günümüzde kanser hastalarına uygulanan en yaygın tedavi yöntemlerinden olan kemoterapi, kanser hücrelerine zarar verirken ne yazık ki spesifik bir hedefe yönelik tedavi boyutunda olmadığı için beraberinde sağlıklı hücrelere de zarar vererek kişinin yaşam kalitesini düşürmektedir. Hedefe yönelik tedavi çalışmaları, kemoterapinin aksine sağlıklı hücrelere zarar vermeden hastayı tedavi etmeyi mümkün kılabilir. Nano boyuttaki hücre ve/veya biyomoleküller hedef alınarak geliştirilmiş bir nanomalzeme; kanseri erken evrede teşhis etmeyi veya kemoterapi tedavilerinde spesifik olarak kanser hücrelerine odaklanmayı mümkün kılabilir. Böylece kemoterapik ilaçlar ile sağlıklı hücrelere zarar vermeden, kanserli hücre veya doku hedef alınarak hastayı tedavi mümkün olabilir.

Grafen ailesi nanomalzemelerin, biyoyumluluk ve toksisite gibi birçok alanda araştırma konusu olmasının sebebi hücre zarını geçebilme ve hücrede fizyolojik olarak değişime sebep olabilme yetenekleridir. Grafen bazlı nanomalzemeler, endositoz yoluyla hücre ile etkileşime girer, ancak hücre tipine bağlı olarak bu mekanizma farklılıklar göstermektedir (Linares vd. 2014; Chatterjee vd. 2014; Magne vd. 2021). Hücre tarafından içselleştirilen grafen ailesi nanomalzemeler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine sebep olarak hücre iskeleti ve/veya farklı hücresel organeller ile etkileşime girebilir. Sonuç olarak meydana gelen ROS, mitokondriyal membran potansiyelini (MtMP) azaltarak ve laktat dehidrojenaz (LDH) salınımı yoluyla hücre zarına zarar verip mitokondriyal bozukluklara neden olabilir. Grafen bazlı nanomalzemeler çekirdeği aşarak doğrudan DNA ile etkileşime girip genotoksik bir etki yaratabilir fakat bunların hepsi nanomalzemenin sentez yöntemi dahil olmak üzere yüzey alanı ve boyutu gibi birçok faktöre bağlıdır (Ou vd. 2016; Liao vd. 2018; Tabish vd. 2018; Magne vd. 2021).

Grafen ailesi nanomalzemelerin, hücrelerle etkileşim kurma metodu belirlenir ise onları gelecek vaat eden hedefe yönelik tedavi uygulamalarında güvenli bir şekilde kullanmak adına yapılan çalışmalar da artış gösterebilir. Grafen ailesi nanomalzemelerin plazma zarına olan etkileri, içselleştirme mekanizmaları ve hücre içi etkileşim kurdukları yapıların belirlenmesi gibi birçok aşama nanobiyoloji çalışmalarına yön vermesi açısından son derecede önemlidir (Magne vd. 2021).

Şimdiye kadar yapılan literatür taramaları sonucunda grafenin sahip olduğu fiziko kimyasal özellikleri neticesinde kanser hücreleri ile olan ilişkisi araştırılmış ve kanser hücrelerinde; apoptoz, nekroz ve otofaji gibi hücre ölümlerine sebep olduğu

bildirilmiştir. Grafenin aynı zamanda mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek kanser hücrelerinde ölüme sebep olurken sağlıklı epitel hücrelerinde böyle bir etki yaratmadığına dair araştırmalar da mevcuttur. Yapılan bilimsel araştırmalar sonucunda grafenin etki mekanizmasının; doz, zaman, kanser hücre hattı ve nano malzemenin sentez yöntemi gibi birçok değişkene bağlı olduğu sonucuna varılmaktadır. Nanoparçacıkların biyolojik yapılarla etkileşimini yöneten en temel özellikleri; boyutu, şekli ve yüzey kimyasıdır. Dahası grafen ve azot-katkılı grafen özellikleri büyük ölçüde sentez yöntemine bağlıdır (Chatterjee vd. 2014; Zhou vd. 2014; Baldea vd. 2020).

Bu çalışmada ise daha önce kolon kanser hücre hattında sitotoksik etkileri incelenmemiş ve solvotermal yöntemle sentezlenmiş azot katkılı grafenin, HT-29 hücre hattında sitotoksik etkilerinin in vitro olarak değerlendirilmesi ve kıyaslanması hedeflenmektedir. Henüz çok yakın bir geçmişte keşfedilmiş yüksek potansiyelli grafen ve onkoloji alanındaki etkileri ile ilgili araştırmalar sınırlı sayıdadır. Dolayısıyla Akdeniz Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonu Birimi tarafından desteklenen FBA- 2017-2205 kodlu “Grafen Tabanlı Elektrokatalizörlerin Üretilmesi” başlıklı proje sonucu spesifik olarak solvotermal yöntem ile sentezlenmiş azot katkılı grafenin kolon kanseri üzerindeki sitotoksik etkisini konu alan araştırmamız, nanoonkoloji alanında hedefe yönelik tedavi araştırmalarına kılavuzluk etme potansiyeli taşımaktadır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Nanoteknoloji ve Nanobiyoloji

Nano ölçü birimi; ölçeğin milyarda biridir. 'Nano' ön eki, 'cüce' veya çok küçük anlamına gelen Yunanca bir ön ekten atıf alır ve metrenin milyarda birini (10^{-9} m) betimler (Mansoori 2005; Bayda 2019). Nanobilim, malzemelerin atomik ve moleküler ölçeklerde yönlendirilmesi ve şekillendirilmesi ile ilgilenen fizik, malzeme bilimi ve biyolojinin bir birleşimidir; nanoteknoloji ise nanometre ölçeğinde maddeyi ölçme, işleme, birleştirme, kontrol etme ve üretme yeteneğidir (Bayda 2019). Atomun, molekülün ve kütsel malzemenin sergilediği özellikler ile bu malzemelerin nanoboyut formlarında gözlenen özellikler fiziksel, kimyasal ve biyolojik açıdan farklılıklar barındırır. Dolayısıyla nanoteknoloji atom, molekül ve malzemelere dair yeni özelliklerin keşfini mümkün kılması sebebi ile tıp, biyoloji, sağlık, kimya ve mühendislik olmak üzere farklı alanlarda disiplinler arası çalışmaları mümkün kılmaktadır (National Nanotechnology Initiative 2019; Bayda 2019).

Modern çağ nanoteknolojisi incelendiğinde ise nano ölçeğini ilk kez fizikçi Richard Feynman keşfetmiştir (Feynman 1960).

Nanoteknolojide, 21. yüzyılın en umut verici araştırma alanlarından birisi ise nanobiyolojidir. Nanobiyoloji, nano ölçekte dizayn edilmiş mühendislik materyalleri ile hücre ve biyolojik yapıdaki moleküller arasında kurulan etkileşimi konu alır (Şekil 2.1). Nanobiyoloji alanındaki çalışmalar; sağlık, tıp ve biyoloji alanlarında günümüzdeki birçok hastalığın araştırılması, teşhis ve tedavisinde kontrollü uygulama fırsatları sunmaktadır. Nano ölçekte dizayn edilmiş mühendislik materyalleri biyolojik yapılar ile aynı boyutlardadır. Bu sebeple tasarlanan nano materyaller biyolojik açıdan uyum ve kontrol edilebilme gibi avantajlar sağladığı için büyük öneme sahiptir (Allhoff 2009; National Nanotechnology Initiative 2019).

Nanobilim alanında hedefe yönelik çalışmalar ile, kanser için kemoterapi ilaçlarının etkinliği geliştirilerek nano-onkoloji alanında ilerlemeler sağlanmıştır (Yuan 2019). Tümör bölgenin hedeflenmesinde nanomalzemeler, antikor ve sitotoksik ajanlar dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonel moleküller ile bir araya getirilmiştir. Dolayısıyla birçok çalışma, nanomalzemelerin; otofaji, metabolizma veya oksidatif stres gibi temel biyolojik süreçleri uygun bir biçimde yönlendirmek amacı ile gerekli terapötik molekülleri sağlamak için de kullanılabileceğini göstermiştir. Dolayısıyla nano-onkoloji, nanobilimin dikkate değer ve gelişime açık bir uygulamasıdır ve kemoterapi tedavilerinin sebep olduğu toksisitede önemli bir azalmaya sebep olmasının yanı sıra, tümör yanıt oranlarının iyileştirilmesini de mümkün kılmaktadır (Cordani 2019).

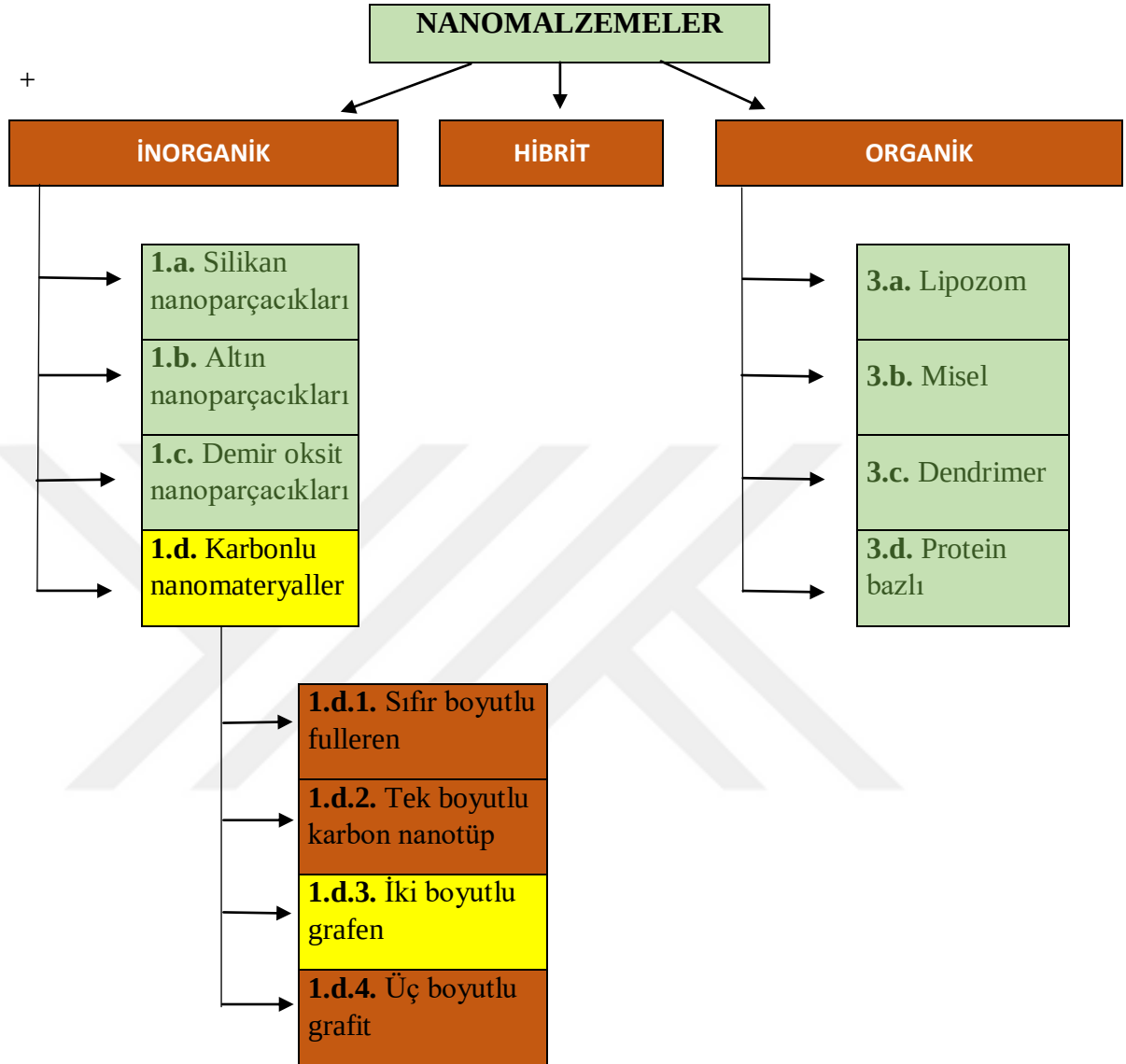


Şekil 2.1. Nanoteknolojinin kimyasal biyolojiye potansiyel katkılarının ana sınıfları (Williams vd. 2021’ den uyarlanmıştır)

2.1.1 Grafen

Nanomalzemeler genel olarak organik nanomalzemeler, inorganik nanomalzemeler ve hibrit nanomalzemeler olarak sınıflandırılabilir. Organik nanomalzemeler; lipozomlar, miseller, dendrimerler ve protein bazlı nanomalzemelerden oluşurken, inorganik nanomalzemeler silika nanoparçacıkları, altın nanoparçacıkları, demir oksit nanoparçacıkları ve karbonlu nanomateryallerdir. Karbon bazlı materyaller ise mekanik, termal ve optik özellikleri sebebi ile nanomalzemeler arasında en dikkat çekici olanlardır. Karbon malzemelerin inorganik malzemelere kıyasla daha çevre dostu oldukları bilinmektedir (Grimsdale vd. 2005; Garnweitner vd. 2008; Sanchez vd. 2011; Chen vd. 2015).

Çizelge 2.1. Nanomalzemelerin sınıflandırılması (Grimsdale vd. 2005; Garnweitner vd. 2008; Sanchez vd. 2011; Chen vd. 2015’ ten uyarlanmıştır).



Karbon, biyomoleküllerin iskelet atomudur. Ayrıca saf veya kovalent halde birçok bileşiğin yapısında mevcuttur. Karbonun hibritleşme göstermediği, en saf halde geometrik dizilim sergilediği kristal formlarından biri elmas ve grafitir (Arseven 2010; Kılıç 2019). Karbon bazlı nanomalzemelerde yer alan karbon atomları; dört tip nanoyapıdan kaynaklanan, altıgen bir düzenlemeye ve sp² orbitallerine sahip kovalent bağlar içerir. Bu dört tip nanoyapı; sıfır boyutlu fullerenler; tek boyuta sahip tek duvarlı karbon nanotüpler; iki boyutlu grafenler ve üç boyutlu grafitlerdir (Dong vd. 2017; Magne vd. 2021)

Çizelge 2.2. Karbon allotroplarının özelliklerinin kıyaslanması (Tiyek vd. 2016'dan uyarlanmıştır)

Özellik	Grafen	Karbon nanotüp	Grafit	Fulleren
Yüzey alanı(m ² /g)	2630	1315	10	5
Termal iletkenlik(W/Mk)	5000	>3000(çok duvarlı knt)	3000	0,4
Mobilite (cm ² /Vs)	15000 SiO üzerinde 200.000 serbest halde	100000	13000	0,56
Young modülü(TPa)	1	0,64	1,06	0,01
Optik geçirgenlik(%)	97,7	-	-	-

Karbon nanoyapılar tek bir grafit katmandan oluşmaktadır. Bu temel yapı taşları, altıgen bir petek yapısında kovalent olarak işlevselleştirilmiş sp² bağlı karbon atomlarından oluşur. Bir grafen katmanı, monoatomik veya tek katmanlı bir grafeni belirtirken, iki ila üç grafit katmanı sırasıyla iki katmanlı ve üç katmanlı grafen olarak bilinir (Bhuyan vd. 2016; Magne vd. 2021).

Grafeni ilk olarak Andre Geim ve Konstantin Novoselov, grafitten mekanik pul pul dökülme yoluyla keşfetti. Grafen üç boyutlu grafitten elde edilmiş tek atomik katmanlı iki boyutlu, oda sıcaklığında iletkenliği ve yüksek taşıyıcılık kapasitesi olan boşluksuz bir nanomalzemedir (Du vd. 2008; Rao vd. 2014). Altıgen geometrik yapısı ile bir atom kalınlığında olan grafen, birçok üstün özelliğe sahiptir. Yüksek derecede yük taşıma kabiliyetine sahiptir. Elektronlar grafen tabakası içerisinde kütlesizmiş gibi davranarak çok hızlı hareket eder. Hem en ince hem de en güçlü malzemedir. Isıyı mükemmel derecede ileten ve dayanıklılık özelliği sergileyen bir malzemedir. Gazları geçirmez. Dayanıklılık göstermekle birlikte esneklik özelliği de sergiler (Kılıç 2019). Kimyasal olarak çok reaktif değildir. Yüksek şeffaflık, yük mobilitesi, sıcaklık direnci, termal iletkenlik ve gerilme direncine sahiptir (Arseven 2010). Grafende konumlanmış iki karbon arası uzaklığın 0,42 nm olması sebebi ile grafen tek tabaka halinde şeffaflık kazanmış ve mükemmel bir iletkenlik seviyesi sergilemektedir (Kozal 2012; Tiyek vd. 2016). Grafenin olağanüstü elektrik iletkenliği ve termal özellikleri sadece elektronik cihazlarda değil, aynı zamanda hücre potansiyelini ölçmek için biyomedikal cihazlarda ve iletken hücre kültürü cihazları ve biyosensörler için bir substrat olarak yararlı olabilir (Artiles vd. 2011; Nguyen vd. 2012; Cohen vd. 2012; Goenka vd. 2014).

Grafenin biyoaktivitesi konu alan; hastalık teşhisi, ilaç taşıyıcı sistemler, antibakteriyel ve antiviral madde üretimi, doku mühendisliği, biyosensörler, fototermal tedaviler ve kanser tedavisi gibi çalışmalar mevcuttur (Dikin vd. 2007; Zhang vd. 2010;

Zhu vd. 2012; Yang vd. 2013; Li vd. 2012; Goenka vd. 2014; Chatterjee vd. 2014; Singh vd. 2014). Tek katmanlı grafen %97.7 şeffaflık gösterir (Zhang vd. 2019). Tek katmanlı grafende bant aralığının olmaması sonucunda elektron hareketliliğinin daha hızlı ve kontrolsüz olması söz konusudur. Dolayısıyla yüzey modifikasyonu veya kimyasal katkılama ile değerlik ve iletkenlik bandı arasında boşluk bandı oluşturulur (Mukherjee vd. 2012; Rao vd. 2014). Heteroatomlu katkılanmış grafen, elektronik yapısı ve diğer içsel özellikleri ile daha etkili bir malzemedir (Panchakarla vd. 2009).

