



T.C.  
AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI BİTKİ VE LİKEN ÖZÜTLERİYLE ELDE EDİLEN ÇİÇEK  
ŞEKİLLİ HİBRİT NANOYAPILARIN ANTİKANSER ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER BİYOLOJİK AÇIDAN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FULYA NURÇİN ÇİĞİR**

**ŞUBAT**

FULYA NURÇİN  
ÇİĞİR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞUBAT 2024

**FARKLI BİTKİ VE LİKEN ÖZÜTLERİYLE ELDE EDİLEN ÇİÇEK  
ŞEKİLLİ HİBRİT NANOYAPILARIN ANTİKANSER ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI VE MOLEKÜLER BİYOLOJİK AÇIDAN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Fulya NURÇİN ÇİĞİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Doç. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞUBAT 2024**

## ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Fulya NURÇİN ÇIĞIR

01/02/2024

FARKLI BİTKİ VE LİKEN ÖZÜTLERİYLE ELDE EDİLEN ÇİÇEK ŞEKLİ HİBRİT  
NANOYAPILARIN ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE  
MOLEKÜLER BİYOLOJİK AÇIDAN DEĞERLENDİRİLMESİ  
(Yüksek Lisans Tezi)

Fulya NURÇİN ÇIĞIR

AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2024

ÖZET

Nanopartiküller, nanometre ölçeğinde boyutlara sahip olan ve bu özelliklerinden dolayı bir dizi endüstriyel, tıbbi ve bilimsel uygulamalar için çeşitli olanaklar sunan yapılardır. Bu da, nanopartiküllerin ilaç geliştirme, görüntüleme teknikleri, kataliz, enerji depolama ve sensör teknolojileri gibi birçok alanda kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Nanopartiküllerin biyolojik sentezi, biyolojik organizmaların veya onların bileşenlerinin kullanılması yoluyla nanopartikül üretimini ifade etmektedir. Bu yöntem, geleneksel kimyasal sentez yöntemlerine alternatif olarak çevre dostu ve etkili bir yaklaşım sunar. Biyolojik sentez; genellikle bitkiler, bakteriler, likenler, mantarlar veya diğer mikroorganizmaların özünden elde edilen biyolojik ajanların kullanımını içerir. Özellikle bitki özleri ve likenler, nanopartikül sentezi için gerekli olan metal tuzlarını indirgeyerek veya çökelterek nanopartiküllerin oluşumunu sağlamaktadır. Bu çalışmada; bakır-nano-flower kompozit malzemenin biyolojik sentezi için *Clodonia foliacea* likeni ve nar kabuğu özütü kullanılmıştır. Sentezlenen bakır-nano-flower kompozit malzemenin kanser hücresi (DLD-1 kolon kanseri ve CCD18-Co sağlıklı kolon hücreleri) üzerine etkileri, kanser yolağında yer alan *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade düzeyindeki değişimlerin tespiti ile belirlenmiştir. MTT analizinde belirlenen dozlara göre nanopartikül uygulaması yapılan DLD-1 ve CCD18-Co hücrelerinde *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerine ait ifade değişimleri belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, *C. foliacea* likeni ve nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli nanopartikül uygulaması bütün konsantrasyonlarda *BCL-2* ve *CYP1A1* geni kontrol grubuna kıyasla artmıştır. Böylelikle bütün konsantrasyonlarda daha çok eksprese olmuş ve uygulama sayesinde kanser hücrelerinde görülen programsız hücre çoğalması olayında etkili *BCL-2* ve *CYP1A1* geninin eksprese düzeyini değiştirmiştir. Fakat gözlenen bu değişimin farklı hücre hatlarında yapılacak bir dizi çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Sayfa Adedi : 53  
Anahtar Kelimeler : *C. foliacea* Likeni, Nar Kabuğu, Nanopartikül, *BCL-2*, *CYP1A1*  
Danışman : Doç. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI

INVESTIGATION OF THE ANTI-CANCER EFFECTS OF FLOWER-SHAPED  
HYBRID NANOSTRUCTURES MADE WITH DIFFERENT PLANT AND LICHEN  
EXTRACTS AND MOLECULAR BIOLOGICAL EVALUATION

(M.Sc. Thesis)

Fulya NURÇİN ÇİĞİR

AMASYA UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2024

ABSTRACT

Nanoparticles are structures that have dimensions on the nanometer scale and, due to these properties, offer various possibilities for a number of industrial, medical and scientific applications. This makes it possible to compartmentalize nanoparticles in many areas such as drug development, planning techniques, catalysis, energy storage and sensor technologies. Biological synthesis of nanoparticles refers to the production of nanoparticles through the use of biological organisms or their components. This method offers an environmentally friendly and effective approach as an alternative to traditional chemical synthesis methods. Biological synthesis; It usually contains information about biological agents obtained from the extract of plants, herbs, lichens, fungi or other microorganisms. In particular, plant extracts and lichens ensure the existence of nanoparticles by reducing or precipitating the metal salts necessary for nanoparticle synthesis. This product; *Cladonia foliacea* analogue and pomegranate peel extract were used for the biological synthesis of copper-nano-flower composite component. The effects of the synthesized copper-nano-flower composite on cancer cells (DLD-1 colon cancer and CCD18-Co healthy colon system) were determined by monitoring the changes in the expression level of *CYP1A1* and *BCL-2* genes involved in the cancer pathway. Expression changes of *CYP1A1* and *BCL-2* genes were determined in the view of DLD-1 and CCD18-Co applied with nanoparticles according to the doses recorded in the MTT analysis. When the results were evaluated, the application of Cu-flower-shaped nanoparticles obtained from *C. foliacea* lichen and pomegranate peel increased the *BCL-2* and *CYP1A1* gene groups at all concentrations compared to the control rates. In addition, the expression of *BCL-2* and *CYP1A1* genes, which were more expressed in all regions and are effective in unscheduled cell proliferation, which is seen in the risk of cancer, was changed due to the application. However, this observed change needs to be evaluated through a series of studies conducted on different cell lines.

Page Number : 53

Key Words : *C. foliacea* Lichen, Pomegranate Peel, Nanoparticle, *BCL-2*, *CYP1A*

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI

## ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, beni her konuda destekleyen değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI'na

Tez çalışmamın nanopartikül sentezi aşamasında çok büyük yardımları dokunan kıymetli eş danışmanım Doç. Dr. Fatih Doğan KOCA'ya ve örnek seçimi sürecindeki desteklerinden dolayı kıymetli hocam Prof. Dr. Mehmet Gökhan HALICI'ya

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda benden destek ve ilgisini esirgemeyen, bilgilerini benimle paylaşan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ'a Sağladıkları olanaklardan dolayı Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Uygulama Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (AUMAULAB) ve tüm merkez çalışanlarına,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve enerji kaynağım olan kıymetli yol arkadaşım Cemil ÇIĞIR'a,

sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                 | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                      | iv    |
| ABSTRACT.....                                                   | v     |
| ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....                                          | vi    |
| İÇİNDEKİLER .....                                               | vii   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                         | x     |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                           | xii   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                            | xiv   |
| 1. GİRİŞ .....                                                  | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                          | 2     |
| 2.1. Nanoteknoloji .....                                        | 2     |
| 2.2. Nanopartikül .....                                         | 3     |
| 2.3. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları .....                  | 3     |
| 2.4. Nanopartikül Sentezi .....                                 | 4     |
| 2.5. Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Biyolojik Ajanlar ..... | 6     |
| 2.5.1. Mikroorganizmalar .....                                  | 6     |
| 2.5.2. Algler .....                                             | 7     |
| 2.5.3. Mantarlar ve likenler .....                              | 7     |
| 2.5.4. Bitkiler .....                                           | 8     |
| 2.6. Kanser .....                                               | 9     |
| 2.6.1. Kanserin genelleştirilmiş tanımı .....                   | 9     |
| 2.6.2. Sitotoksosite ve MTT testi .....                         | 10    |



|                                                                                      | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.6.3. Kolon kanseri epidemiyolojisi .....                                           | 10    |
| 2.6.4. Kolon kanseri risk faktörleri .....                                           | 11    |
| 2.6.5. Kanser araştırmalarında biyobelirteçler .....                                 | 12    |
| 2.6.6. Kanser biyobelirteçlerinin biyomoleküllere göre sınıflandırılması .....       | 13    |
| 2.6.7. Kanser araştırmalarında kullanılan genler .....                               | 14    |
| 2.6.8. <i>Sitokrom p450</i> geni .....                                               | 14    |
| 2.6.9. <i>BCL2</i> geni .....                                                        | 15    |
| 3.MATERYAL VE YÖNTEM .....                                                           | 16    |
| 3.1. Nanomalzemelerin Sentezi .....                                                  | 16    |
| 3.1.1. <i>Cladonia foliacea</i> likeni ve nar kabuğu özütlerinin elde edilmesi ..... | 16    |
| 3.1.2. Çiçek şekilli hibrit nanoyapıların sentezi .....                              | 16    |
| 3.2. Nanomalzemelerin Karakterizasyonu .....                                         | 16    |
| 3.3. Hücre Kültürü .....                                                             | 17    |
| 3.4. Moleküler Biyolojik Çalışmaları .....                                           | 18    |
| 3.4.1. Total RNA izolasyonu.....                                                     | 18    |
| 3.4.2. DNaz uygulaması.....                                                          | 18    |
| 3.4.3. cDNA (Tamamlayıcı zincir) sentezi.....                                        | 18    |
| 3.4.4. Primer dizaynı.....                                                           | 20    |
| 3.4.5. Real-Time PCR reaksiyonu.....                                                 | 21    |
| 4. BULGULAR.....                                                                     | 23    |
| 4.1. Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyon Sonuçları.....                    | 23    |

|                                                                | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------|-------|
| 4.2. MTT Analiz Sonuçları.....                                 | 25    |
| 4.3. Moleküler Biyolojik Analiz Sonuçları.....                 | 28    |
| 4.4. Real-Time PCR Sonuçlarının Normalizasyonu ve Analizi..... | 30    |
| 5. TARTIŞMA .....                                              | 39    |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİ .....                                        | 44    |
| KAYNAKLAR .....                                                | 46    |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                 | 53    |



## ÇİZELGELER DİZİNİ

| Çizelge                                                                                                                                                                                                 | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 2. 1. NP'lerin kullanım alanları.....                                                                                                                                                           | 4     |
| Çizelge 3. 1. Çiçek şekilli hibrit nanoyapıların karakterizasyonu.....                                                                                                                                  | 17    |
| Çizelge 3. 2. RNase free tüpe eklenen bileşenler .....                                                                                                                                                  | 18    |
| Çizelge 3. 3. Total RNA ve primer karışımının bileşenleri ve son konsantrasyonları..                                                                                                                    | 19    |
| Çizelge 3. 4. Ters transkripsiyon reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları...                                                                                                                | 19    |
| Çizelge 3. 5. Ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirildiği program.....                                                                                                                         | 20    |
| Çizelge 3. 6. Çalışmada kullanılan genler için tasarlanan Real-Time PCR primer dizileri.....                                                                                                            | 20    |
| Çizelge 3. 7. Optimize edilen ve kullanılan Real-Time PCR bileşenleri ve bunların konsantrasyonları.....                                                                                                | 21    |
| Çizelge 3. 8. Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program .....                                                                                                                                   | 22    |
| Çizelge 4. 1. Elde edilen Cu-çiçek şekilli nano yapılara ait karakterizasyon (FE-SEM, EDX) sonuçları.....                                                                                               | 23    |
| Çizelge 4. 2. MTT analizi sonucu belirlenen dozlara göre nar kabuğu ile elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulanan hücrelerden elde edilen total RNA'ların saflık ve miktar tayinleri.....               | 25    |
| Çizelge 4. 3. DLD-1 ve CCD18-Co hücre hatlarında nar kabuğu bitkisinden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulamasının MTT sonuçları.....                                                                | 27    |
| Çizelge 4. 4. MTT analizi sonucu belirlenen dozlara göre <i>Cladonia foliacea</i> ile elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulanan hücrelerden elde edilen total RNA'ların saflık ve miktar tayinleri..... | 29    |
| Çizelge 4. 5. MTT analizi sonucu belirlenen dozlara göre nar kabuğu ile elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulanan hücrelerden elde edilen total RNA'ların saflık ve miktar tayinleri.....               | 29    |