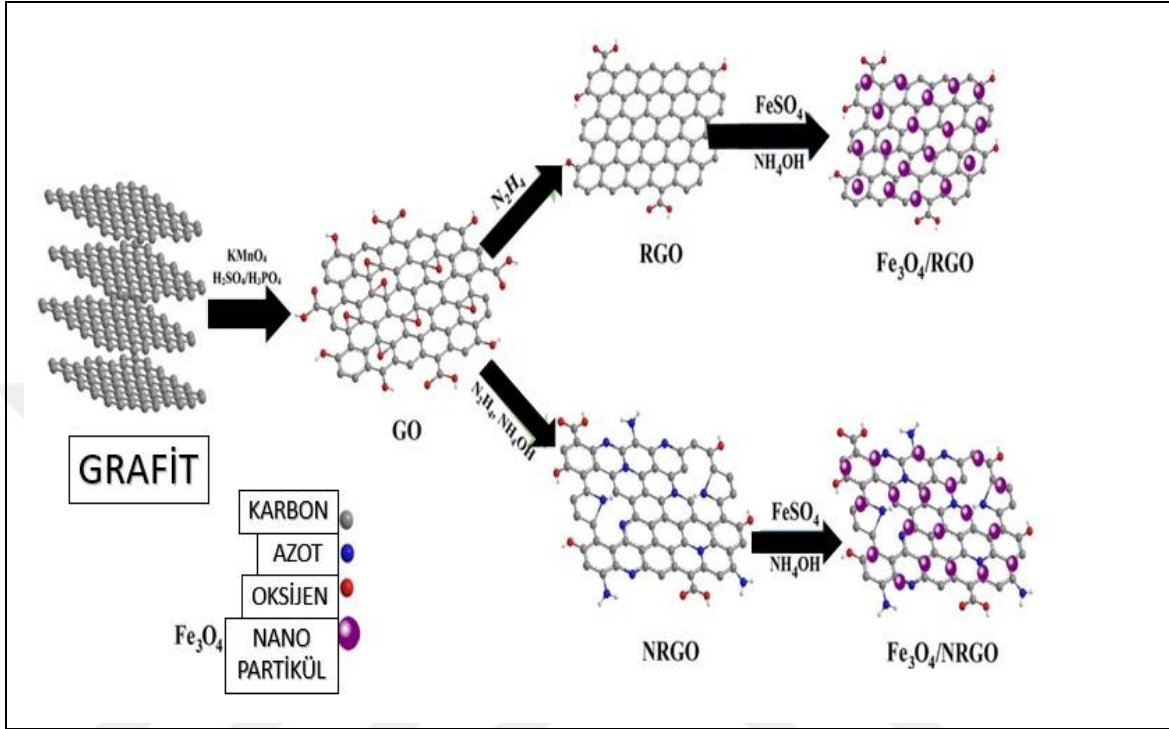
Grafen Ailesi Nanomalzemelerin (GFN); şekil, boyut, yüzey alanı, tabaka sayısı, yanal boyutlar, yüzey kimyası, sertlik gibi özellikleri, biyolojik sistemlerle etkileşimini önemli ölçüde belirlemektedir (Sanchez vd. 2012; Guo vd. 2014). Nanoparçacıkların biyolojik yapılarla etkileşimini yöneten üç özellik; boyutu, şekli ve yüzey kimyasıdır (Gonçalves vd. 2013). Genel olarak, küçük boyutlu ve yüksek fonksiyonel gruplara sahip olan GFN'ler, daha büyük boyutlu ve az sayıda fonksiyonel grup içeren GFN'ler ile karşılaştırıldığında, hücreye girişi daha kolay olmaktadır (Guo vd. 2014). Grafen, hücre zarlarına yapışma yoluyla ve hücre reseptörleri ile bağlanma ile etkileşime girebileceği için stresi indükleyebilir ve bu sayede kanser hücrelerinde apoptotik mekanizmaları aktive edebilir (Geim vd. 2007). Aynı zamanda grafenin sahip olduğu yüzey ve fonksiyonel gruplar sayesinde biyolojik moleküller fonksiyonel gruplara bağlanabilirken, grafen yüzeyi de hücre zarı ile etkileşim kurabilir (Jaworski vd. 2015). Bu bağlamda grafen ailesi nanomalzeme sınıfı; ilaç iletimi, görüntüleme ajanları, biyosensörler ve doku mühendisliği gibi birçok alanda araştırma konusu olmuştur (Maiti vd. 2019; Mohajeri vd. 2019).

2.1.2. Katkılı Grafen

Grafenin yarı iletken özelliklerini kontrol altına alabilmek amacı ile kimyasal katkılama uygulanarak; valans ve iletkenlik bandı arasında enerji boşluğu oluşturulmaktadır (Wu vd. 2012; Kılıç 2019). Kimyasal katkılama (doping), grafenin elektronik özelliği dahil birçok özelliğini etkileme potansiyeline sahiptir. Grafenin kimyasal olarak katkılanması; yüzey transferi ve yer değiştirme ile mümkündür. Grafen ile dopantı arasında yük aktarımı sağlanarak grafenin kimyasal bağlarında hasar oluşturmadan yüzey katkılama gerçekleştirilebilir. Azot, bor, demir veya kükürt gibi karbon dışındaki herhangi bir atom, grafen iskeletinde konumlanmış karbon ile yer değiştirerek kimyasal katkılanır ise grafenin iskelet yapısı değişime uğramaktadır (Şekil 2.2) (Wang vd. 2015; Kılıç 2019).

Karbon malzemelerin kimyasal katkılanmasında, azot mükemmel bir potansiyele sahiptir. Bununla birlikte, grafen ve N-katkılı grafen özellikleri büyük ölçüde sentez yöntemine bağlıdır (Tian vd. 2016; Bundaleska vd. 2018; Baldea vd. 2020). Grafende azot katkısı, iç optik ve elektriksel özelliklerini etkili bir şekilde değiştirebilir, bu da daha yüksek elektrokatalitik aktivite ve iletkenliğe sebep olur. Azot katkılı grafen malzemeler 35S/cm'lik mükemmel elektrik iletkenliğine sahiptir. Hızlı elektron transfer kinetiği ve grafen bazlı materyallerin üstün elektrokatalitik aktivitesi nedeniyle, klinik tanı ile ilgili birkaç önemli küçük molekülü tespit etmek için yeni elektrokimyasal sensörler geliştirme konusundaki uygulamalarına çok sayıda çalışma

ayrılmıştır (Pareek vd. 2019). Azot veya bor ile katılanmış grafen, bir bant aralığı yaratır ve onu n-tipi veya p-tipi bir malzeme yapar. Bu tür kimyasal katkı malzemeler benzersiz özelliklere sahiptir, örneğin nitrojen katkılı grafen iyi bir elektron vericidir. Bu noktada birçok uygulama alanında kullanılmaktadır (Zhu vd. 2013).

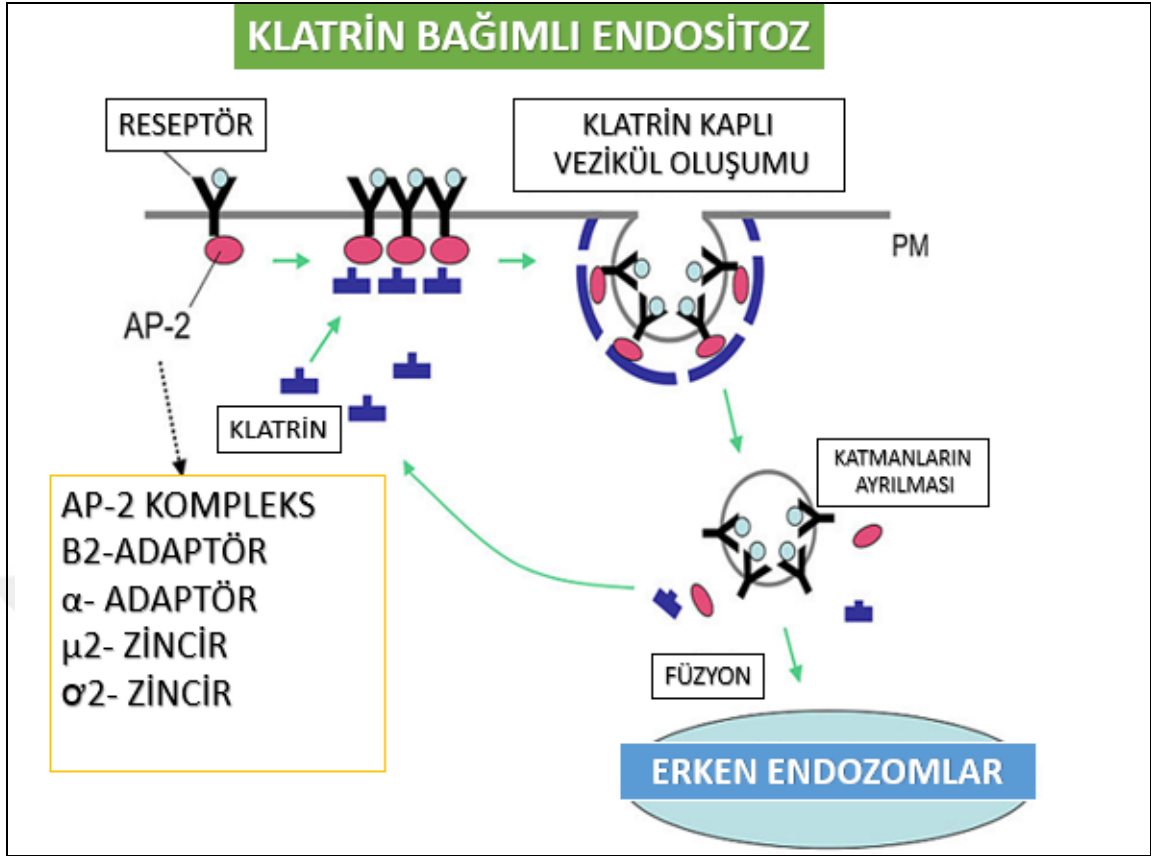


Şekil 2.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{RGO}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{NRGO}$ nanokompozitlerinin sentez şeması (Naderi vd. 2016' dan uyarlanmıştır)

2.1.3. Grafen ve türevlerinin biyolojik aktiviteleri

2.1.3.1. Grafen bazlı nanomalzemelerin biyolojik sistemlerle etkileşimleri

Grafen ailesi nanomalzemeler, hücre zarını geçme ve fizyolojik ortamı değiştirme yetenekleri nedeniyle biyoyumluluk ve toksisite gibi birçok alanda araştırma konusudur. Grafen bazlı nanomalzemeler, hücrelerle endositoz yoluyla etkileşime girer. Ancak hücre tarafından içselleştirme mekanizmaları hücre hattına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Linares ve arkadaşları (2014), yaptıkları çalışmada üç farklı hücre hattında endositozun farklı alım mekanizmalarının mevcut olduğunu ve bu mekanizmaların hücre hattına bağlı olarak çeşitlilik gösterdiği bulgusunu elde ettiler. Bununla birlikte, kullanılan üç hücre tipinde ortak olarak makropinositoz mekanizması genel bir içselleştirme süreci olarak belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan grafen ailesi nanomalzemenin, hücre hatlarında klatrin-bağımlı mekanizmalar tarafından içselleştirildiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil2.3) (Grant vd. 2006; Linares vd. 2014).

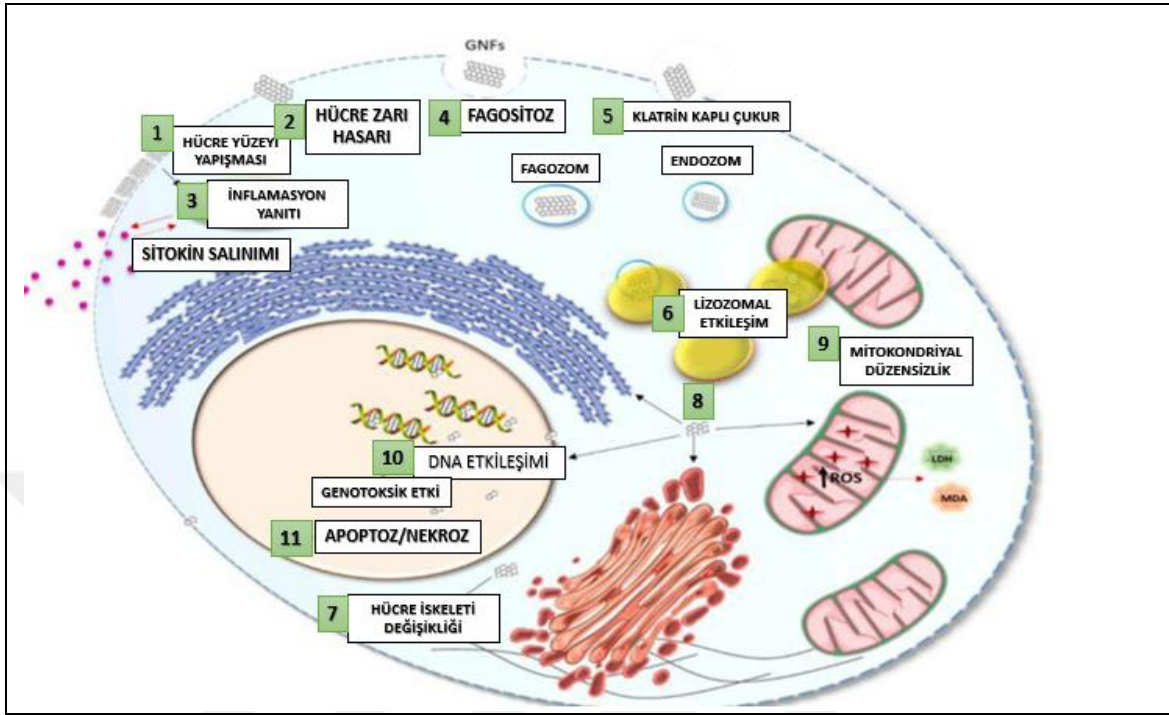


Şekil 2.3. Grafenin klatrin aracılı endositoz mekanizması ile hücre içine alınması (Grant vd. 2006’ den uyarlanmıştır)

İçselleştirmeden sonra, grafen ve türevleri, parçalandıkları veya lizozom, mitokondri, çekirdek ve hücre iskeleti gibi diğer hücre içi organellerle etkileşime girmek için bir baz olarak kullanıldığı endozom- lizozom sisteminde tutulur. Ayrıca, grafen nanoparçacıkları ve türevleri, sitoplazmik içeriğin sızmasına bağlı olarak enflamatuvar yanıtın izlediği hasara neden olarak plazma zarından geçebilmektedir. Sitozolde, grafen bazlı nanomalzemeler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi yoluyla hücre iskeleti ve/veya farklı hücresel organeller ile etkileşime girerek toksik etkiye sebep olabilmektedir. Bunlara ek olarak, ROS lipid peroksidleri üretmek için membran lipidlerinden doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu da indükleyebilir (Şekil 2.4). Grafen bazlı nanomalzemeler (GNM'ler) çekirdeğe ulaştığında, doğrudan DNA ile etkileşime girebilir ve genotoksik etkilere neden olabilir (Ou vd. 2016; Liao vd. 2018; Tabish vd. 2018; Magne vd. 2021).

GNM'lerin biyolojik etkilerinin; malzemenin yanal boyutu ve katman sayısı, uygulama dozu, maruz kalma süresi, yüzey kimyası ve saflık gibi faktörlerden güçlü bir şekilde etkilendiği literatürde birçok farklı çalışma ile belirtilmektedir. Bu özellikler, kullanılan sentez işlemine ve işlevselleştirme yöntemlerine göre değişmektedir (Zhang vd. 2016; Higashisaka vd. 2017; Yan vd. 2017; Nasirzadeh vd. 2019). Dolayısıyla, grafen bazlı nanomalzemelerin fiziko-kimyasal özelliklerine bağlı olarak biyolojik

sistemlerle etkileşimlerini doğru anlamlandırmak hedefe yönelik çalışmaları mümkün kılabilir.



Şekil 2.4. Grafen ailesi nanomalzemelerinin (GNF'ler) plazma zarı ile olası etkileşimleri ve sitotoksik etkileri (Magne 2021'den uyarlanmıştır)

Partikül boyutunun nanomalzemenin biyoyumluluğu ve toksisitesi için belirleyici bir faktör olduğu araştırmalar ile desteklenmiştir (Jia vd. 2019). Chatterjee ve arkadaşlarının HepG2 insan hepatokarsinom hücreleri ile, grafen türevlerinin yüzeydeki oksidasyon durumunun etkisini araştırdıkları bir çalışma sonucunda; GO nanoparçacıklarının içselleştirildiğini ancak hücre yüzeyinde indirgenmiş GO (rGO) nanoparçacıklarının kaldığı belirtilmiştir (Chatterjee vd. 2014). Mao ve ekibinin yaptığı araştırmanın sonucu ise, grafenin oksidasyon derecesinin lipid çift katmanlı membrana zarar verdiğini bu nedenle, daha yüksek oksidasyon derecesine sahip daha büyük grafen nanoparçacıklarının, daha yüksek sitotoksik etkiler üretebileceğini göstermektedir (Mao vd. 2014).

Grafen ailesi nanomalzemeler düşük konsantrasyonlarda memeli hücrelerinde çok az toksisiteye neden olur veya hiç toksisite göstermezken yüksek konsantrasyonlarda hücre zar dinamiğini etkilemektedir (Zhang vd. 2016). Qin ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada grafen kuantum noktalarının (GQD) makrofaj hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmişler ve hücrelerin 1, 5, 10, 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında GQD' lere maruz kalma süresinin 24' ten 48' e çıkarılması sonucu apoptotik hücre ölüm sayısında artış gözlemlendiği bildirmişlerdir (Qin vd. 2015). Yan ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada ise *in vitro* toksisite testleri kapsamında THP-1 akut monositik lösemi hücrelerine 24 saat boyunca GO ve indirgenmiş GO nanoplakalar farklı dozlarda uygulanmış, doza bağlı bir şekilde ROS oluşumu ile ilişkili hücre büyümesinin inhibisyonunu gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir. Çalışmada ayrıca pro-

inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun, GO ile tedavi edilen hücrelerde doza bağlı bir şekilde arttığını tespit etmişlerdir (Yang vd. 2013). Nasirzadehet ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise; GP nanopartiküllerinin insan alveolar adenokarsinom hücreleri (A549) üzerindeki sitotoksik etkilerinin doza ve zamana bağlı olduğu belirtilmiştir (Nasirzadeh vd. 2019).

Grafen ve türevlerinin, biyolojik sistemlerle hangi yolla etkileşim kurduklarını anlamak da oldukça önemli bir konudur. Çünkü nanomalzemenin vücuda giriş yolu, sonraki varış yeri için de belirleyicidir. Grafen bazlı nanomalzemelerde metabolize edilme süreci, GNM'lerin sahip oldukları içsel fiziksel ve kimyasal özellikleri tarafından belirlenir (Ouyang vd. 2015; Fadeel vd. 2018; Magne vd. 2021). Ancak bu özellikler biyolojik ortamdaki proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin absorpsiyonu ile değiştirilebilir (Magne vd. 2021).

Grafen ve türevlerinin biyoyararlanımı ve toksisite çalışmalarında giderek gerçekleşen artışa rağmen, güvenli ve etkili formülasyonların geliştirilebilmesi için henüz açığa kavuşturulması gereken birçok nokta vardır. Bu noktada nanomalzemenin; sentezlenme, geliştirilme ve enfekte hücreye doğrulukla iletilebilecek şekilde tasarlanması mümkün kılınır ise sağlıklı hücreler korunarak hedefe yönelik tanı ve tedavide umut verici sonuçlar elde edilebilir (Magne vd. 2021).

2.1.3.2. Grafen ve türevlerinin sitotoksik etkileri

Literatürde grafen ailesi nanomalzemelerin sitotoksik etkisinin araştırıldığı farklı hücreler kullanılarak yapılmış birçok çalışma yer almaktadır (Liao vd. 2018; Magne vd. 2021). Grafen nanomalzemelerin hücrelerle nasıl etkileşime girdiğinin doğru anlaşılması, onları gelecek vaat eden hedefe yönelik tedavi uygulamalarında güvenli bir şekilde kullanmak için çok önemlidir. Grafen ailesi nanomalzemelerin plazma zarına olan etkileri, içselleştirme mekanizmaları ve hücre içi etkileşim kurdukları yapıların belirlenmesi gibi birçok aşama nanobiyoloji çalışmalarına yön vermesi açısından son derecede önemlidir (Magne vd. 2021).

Literatürde grafen ve türevlerinin mitokondriyal bozukluklara ve lipid peroksidasyonuna neden olduğunu ve ROS üretimini arttırdığını bildiren çalışmalar dikkat çekicidir. Ayrıca, grafen nanopartiküller hücre çekirdeğine girebilir ve DNA ile reaksiyona girerek genotoksik etkiler oluşturabilir (Ou vd. 2016; Liao vd. 2018; Tabish vd. 2018; Magne vd. 2021). Grafen bazlı nanomalzemelerin ana toksisite mekanizması olarak reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi kabul görmektedir, dolayısıyla bu süreç oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtların uyarılması ile sonuçlanır (Lalwani vd. 2016). Gurunathan ve arkadaşları insan akut monositik lösemi hücre hattında (THP-1'de) GO ve vanilinin (V-rGO) immünotoksitesini değerlendirmişler ve sitotoksitenin hücrelerde, laktat dehidrojenaz (LDH) seviyesinde bir artışa, mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) kaybına, ATP seviyelerinde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada, ROS düzeylerindeki artışın ve lipid peroksidasyonunun THP-1 hücrelerinde redoks dengesizliğine, proapoptotik genlerin ekspresyonunda artışa ve anti-apoptotik genlerin ifadesinde ise azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Gurunathan vd. 2019). Zhou ve arkadaşları MDA-MB-231 metastatik meme kanseri hücrelerinde PEG-GO nanoparçacık maruziyetinin F-aktin polimerizasyonunda yer alan GTPazlar olan Rac1 ve RhoA'nın ekspresyonunu negatif

olarak modüle ettiğini ve bu nedenle F aktin polimerizasyonunun kesintiye uğradığını bildirmişlerdir (Zhou vd. 2014).