| Çizelge                                                                                                                                                                                                                                 | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 4. 6. <i>Cladonia foliacea</i> likeninden elde edilen nanopartikül uygulaması sonucunda DLD-1 hücrelerine ait normalize edilmiş Real-Time PCR sonuçları.....                                                                    | 30    |
| Çizelge 4. 7. <i>Cladonia foliacea</i> likeninden elde edilen nanopartikül uygulaması yapılan DLD-1 hücrelerine ait normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları.....     | 31    |
| Çizelge 4. 8. Nar kabuğundan elde edilen nanopartikül uygulaması sonucunda DLD-1 hücrelerine ait normalize edilmiş Real-Time PCR sonuçları....                                                                                          | 31    |
| Çizelge 4. 9. Nar Kabuğundan elde edilen nanopartikül uygulaması yapılan DLD-1 hücrelerine ait normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları.....                          | 32    |
| Çizelge 4. 10. <i>Cladonia foliacea</i> likeninden elde edilen nanopartikül uygulaması sonucunda CCD18-Co hücrelerine ait normalize edilmiş Real-Time PCR sonuçları.....                                                                | 32    |
| Çizelge 4. 11. <i>Cladonia foliacea</i> likeninden elde edilen nanopartikül uygulaması yapılan CCD18-Co hücrelerine ait normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları..... | 33    |
| Çizelge 4. 12. Nar kabuğundan elde edilen nanopartikül uygulaması sonucunda CCD18-Co hücrelerine ait normalize edilmiş Real-Time PCR sonuçları.....                                                                                     | 33    |
| Çizelge 4. 13. Nar Kabuğundan elde edilen nanopartikül uygulaması yapılan CDD18-Co hücrelerine ait normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin o ortalama, standart hata ve standart sapmaları.....                    | 34    |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil                                                                                                                                                                                                                                                       | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2. 1. Makro materyaller ve nano boyut.....                                                                                                                                                                                                            | 2     |
| Şekil 2. 2. Nanomateryal boyutları.....                                                                                                                                                                                                                     | 3     |
| Şekil 2. 3. Nanoteknolojide sentez yaklaşımları.....                                                                                                                                                                                                        | 5     |
| Şekil 2. 4. Nanopartiküllerin avantajları.....                                                                                                                                                                                                              | 6     |
| Şekil 4. 1. Nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli nano yapıya ait karakterizasyon (FE-SEM) sonuçları.....                                                                                                                                             | 24    |
| Şekil 4. 2. <i>Cladonia foliacea</i> likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nano yapıya ait karakterizasyon (FE-SEM) sonuçları.....                                                                                                                        | 24    |
| Şekil 4. 3. <i>Cladonia foliacea</i> liken türünden biyolojik sentez yoluyla elde edilen Cu-çiçek şekilli NP'nin 24 saatlik uygulaması sonucunda DLD-1 hücrelerinde ( $5 \times 10^3$ hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi.....    | 26    |
| Şekil 4. 4. <i>Cladonia foliacea</i> liken türünden biyolojik sentez yoluyla elde edilen Cu-çiçek şekilli NP'nin 24 saatlik uygulaması sonucunda CCD18-Co hücrelerinin ( $5 \times 10^3$ hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi..... | 26    |
| Şekil 4. 5. Nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP'nin 24 saatlik uygulaması sonucunda DLD-1 hücrelerinde ( $5 \times 10^3$ hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi .....                                                     | 28    |
| Şekil 4. 6. Nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP'nin 24 saatlik uygulaması sonucunda CCD18-Co hücrelerinin ( $5 \times 10^3$ hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi .....                                                  | 28    |
| Şekil 4. 7. <i>Cladonia foliacea</i> likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması yapılmış DLD-1 hücre örneklerinde belirlenen dozlara bağlı <i>CYP1A1</i> ve <i>BCL-2</i> genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler.....                        | 35    |
| Şekil 4. 8. <i>Cladonia foliacea</i> likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması yapılmış CCD18-Co hücre örneklerinde belirlenen dozlara bağlı <i>CYP1A1</i> ve <i>BCL-2</i> genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler.....                     | 36    |

| Şekil                                                                                                                                                                                                               | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 4. 9. Nar Kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması yapılmış DLD-1 hücre örneklerinde belirlenen dozlara bağlı <i>CYP1A1</i> ve <i>BCL-2</i> genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler.....     | 37    |
| Şekil 4. 10. Nar Kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması yapılmış CCD18-Co hücre örneklerinde belirlenen dozlara bağlı <i>CYP1A1</i> ve <i>BCL-2</i> genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler..... | 38    |



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, yanda açıklamaları verilmek üzere aşağıda listelenmiştir.

| Simgeler        | Açıklama                  |
|-----------------|---------------------------|
| %               | Yüzde                     |
| °C              | Santigrat Derece          |
| µg              | Mikrogram                 |
| µL              | Mikrolitre                |
| µM              | Mikromolar                |
| cm <sup>2</sup> | Santimetre Kare           |
| dk              | Dakika                    |
| g               | Gram                      |
| M               | Molar                     |
| ml              | Mililitre                 |
| mM              | Milimolar                 |
| ng              | Nanogram                  |
| ng/ml           | Mililitre Başına Nanogram |
| nm              | Nanometre                 |
| rpm             | Dakikadaki Devir Sayısı   |
| s               | Saniye                    |

| <b>Kısaltmalar</b> | <b>Açıklama</b>                            |
|--------------------|--------------------------------------------|
| A549               | İnsan akciğer kanser epitel hücre hattı    |
| Ag                 | Gümüş                                      |
| AGS                | İnsan mide karsinomu                       |
| AMJ-13             | Meme kanseri hücresi                       |
| Au                 | Altın                                      |
| CCD18-Co           | Sağlıklı kolon hücresi                     |
| cDNA               | Tamamlayıcı DNA                            |
| CO <sub>2</sub>    | Karbondioksit                              |
| COLO205            | İnsan kolon kanseri hücre hattı            |
| Ct                 | Cycle treshold                             |
| Cu                 | Bakır                                      |
| CuO                | Bakır Oksit                                |
| DLD-1              | Kolon kanseri hücresi                      |
| DMSO               | Dimetil sülfoksit                          |
| DNA                | Deoksiriboz nükleik asit                   |
| EDX                | Enerji dağıtıcı x-ışını spektroskopisi     |
| FESEM              | Alan emisyonu taramalı elektron mikroskobu |
| FT-IR              | Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopu  |
| HCT                | İnsan kolon kanseri hücre hattı            |
| HEK293             | İnsan embriyonik böbrek hücre hattı        |
| HT29               | İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı     |
| IC50               | %50 baskılayıcı konsantrasyon              |
| LOH                | Heterozigotluk kaybı                       |



|        |                                               |
|--------|-----------------------------------------------|
| miRNA  | MikroRNA                                      |
| MSI    | Mikrosatellit instabilitesi                   |
| NCBI   | National center for biotechnology information |
| NGS    | Next-generation sequencing                    |
| NIH    | National institutes of health                 |
| NP     | Nanopartikül                                  |
| PBS    | Phosphate buffer saline                       |
| pH     | Power of hydrogen                             |
| Pt     | Platin                                        |
| RNA    | Ribonükleik asit                              |
| SKBR3  | Meme kanseri hücresi                          |
| SKOV-3 | Yumurtalık kanseri hücresi                    |
| SNP    | Tek nükleotid polimorfizm                     |
| SW480  | İnsan kolon kanseri hücre hattı               |