2.2. KANSER

Sağlıklı bir hücrede DNA onarımı, büyüme veya apoptoz gibi temel süreçlerin yolları belirli hücre döngüsü kuralları ile denetlenir. Bu kurallar hücredeki homeostasiyi korumak amacı ile belirli bir düzende işleyiş gösteren kurallardır. Çevre tarafından tetiklenebilen, hücredeki birikmiş çoklu genetik mutasyonların, hücreyi kendi kontrol mekanizma kurallarından kaçırması sonucu karsinogenez süreci tetiklenir. Böylelikle kanser hücresi, karsinogenez sürecinde kazanılmış moleküler, biyokimyasal ve hücresel özellikler ile bir takım kuralsız yetenekler sergilemeye başlar (Hanahan vd. 2000; Patel 2012).

Birçok kanser türünde, insan genomunda yer alan ve mutasyona uğrayan gen bölgeleri incelenmiş ve kanserle ilişkili bu genler, onkogen ve tümör baskılayıcı genler olarak isimlendirilmiştir. Sağlıklı bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi, onkogenlerin aktif, tümör baskılayıcı genlerin ise inaktif hale gelmesi sonucu gerçekleşmektedir (Tran vd. 2008; Patel 2012). Hücrede meydana gelen mutasyonlar, onkogenlerin öncülü olan protoonkogenleri aktif onkogenlere dönüştürür. Bu dönüşümü üç farklı yolla yapabilir; ilki genin sekansını değiştirebilir, ikincisi genin amplifikasyonunu sağlayabilir ve son olarak gen translokasyonu ile aktifleşmeyi sağlayabilir. Bu aktifleşme sonucu hücre çoğalması tetiklenebilir. Tümör baskılayıcı genler ise bir dizi sıralı olaylar sonucu değiştirilir ve inhibe edilir. Onkogen ve tümör baskılayıcı gen sınıflarında meydana gelen mutasyonlar sonucu hücrede metabolizma, çoğalma ve ölüm gibi temel hücresel süreçlerde değişim meydana gelir (Hanahan vd. 2000). Kanser hücresi, hücrede yer alan, protoonkogen ve tümör baskılayıcı genler tarafından kontrol edilen birçok düzenlemeden kaçır ve dolayısıyla kontrolsüz çoğalır (Macleod 2000).

Hanahan ve Weinberg (2000), belirttiği üzere kanser hücrelerinin; büyüme sinyallerinin varlığına mecbur kalmama, büyümeyi inhibe edecek sinyalleri göz ardı edebilme, metastaz ve invazyon, anjiyogenez, apoptozu atlatabilme, sınırsız replikasyon gibi zamanla edindiği altı özelliği bulunmaktadır (Hanahan vd. 2000).

İnsandaki kanser modelleri benzerlikler gösterse de onkogenezi sırasında izlenen yollar oldukça çeşitlilik gösterir (Hanahan vd. 2000). Genel olarak kanser, heterojen bir patoloji sergiler (Brennan vd. 2009; Kreeger vd. 2010). Örneğin, spesifik onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin mutagenezi, bazı tümör ilerleme yollarında erken ve bazılarında ise geç ortaya çıkabilir. Hanahan ve Weinberg (2000), tüm kanserlerin bir dizi ayırt edici yeteneğin kazanılması ile karakterize edilebilmesine rağmen, bu özelliklerin kazanıldığı yolların hem mekanik hem de kronolojik olarak değiştiğini belirtmektedir (Şekil.2.5) (Hanahan vd. 2000).

2.2.1. Kolon kanseri ve tedavi yöntemleri

Günümüzde en önemli mortalite sebeplerinden biri kanserdir (Siegel vd. 2020; Özer 2021). Globocan kanser verilerine göre 2018 yılında dünyada; 9.555.027 kişi kanser sebebi ile yaşamını yitirmiştir. Bu 9.555.027 kişinin, 880.792'si (% 9.2) kolon kanseri sebebi ile yaşamını yitirmiş (Globocan 2018) ve eş zamanlı olarak 1.849.518'i kolon kanseri teşhisi olarak 18.078.957 kanser öyküsü meydana gelmiştir. 2040 yılı gibi yakın bir gelecekte ise bu sayının 29.500.000 bulması tahmin edilmektedir (Who 2018). Dünyada ve ülkemizde, ölüme neden olan ilk iki kanser tipi sırasıyla akciğer ve meme kanseridir. Kolon kanseri ise üçüncü sırada yer alarak dünyada ve ülkemizde ciddi mortalite sebebi olmaktadır. Globocan verilerine baz alındığında, Türkiye'de 2018 yılında kanser nedeni ile 116.710 kişi yaşamını yitirmiş ve 20.031'i (% 9.5) kolon kanseri olmak üzere toplam 210.537 yeni kanser öyküleri meydana gelmiştir (Bray vd. 2018; Özer 2021).

Bağırsak epitel hücreleri, progenitor hücrelerindeki bir dizi genetik değişim sonucu tümör hücrelerine dönüşebilir. Bu dönüşüm onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcıların inaktivasyonu gibi hücre homeostazisini etkileyecek bir takım değişim ile sonuçlanır (Kheirleiseid vd. 2013). Dolayısıyla iyi huylu doku büyümelerinin oluşturduğu kitlenin zamanla agresif tümöre dönüşümü sonucunda kolon kanseri meydana gelmektedir (Vogelstein vd. 2002).

Amerikan Kanser Ortak Komitesi, kolon kanserinin prognozu belirlemek ve buna uygun tedavi süreci oluşturmak amacı ile TNM sistemini baz alarak kolon kanseri evrelerini sınıflandırmıştır (T=primer tümör; N=bölgesel lenf düğümleri; M=uzak metastaz). Uygulanan tedaviler çeşitlilik göstermekle birlikte TNM sisteminde beş evre bulunmaktadır (Hari vd. 2013; Özer 2021). Evre 0' da, kolon epitel hücrelerinde normal olmayan büyüme gözlenir, kolon mukozasında premalign doku bozulması veya kanser oluşumu meydana gelir. Anormal büyüme ile oluşan doku parçaları sınırlı bir çevre dokuyuda dahil ederek vücuttan çıkarılır. Veya organ bütünü ya da bir kısmı ile vücuttan uzaklaştırılabilir. Evre I ve II' de primer tümör kolon duvarı içerisinde yayılım gösterir. Bu evrede uygulanan klasik tedavi, kolon segmentinin organdan cerrahi olarak uzaklaştırılmasıdır. Evre III'te ise kanser, kolon duvarına geçerek komşu lenf düğümlerine veya dokularına yayılım sağlar. Bu evrede yaygın tedavi yöntemi olarak cerrahi olarak tümörün çıkarılması ve devamında kemoterapi uygulaması yer almaktadır. Son evrede ise, kanser lenf boğumlarına yayılım sağladığında ya da uzak organlarda metastaz oluştuğunda, etkilenen organların rezeksiyonu uygundur. Tedavi veya belirtilerin ilerlemesini önlemek için radyoterapi ve hedefe yönelik tedavi kullanılabilir. Cerrahi işlem öncesi veya sonrası ise kemoterapiden faydalanılabilir (Özer 2021). Kolon kanser hücrelerinde, Hanahan (2000)' in öne sürdüğü; sağlıklı hücrelerin kanserleşme sürecinde edildiği bir dizi kazanılmış özellikler gözlenir. Dolayısıyla kolon kanser hücrelerinde bir dizi gen mutasyonları ve epigenetik değişimler sonucu, sağlıklı hücrelerde korunan onkogen ve tümör baskılayıcı gen homeostazisi bozulur. Sonuç olarak hücre proliferasyonu gibi birçok yaşamsal faaliyeti denetleyen moleküler yollar denetlenemez ve düzenlenemez hale gelir (Özer 2021) (Çizelge 2.3)

Çizelge 2.3. Kolon kanseri ile ilişkili tümör baskılayıcı genler ve onkogenler (Munteanu vd. 2014; Özer 2021)

Gen Çeşidi	Görülme Sıklığı %	Hata Sebebi
APC	85	β -katenin onkoproteinine bağlı mutasyon. Mitoz bölünme esnasında iç mikrotübüllerinin düzenlenememesine sebep olur.
MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	12- 25	DNA eşlenmesi esnasında meydana gelen hataların onarılamaması sonucu görülen onkojenik ve tümör baskılayıcı genlerin miktarındaki değişim.
TP53	35- 55	Hücre döngüsünün kontrolünden sorumlu bir proteinin kodlanamaması. Önlenemeyen missense mutasyon hücrenin yaşamsal faaliyetlerinin durdurulmasına sebep olur.
TGFBR2	25- 40	Engellenemeyen büyüme ve apoptozdan sorumlu reseptörün TGFBR2 geninde meydana gelen mutasyon sonucu etkisini kaybetmesi.
KRAS	35- 45	Protein KRAS G' nin, ERK1/2 veya mTOR sinyal yollarının aktivasyonunu sağlaması sonucu apoptozun önlenmesi.
PTEN	10- 15	PI3K yolağını destekleyerek apoptozu engeller

Kolon kanseri tedavilerinde cerrahi yöntemde tümörün dokudan uzaklaştırılması sonucu malign kalıntıların dokuda varlığını sürdürmesi tümörün yok edilmesi ve hastalığın tamamen iyileştirilmesi açısından engel oluşturmaktadır (Stein vd. 2011). Radyoterapi tedavisinde kanser hücreleri özgün frekansta ve şiddette iyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakılır. Fakat kanser hücrelerine eşit derecede ulaşım sağlanamadığı gibi kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücreler de radyasyona maruz kaldığı için kolon kanserinde radyoterapi kullanım sıklığı azdır (Mayoclinic 2018).

2.2.2. Apoptoz

Apoptoz (a-po-toe-sis) terimi, hücrede meydana gelen ölümün morfolojik açıdan bir başka biçimini ifade etmek amacı ile ilk kez 1972'de Kerr' in kullanımı sonucunda literatürde yerini aldı. (Kerr vd. 1972; Elmore vd. 2007). Apoptoz, büyüme, fonksiyonel gelişim ve hücrelerin genç olma özelliğini yitirmesi ensasında dokulardaki hücre popülasyon dengesini korumak sebebi ile meydana gelen homeostatik bir mekanizmadır. Apoptoz yalnızca dokulardaki popülasyon dengesini koruma amacı ile değil yanı sıra bağışıklık reaksiyonlarında veya hücreler zarar gördüğü esnada da bir

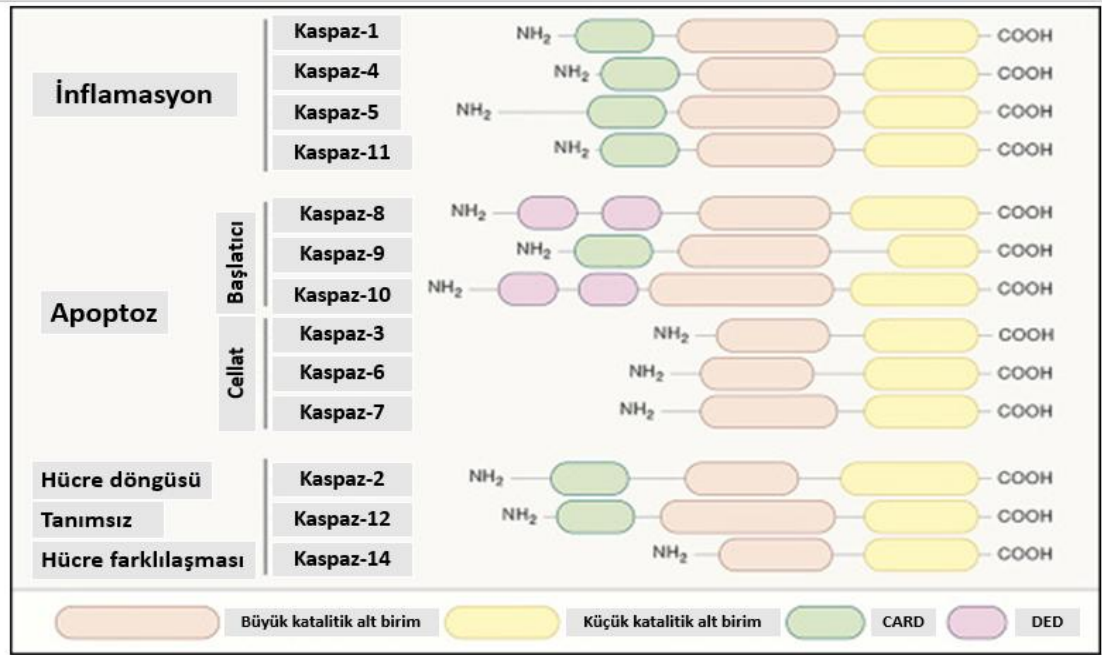
savunma mekanizması olarak sürece dahil olabilmektedir (Norbury vd. 2001; Elmore 2007).

Patolojik ve fizyolojik olarak birçok uyarın apoptoz mekanizmasının meydana geliş sürecini destekler. Tüm hücreler aynı uyarana yanıt olarak aynı cevabı vermeyebilir ve hatta bu cevap ölüm ile sonuçlanmayabilir. Hücrelerin apoptotik süreçte aynı uyarana maruz kalmalarına rağmen farklı cevaplar oluşturulmasına örnekler mevcuttur. Örneğin kanser kemoterapi tedavisi amacı ile tercih edilen ilaçlar, birtakım hücre tiplerinde DNA hasarına sebebiyet verir dolayısıyla p53'e aracılığıyla apoptotik ölüme neden olabilir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, birtakım hücre tiplerinde (örneğin timositler) apoptotik ölüme sebep olurken, bazı hücre tiplerinde süreci etkilemeyebilir (Elmore 2007).

Apoptoz mekanizmaları, enerjiye bağlı moleküler olaylar zincirini içeren karmaşık ve sistematik olarak ilerleyen bir süreçtir. Elde edilen literatür sonuçlarına göre; iki temel apoptotik yol saptanmıştır: dışsal- ölüm reseptör yolu ve içsel-mitokondriyal yol. Fakat hücrenin ölüm yolları arasında, perforin-granzim bağımlı üçüncü bir yolu daha mevcuttur. Bu yolak, granzim B veya granzim A yoluyla apoptozu başlatabilir. Bu üç yol kaspaz-3'ün aktifleşmesi ve DNA fragmentasyonu, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin dejenarasyonu, proteinlerin çapraz bağ oluşturması, apoptotik cisimlerin meydana gelmesi, fagositik hücre reseptörleri için ligandların eksprese edilmesi ve nihayet fagositik hücreler tarafından alımı ile sonuçlanır (Martinvalet vd. 2005).

Kaspazlar “Caspase; Cysteine Aspartyl-specific Protease” sistein proteazlardır. Kaspazlar, birçok hücre tipinde inaktif bir proenzim formunda ifade edilir ve bir kez aktive edildiklerinde, sıklıkla diğer prokaspazları aktive ederek, proteaz kaskadının başlatılmasına neden olur. Kaspazların birbirini aktive ettiği bu proteolitik kaskad, apoptotik sinyallerin güçlendirilmesine sebep olur. Kaspazların aktive kazanması için gerekli substrat örnekleri arasında; hücre döngüsü kontrolünde yer alan proteinler, hücre iskeletini meydana getiren protein çeşitleri, sitokin öncülleri, sinyal iletiminde yer alan proteinler, DNA metabolizmasında görevli proteinler, RNA metabolizmasına rol oynayan proteinler ve transkripsiyon faktörleridir (Wong 2011; Tektemur 2020).

Kaspaz ailesinin üyeleri, açıklanan fonksiyonlara ve alan yapılarına göre enflamatuar veya apoptotik olarak sınıflandırılır. Kaspazlar-1, -4, -5 ve -11, enflamatuar kaspazlar olarak gruplandırılır ve N-terminal ucunda bir CARD (kaspaz alım alanı) alanı içerir. Apoptotik kaspazlar ise kendi içerisinde başlatıcı ve yürütücü kaspazlar olarak alt kategorilere ayrılabilir. Kaspaz -8, -9 ve -10, işlevleri apoptozu başlatmaktır. Cellat kaspazları ise -3, -6 ve -7 olarak belirtilmiştir (Şekil 2.5) (Opdenbosch vd. 2019).



Şekil 2.5. Kaspazların yapısı ve sınıflandırılması (Opdenbosch vd. 2019' dan uyarlanmıştır).

Apoptozu başlatan dışsal sinyal yolları, transmembran reseptör aracılı etkileşimler sayesinde aktiflenir (Locksley vd. 2001; Elmore 2007). TNF reseptör ailesinin üyeleri "ölüm alanı" denilen ortalama 80 amino asitlik bir sitoplazmik alana konumlanmıştır (Ashkenazi vd. 1998).

Dışsal yolağın gerçekleşmesinde görev alan bu reseptörlerin kümelenmesi ve homolog trimerik ligand ile bağlanmaları mümkündür. Fas liganının Fas reseptörüne bağlanması ile bu reseptör Fas ilişkili ölüm domainine (FADD) bağlanır. TNF liganının TNF reseptörüne bağlanması ise FADD ve reseptör interaktif protein (RIP) birimleri ile adaptör TNFR-1 ilişkili ölüm domaini (TRADD) proteininin bir araya gelmesine sebep olur. FADD daha sonra prokaspaz-8' e bağlanır. Sonuç olarak, prokaspaz-8'in aktivasyon kazanması ile ölüm indükleyici bir sinyal kompleksi (DISC) meydana getirir (Kischkel vd. 1995).

Kaspaz-8 etkinleştirildiğinde, apoptozun uygulama fazı tetiklenir. Başlatıcı kaspaz-8 aşağı akışı veya efektör kaspazları parçalayarak apoptozu başlatır (Şekil 2.6.) (Wong 2011). Kaspaz-8, direkt prokaspaz-3'ü aktive edecek ya da sitozol içinde proapoptotik protein olan Bid'i keserek tBid' i aktive edecektir. Aktifleşen tBid, sitokrom-c ve AIF'nin (apoptoz indükleyici faktör) mitokondriden salınması ile apoptozu tetikleyecektir (Fan vd. 2003; Wong 2011).