## 1. GİRİŞ

Kanser, bireyin yaşam kalitesini büyük ölçüde bozabilen ve küresel olarak yaygın görülen ölümcül hastalıklardan biridir. Teknolojik gelişmelerin hızla yayılması nedeniyle kanser gibi hayatı tehdit eden genetik hastalıklar artmıştır. Tehlikeli toksik maddelere maruz kalınması, hücresel sistemin standart mekanizmasını değiştirebilir ve sonuçta genetik hasara neden olabilir. Ayrıca, yetersiz meyve ve sebze içeren zayıf bir diyet ve sigara kullanımı gibi faktörler kanser riskini artırabilir. Erken aşamada teşhis ve tedavi sayesinde hastaların hayatta kalma süreleri uzatılabilir. Günümüzde gelişen teknolojiyle birlikte kanserin tanı ve tedavisinde olumlu gelişmeler gözlenmektedir (Esmeeta ve diğerleri, 2022).

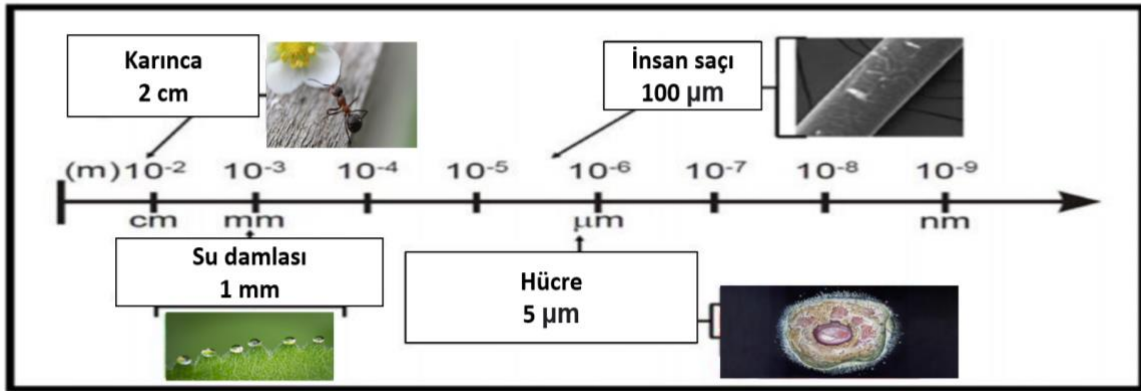
“Nanoteknoloji” kavramı 1959 yılında Richard Feynman tarafından ortaya atılmış ve 1974 yılında Norio Taniguchi tarafından isimlendirilmiştir (Miyazawa ve diğerleri, 2021). Bu teknoloji çevre dostu eşsiz özelliklere sahip olup tıp, fizik, kimya, biyoloji, kozmetik ve elektronik gibi çeşitli disiplinler arası çalışmalara olanak sağlayan ve hızla büyüyen önemli bir alandır (Fawzy ve diğerleri, 2021). Nanoteknoloji, nano ölçekte gelişmiş fonksiyonel materyaller geliştirmek için biyoloji, kimya, malzeme bilimi ve fizik gibi çeşitli bilimsel disiplinlerdeki araştırmacıları bir araya getiren multidisipliner bir alan olup endüstriyel ve biyomedikal uygulamalar için çeşitli yeni nanomalzeme türlerinin sentezine izin vermektedir. Nanoteknoloji, genellikle yeni uygulamaları mümkün kılan malzemelerin benzersiz özelliklerinin ortaya çıktığı bir ölçek olan nano ölçekli boyutta maddelerin anlaşılmasını ve çeşitli nanopartiküllerin (NP) sentezi, karakterizasyonu ve uygulamaları ile ilgilenir (Liao, Li ve Tjong, 2019).

NP’ler, 100 nm’den küçük partiküller olarak tanımlanır. Küçük boyut ve geniş yüzey alanı, NP’lerin kozmetik, elektronik ve tıbbi uygulamalar gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmasını sağlar (Missaoui ve diğerleri, 2021). NP’lerin geniş yüzey alanları ve yüksek ısıya karşı dayanıklı olmaları bilim insanlarının dikkatini çekmekte ve bu konu üzerinde yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir (Baran, 2018). NP’ler genel olarak organik ve inorganik olmak üzere iki grupta sınıflandırılır. Organik NP’ler karbon, inorganik NP’ler ise altın (Au) ve gümüş (Ag) gibi soy metal veya çinko oksit ve titanyum oksit gibi yarı iletken elementler içerir (Moghaddam ve diğerleri, 2015).

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nanoteknoloji

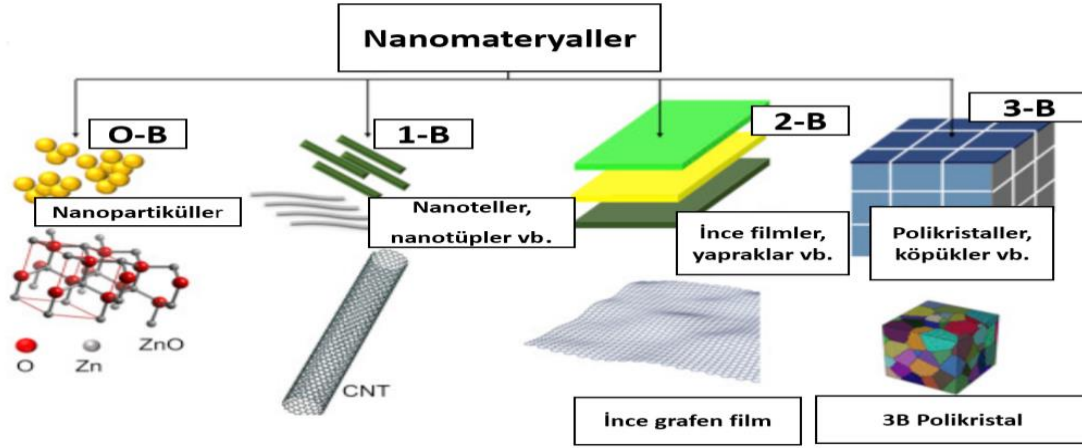
Nanoteknoloji, teşhis ve tedavi uygulamaları için nanomateryal bazlı ürünlerin geliştirildiği hemen hemen her bilim alanında genişleyen bir araştırma ve yenilik alanını temsil etmektedir. Etimolojik kökeni Yunancaya dayanan ‘nano’ sözcüğü ‘cüce’ anlamına gelmektedir. 1 nm metrenin milyarda birini gösterir. Nanobilim, 1 ile 100 nm arasında değişen nm ölçeklerinde olan yapıların incelenmesidir. Bunu cihazlar gibi pratik uygulamalarda kullanan teknolojiye ise nanoteknoloji denir. Daha genel geçer bir tanım yapılacak olursa boyutları 100 nm’den küçük olan yapılar, nanoteknoloji kapsamında incelenmektedir. Bu teknoloji ile birlikte geliştirilen malzemelerin boyutlarının ne kadar küçük olduğunun daha iyi anlaşılması için; tek bir insan saçının 60.000 nm kalınlığında veya deoksiriboz nükleik asit (DNA) çift sarmalının 1 nm yarıçapında olduğunu belirtmekte fayda var. (Şekil 2. 1.) (Bayda ve diğerleri, 2019).