Tüm bu uyarılar sırasıyla mitokondriyal zar ve matrikste yer alan BAK/ BAX gibi pro-apoptotik proteinlerin konformasyonel değişimlerine neden olur. Bu değişiklikler, mitokondriyal transmembran potansiyelinin korunamaması, pro-apoptotik proteinlerin zarlar arası boşluktan salınması gibi sonuçlara yol açar (Saelens vd. 2004). Pro-apoptotik proteinler; sitokrom c, Smac (kaspaz aktivatörü)/DIABLO (IAP Bağlayıcı protein) ve serin proteaz HtrA2/Omi' dir (Du vd. 2000; van Loo vd. 2002; Garrido vd

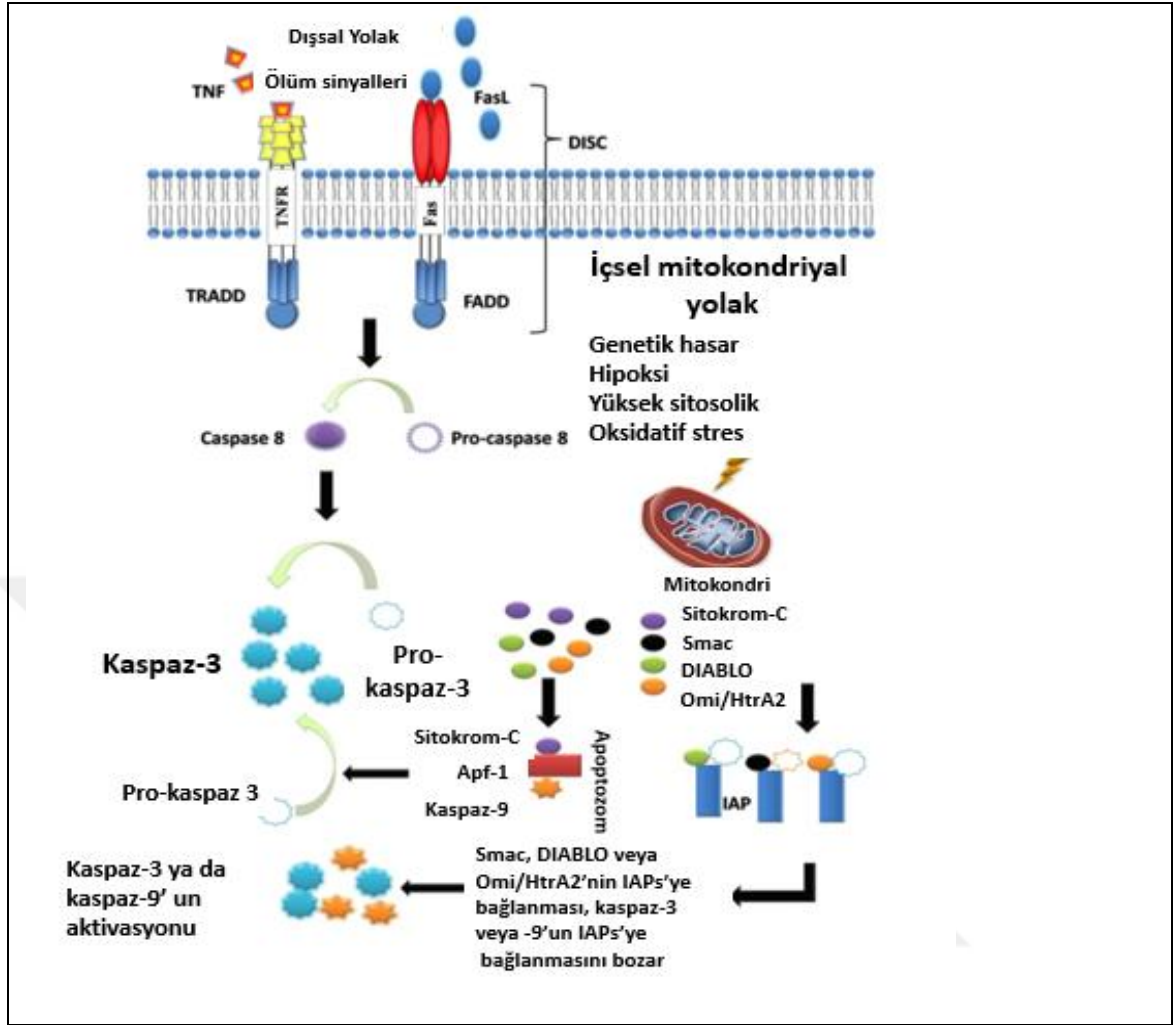
2006). Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolu aktive etmede görev alır. Ayrıca Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi'nin IAP (apoptoz proteinlerinin inhibitörleri) aktivitesini durdurarak apoptozu destekler (Van Loo vd. 2002; Schimmer 2004; Elmore 2007). Sitokrom c, Apaf-1'i ve procaspaz-9'u bağlar aktive ederek "apoptozom" yapısını meydana getirir (Chinnaiyan 1999; Hill vd. 2004; Elmore 2007). Procaspaz-9'un apoptozom oluşumuna katılması ile kaspaz-9 aktivasyonu gerçekleşir (Elmore 2007).

Apoptoz sırasında mitokondriden AIF (apoptoz indükleyici faktör), endonükleaz G ve CAD (Kaspazla aktive edilen deoksiribonükleaz) salınır. AIF çekirdeğe doğru yol alır ve DNA'nın ~50-300 kb parçalara bölünmesine ve periferik nükleer kromatinin yoğunlaşmasına sebep olur (Joza vd. 2001). Nükleer yoğunlaşmanın bu erken biçimine "evre I" yoğunlaşma adı verilir (Susin vd. 2000). Endonükleaz G ayrıca, oligonükleozomal DNA fragmanları üretmek için nükleer kromatini parçaladığı çekirdeğe yönelir (Li vd. 2001). AIF ve endonükleaz G ve CAD kaspazdan bağımsız bir şekilde görev alır. CAD daha sonra mitokondriden salınır ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına böylelikle daha belirgin ve gelişmiş bir kromatin yoğunlaşmasına neden olur (Sakahira vd. 1998). Belirli bir zaman sonra gerçekleşen ve daha çok farkedilen kromatin yoğunlaşmasının sağlandığı evre; "evre II" yoğunlaşma olarak adlandırılır (Susin vd. 2000; Elmore 2007).

Mitokondri üzerinden gerçekleşen apoptotik süreçlerin takibi Bcl-2 protein ailesi ile sağlanır (Cory vd. 2002). Tümör baskılayıcı protein p53, Bcl-2 protein ailesinin düzenlenmesinde kritik bir öneme sahiptir (Schuler vd. 2001). Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal membran geçirgenliğini yönetir ve pro-apoptotik veya anti-apoptotik gruplar barındırır. Apoptozun devreye girip girmeyeceğini belirleyen kriter mutlak miktarları değil, pro- ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengedir (Wong 2011). Literatür taramaları sonucu görülmektedir ki, Bcl-2 ailesinde toplam 25 tanımlanmış gen mevcuttur. Anti-apoptotik proteinlerin bazıları Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG'yi ve proapoptotik proteinlerin bazıları Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad'i içerir. Bcl-2 protein ailesinin temel etki mekanizması, mitokondriyal membran geçirgenliğinin değişimi sebebi ile mitokondriden sitokrom c salınımını denetlemektir (Elmore 2007).

Kaspaz-3, cellat kaspazdır. Başlatıcı kaspazlardan (kaspaz-8, kaspaz-9 veya kaspaz-10 veya Granzim B) herhangi biri tarafından aktif hale getirilir. Kaspaz-3, endonükleaz CAD' yi spesifik olarak aktive eder. CAD magnezyum bağımlı bir endonükleazdır. Aktif kaspaz-3, CAD' yi serbest hale getirebilmek adına ICAD'yi parçalar (Sakahira vd. 1998). CAD daha sonra çekirdek içindeki kromozomal DNA'yı keser ve bu süreç kromatin yoğunlaşmasıyla sonuçlanır.

Apoptozun son evresi, apoptotik hücrenin fagositoz yolu ile alınmasıdır. Simetrik olmayan fosfolipid ve fosfatidilserinin apoptotik hücrelerin ve bunların parçalarının yüzeyinde dışa dönmesi bu faza ait spesifik bir özelliktir (Elmore 2007). Apoptotik hücrelerin dış yüzeyinde fosfatidilserinin görünümü inflamatuvar olmayan fagositik tanımayı sağlar ve erken alım ve atılmalarını kolaylaştırır (Fadok vd. 2001). Hücresel bileşenlerin sitozole salınımı gerçekleşmeden bu erken alım süreci, hiçbir inflamatuvar yanıtın oluşmasına sebep olmaz.



Şekil 2.6. Apoptozun içsel ve dışsal yolu (Wong 2011' den uyarlanmıştır)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları

HT-29 (ATCC® HTB-38™, insan kolorektal kanseri hücre hattı) ve HUVEC (ATCC® CRL-1730™, insan göbek kordonu veni endotel hücre hattı) hücreleri Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Kanser Moleküler Biyolojisi laboratuvarından temin edildi. HT-29 hücreleri için %10 Fetal Bowin Serum (FBS), %1' lik esansiyel olmayan aminoasit, sodyum pirüvat, antibiyotik ve yüksek glikoz içeren DMEM besiyerinde çoğaltıldı. HUVEC hücreleri ise %10 Fetal Bowin Serum (FBS), %1' lik esansiyel olmayan aminoasit, sodyum pirüvat ve antibiyotik içeren RPMI 1640 besiyerinde uygun hücre kültürü koşullarında çoğaltıldı. Bütün hücreler %5 CO₂ ' li atmosferde 37° C' de inkübe edilerek ATCC (American Type Culture Collection)' nin tavsiye ettiği şekilde %0.25 tripsin; % 0.03 EDTA karışımı ya da hücre kazıyıcılar ile kaldırılıp 1:2 ya da 1:3 oranında olacak şekilde pasajlandı, kullanılmayan hücreler ise %95 besiyeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan solüsyon içerisinde -80° C' de derin dondurucuda saklandı.

3.2. Azot katkılı grafenin ve pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatinin hücrelere uygulanması

Çalışmada, Akdeniz Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonu Birimi tarafından desteklenen FBA- 2017-2205 kodlu “Grafen Tabanlı Elektrokatalizörlerin Üretilmesi” başlıklı proje sonucu üretilen azot katkılı grafen (N-GN) kullanılmıştır. HT-29 ve HUVEC hücreleri stoktan açılarak küçük petri kaplarına ekildi. Petri başına ortalama yoğunluk %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri için ekildi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda besi yerleri uzaklaştırıldı. 10mg azot katkılı grafen 10ml PBS (fosfat tamponu (pH:6.2) ile çözdürüldü. Hazırlanan karışım ultrasonik banyoda (marka: Blabmarket) 30dk tutularak çözünmesi sağlandı ardından 0.22 µm şırınga filtreden geçirilerek steril edildi. Hazırlanan ana stok %1 FBS' li besiyer ile 250, 200, 150, 100, 50, 25 ve 5 mg/mL olacak şekilde seyreltildi. Azot katkılı grafenin kuyucuklara eş zamanlı olarak uygulanmasının ardından tek sıra kuyucuktaki hücre canlılığı WST ile saptandı ve başlangıç zamanı (T0) olarak kaydedildi. Cisplatin için 1mg/mL olacak şekilde hazırlanan ana stok %1 FBS' li besiyer ile 250, 200, 150, 100, 50, 25 ve 5 mg/mL olacak şekilde seyreltildi. Cisplatinin kuyucuklara eş zamanlı olarak uygulanmasının ardından tek sıra kuyucuktaki hücre canlılığı WST ile saptandı ve başlangıç zamanı (T0) olarak kaydedildi.

3.3. Sitotoksikite Testleri

Azot katkılı grafenin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri aşağıdaki testler ile değerlendirildi.

3.3.1. WST-1 Hücre Proliferasyon Kiti

Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan azot katkılı grafen her kuyucuğa 100 µg/ml olacak şekilde eklendi ve hücreler 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri

boyunca %5 CO₂ 'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübe edildi. Her inkübasyon süresi sonunda, kit protokolünde belirtildiği üzere kuyucuklardaki besi yerleri çekilmeden üzerlerine 10 µg/ml WST-1 (Roche Katalog No:11 644 807 001) solüsyonu eklendi, ortalama 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sona ermesinin ardından plakların absorbans değerleri Elisa kit okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan Go), 450 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi.

3.3.2. Tripan mavisi testi

Tripan mavisi (0.4 % ; Hanks tuz-fosfat tamponu) testi canlı ve ölü hücrelerin mikroskop altında tespit edilerek sayılması esasına dayanır. Ölü hücreler hücre zarı bütünlüğünü kaybettiği için mavi renkli boyayı içine alarak mikroskop altında mavi olarak görülür. Canlı hücre zarı ise seçici geçirgenliği koruyarak boya girişine izin vermez ve mikroskopta şeffaf renkte gözlenir. Bu sayede WST sitotoksosite testi sonuçlarının doğruluğu test edilir. Hücre canlılığı aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı / ml} = (\text{Toplam Hücre Sayısı / n}) \times \text{Sulandırma Faktörü} \times 10$$

(n: Hemositometrede yer alan karelerden sayılan kare sayısını göstermektedir)

$$\% \text{ Canlı Hücre} = \left(\frac{\text{Canlı hücre sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \right) \times 100$$

HT- 29 hücreleri 1x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara bölündü. Yirmi dört saatlik inkübasyon süresi sonrasında besiyerler uzaklaştırıldı. %1'lik besiyeri ile hazırlanmış IC₅₀ (93.4 mg/ml) dozu ekstraktlara iki tekrarlı olacak şekilde uygulandı. Kontrol grubu yalnızca %1'lik FBS içeren besiyer ile hazırlandı. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklardan toplanan besiyerleri 3000 rpm'de 3 dakika olacak şekilde santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından kuyucuklara 500 µl tripsin eklendi ve plaklardan toplanan hücreler santrifüj sonucunda elde edilen çökeltinin üzerine eklendi. Elde edilen karışım 3000 rpm'de 5 dakika daha santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüp içerisine 500 µl besiyer ve 500 µl tripan mavisi eklendikten sonra pellet çözdürüldü. Hazırlanan örnek buz içerisine alınıp 100 µl PBS (fosfat tamponlu salin) ve 100 µl örnek olacak şekilde sulandırıldı ve mikroskop altında hemositometre ile canlı ve ölü hücreler sayıldı.

3.4. Apoptoz testleri

3.4.1. Kaspaz- 3 enzim miktarının araştırılması

HT- 29 hücreleri 3×10^6 / mL olacak şekilde küçük petri kaplarına bölünerek 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Petri kaplarına inkübasyon süresi boyunca yapışan hücrelerin besiyerleri çekildi ve %1'lik FBS içeren besiyer ile hazırlanan IC₅₀ dozu (93.4 mg/ml) uygulandı. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda petride kalan hücreler fosfat tamponu uygulanarak kazıyıcı yardımı ile kaldırıldı ve süpernatantlar ile birlikte toplandı. 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 1mL kaspaz hücre parçalama tamponu (1X) eklendi. Hücreleri parçalamak için dondurup-çözme tekniği kullanıldı. Ard arda 5 kez -80' de dondurulup ardından oda sıcaklığına maruz bırakılan hücreler ekstre edildi. 2000 rpm'de 20 dakika yeniden santrifüjlenen örneğin süpernatantı buz içerisinde bekletilen ependorf tüplere aktarıldı. Kolorimetrik eliza kit protokolü (Kat no: EH0546) izlenerek örnekte yer alan kaspaz- 3 miktarı tespit edildi;

Deney öncesi aşamada numunelerimizin protein konsantrasyonunu optimize etmek amacı ile PBS ve seyreltme solüsyonu kullanılarak deneme çalışmaları yapıldı. Numune seyreltme tamponu ile ½ oranında seyreltilti. Deneyden 1 saat önce; 0,1 ml/kuyu × kuyu miktarı olacak şekilde çalışma solüsyonunun gerekli toplam hacmini hesaplandı. Biotin saptama antikorunu Antikor Seyreltme Tamponu ile 1:100'de seyreltin ve iyice karıştırın. Deneyden 30 dakika önce HRP-Streptavidin konjugatının (SABC) çalışma solüsyonunun hazırlandı. Çalışma solüsyonunun gerekli toplam hacmini hesaplandı: (0,1 ml/kuyu × kuyu miktarı. 01. -0.2 ml fazla hazırlanabilir). SABC'yi SABC Seyreltme Tamponu ile 1:100' de seyreltilti ve karıştırma işlemi ile homojenize hale getirildi.

Plate açıldıktan sonra kullanım süresine kadar kuru tutulmasına dikkat edildi. Kitleri kullanmadan önce tüm tüpleri ters çevrilerek içerisindeki bileşenlerin homojenize olmasını sağlandı. Bu süreçte TMB reaktifleri ışıktan saklanır. Yıkama işlemi bu kitin en hassas noktasıdır oldukça dikkatli olunmalı ki yanlış okuma alınmasın. Numune ve standartlar için en az iki kuyucuk tercih edilir. Deney öncesinde mikropilaka okuyucu, 37 °C' de inkübatör, tek kullanımlık pipet uçları, 15- 50'lik falkonlar ve ependorflar, deiyonize su hazırlanır. Solüsyonlar 20 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Yıkama solüsyonu optimize edilerek (2ml solüsyon 5 + 48 ml dH₂O) hazırlandı. Plakalarda bulunan solüsyonu kuyucukların kenarlarına değdirmenle çekilip atıldı. 300 ml ile iki kez 1 dk bekeleyerek kuyucuklar yıkandı. Numunemizdeki protein konsantrasyonu baz alınarak, seyreltilmiş hedef protein konsantrasyonunun kitin optimum tespit aralığına düşmesi sağlanır. Bu seyreltme ile mümkündür. Dolayısıyla deney önce hazırlık aşamasında seyreltme çalışmaları optimize edildiği içinbu değerler baz alınmıştır. Çalışmamızda standart 20, 10, 5, 2.5, ve 1 mg/ml olacak şekilde sulandırıldı. Seyreltilen örnekler kuyucuklara 100 µl olacak şekilde eklendi. Plakanın üzeri kapatıldı ve 37 °C' de 90 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plate içeriği uzaklaştırıldı ve iki kez 1 dk aralıkla yıkandı. Bu esnada platelerinin tamamen kurumamasına dikkat edilmeli. 2475 µl Antibody dilution buffer ' ın üstüne Biotin Anti Human Cas3 Antibody ' den 25 µl eklendi (sulandırma faktörü: 100) ve kuyucuklara 100 µl olacak şekilde eklendi. Platenin üzeri kapatıldı ve 37 °C' de 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda plate içeriği uzaklaştırıldı ve yıkama tamponu ile 1 dk bekletilerek 3 kez yıkandı. Ardından kuyucuklara SABC working solüsyonundan 100 µl ekleyip 37 °C' de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonucu yine içerik uzaklaştırıldıktan sonra 1 dk bekleterek 5 kez yıkama yapıldı. Devamında kuyucuklara 90 µl TMB

substratı eklendi ve üzeri kapatılarak karanlıkta 37 °C’ de 30 dk bekletildi. Burada renk değişimi gözlenir ve bu değişim takip edilerek 30 dakikayı aşmadan bekleme süresi tamamlanır. Son olarak 50 µl stop solüsyonu eklendi, renk sarıya döndükten sonra stop solüsyonu, TMB substratının eklendiği sırayla kuyucuklara eklendi ve 450 nm okuma alındı.

3.4.2.DNA fragmentasyonu

1. Hücrelerin toplu olarak Brd-u ile etiketlenmesi

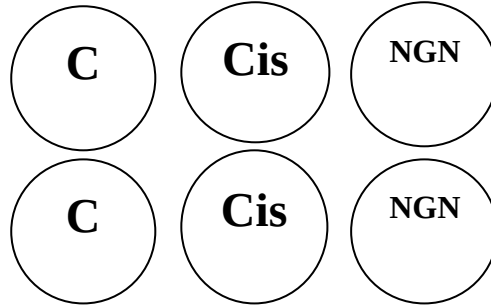
HT- 29 hücreleri 1×10^5 c/mL olacak şekilde küçük petri kaplarında 24 saatlik bir inkübasyona bırakıldı. %80- 90 oranında doluluğa ulaşmış petriler 2ml tripsin ile kaldırıldı. 10.000 rpm 3dk santrifüjlendi. Solüsyon 7 (Brd-u etiketleme kiti) son konsantrasyon 10 µM olacak şekilde ayarlandı. 4×10^5 c/mL hücre olacak şekilde hazırlandı ve üzerine 100 µl Brd- u kiti eklendi. Tekrar petriye ekildi. İn vitroda çoğalan hücreler non radyoaktif Brd-u ile 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra sonra kazıyıcı ile toplandı ardından 300 g’ de 8 dk santrifüj edildi. Kültür medyumunu uzaklaştırıldı böylece bağlanmamış Brd-u’ larda atıldı. Kalan işaretli hücreler besiyer ile çözülür ve küçük petriye 1 ml ‘de 100.000 c/mL olacak şekilde bölünür. Deney iki tekrarlı olacak biçimde hazırlandı.

2. Hücre ölümü karakterizasyonu

Bu bölüm iki aşamadan oluşmaktadır;

Bölüm 1: Erken nekroz durumlarında ve apoptozun geç aşamalarında DNA fragmanları içerecek olan süpernatant analiz edilir.

Bölüm 2: Kalan hücreler, sitoplazmada bulunan apoptotik DNA parçalarını serbest bırakmak için parçalanır.



Kültür ortamındaki Brd-u işaretli hücrelerin 100 ul'si pipetlenir ve 6 kuyucuklu plaklara 1mL’ de 100.000 c/w olacak şekilde hücreler iki tekrarlı olarak bölündü. Kuyu başına uygun miktarda apoptozu indükleyen reaktif içeren 100 ul hücre kültürü ortamı eklendi. +37°C'de 6 saat boyunca inkübe edildi. Kazıyıcı ile kaldırıldı ve 250 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Üzerine hücreleri liziz etmek amacı ile 2ml solüsyon 5 eklendi (solüsyon 5, yarı yarıya deiyonize su ile sulandırılarak hazırlandı.) Oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. 10 dk 250 g’de santrifüjlendi. Elisa prosedürü için 100 ul örnek transfer edilecek.

3. Kaplama

Bu adımda mikropalakalar anti- DNA ile kaplanır. 96 kuyucuklu plaklar kullanacağımız kuyucuk başına 100 µl solüsyon 3 ile kaplanır. 24 saat, +2- 8' de inkübe edilir ki anti- DNA antikoru kuyucuklara kaplansın. Kit gereği (Katalog No: 11 585 045 001) 24 saat alüminyum folyo ile sarılmış biçimde bekler.

4.Engelleme

Ertesi gün kuyucuklara; 200 µl, 1x' lik solüsyon 5, brd-u ile işaretlenmiş 1×10^5 hücre kuyucuk başına 5×10^5 c/w hesaplanarak ve IC₅₀ dozundaki NGN/ Cisplatin ile birlikte eklendi ve alüminyum folyo ile kaplandıktan sonra oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Ardından solüsyon çekildi. Yıkama işlemi 3 dk bekletilecek şekilde 300 µl solüsyon 4 ile, 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Böylece antijeni ile bağlanmayan anti-DNA antikoru uzaklaştırıldı. Yıkama solüsyonu aspire edildikten sonra elisa prosedürü uygulandı.

5.Apoptoz tayin –ELİSA

Kompatent örnekler platelere uygulandıktan sonra 6 saat beklenir ve plate kültür mediumu ile kazınır. 9 dk 300 g'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellete 200 µl 1x inkübasyon solüsyonu eklendi ve 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 9 dk 300 g'de tekrar santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant (kompatent örnek) 100 µl kuyucuklara eklenip ve alüminyum folyo ile kaplandıktan sonra oda sıcaklığında 90 dk bekletildi. Ardından örnekler uzaklaştırıldıktan sonra 2 dk bekletilecek şekilde 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Son yıkamada solüsyon çekilmez ve 500 µl buffer solüsyonu eklenerek mikrodalga 5 dk çalıştırıldı (Mikrodalga ışıması ile DNA'yı sabitlemek ve denatüre etmek için). Süre sonunda sıvı uzaklaştırıldı 100 µl solüsyon 6 eklendi. Alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra 90 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 2 dk bekletilecek şekilde 300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Böylece sağlam hücrede brd-u işaretli DNA zaten ışıma veremez ama NGN/Cisplatin hücremde apoptotik etki yarattıysa işaretli DNA fragmenti kuyucuğa kaplanan anti- dna antikoru bağlanır ve ışıma verir. Sıvıyı uzaklandırdıktan sonra karanlıkta 100 µl substrat solüsyonu eklendi. Yine karanlıkta çalkalayıcıda homojenize edildi. Renk değişiminden sonra 25 µl stop solüsyonu eklendi ve 1 dk daha çalkalayıp, 450 nm okuma alındı.

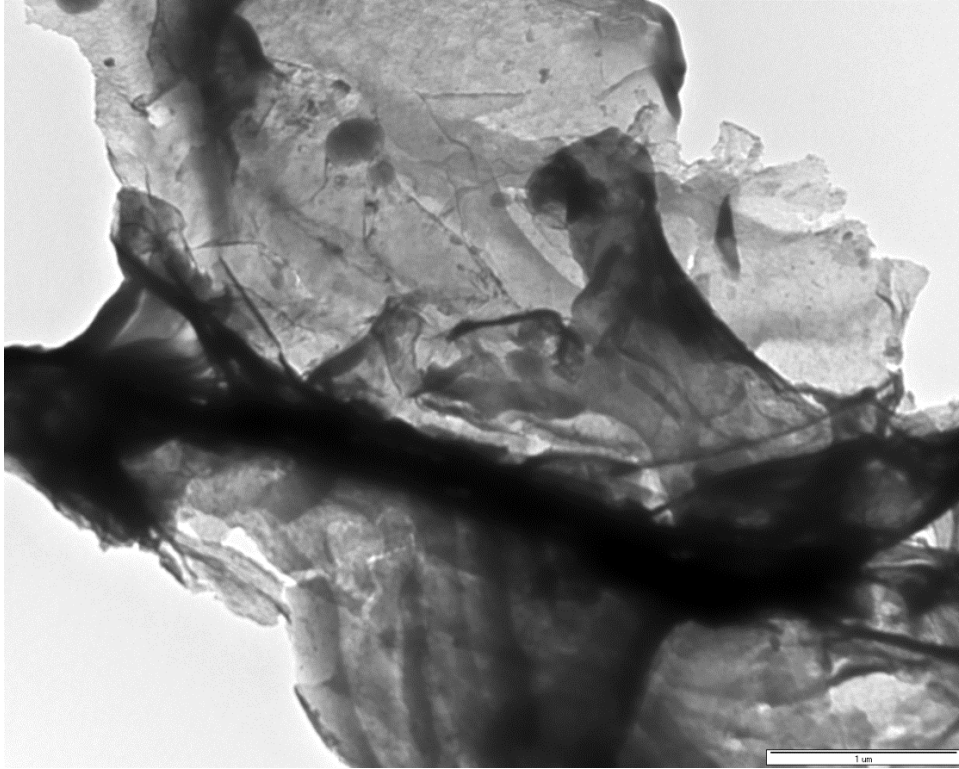
3.5. İstatistiksel analiz

Deneylerden elde edilen bulgular Graph-pad InStat istatistik programında Tek Yönlü Anova ve ardından Dunnet çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirilmiştir. NGN' nin IC₅₀ değeri Sigma Plot 10.0 istatistik programı kullanılarak belirlendi. Tüm veriler Sigma Plot 10.0 programı aracılığıyla grafikler haline getirildi.

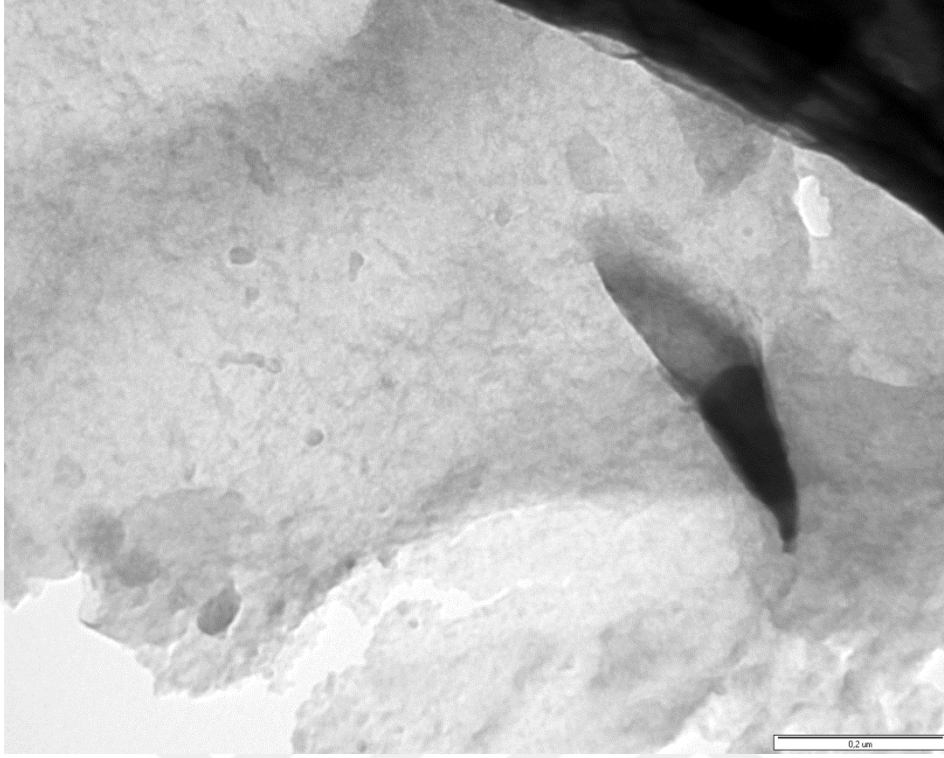
4. BULGULAR

4.1. Azot Katkılı Grafenin Sentezlenmesi

Numuneler, maksimum hacmi 100 ml olan teflon astarlı bir otoklav (Berghof, Almanya) kullanılarak solvotermal yöntemle sentezlendi. Tipik olarak, 1:1 M oranında Na (12 g) ve DMF (40 ml) öncüleri, Ar dolu Eldiven Kutusunda (MBRAUN, Almanya) kapalı bir reaktör kabına konuldu ve reaktörde 72 saat 190°C'de ısıtıldı. . Daha sonra elde edilen katı, koyu sarı solvotermal ürün, viskoz bir bulamaç oluşturmak üzere 3 M HCl ile nötralize edildi ve daha sonra ürünü kurutmak için bir sıcak plaka üzerinde 100°C' de 48 saat ısıtıldı. Son olarak, öğütülmüş katı, 30 dakika boyunca Argon akışında (0.1 L dak.1) 10 C.dk.1' lik bir ısıtma hızıyla 750 °C' de pirolize edildi. Ürün birkaç kez ultra saf su ile yıkandı, 85°C'de vakum fırınında kurutuldu ve N-GN olarak gösterildi. N-GN' nin katman sayısı, gözenek yapısı ve grafene ait karakteristik buruşuk yapısının belirlenebilmesi için ZEISS LEO 906E (120 kV) marka Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile görüntüleri alınmıştır N-GN için farklı büyütmelerden alınmış TEM görüntüleri Şekil 4.1 ve 4.2'de verilmiştir.

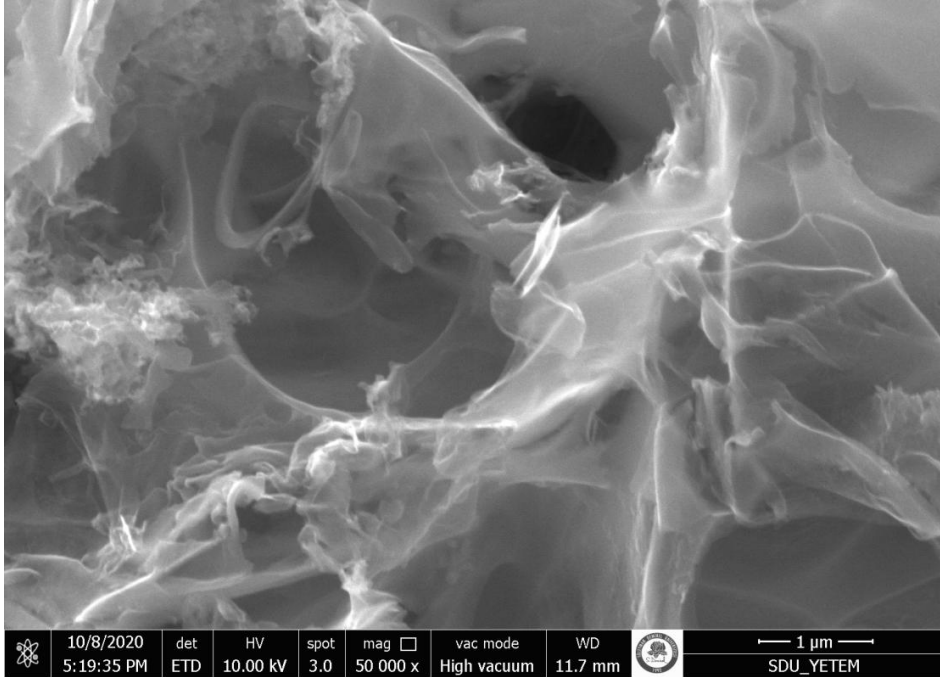


Şekil 4.1. N-GN 'nin x20000 büyütülerek elde edilmiş TEM görüntüsü

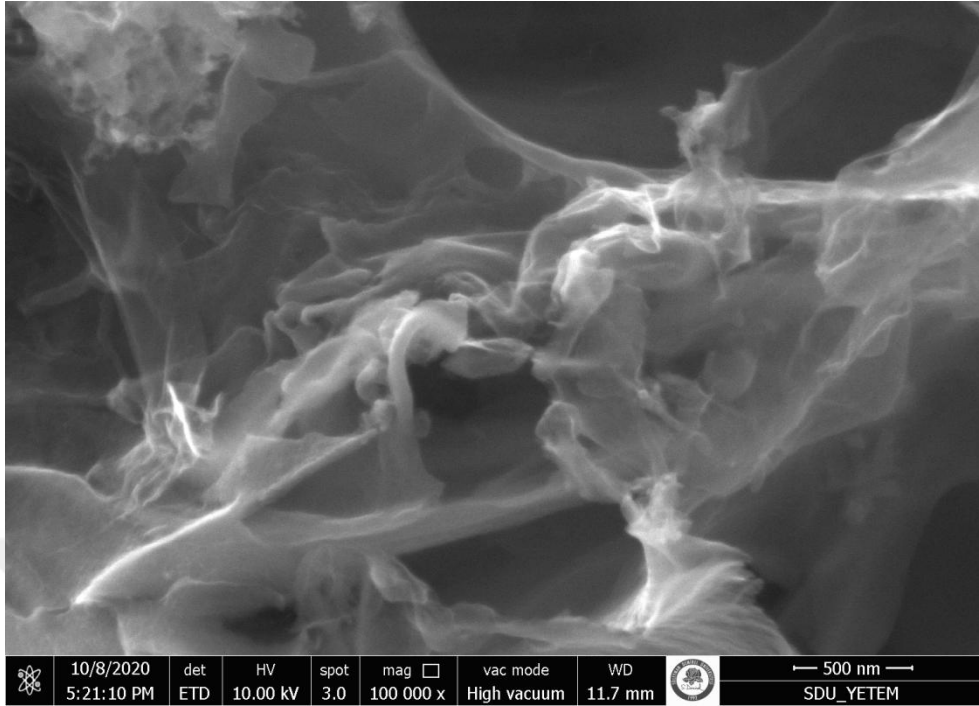


Şekil 4.2. N-GN 'nin x100000 büyütülerek elde edilmiş TEM görüntüsü

TEM görüntülerinden N-GN' nin kalınlığı düşük ve ağısı yapıda 2-4 tabaka ile tek tabakalı grafen yapılarının bir arada olduğu gözlenmiştir. N-GN' nin morfolojik yapısının daha detaylı görüntüsü taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinden elde edilebilir. N-GN' nin FEI QUANTA FEG 250 (10 kV) marka cihaz ile elde edilmiş SEM görüntüleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilmiştir.

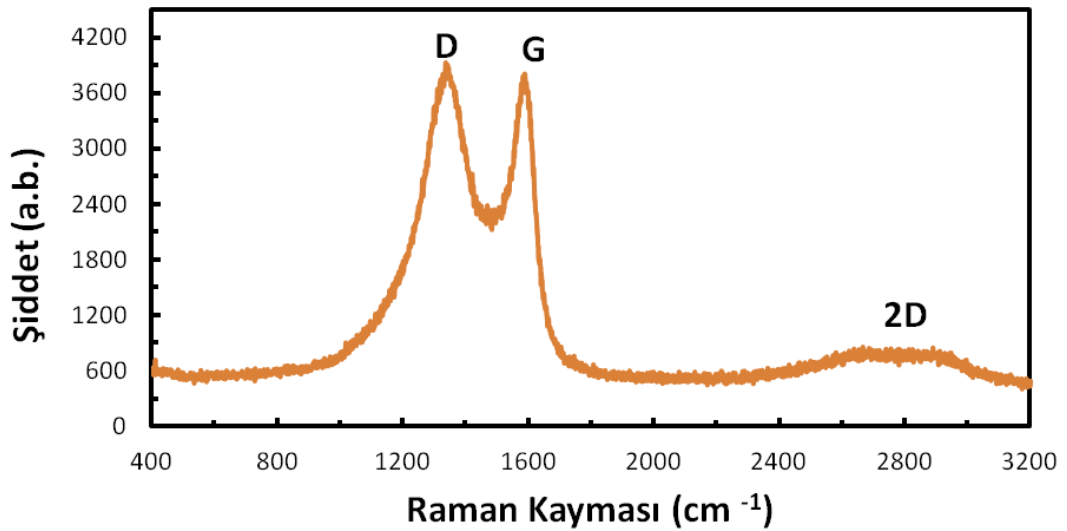


Şekil 4.3. N-GN'nin x50000 büyütülerek elde edilmiş SEM görüntüsü



Şekil 4.4. N-GN' nin x100000 büyütülerek elde edilmiş SEM görüntüsü

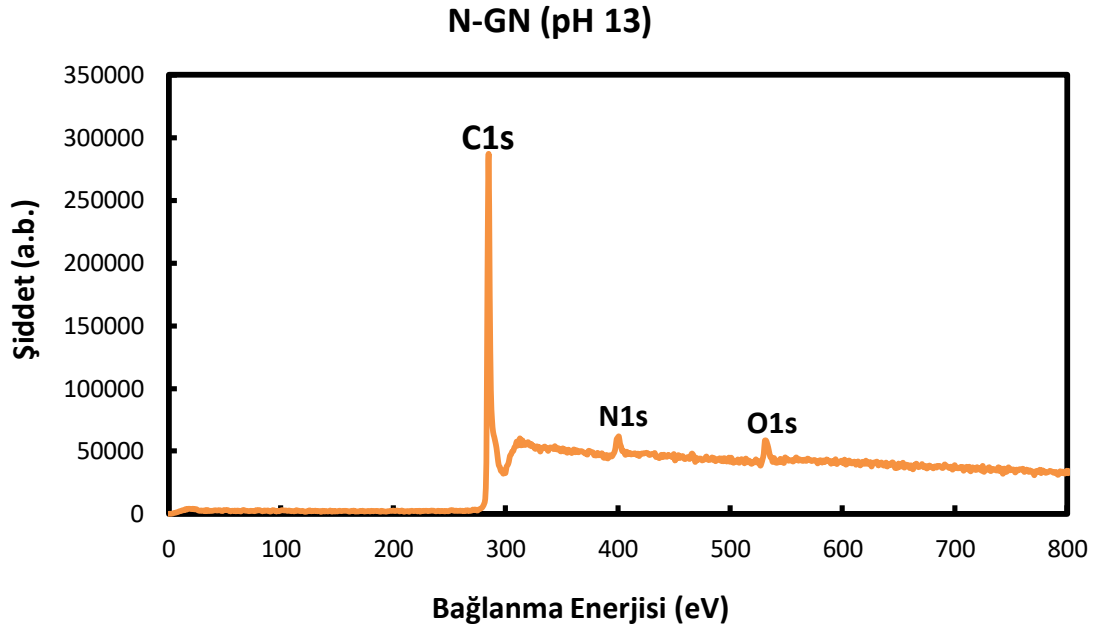
N-GN' ye ait SEM görüntülerinden grafene özgü düşük tabaka sayılı buruşuk ipek yapısı açıkça görülmektedir. Ayrıca, N-GN' nin makro ve mezo gözenekli yapıda olduğu görülmüştür. Şekil 4.5, toz formunda N-GN' nin Renishaw in-via Raman mikroskobu ile, 514 nm Ar-iyon lazeri altında uyarılmasıyla elde edilmiş Raman Spektrumunu göstermektedir.