Şekil 2. 1. Makro materyaller ve nano boyut (Bayda ve diğerleri, 2019)

Nanomalzemeler, sıfır (0B), bir (1B), iki (2B) ve üç (3B) boyutlular olmak üzere yapılarındaki partiküllerin büyüklüğüne ve geometrik şekillerine göre dört kategoride incelenir. Bu sınıflandırma nanomalzemelerin sahip olduğu elektronların hareketine bağlı olarak yapılır. 0B nanomalzemelerdeki elektronlar boyutsuz bir alandayken, 1B nano malzemelerde x ekseni boyunca hareket edebilen elektronlar bulunmaktadır. Bunlarla birlikte, 2B ve 3B nanomalzemeler sırasıyla x – y ekseni ve x, y, z ekseni boyunca elektron

hareketine sahip olup aşağıdaki şekilde daha net bir şekilde gösterilmeye çalışılmıştır (Şekil 2. 2.) (Pokropivny ve Skorokhod, 2007; Malhotra ve Ali, 2018).



Şekil 2. 2. Nanomateriyal boyutları (Malhotra ve Ali, 2018)

## 2.2. Nanopartikül

NP'ler, boyutları 1 ila 100 nm arasında değişkenlik gösteren organik, inorganik veya hibrit malzemeler olup geniş yüzey alanlarından dolayı yüksek yüzey enerjisine sahip parçacıklardır. Genel olarak küre, çubuk, tel, küp, koni ve spiral gibi çeşitli şekil ve yapılar sahip olan NP'ler; fotokimyasal reaksiyonlar, volkanik patlamalar, orman yangınları, basit erozyonlar, bitkiler, hayvanlar hatta mikroorganizmalar tarafından üretilebilir (Dahoumane ve diğerleri, 2017). Bitki ve mikroorganizma kaynaklı NP'lerin üretimi, diğer yollara kıyasla çevre dostu olmaları ve üretim sürecinin basitliği nedeniyle son zamanlarda bilim adamlarının odak noktası haline gelmiştir. Günümüzde NP sentezi için bakteri, alg ve mantar dâhil olmak üzere bir dizi bitki türü ve mikroorganizma kullanılmaktadır (Panpatte, Jhala, Shelat ve Vyas, 2016).

## 2.3. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

NP'ler, nano ölçekli boyutları sayesinde benzersiz katalitik, optik, manyetik ve elektriksel özelliklere sahiptir (Thamima ve Karuppuchamy, 2014). Bu özellikleri sayesinde NP'lerin kullanım alanları her geçen gün artmaktadır. Kalay oksit, demir oksit, çinko oksit ve

titanyum gibi metal oksit nanoparçacıkları çeşitli cihaz uygulamalarında önemli bir rol oynamaktadır (Biswas ve diğerleri, 2023). Ayrıca tıp ve sağlık, tarım ve gıda, çevre ve enerji, havacılık ve uzay gibi birçok alanda da yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Mboniyirivuze ve diğerleri, 2015). Genel olarak NP'lerin kullanım alanları aşağıda verilen çizelgede özetlenmiştir; (Çizelge 2. 1) (Denkbaş, 2015).

Çizelge 2. 1. NP'lerin kullanım alanları (Denkbaş, 2015).

| Sektör                         | Uygulama                                                                                                               |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biyomühendislik, tıp ve sağlık | Kemik doku mühendisliği, Pansuman malzemeleri, Elektronik veri toplama aletleri, ilaç transferi, moleküler görüntüleme |
| Çevre ve enerji                | Hava ve su arıtımı                                                                                                     |
| Ev işleri                      | Seramik, cam ve pencere temizleme materyalleri                                                                         |
| İnşaat                         | Boya, vernik, plastik üretimi                                                                                          |
| Kozmetik                       | Güneş kremi, diş macunu                                                                                                |
| Mühendislik                    | Makineler için koruyucu kaplamalar                                                                                     |
| Otomotiv                       | Araba aletleri, Sensörler, katalizörler                                                                                |
| Savunma                        | İnsansız hava araçları, akıllı mermiler, akıllı üniformalar                                                            |
| Spor materyalleri              | Tenis racketleri                                                                                                       |
| Tarım ve gıda                  | Nanogübre, tarım araçları                                                                                              |
| Tekstil                        | Yanmayan ve çarpmaya dayanıklı yüzeyler, suya dayanıklı kumaşlar                                                       |

## 2.4. Nanopartikül Sentezi

NP'lerin geleneksel olarak sentezlenmesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. NP'lerin sentezinde çeşitli hazırlama yöntemlerini içeren ve çok eski zamanlardan beri bilinen bu yöntemler 'yukarıdan aşağı' ve 'aşağıdan yukarıya' olmak üzere

iki ana başlık altında toplanır. ‘Yukarıdan aşağıya’ olarak isimlendirilen ilk yaklaşımda birçok fiziksel ve kimyasal teknikle maddenin makro boyuttan nano boyuta indirgenmesi amaçlanmaktadır. Bu yönetime verilebilecek en güzel örnekler; aşındırma ve mekanik öğütmedir. ‘Aşağıdan yukarıya’ olarak bilinen ikinci yaklaşımda ise atomlar veya moleküller nanoyapıdaki organik veya inorganik molekülleri oluşturmak amacıyla çeşitli kimyasal reaksiyonlar aracılığıyla bir araya gelir. Nanopartiküllerin sentezinde sıklıkla ‘aşağıdan yukarıya’ olan yaklaşım görülür (Şekil 2. 3.) (Ateş, 2015).