Şekil 4.5. N-GN Raman spektrumu,

Burada, 1582 cm^{-1} de gölenen G bandı, N-GN için düzlemsel sp^2 hibritleşmiş karbon atomlarından kaynaklanmaktadır ve SEM ile TEM görüntülerinde belirlenen yapının kimyasal olarak grafen olduğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca $2000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ aralığında beliren band 2D bandı olarak bilinir ve N-GN'nin düşük tabaka sayısına sahip grafen olduğunu göstermektedir. Yaklaşık olarak 1360 cm^{-1} de görülen D bandı ise sp^3 karbonlardan kaynaklanır ve N-GN' de grafen plakalarına bağlı fonksiyonel grupların bulunduğunu göstermektedir. Şekil 4.6' da N-GN' nin elementel bileşimi ve bu elementlerin bulunduğu muhtemel fonksiyonel grup türü hakkında bilgi veren X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) spektrumu verilmiştir. Burada, N-GN' nin yapısında sadece C, N, ve O elementlerinin bulunduğu görülmektedir. Spektrumdaki piklerin altında kalan alanların oranından N-GN' nin %93 C, %4 N ve %3 O içerdiği hesaplanmıştır.

N-GN' nin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu için yapılan yukarıdaki tartışma sonucu N-GN' nin azot katkılanmış, düşük tabaka sayılı grafen olduğu sonucuna varılmıştır.



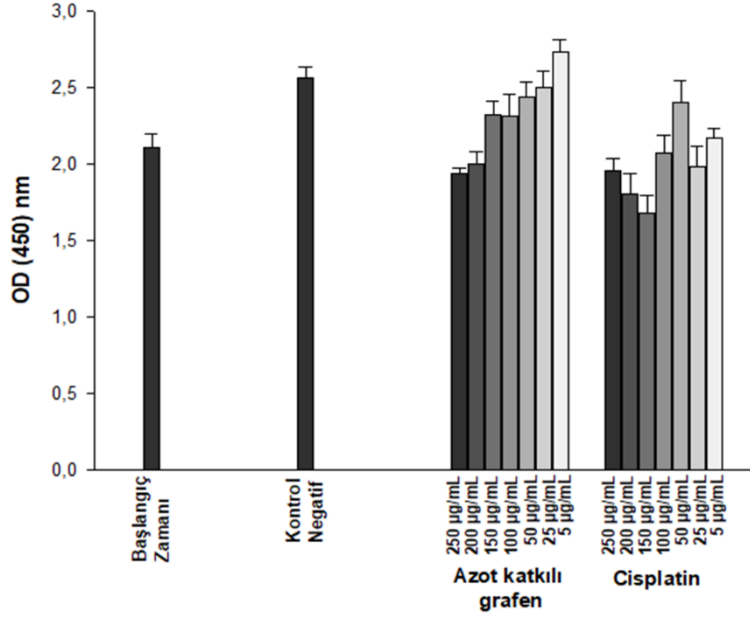
Şekil 4.6. N-GN' nin XPS spektrumu. Ölçümler Thermo Fisher K-Alpha marka XPS cihazında elde edilmiştir.

4.2. Azot Katkılı Grafenin HT-29 ve HUVEC Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler

Azot katkılı grafenin HT-29 ve HUVEC hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde; 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 mg/mL dozlarda incelendi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda her bir hücre hattı için optik yoğunluk (OD) grafikleri sigmaplot istatistik programında değerlendirilerek çizilmiştir.

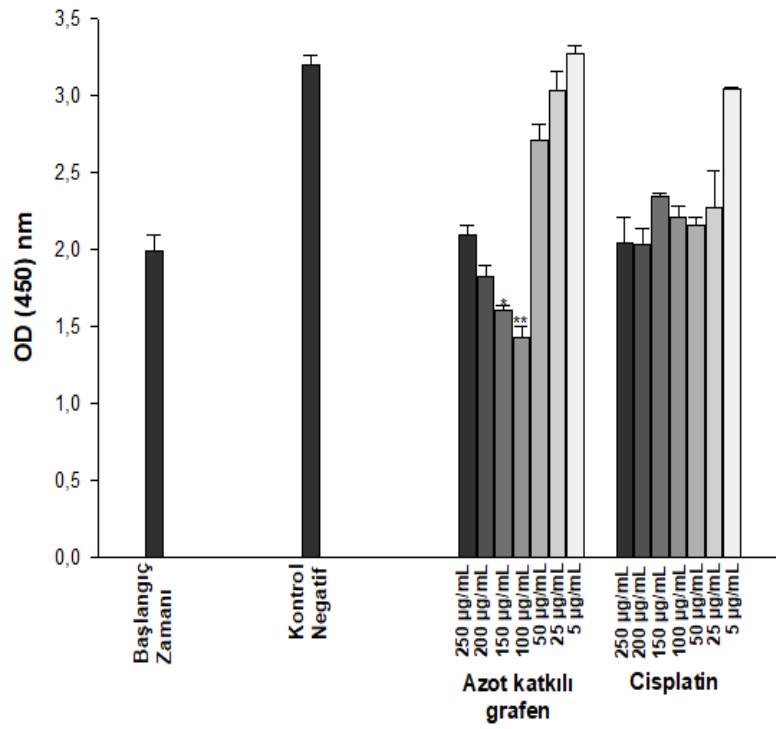
4.2.1. Azot katkılı grafenin HT-29 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin WST-1 testi ile gösterilmesi

Azot katkılı grafen ve pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatin, 12 saatlik inkübasyon süresi sonunda HT-29 hücrelerinde hiçbir dozda sitotoksik etki sergilememiştir ($p>0.05$) (şekil4.1).



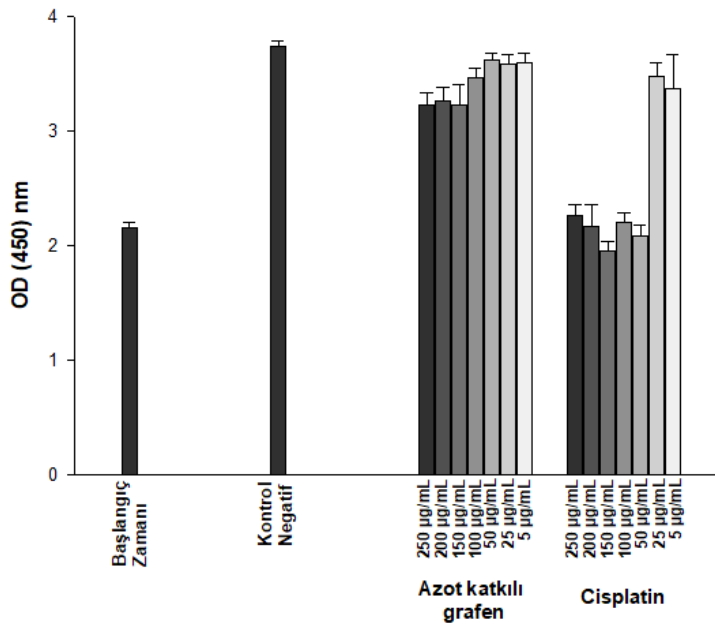
Şekil 4.7. Azot katkılı grafen ve cisplatinin 250- 5 mg/mL arasında denenen dozlarının 12 saatlik inkübasyon süresinde HT-29 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Azot katkılı grafen, 150 mg/mL ($p<0.05$) ve 100 mg/mL ($p<0.01$)' lik dozlarda 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda HT-29 hücrelerinde sitotoksik etki sergilemiştir. Cisplatin ise hiçbir uygulama dozunda sitotoksik bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.2)



Şekil 4.8. Azot katkılı grafen ve cisplatinin 250- 5 mg/mL arasında denenen dozlarının 24 saatlik inkübasyon süresinde HT-29 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$)

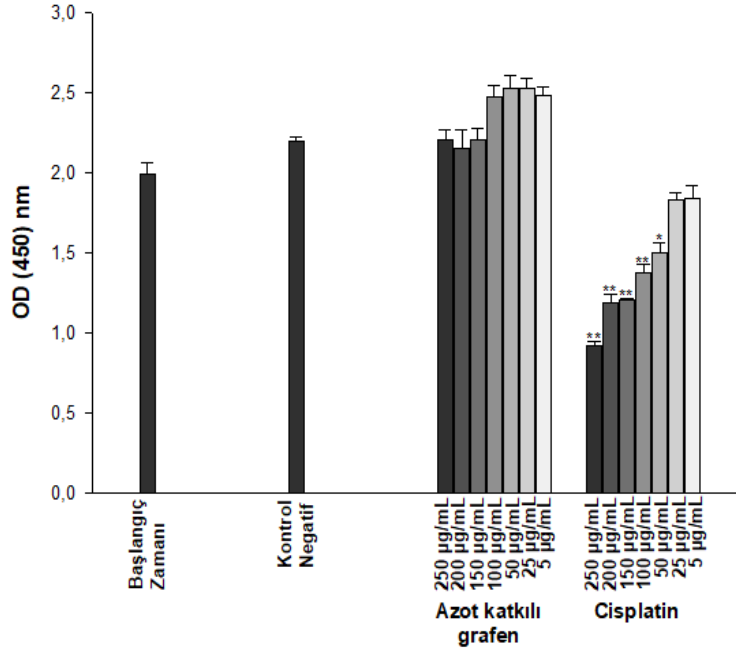
Azot katkılı grafen ve cisplatin, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda HT-29 hücrelerinde hiçbir dozda sitotoksik etki sergilememiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.9. Azot katkılı grafen ve cisplatinin 250- 5 mg/mL arasında denenen dozlarının 48 saatlik inkübasyon süresinde HT-29 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

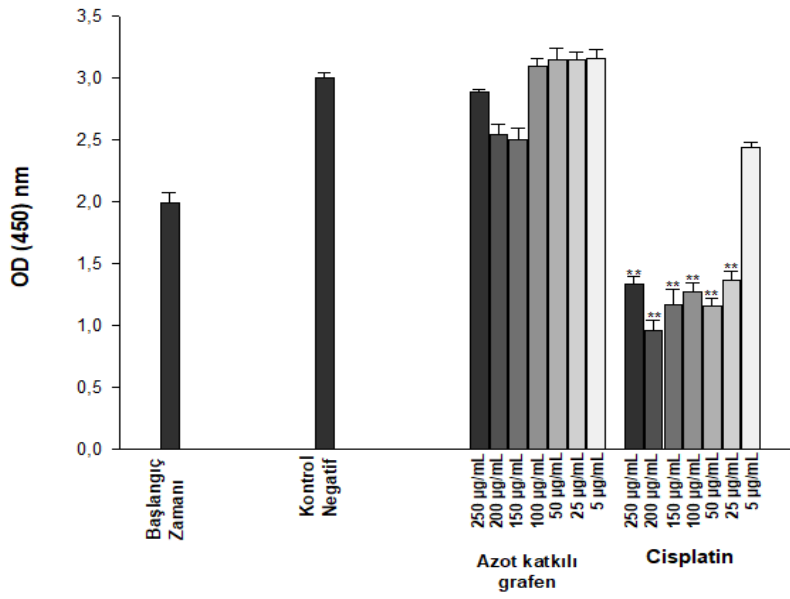
4.2.2. Azot katkılı grafenin HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin WST-1 testi ile gösterilmesi

12 saatlik inkübasyon süresi sonunda NGN, HUVEC hücrelerinde hiçbir dozda sitotoksik etki yaratmazken ($p>0.5$) cisplatin 250, 200, 150, 100 ($p<0.01$) ve 50 ($p<0.5$) mg/mL' lik dozlarda sitotoksik etkili bulunmuştur.

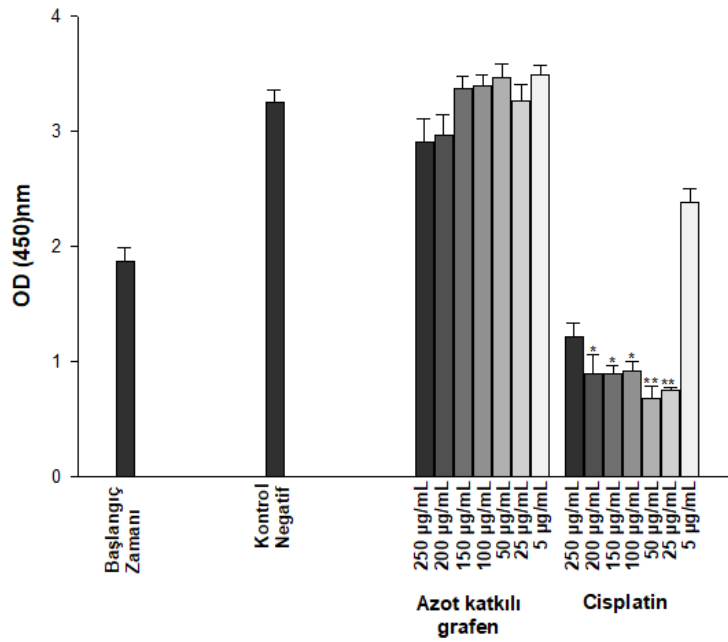


Şekil 4.10. Azot katkılı grafen ve cisplatinin 250- 5 mg/mL arasında denenen dozlarının 12 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$)

24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonunda NGN, HUVEC hücrelerinde hiçbir dozda sitotoksik etki sergilememiştir ($p>0.5$). Cisplatin 24 saat sonunda 5 mg/mL' lik konsantrasyon dışındaki tüm dozlarda endotel hücrelerinde sitotoksik etkiler sergilemiştir ($p<0.01$). Cisplatin 48 inkübasyon sonrasında da 200, 150, 100 ($p<0.05$) ve 50, 25 ($p<0.01$) mg/mL' lik dozlarda sitotoksik bulunmuştur (Şekil 4.5 ve 4.6).



Şekil 4.11. Azot katkılı grafen ve cisplatinin, 250- 5 mg/mL arasında denenen dozlarının 24 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$).

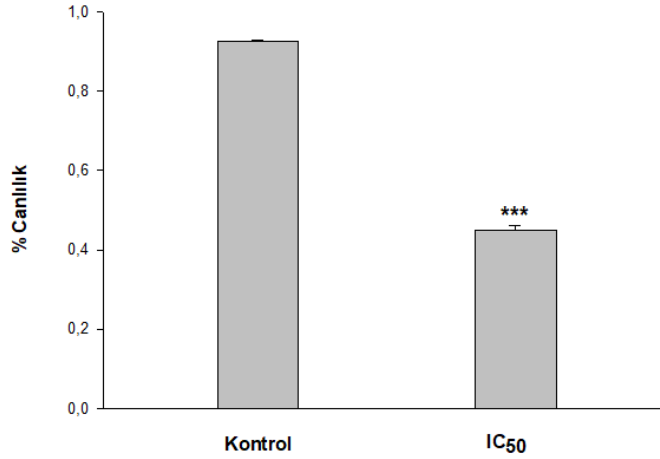


Şekil 4.12. Azot katkılı grafenin ve cisplatinin, 250- 5 mg/ml arasında denenen dozlarının 48 saatlik inkübasyon süresinde HUVEC hücreleri üzerine sitotoksik etkisi (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$)

4.2.3. Azot katkılı grafenin HT-29 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin tripan mavisi testi ile gösterilmesi

Elde edilen tüm WST testi sonuçları instat isatistik programında değerlendirilmiştir. 24 saat sonunda hesaplanan IC_{50} değeri (93.4 mg/ml) diğer deneylerde kullanılacak en etkili doz olarak belirlenmiştir.

Tripan mavisi testinde, azot katkılı grafenin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda IC_{50} (93. 4 mg/ml) dozunun, HT- 29 hücre hattında % canlılık üzerinde önemli bir etkisi olduğu tespit edilmiştir (***, $p<0,001$) (şekil 4.7).

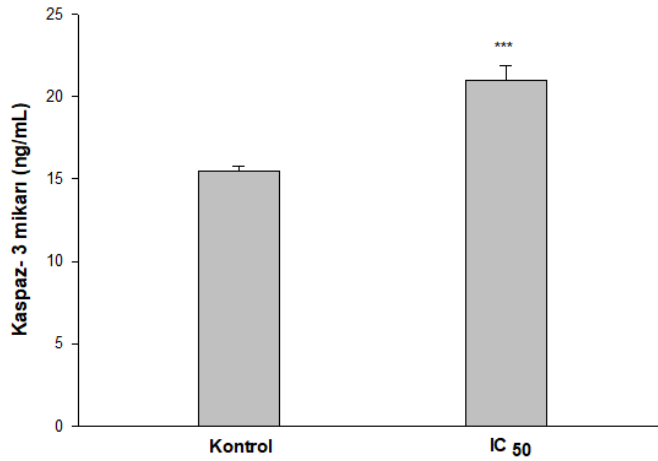


Şekil 4.13. Azot katkılı grafenin 24 saatlik inkübasyon süresinde IC_{50} dozunun (93.4 mg/ml) HT- 29 hücre hattında hücre canlılığına etkisi % (***, $p<0,001$)

4.3. Apoptoz testleri

4.3.1 Azot katkılı grafenin HT-29 hücrelerinde Kaspaz-3 Miktarı Üzerindeki Etkisi

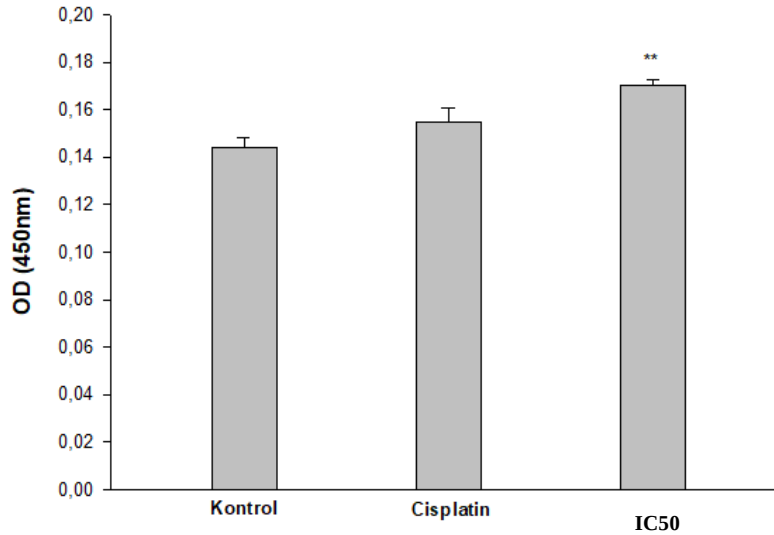
24 saatlik inkübasyon sonrasında, NGN IC_{50} değerinde hazırlanan dozda HT- 29 hücrelerinde kaspaz- 3 miktarında önemli artışa neden olmuştur ($p= 0.0018$) (şekil 4.8). Kontrol grubunda 15.492 ng/mL, IC_{50} NGN uygulanan hücrelerde ise 20.985 ng/mL kaspaz- 3 tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. 24 saat inkübasyon sonunda azot katkılı grafenin IC₅₀ dozunun HT- 29 hücrelerindeki kaspaz-3 miktarı üzerine etkisi (***,p= 0,0018)

4.3.2. Azot katkılı grafenin HT- 29 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin DNA fragmentasyon elisa kiti ile gösterilmesi

24 saatlik inkübasyona bırakılan IC₅₀ dozundaki azot katkılı grafen, HT- 29 hücrelerinde DNA fragmentasyon miktarında anlamlı bir değişime sebep olmuştur (p<0.01). Cisplatin ise, HT- 29 hücrelerinde DNA fragmentasyonuna yol açmamıştır (p>0.5) (şekil 4.9).