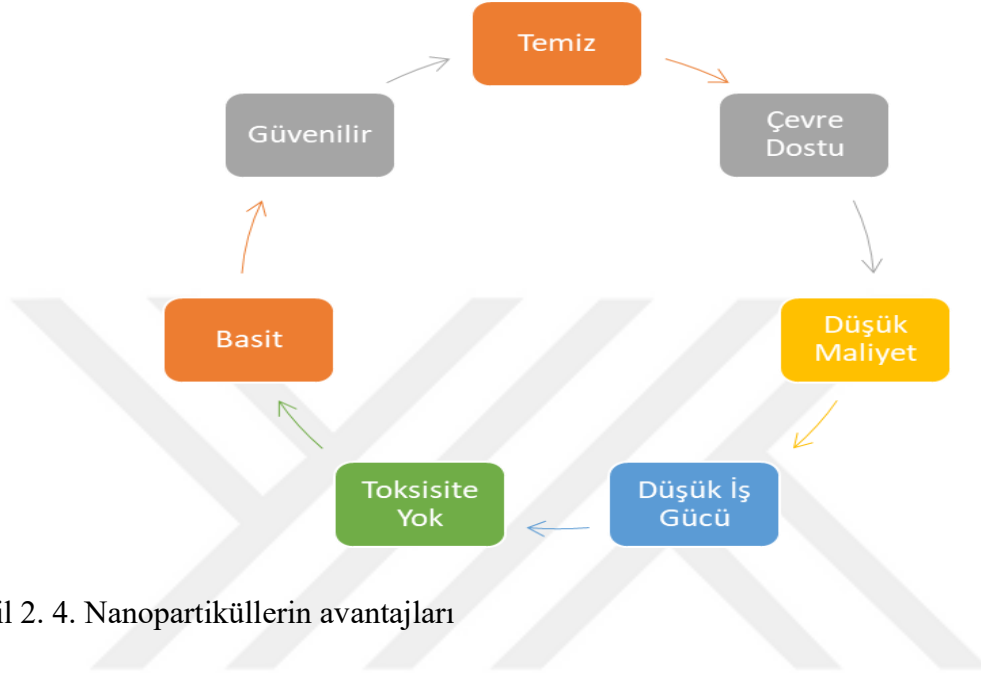


Şekil 2. 3. Nanoteknolojide sentez yaklaşımları (Ateş, 2015)

NP’lerin fiziksel sentezi kimyasal buhar biriktirme, termal buharlaşma, darbeli lazer birikimi, moleküler ışın epitaksisi gibi yöntemleri içermektedir. Ancak bu yöntemler yüksek enerji ve maliyet gerektirmektedir. Kimyasal yöntemler ise soljel, sonokimyasal, hidrotermal, piroliz sprey ve elektrodpozisyon gibi pahalı ve çevre dostu olmayan yöntemleri kapsamaktadır. NP’lerin fiziksel ve kimyasal sentezinde bazı toksik maddelerin kullanımı, zararlı ürün oluşumu ve maliyetli olması gibi etkenler bu yöntemler için dezavantaj oluşturmaktadır (Jassal, Kaur, Prasad ve Singh, 2022).

Biyolojik ajanlarla NP’lerin sentezi ile alakalı çalışmalar günümüzde hız kazanmıştır. NP’lerin biyosentezi; toksik olmayan, basit, ucuz ve güvenilir bir şekilde doğal canlıların kullanılması olarak tanımlanabilir (Sivaraj ve diğerleri, 2014). Biyolojik sentez, nanoparçacıkları sentezlemenin çevre dostu, uygun maliyetli bir yolu olarak kabul edilir (Şekil 2. 4.). Kök, meyve, gövde, tohum ve yaprak gibi bitki parçaları nanoparçacıkları yapmak için kullanılır. Organik asitler, proteinler, vitaminler, flavonoidler, terpenoidler ve

polisakkaritler gibi sekonder metabolitler indirgeyici ajan olarak görev yapabilmektedir (Nabi ve diğerleri, 2018). Bitki özütlerinde bulunan indirgeyici ajanların kombinasyonları farklılık gösterdiği için farklı bitki özütleri NP'lerin karakterizasyonunu etkilemektedir (Mittal, Chisti ve Banerjee, 2013).



Şekil 2. 4. Nanopartiküllerin avantajları

## 2.5. Nanopartikül Sentezinde Kullanılan Biyolojik Ajanlar

### 2.5.1. Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar tarafından salgılanan enzim, şeker ve protein gibi biyomoleküller sayesinde NP'lerin biyolojik sentezi sağlanmaktadır. Metalik nanoparçacıkların sentezi için kullanılan başlıca bakteri türleri arasında ise *Actinobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Lactobacillus spp.*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium spp.*, ve *Pseudomonas spp.* bulunmaktadır. Johnston ve arkadaşları saf Au NP'lerin *Delftia acidovorans* isimli bakteri tarafından sentezlendiğini göstermiştir (Johnston ve ark. 2013). Hussein ve arkadaşları ise yapmış oldukları çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* kullanarak altın NP'lerin biyosentezini gerçekleştirdiler (Hussein ve diğerleri, 2007). Önceki çalışmalar, NP'lerin mikroorganizmalar tarafından hücre içinde ve dışında sentezlediğini belirtmiştir. Besin, ışık, pH ve sıcaklık gibi parametrelerin ayarlanması bakteri kültürünün hazırlanması için gerekli olan bir süreçtir. Mikroorganizmalar kullanılarak NP sentezi birçok avantaj

içermesine rağmen bu süreçlerin sürekliliğinin sağlanması maliyeti artırmaktadır (Shah, Fawcett, Sharma, Tripathy ve Poinern, 2015).

### 2.5.2. Algler

Algler suda yaşayan mikroorganizmalar olup kimyasal yöntemle kıyasla çevre dostu ve ucuzdur. Bununla birlikte; tarım, ilaç, kozmetik ve medikal alanlarında kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu canlılar protein yağ, mineral ve fenolik bileşikler yönünden zengin mikroorganizmalardır. Alglerin içeriğinde bulunan hidroksil ve karboksil gibi fonksiyonel grupların, metallerin indirgenmesinde etkili olması nedeni ile NP'lerin sentezi için tercih edilmekte olan bir canlıdır (Mahdavi ve diğerleri, 2013). Senapati ve arkadaşları *Tetraselmis kochinensis* alg türüyle Au NP'nin hücre içi sentezini bildirmiştir (Senapati ve diğerleri, 2012). Yapılan başka bir çalışmada ise *Scenedesmus spp.* ile 15-20 nm boyutunda Ag NP'nin hücre içi ve hücre dışında sentezi gerçekleştirilmiştir (Jena ve diğerleri, 2014). Algler aracılığıyla sentezlenen NP'lerin boyutları pH ve sıcaklık gibi parametrelere bağlı olarak değişmektedir. Örneğin Castro ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada *Chondrus crispus* ile pH 2 ortamında sentezlenen Au NP'nin boyutunun 200 nm iken pH 4'te 30 nm boyutunda olduğunu gözlemlemişlerdir (Castro ve diğerleri, 2013).

### 2.5.3. Mantar ve likenler

Mantarlar, NP sentezi sürecinde indirgeyici rol üstlenen enzim ve proteinlerin sentezinden sorumludur. Mantarların bakterilere kıyasla yüksek biyokütle ve düşük maliyete sahip olmasından dolayı NP sentezi için kullanım avantajı sağlamaktadır (Tarannum, Divya ve Gautam, 2019). Mantarlar ve algler arasındaki simbiyotik ilişkiden kaynaklanan organizmalar olan likenler kapsamlı bir şekilde araştırılmış olan canlılardır. Son zamanlarda araştırmacılar, likenleri nanoparçacıkları sentezlemek için kullanma ve ayrıca onları antimikrobiyal ajanlar olarak kullanma olasılıklarını araştırmaktadır (Rattan, Shukla, Sharma ve Bhat, 2021). Subashini ve arkadaşı Ag NP'lerin mantarlardan sentezini ve bunların biyolojinin çeşitli alanlarındaki uygulamalarını bildirmiştir. (Subashini ve Bhuvaneswari, 2018). Arun ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada *Schizophyllum commun* ile hücre dışı sentezi gerçekleşen Ag NP'nin 51-93 nm boyutlarında ve yuvarlak şekilli olduğunu bildirmişlerdir (Arun, Eyini ve Gunasekaran, 2014). Alqahtani ve



arkadaşları ise yapmış oldukları çalışmada *Xanthoria parietina* liken özütü ile sentezledikleri AgNP'lerin antikanser aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (Alqahtani, Al Othman ve Mohammed, 2020).

#### 2.5.4. Bitkiler

NP'lerin bitki bazlı sentezi, genellikle mikroorganizmaların kullanıldığı yöntemlere göre daha kolay geliştirilebilmesi, biyolojik olarak daha az tehdit oluşturması ve hücre kültürü büyütme aşamasını içermemesi nedeniyle daha fazla benimsenmektedir (Tarannum ve diğerleri, 2019). Mohammadinejad ve arkadaşları yakın zamanda *Sesbania drummondii*, *Ipomoea lacunosa*, *Festuca rubra* ve *Arabidopsis thaliana* dâhil olmak üzere NP'lerin hücre içi sentezinde yer alan en önemli bitkileri listeledi. Dokularında NP'lerin üretimi için en çok çalışılan bitki türü *Medicago sativa*, ardından *Brassica juncea* 'dır. Bu türler şimdiye kadar Ag, Au, bakır (Cu) ve platin (Pt) NP'lerin sentezinde yer almıştır (Mohammadinejad ve diğerleri, 2019). NP sentezinde mikroorganizmaların yerine bitki özütlerinin kullanılmasıyla birlikte hücre kültürünün devamlılığını sağlamak gibi ayrıntılı bir dizi işleme ihtiyaç duyulmamaktadır (Tarannum ve diğerleri, 2019). Ayrıca ağaç ve meyve kabuklarının NP sentezinde kullanılması hem ekonomik açıdan hem de atık maddelerin değerlendirilmesi açısından avantaj sağlamaktadır. Çalışmamızda kullandığımız nar bitkisi önemli fitokimyasalları içermesinden dolayı araştırmacılar için tıbbi bir değere sahiptir. Narın kabuğu, yaprakları, suyu ve yağı; flavonlar, antosiyanidinler, alkaloidler ve luteolin başta olmak üzere birçok fitokimyasal maddeyi içerir (Khan, Alanazi, Alsaif, Wani ve Bhat, 2021). Çok sayıda çalışma, bu önemli fitokimyasalların antikanser ve antioksidan özelliklerini göstermiştir (Nisha ve diğerleri, 2015). Bununla birlikte nar bitkisinin kanser tedavisi için çok çeşitli farmakolojik etkileri de rapor edilmiştir (Annu ve diğerleri, 2018).

### 2.6. Kanser

#### 2.6.1. Kanserın genelleştirilmiş tanımı

Kanser, dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer alan ve günümüzde insan sağlığını tehdit eden en ciddi hastalıklardan biridir (Yang ve diğerleri, 2022). Bu

hastalık, organizmaya ait hücrelerin farklı nedenlerden dolayı kontrolsüz şekilde çoğalması olarak tanımlanmaktadır. DNA hasarı tamir mekanizmalarındaki genetik değişiklikler, bazı tümör baskılayıcı genlerin işlevlerinde meydana gelen kayıplar, proto-onkogenlerin mutasyona uğraması sonucu onkogenlere dönüşmesi ve apoptozda görev alan genlerin ekspresyon düzeyinde değişiklik meydana gelmesi kansere neden olan olaylar olarak bilinmektedir (Kreeger ve Lauffenburger, 2010). Kanser başlıca sebepleri arasında genetik faktörler, mutasyonlar, sigara ve alkol kullanımı, beslenme ve hormonlar gösterilmektedir. Bireyin sahip olduğu sağlıklı hücreler belirli sinyaller sayesinde kontrol altında tutulabilirken, kanser hücreleri bu sinyallerde bağımsız olarak kendi kendini yöneterek kontrolsüz bir şekilde büyüme ve çoğalma özelliklerine sahiptirler. Kanser hücrelerindeki bu kontrolsüz şekilde çoğalma kanser türlerinin hepsinde görülen ortak bir özelliktir (Lewandowska, Rudzki, Rudzki, Lewandowski ve Laskowska, 2019).

Kanser hücrelerinin, olduğu organdan kan ve lenfatik sistem aracılığıyla farklı doku ve organlara yayılması ‘metastaz’ olarak tanımlanır. Bu hücreler ulaştıkları doku ve organlarda yeni tümörler oluşturup büyümeye devam ederler (Tavassoli ve Devilee, 2003). Kanserden dolayı yaşanan ölümlerin birçoğu metastaz sürecinin ilerleyişine bağlıdır. Metastaz süreci, tümör hücrelerinin ilk olduğu kitleden ayrılıp farklı dokulara invazyonunu ve kolonizasyon aşamasını kapsar (Svokos, Salhia ve Toms, 2014). İnvazyon doku ve organların yenilenmesinde görev almaktadır. Kanserli hücreler, kontrol sinyallerine cevap vermedikleri için dokulardan gelen sinyallere ihtiyaç duymadan kendi sinyalleriyle sürekli olarak invazyon gerçekleştirirler. Metastazın gerçekleşmesi için invazyon, tümör hücrelerinin çoğalması ve anjiyogenezis olayları olmalıdır. Tümörün büyümesinde hücrenin kontrolsüz çoğalması ve düşük apoptoz etkilidir. Bu olaylar arasındaki denge durumu tümörün çoğalmasına veya gerilemesine etki eder (Reed, 1999). Bununla birlikte tümör çeşitlerinin çoğu bulunduğu organa spesifik bir yayılma çeşidi meydana getirir. Örneğin meme kanseri metastazının, sıklıkla akciğer, karaciğer, kemik ve beyin gibi organlara yayıldığı bildirilmiştir (Ustaalioglu ve diğerleri, 2009).