Şekil 4.15. 24 saat inkübasyon sonunda azot katkılı grafenin IC₅₀ dozunun ve cisplatinin HT- 29 hücrelerindeki DNA fragmentasyon miktarı üzerine etkisi (**,p<0,01)

5. TARTIŞMA

Kanser sistemik bir hastalıktır. Sağlıklı hücre ile kanser hücresi arasındaki temel fark; kanser ile ilişkili olan onkogen ve tümör baskılayıcı gen sınıflarının dengesidir. Hücrede meydana gelen ve biriken mutasyonlar bir takım biyokimyasal, moleküler ve hücresel özelliklerin kazanılmasına sebep olur. Onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu metabolizma, çoğalma ve ölüm gibi temel hücresel faaliyetlerde değişim meydana gelir. Karsinogenez sürecinde kazanılmış bu özellikler sonucu hücre, homeostasiyi sağlamak amacı ile var olan kontrol mekanizmalarından kaçmayı başarır. İnsandaki kanser modelleri incelendiğinde onkogeneze sürecinin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla hücrenin karsinogenez sürecinde kazandığı bir takım özelliklerin kronolojik ve mekanik olarak farklı yollar izlemesi sonucu kanser heterojen bir patoloji sergiler (Hanahan vd. 2000; Tran vd. 2008; Patel 2012).

Kolon kanseri, akciğer ve meme kanseri ile birlikte dünyada en yüksek mortalite seviyesine sahip ilk üç kanser tipini oluşturmaktadır (Bray vd. 2018). İnsanda kalın bağırsak çekum, kolon ve rektum olmak üzere üç kısma ayrılır. Kolon kendi içerisinde; çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon olarak ayrılır (Özer 2021). Bağırsak epitel hücreleri, progenitor hücrelerinde meydana gelen bir dizi genetik değişimler sonucu tümöre dönüşebilmektedir. Bu değişimler onkogen ve tümör baskılayıcı gen sınıflarının homeostasinde değişime sebep olur ve sonuç olarak zamanla iyi huylu polipler agresif tümöre evrilir (Vogelstein vd. 2002; Kheirelseid vd. 2013).

Atom, molekül veya malzemeler nano boyutta farklı özellikler sergilerler. Bu yüzden tasarlanmış nanomalzemeler, biyo yapılar ile aynı boyutta olduğu ve ilaçlar ile katkılanabilir olduğu için sağlık, tıp ve biyoloji alanlarında kontrol, biyo uyumluluk ve hedefe yönelik tedavi gibi birçok açıdan avantaj sunar (Bayda vd. 2020). Karbon doğada en çok bulunan ve bilimsel olarak çok fazla çalışılmış bir ametaldir. Karbon bazlı nanomalzemeler ise diğer nanomalzemelere kıyasla daha fazla çevre dostudur. Karbonun en saf allotropu olan grafen ise henüz yakın bir keşif tarihine sahiptir (Chen vd. 2015; Kılıç 2019). Grafen geniş bir yüzey alanına sahip bilinen en dayanıklı nano malzemedir. Bu sayede yüzey modifikasyonu yoluyla biyolojik fonksiyonelleştirmeye uygundur (Kılıç 2019). Band boşluğu bulunmayan saf grafenin iletkenlik özelliğini daha kontrollü hale getirmek kimyasal katkılama ile mümkündür. Azot ise bu kimyasal katkılamada tercih edilen en ideal atomdur. Çünkü azot, grafen ile benzer atomik boyuta ve değerlik elektronlarına sahiptir (Tian vd. 2016). Grafen ve N katkılı grafenin özellikleri büyük ölçüde sentez yöntemine bağlıdır (Bundaleska 2018; Baldea 2020). Grafen ailesi nanomalzemeler endositoz yolu ile hücre zarını geçebilir ve sitozolde konumlanmış birçok organel yapısı ile etkileşim kurabilir (Magne 2021).

Yapılan literatür çalışmalarına göre grafenin kanser hücrelerine olan etkisi araştırılmış ve; apoptoz, nekroz ve otofaji gibi yollarla hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir. Grafenin kanser hücresinde mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu inhibe ederken sağlıklı hücrelerde herhangi bir sitotoksik etki göstermediği de bilinmektedir. Araştırmalardan elde edilen sonuçlar, grafenin etki mekanizmasının; doz, zaman, uygulanan hücre ve nanomalzemenin sentez yöntemi gibi birçok değişkene bağlı olduğunu göstermektedir. Çünkü nanomalzemelerin biyolojik yapılarla olan etkileşimini

boyutu, şekli ve yüzey kimyası belirler (Chatterje vd.2014; Zhou vd. 2014; Baldea vd. 2020).

Kolon kanseri tedavisinde hastalığın prognozuna göre uygulanan tedavi yöntemleri değişiklik gösterir. En sık tercih edilen yöntem ise cerrahi yöntemdir. Fakat cerrahi yöntemde kanserli doku vücuttan uzaklaştırılsa bile malign kalıntısı vücutta varlığını sürdürebilir (Stein vd. 2011). Uygulanan diğer bir tedavi yöntemi radyoterapidir. Radyoterapide ise kanser hücrelerine eşit derecede ulaşım sağlanamaz. Yüksek dozda radyasyon tümör dokuya verilemez çünkü yüksek doz, hücreleri hipoksi durumuna iter ve sonucu tedavide beklenenin aksine, büyüme faktörlerinin salınımı ile tümörün daha da büyümesine sebep olur (Zhou vd 2014). Uygulanan spesifik frekans ve şiddettedeki iyonlaştırıcı radyasyonlar ise, kanser hücreleri ile beraber sağlıklı hücrelere de ulaşır (Mayoclinic 2018). Kemoterapi tedavileride tümöre uygulanan kemoterapik ajan ise, yine kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere zarar verebilmektedir (Özer 2021). Kısaca, günümüzde uygulanan kanser tedavi yöntemlerinin en büyük dezavantajı hedefe yönelik olmamasıdır.

Doz ve maruziyet süresine dayanarak hücre ölümüne neden olan maddeler sitotoksik olarak adlandırılır. Sitotoksikite çalışmalarında, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin belirlenmesi amacıyla sitotoksikite testleri uygulanır (Tokur vd. 2017). Sitotoksikite belirleme metodları kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemler olarak bilinmektedir (Crouch vd. 1993; Fan vd. 2007; Longo-Sorbello vd 2006). Yöntemler farklılık gösterebilir sitotoksikite çalışmalarında en kritik nokta çalışma sonucunda canlı/ölü hücre oranındaki değişimdir. Çalışmamızda kullandığımız WST gibi tetrazolyum tuzları kolorimetrik yöntemlere örnek verilebilir. Tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenir. İndirgenmeleri sonucu formazan yapısına dönüşürler ve bu dönüşüm renk değişikliğine sebep olur. Tetrazolyum halkası sadece aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve bu şekilde formazan yapısına dönüşümü sağlanabilir. Dolayısıyla renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücrelerde gözlenir (Mossman 1983).

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda; Jaworski ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, GO (grafen oksit) ve rGO (indirgenmiş grafen oksit)' in U87 ve U118 glioblastoma hücre hattı serilerindeki *in vitro* ve *in vivo* sitotoksik etkilerini araştırmıştır. *In vitro* sitotoksikite çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular GO ve rGO' in her iki glioblastoma hücre hattında canlılığın azalmasına sebep olduğunu göstermektedir. 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/mL'lik bir konsantrasyonda 24 saat inkübe edilen U87 ve U118 hücre hatlarında doz artışına bağlı olarak canlılık azalmıştır. Tıpkı bizim çalışmamızda olduğu gibi 100 µg/mL'lik doz en fazla sitotoksik etkiye sebep olmuştur. Yaptığımız çalışmada, N-GN' nin HT- 29 kolon kanser hücre hattındaki 24 saatlik 250, 200, 150, 100, 50, 25 ve 5 µg/mL 'lik dozlarındaki inkübasyon sonucunda; 150 ve 100 µg/mL 'lik dozlarda anlamlı bir sitotoksik etki elde ettik. Dolayısıyla yaptığımız çalışma, Jaworski ve ekibinin yaptığı çalışma ile inkübasyon süresi ve etkili doz aralığı yönünden uyumluluk göstermektedir (Jaworski vd. 2015).

Çalışmamızda azot katkılı grafenin HT-29 ve HUVEC hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri WST-1 testi ile ölçülmüştür. N-GN, HT-29 kolon kanser hücre hattında 12 ve 48 saatlik inkübasyon süresince uygulanan hiçbir doz aralığında anlamlı bir sitotoksik etki göstermemiştir. Fakat 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda

uygulanan 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL tüm dozlar için 150 ve 100 µg/mL dozlarında anlamlı bir sitotoksik etki yaratmıştır.

Kontrol pozitif grubu için kullanılan ve kolon kanseri dahil birçok kanser tedavisinde sıkça tercih edilen cisplatin ise, HT-29 hücre hattında 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresince uygulanan hiçbir dozda anlamlı bir sitotoksik etki sergilememiştir.

N-GN, çalışmamızda kontrol grubu olarak kullanılan HUVEC endotel hücre hattında tam da beklendiği gibi 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresince uygulanan hiçbir dozda sitotoksik etki göstermemiştir. Fakat cisplatin HUVEC endotel hücrelerinde tüm inkübasyon sürelerinde anlamlı bir sitotoksik etki sergiledi. Cisplatin 12 saatlik inkübasyon sonunda HUVEC hücrelerinde 250, 200, 150, 100 ve 50 µg/mL dozları için anlamlı bir sitotoksik etkiye sebep olmuştur. Cisplatin 24 saatlik inkübasyon sonunda ise 250, 200, 150, 100, 50 ve 25 µg/mL dozları için anlamlı bir sitotoksik etkiye sebep olmuştur. Yine cisplatin 48 saatlik inkübasyon sonunda ise 200, 150, 100, 50 ve 25 µg/mL dozları için anlamlı bir sitotoksik etkiye sebep olmuştur.

Çalışmamızda N-GN' nin, HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini ölçmek amacı ile uygulanan WST-1 hücre canlılık testini doğrulamak için hücrelere tripan mavisi testi uygulandı. Elde edilen WST sonuçlarının OD değerleri sonucunda IC50 değeri; 93.4 µg/mL olarak saptandı. Anlamlı bir sitotoksik etki 24 saatlik inkübasyon süresinde elde edilmiştir. Dolayısıyla tripan testi HT-29 hücre hattına, N-GN' nin IC50 dozu 24 saatlik inkübasyon süresi için uygulandı. Tripan mavisi testinde, azot katkılı grafenin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda IC50 dozunun, HT-29 hücre hattında % canlılık üzerine azaltıcı yönde önemli bir etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada insan meme kanseri hücrelerinde ve insan meme epitel hücre hattı üzerinde PEG-GO (polietilen glikol ile modifiye edilmiş grafen oksit)' in 24 saatlik inkübasyon süresince 0, 5, 10, 20, 40, ve 80 µg/ml dozları için sitotoksik etkisi, hücre iskeleti değerlendirilmesi, ATP üretim miktarı ve mitokondriyal oksidatif seviyesi ölçüldü. Zhou ve ekibi yaptıkları çalışmada, PEG-GO' in sadece bir ilaç taşıyıcısı olmadığını, aynı zamanda üç meme kanseri hücre hattında mitokondriyal oksidatif ve ATP üretimini tek başına inhibe ettiğine dair bulgular elde etti. Daha da önemlisi çalışmada, PEG-GO'nun MCF-10A kanserli olmayan meme epitel hücrelerinin yaşayabilirliği, mitokondriyal oksidatif ve ATP üretimi üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı bulgular arasına eklenmiştir. Ayrıca, elde ettikleri verilere dayanarak, meme kanseri hücrelerinde hücre hareketliliğini doğrudan bozduğunu göstermektedir (Zhou vd. 2014).

Apoptoz, hücredeki Na, Cl, K iyon taşıyıcı sistemlerin durması sonucu hücrede büzüşme ve çevre hücreler olan temasın kesilmesi gibi karakteristik özelliklere sahiptir (Akşit vd. 2008). Hücrede normalde inaktif formda bulunan kaspazlar sitotoksik etki sonucu birbirlerini proteolitik olarak aktif forma dönüştürürler. Aktif hale gelen kaspazlar DNA tamir ve replikasyon mekanizmasında görev alan enzimleri inaktif hale getirirler. Kaspazlar hücre iskeletini oluşturan protein yapıları keserek hücre zarının apoptoza özgü olan tomurcuk görünümünü almasına sebep olurlar. Apoptoz; içsel, dışsal veya granzim- perforin yolları ile mümkündür. Fakat hangi yol olursa olsun hücreye ölüm emrini veren ve cellat kaspaz olarak adlandırılan efektör kaspaz- 3

apoptozun en temel proteazıdır. Bu nedenle apoptoz çalışmalarında kaspaz-3 enzim miktarındaki değişim son derece kritik bir göstergedir (Çoşgun vd. 2011).

Jaworski ve ekibi aynı çalışmalarında GO ve rGO' in U87 ve U118 glioblastoma hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonucunda apoptozun belirteci olan kaspas-3 aktivasyonunu test etmiştir. Elde ettikleri sonuçlar her iki hücre hattında da GO ve rGO, kaspaz-3 aktivasyonunda artış gösterdiği yönündedir. Jaworski ve ekibi, in vitro çalışma sonuçlarına göre, GO' in glioma hücreleri için rGO' ten daha az toksik olduğunu belirtti. rGO' in, hücre ölümünü çoğunlukla apoptoz yoluyla indüklediği, dolayısıyla grafenin kanser tedavisinde potansiyel uygulanabilirliğinin olduğunu bulgularına eklemişlerdir. rGO ve glioma hücre zarları arasındaki temasın, rGO toksisitesinin ana nedeni olabileceği tahmininde bulunmuşlardır. İn vivo araştırma sonuçları, glioblastoma tümörlerine enjekte edilen hem GO hem de rGO'nun tümörlerin hacmini ve ağırlığını azalttığını yönündedir. Bu bulgular neticesinde Jaworski ve ekibi çalışmalarında, tümörlerde grafen trombositleri ve glioma hücreleri arasındaki şiddetli toksisiteye yol açan etkileşimin grafen yüzeyinin biçiminin olduğunu vurgulamaktadırlar (Jaworski vd. 2015). Yaptığımız bu çalışmada ise HT-29 hücrelerinde, azot katkılı grafenin IC50 dozunun 24 saatlik inkübasyon süresince kaspaz-3 miktarında etkili bir artışa sebep olduğu tespit edilmiştir.

Baldea ve ekibi gerçekleştirdikleri çalışmada farklı miktarlarda nitrojen içeren üç azot katkılı grafenin HUVEC epitel ve DLD-1 kolon kanseri hücre hattı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. N-grafenlerin etkilerinin hücre tipine ve yapıdaki nitrojen miktarına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. HUVEC hücrelerine, N-grafenlerin endositoz ile alındığını ve özellikle yüksek nitrojen içeriğine sahip numunelerin muhtemelen mekanik etki ile canlılığı azalttığını saptamışlardır. Çalışmada tümör DLD1 hücrelerinde, test edilen tüm N-grafenler, çeşitli mekanizmalarla hücre ölümüne yol açtığı ortaya konmuştur: oksidatif stres, özellikle NGr-3 için bir proinflamatuvar durumun indüklenmesi, otofaji, apoptoz, DNA hasarı ve nekroz. En ciddi DNA lezyonlarının ve ultrastrüktürel değişikliklerinin, yüksek oranda nitrojen, NGr-2 ve NGr-3 içeren numunelerden kaynaklandığında çalışma sonuçlarına eklenmiştir. Mevcut araştırma, yüksek nitrojen içeriğine sahip N-grafenin DLD1 tümör hücreleri üzerindeki önemli sitotoksik etkisini ve HUVEC normal hücreleri üzerinde bazı sitoprotektif etkilerini göstermektedir. Tümör hücreleri üzerindeki toksik etkilere dayanan çalışmada, N-grafenlerin gelecekte tek başına veya kemoterapi ilaçlarıyla yüklü antikanser ajanlar olarak kullanılma olasılığının muhtemel olduğu belirtilmiştir (Baldea 2020). Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada ise, apoptozun en önemli göstergesi olan DNA' fragmentasyon miktarında anlamlı bir artış elde edildi. Yapılan tüm testlerin bulguları birlikte değerlendirildiğinde sitotoksikite testleri saptadığımız hücre ölümlerinin apoptoz aracılı olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

1. Azot katkılı grafen 12 saatlik inkübasyon süresi sonunda HT-29 hücrelerinde 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$ tüm dozlar için istatistiksel olarak önemli bir sitotoksik etkiye sebep olmamıştır.
2. Cisplatin, 12 saatlik inkübasyon süresi sonunda HT-29 hücrelerinde 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$ tüm dozlar için istatistiksel olarak önemli bir sitotoksik etkiye sebep olmamıştır.
3. Azot katkılı grafen, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda HT-29 hücrelerinde 150 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ dozlar için istatistiksel olarak önemli sitotoksik etkiye sebep olmuştur (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$).
4. Cisplatin 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$ tüm dozlar için anlamlı bir etkiye sebep olmamıştır.
5. Azot katkılı grafen, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda HT-29 hücrelerinde 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$ tüm dozlar için istatistiksel olarak önemli bir sitotoksik etkiye sebep olmamıştır.
6. Cisplatin, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda HT-29 hücrelerinde 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$ tüm dozlar için istatistiksel olarak önemli bir sitotoksik etkiye sebep olmamıştır.
7. Azot katkılı grafen, 12 saatlik inkübasyon süresi sonunda HUVEC hücrelerinde 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$ tüm dozlar için istatistiksel olarak önemli bir sitotoksik etkiye sebep olmamıştır.
8. Cisplatin, 12 saatlik inkübasyon süresi sonunda HUVEC hücrelerinde 250, 200, 150, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ dozları için sitotoksik etkiye sebep olmuştur (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$).
9. Azot katkılı grafen, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda HUVEC hücrelerinde 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$ tüm dozlar için istatistiksel olarak önemli bir sitotoksik etkiye sebep olmamıştır.
10. Cisplatin, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda HUVEC hücrelerinde 250, 200, 150, 100, 50, 25 $\mu\text{g/mL}$ dozları için önemli bir sitotoksik etkiye sebep olmuştur (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$).
11. Azot katkılı grafen, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda HUVEC hücrelerinde 5, 25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$ tüm dozlar için istatistiksel olarak önemli bir sitotoksik etkiye sebep olmamıştır.
12. Cisplatin, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda HUVEC hücrelerinde 200, 150, 100, 50, 25 $\mu\text{g/mL}$ dozları için önemli bir sitotoksik etkiye sebep olmuştur (**, $p<0.01$; *, $p<0.05$).
13. Tripan mavisi testinde, azot katkılı grafenin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda IC_{50} (93.4 $\mu\text{g/mL}$) dozunun, HT- 29 hücre hattında % canlılık üzerinde önemli bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. (***, $p<0,001$).
14. HT- 29 hücrelerinde, azot katkılı grafenin IC_{50} dozunun (93.4 $\mu\text{g/mL}$) 24 saatlik inkübasyon süresince kaspaz-3 miktarı istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir (***, $p<0,0018$).
15. 24 saatlik inkübasyona bırakılan IC_{50} dozundaki azot katkılı grafen, HT- 29 hücrelerinde DNA fragmentasyon miktarında anlamlı bir değişime sebep olmuştur (**, $p<0.01$).

- 16.** Cisplatin, HT- 29 hücrelerinde DNA fragmentasyon miktarında anlamlı bir değişime sebep olmamıştır.