### 2.6.2. Sitotoksosite ve MTT testi

Yirminci yüzyıl boyunca, yeni bir ilaç molekülünün sentezlenmesinden gerçek bir ürün haline gelmesine giden yol her zamankinden daha uzun sürdü. Sitotoksosite deneyleri, belirli bir kimyasal bileşiğin belirli bir insan hücre hattı üzerindeki etkilerini değerlendirmenin hızlı bir yoludur. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan yöntem 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür testidir (MTT). MTT yöntemi Mosmann tarafından 1983 senesinde hücre proliferasyonu yöntemi olarak bulunmuş olup aynı yıllarda kanser hücrelerinde kemoterapötik ilaçların etkisini araştırmak için kullanılmıştır. Canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile MTT solüsyonunda bulunan tetrazolium halkasını hücrelerde bulunan dehidrojenaz enzimleriyle reaksiyona girip parçalanarak formazan kristallerinin oluşmasına sebep olur. Yani, sağlam hücrelerin mitokondrisinde bulunan dehidrojenaz enzimi vasıtasıyla tetrazolium halkası parçalanarak formazana dönüştürülmektedir. MTT testi, hücre canlılığını, hücre aktivasyonunu ve hücre büyümesini ölçmek için kullanılan güvenilir bir test olarak bilinmektedir (Mosmann, 1983).

MTT testi, mitokondriyal dehidrojenaz enzimine bağlı olarak canlı hücrelerin sarı renkli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromürün suda çözünmeyen mor renge dönüşmesine bağlıdır. Mitokondriyal aktiviteyle rengin yoğunluğu direkt olarak ilişkilidir. Canlı hücrelerde aktivite olduğu zaman formazan kristalleri oluşmaktadır. Çünkü ölü hücreler formazan kristallerini oluşturmamaktadır. Özetle, MTT boyasının sarı rengi canlı aktivitesi sonucunda çözücü eklenmesiyle mora dönüşmektedir. Sonrasında bu renk değişimi mikropilaka okuyucusunda okunarak optik yoğunluk olarak veri elde edilmektedir. Sitotoksosite çalışmalarında yaygın bir şekilde MTT testinin kullanıldığı bilinmektedir.

### 2.6.3. Kolon kanseri epidemiyolojisi

Kolon kanseri dünya çapında görülen üçüncü en yaygın kanserdir ve kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (Wong, Diakos, Hugh ve Molloy, 2022). Kolon kanseri, kolonik epitel hücrelerinin anormal büyümesinden kaynaklanır ve tehlikeli bir tümörle sonuçlanır. Kolon kanseri hastalarının çoğu, bağırsak sıkışması semptomlarından şikâyet etmektedir. Hastaların %50'den fazlası, hızlı tempolu bir yaşam tarzı ve yeme alışkanlıklarındaki önemli

değişiklik nedeniyle dünya çapında gelişmiş ülkelerdendir. Vakaların çoğunu 50 veya 60 yaşın üzerindeki hastalar oluşturmaktadır. En fazla kolon kanseri vakası sayısı Avustralya ve Yeni Zelanda'da rapor edilirken, en düşük vaka sayısı Batı Afrika'da bildirildi. Küresel kanser istatistiklerine göre, 2020 yılında kolon kanseri nedeniyle 19,3 milyon yeni vaka ve 9,9 milyon ölüm tespit edildi (Esmeeta ve diğerleri, 2022). Bu kanser türü doğasına göre rastlantısal (%70'in üzerinde), ailesel (%25 civarında) ve kalıtsal kolon kanseri (%5 civarında) olmak üzere 3 tipe ayrılır (Faivre, 1994).

#### **2.6.4. Kolon kanseri risk faktörleri**

Kolon kanseri riskini artıran pek çok faktör vardır; (Esmeeta ve diğerleri, 2022, Keum ve Giovannucci, 2019).

- 50 yaşın üzerindeki bireylerin kolon kanserine yakalanma riski genç bireylere göre daha fazladır.
- Gelişmekte olan ülkelerde daha az lif tüketimi ve daha fazla hayvansal protein ve yağ tüketimi gibi batı diyetlerini kullanmaya başlayan insanlarda kolon kanseri görülme sıklığı artmaktadır.
- Hareketsiz bir yaşam tarzı, tip II diyabet ve fiziksel aktivite eksikliği kolon kanseri insidansını artırabilir.
- Aşırı alkol tüketimi vücutta asetaldehit birikmesine yol açarak DNA'ya zarar verir.
- Sigara içmek, DNA hasarına neden olan oksidatif stresi indükler ve kontrolsüz hücre proliferasyonunu teşvik edebilir.
- Prostat kanseri tedavisi sırasında radyasyon tedavisi, normal kolonik epitel DNA'sının mutasyon şansını artırabilir, kolon kanserinin ilerlemesine neden olabilir.
- 50 yaş ve üzeri kişilerde görülme sıklığı daha yüksek olan polipler iyi huylu olabileceği gibi, zaman içerisinde kansere dönüşme ihtimali de vardır.
- Birinci dereceden yakınlarda kolon kanseri öyküsü olması durumunda, kişinin kolon kanseri olma ihtimali artmaktadır.
- Meme, rahim ve yumurtalık kanserleri kolon kanserinin oluşma ihtimalinin artıran faktörlerdir.

- Ülseratif kolit ve crohn hastalığı kolon kanserinin tetikleyen etmenlerdir. Bu hastalığa sahip kişilerde kolon kanserinin görülme riski sağlıklı kişilere oranla 10 kat daha fazladır.

### 2.6.5. Kanser araştırmalarında biyobelirteçler

Biyobelirteç kavramı National Institutes of Health (NIH) tarafından ‘kanda, diğer vücut sıvılarında veya dokularda bulunan ve normal veya anormal bir sürecin, durumun veya hastalığın belirtisi olan biyolojik bir molekül’ olarak tanımlanır (Langan ve