7. KAYNAKLAR

- Akşit, H. and Bildik, A. 2008. Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1), 55-63.
- Allhoff, F. 2009. On the autonomy and justification of nanoethics. In *Nanotechnology & society* (pp. 3-38). Springer, Dordrecht.
- Arseven, M. and Grubu, İ. M. A. 2010. Nanokarbon ve formları. *Hacettepe Üniversitesi, İleri Malzemeler Araştırma Grubu Nanoteknoloji&Nanotıp Anabilim Dalı*.
- Artiles, M. S., Rout, C. S. and Fisher, T. S. 2011. Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(14-15), 1352-1360.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *science*, 281(5381), 1305-1308.
- Baldea, I., Olteanu, D., Filip, G. A., Pogacean, F., Coros, M., Suci, M. and Pruneanu, S. 2020. Cytotoxicity mechanisms of nitrogen-doped graphene obtained by electrochemical exfoliation of graphite rods, on human endothelial and colon cancer cells. *Carbon*, 158, 267-281.
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. and Rizzolio, F. 2019. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112.
- Bhuyan, M. S. A., Uddin, M. N., Islam, M. M., Bipasha, F. A. and Hossain, S. S. 2016. Synthesis of graphene. *Int Nano Lett* 6 (2): 65–83.
- Blagosklonny, M. V. 2003. Cell immortality and hallmarks of cancer. *Cell Cycle*, 2(4), 295-298.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Brennan, K., Offiah, G., McSherry, E. A., and Hopkins, A. M. 2009. Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer?. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Bundaleska, N., Henriques, J., Abrashev, M., Botelho do Rego, A. M., Ferraria, A. M., Almeida, A. and Tatarova, E. 2018. Large-scale synthesis of free-standing N-doped graphene using microwave plasma. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
- Chatterjee, N., Eom, H. J., and Choi, J. 2014. A systems toxicology approach to the surface functionality control of graphene–cell interactions. *Biomaterials*, 35(4), 1109-1127.
- Chen, D., Dougherty, C. A., Zhu, K. and Hong, H. 2015. Theranostic applications of carbon nanomaterials in cancer: Focus on imaging and cargo delivery. *Journal of controlled release*, 210, 230-245.
- Chinnaiyan, A. M. 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1(1), 5-15.
- Cohen, J. J. 1991. Programmed cell death in the immune system. *Advances in immunology*, 50, 55-85.

- Cohen-Karni, T., Langer, R. and Kohane, D. S. 2012. The smartest materials: the future of nanoelectronics in medicine. *ACS nano*, 6(8), 6541-6545.
- Cohen-Karni, T., Qing, Q., Li, Q., Fang, Y. and Lieber, C. M. 2010. Graphene and nanowire transistors for cellular interfaces and electrical recording. *Nano letters*, 10(3), 1098-1102.
- Cordani, M. and Somoza, Á. 2019. Targeting autophagy using metallic nanoparticles: A promising strategy for cancer treatment. *Cellular and molecular life sciences*, 76(7), 1215-1242.
- Cory, S. and Adams, J. M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 647-656.
- Coşgun, G. and Özgür, H. 2011. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. 20: 145.
- Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., and Fletcher, J. 1993. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of immunological methods*, 160(1), 81-88.
- Dikin, D. A., Stankovich, S., Zimney, E. J., Piner, R. D., Dommett, G. H., Evmenenko, G. and Ruoff, R. S. 2007. Preparation and characterization of graphene oxide paper. *Nature*, 448(7152), 457-460.
- Dong, L., Chen, Z., Lin, S., Wang, K., Ma, C. and Lu, H. 2017. Reactivity-controlled preparation of ultralarge graphene oxide by chemical expansion of graphite. *Chemistry of Materials*, 29(2), 564-572.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), 33-42.
- Du, X., Skachko, I., Barker, A. and Andrei, E. Y. 2008. Approaching ballistic transport in suspended graphene. *Nature nanotechnology*, 3(8), 491-495.
- Elmore, S. A., Dixon, D., Hailey, J. R., Harada, T., Herbert, R. A., Maronpot, R. R. and Creasy, D. M. 2016. Recommendations from the INHAND apoptosis/necrosis working group. *Toxicologic pathology*, 44(2), 173-188.
- Fadeel, B., Bussy, C., Merino, S., Vázquez, E., Flahaut, E., Mouchet, F. and Bianco, A. 2018. Safety assessment of graphene-based materials: focus on human health and the environment. *ACS nano*, 12(11), 10582-10620.
- Fadok, V. A., De Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M. and Bratton, D. L. 2001. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 1071-1077.
- Fan, F. and Wood, K. V. 2007. Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay and drug development technologies*, 5(1), 127-136.

- Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D. and Lieberman, J. 2003. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*, 112(5), 659-672.
- Feynman, R. 1960. Nanotechnology. *Caltechs Eng. Sci*, 23, 22-36.
- Garnweitner, G. and Niederberger, M. 2008. Organic chemistry in inorganic nanomaterials synthesis. *Journal of Materials Chemistry*, 18(11), 1171-1182.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C. and Kroemer, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 13(9), 1423-1433.
- Geim, A. K. And Novoselov, K. S. 2007. The rise of graphene. *Nature materials*, 6(3), 183-191.
- Globocan 2018. Cancer tomorrow. <https://gco.iarc.fr/today/home> [Son Erişim Tarihi: 08.01.2023].
- Globocan 2022. Cancer tomorrow. <https://gco.iarc.fr/today/home> [Son Erişim Tarihi: 08.01.2023].
- Goenka, S., Sant, V. and Sant, S. 2014. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 173, 75-88.
- Gonçalves, G., Vila, M., Portolés, M. T., Vallet-Regi, M., Gracio, J. and Marques, P. A. A. 2013. Nano-graphene oxide: a potential multifunctional platform for cancer therapy. *Advanced healthcare materials*, 2(8), 1072-1090.
- Grant, B. and Sato, M. 2006. Intracellular trafficking. Department of Molecular Biology and Biochemistry, Rutgers University, Piscataway, NJ 08854 USA, pp: 21;1-9.
- Grimsdale, A. C. and Müllen, K. 2005. The chemistry of organic nanomaterials. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(35), 5592-5629.
- Guo, X. and Mei, N. 2014. Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials. *Journal of food and drug analysis*, 22(1), 105-115.
- Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M. and Kim, J. H. 2019. Differential immunomodulatory effect of graphene oxide and vanillin-functionalized graphene oxide nanoparticles in human acute monocytic leukemia cell line (THP1). *International journal of molecular sciences*, 20(2), 247.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hari, D. M., Leung, A. M., Lee, J. H., Sim, M. S., Vuong, B., Chiu, C. G. and Bilchik, A. J. 2013. AJCC Cancer Staging Manual 7th edition criteria for colon cancer: do the complex modifications improve prognostic assessment?. *Journal of the American College of Surgeons*, 217(2), 181-190.

- Higashisaka, K., Nagano, K., Yoshioka, Y. and Tsutsumi, Y. 2017. Nano-safety research: examining the associations among the biological effects of nanoparticles and their physicochemical properties and kinetics. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(3), 243-248.
- Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M. and Martin, S. J. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal*, 23(10), 2134-2145.
- Jaworski, S., Sawosz, E., Kutwin, M., Wierzbicki, M., Hinzmann, M., Grodzik, M. and Chwalibog, A. 2015. In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma. *International journal of nanomedicine*, 10, 1585.
- Jia, P. P., Sun, T., Junaid, M., Yang, L., Ma, Y. B., Cui, Z. S. and Pei, D. S. 2019. Nanotoxicity of different sizes of graphene (G) and graphene oxide (GO) in vitro and in vivo. *Environmental Pollution*, 247, 595-606.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y. And Penninger, J. M. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828), 549-554.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239–57.
- Kheirleiseid, E. A., Miller, N., and Kerin, M. J. 2013. Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature.
- Kılıç, E. 2019. Grafen esaslı yeşil nanokompozitlerin hazırlanması, karakterizasyonu ve çeşitli uygulamalarda kullanılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal*, 14(22), 5579-5588.
- Kozal, B. 2012. Karbon tabanlı petek örgülerin elektronik özellikleri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi.
- Kreeger, P. K. and Lauffenburger, D. A. 2010. Cancer systems biology: a network modeling perspective. *Carcinogenesis*, 31(1), 2-8.
- Lalwani, G., D'Agati, M., Khan, A. M. and Sitharaman, B. 2016. Toxicology of graphene-based nanomaterials. *Advanced drug delivery reviews*, 105, 109-144.
- Li, L. Y., Luo, X. and Wang, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842), 95-99.
- Li, N., Chen, Z., Ren, W., Li, F. and Cheng, H. M. 2012. Flexible graphene-based lithium ion batteries with ultrafast charge and discharge rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(43), 17360-17365.

- Liao, C., Li, Y., and Tjong, S. C. 2018. Graphene nanomaterials: Synthesis, biocompatibility, and cytotoxicity. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3564.
- Linares, J., Matesanz, M. C., Vila, M., Feito, M. J., Goncalves, G., Vallet-Regi, M. and Portolés, M. T. 2014. Endocytic mechanisms of graphene oxide nanosheets in osteoblasts, hepatocytes and macrophages. *ACS applied materials & interfaces*, 6(16), 13697-13706.
- Locksley, R. M., Killeen, N. and Lenardo, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501.
- Longo-Sorbello, G. S., Saydam, G., Banerjee, D. and Bertino, J. R. 2006. Cytotoxicity and cell growth assays. In *Cell biology* (pp. 315-324). Academic Press.
- Macleod, K. 2000. Tumor suppressor genes. *Current opinion in genetics & development*, 10(1), 81-93.
- Magne, T. M., de Oliveira Vieira, T., Costa, B., Alencar, L. M. R., Ricci-Junior, E., Hu, R. and Santos-Oliveira, R. 2021. Factors affecting the biological response of Graphene. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 203, 111767.
- Maiti, D., Tong, X., Mou, X. and Yang, K. 2019. Carbon-based nanomaterials for biomedical applications: a recent study. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1401.
- Mansoori, G. A. and Soelaiman, T. F. 2005. *Nanotechnology--An introduction for the standards community*. ASTM International.
- Mao, J., Guo, R. and Yan, L. T. 2014. Simulation and analysis of cellular internalization pathways and membrane perturbation for graphene nanosheets. *Biomaterials*, 35(23), 6069-6077.
- Martinvalet, D., Zhu, P. and Lieberman, J. 2005. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, 22(3), 355-370.
- Mayoclinic. Diagnosis: Screening for colon cancer. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/diagnosis/treatment/drc-20353674> [Son Erişim Tarihi: 08.01.2023].
- Mohajeri, M., Behnam, B. and Sahebkar, A. 2019. Biomedical applications of carbon nanomaterials: Drug and gene delivery potentials. *Journal of cellular physiology*, 234(1), 298-319.
- Mossman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.
- Mukherjee, S. and Kaloni, T. P. 2012. Electronic properties of boron-and nitrogen-doped graphene: a first principles study. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(8), 1-5.
- Munteanu, I. and Mastalier, B. 2014. Genetics of colorectal cancer. *Journal of medicine and life*, 7(4), 507.
- Naderi, H. R., Norouzi, P., Ganjali, M. R. and Gholipour-Ranjbar, H. 2016. Synthesis of a novel magnetite/nitrogen-doped reduced graphene oxide nanocomposite as high performance supercapacitor. *Powder Technology*, 302, 298-308.

- Nasirzadeh, N., Azari, M. R., Rasoulzadeh, Y. and Mohammadian, Y. 2019. An assessment of the cytotoxic effects of graphene nanoparticles on the epithelial cells of the human lung. *Toxicology and Industrial Health*, 35(1), 79-87.
- National Nanotechnology Initiative. <https://www.nano.gov/>. [Son Erişim Tarihi: 08.01.2023].
- Nguyen, P. and Berry, V. 2012. Graphene interfaced with biological cells: opportunities and challenges. *The journal of physical chemistry letters*, 3(8), 1024-1029.
- Norbury, C. J. and Hickson, I. D. 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41(1), 367-401.
- Opdenbosch N. and Lamkanfi M. 2019. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Science Direct*, 50; 1352-1364.
- Ou, L., Song, B., Liang, H., Liu, J., Feng, X., Deng, B. and Shao, L. 2016. Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. *Particle and fibre toxicology*, 13(1), 1-24.
- Ouyang, S., Hu, X. and Zhou, Q. 2015. Envelopment–internalization synergistic effects and metabolic mechanisms of graphene oxide on single-cell *Chlorella vulgaris* are dependent on the nanomaterial particle size. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(32), 18104-18112.
- Özer, B.O. 2021. Kolon Kanseri Tedavisi İçin Yeni Nanoterapötik Modalitelerin Geliştirilmesi. Doktora tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, 153 s.
- Panchakarla, L. S., Subrahmanyam, K. S., Saha, S. K., Govindaraj, A., Krishnamurthy, H. R., Waghmare, U. V. and Rao, C. N. R. 2009. Synthesis, structure, and properties of boron-and nitrogen-doped graphene. *Advanced Materials*, 21(46), 4726-4730.
- Pareek, A. and Mohan, S. V. 2019. Graphene and its applications in microbial electrochemical technology. *Microbial Electrochemical Technology*, 75-97.
- Patel, A. 2012. The Cell Biological Basis of Cancer. PhD Thesis. Miami University Oxford.
- Qin, Y., Zhou, Z. W., Pan, S. T., He, Z. X., Zhang, X., Qiu, J. X. and Zhou, S. F. 2015. Graphene quantum dots induce apoptosis, autophagy, and inflammatory response via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B mediated signaling pathways in activated THP-1 macrophages. *Toxicology*, 327, 62-76.
- Rao, C. N. R., Gopalakrishnan, K., and Govindaraj, A. 2014. Synthesis, properties and applications of graphene doped with boron, nitrogen and other elements. *Nano today*, 9(3), 324-343.
- Saelens, X., Festjens, N., Walle, L. V., Gurp, M. V., Loo, G. V. And Vandenabeele, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23(16), 2861-2874.
- Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391(6662), 96-99.

- Sanchez, C., Belleville, P., Popall, M., and Nicole, L. 2011. Applications of advanced hybrid organic–inorganic nanomaterials: from laboratory to market. *Chemical Society Reviews*, 40(2), 696-753.
- Sanchez, V. C., Jachak, A., Hurt, R. H. and Kane, A. B. 2012. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. *Chemical research in toxicology*, 25(1), 15-34.
- Schimmer, A. D. 2004. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer research*, 64(20), 7183-7190.
- Schuler, M. and Green, D. R. 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(6), 684-688.
- Siegel Rebecca, L. and Miller Kimberly, D. 2019. Jemal Ahmedin. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(1), 7-34.
- Singh, N., Srivastava, G., Talat, M., Raghubanshi, H., Srivastava, O. N. and Kayastha, A. M. 2014. Cicer α -galactosidase immobilization onto functionalized graphene nanosheets using response surface method and its applications. *Food Chemistry*, 142, 430-438.
- Stein, A., Atanackovic, D. and Bokemeyer, C. 2011. Current standards and new trends in the primary treatment of colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 47, S312-S314.
- Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M. and Kroemer, G. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, 192(4), 571-580.
- Tabish, T. A., Pranjol, M. Z. I., Jabeen, F., Abdullah, T., Latif, A., Khalid, A. and Zhang, S. 2018. Investigation into the toxic effects of graphene nanopores on lung cancer cells and biological tissues. *Applied materials today*, 12, 389-401.
- Tektemur A. 2020.
<https://akademiksunum.com/index.jsp?modul=document&folder=3314a104be85895d6846b30b16836dc92aa5d845>. [Son Erişim Tarihi: 08.01.2023].
- Tian, H., Wang, L., Sofer, Z., Pumera, M. and Bonanni, A. 2016. Doped graphene for DNA analysis: The electrochemical signal is strongly influenced by the kind of dopant and the nucleobase structure. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
- Tiyek, İ., Dönmez, U., Yıldırım, B., Alma, M. H., Ersoy, M. S. and Karataş, Ş. 2016. Kimyasal yöntem ile indirgenmiş grafen oksit sentezi ve karakterizasyonu. *Sakarya University Journal of Science*, 20(2), 349-357.
- Tokur, O. and AKSOY, A. 2017. In vitro sitotoksikite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.
- Tran, P. T., Fan, A. C., Bendapudi, P. K., Koh, S., Komatsubara, K., Chen, J. and Felsher, D. W. 2008. Combined Inactivation of MYC and K-Ras oncogenes reverses tumorigenesis in lung adenocarcinomas and lymphomas. *PloS one*, 3(5), e2125.

- Van Loo, G., Saelens, X., Van Gurp, M., MacFarlane, M., Martin, S. J. and Vandenabeele, P. 2002. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death & Differentiation*, 9(10), 1031-1042.
- Vogelstein, B. And Kinzler, K. W. 2002. *The genetic basis of human cancer*. McGraw-Hill Professional.
- Wagner, F. E., Haslbeck, S., Stievano, L., Calogero, S., Pankhurst, Q. A. and Martinek, K. P. 2000. Before striking gold in gold-ruby glass. *Nature*, 407(6805), 691-692.
- Wang, X. and Shi, G. 2015. An introduction to the chemistry of graphene. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(43), 28484-28504.
- WHO. 2018. <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>. [Son Erişim Tarihi: 08.01.2023].
- WHO. 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. [Son Erişim Tarihi: 08.01.2023].
- Williams, R. M., Chen, S., Langenbacher, R. E., Galassi, T. V., Harvey, J. D., Jena, P. V., and Heller, D. A. 2021. Harnessing nanotechnology to expand the toolbox of chemical biology. *Nature chemical biology*, 17(2), 129-137.
- Wong, R. S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 30(1), 1-14.
- Wu, T., Shen, H., Sun, L., Cheng, B., Liu, B. and Shen, J. 2012. Nitrogen and boron doped monolayer graphene by chemical vapor deposition using polystyrene, urea and boric acid. *New Journal of Chemistry*, 36(6), 1385-1391.
- Yan, J., Chen, L., Huang, C. C., Lung, S. C. C., Yang, L., Wang, W. C. and Lin, C. H. 2017. Consecutive evaluation of graphene oxide and reduced graphene oxide nanoplatelets immunotoxicity on monocytes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 153, 300-309.
- Yang, K., Li, Y., Tan, X., Peng, R. and Liu, Z. 2013. Behavior and toxicity of graphene and its functionalized derivatives in biological systems. *Small*, 9(9-10), 1492-1503.
- Yuan, Y., Gu, Z., Yao, C., Luo, D. And Yang, D. 2019. Nucleic acid-based functional nanomaterials as advanced cancer therapeutics. *Small*, 15(26), 1900172.
- Zhang, B., Wang, Y. and Zhai, G. 2016. Biomedical applications of the graphene-based materials. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 953-964.
- Zhang, L., Xia, J., Zhao, Q., Liu, L. and Zhang, Z. 2010. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *small*, 6(4), 537-544.
- Zhang, X., Wang, Y., Luo, G. and Xing, M. 2019. Two-dimensional graphene family material: assembly, biocompatibility and sensors applications. *Sensors*, 19(13), 2966.
- Zhou, H., Zhang, B., Zheng, J., Yu, M., Zhou, T., Zhao, K. and Wei, T. 2014. The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene via the impairment of mitochondrial respiration. *Biomaterials*, 35(5), 1597-1607.

- Zhou, T., Zhang, B., Wei, P., Du, Y., Zhou, H., Yu, M. and Wei, T. 2014. Energy metabolism analysis reveals the mechanism of inhibition of breast cancer cell metastasis by PEG-modified graphene oxide nanosheets. *Biomaterials*, 35(37), 9833-9843.
- Zhu, C. and Dong, S. 2013. Recent progress in graphene-based nanomaterials as advanced electrocatalysts towards oxygen reduction reaction. *Nanoscale*, 5(5), 1753-1767.
- Zhu, Z., Garcia-Gancedo, L., Flewitt, A. J., Xie, H., Moussy, F. and Milne, W. I. 2012. A critical review of glucose biosensors based on carbon nanomaterials: carbon nanotubes and graphene. *Sensors*, 12(5), 5996-6022.



ÖZGEÇMİŞ

ZELİHA YÜCEL

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2019-2023	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2011-2015	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya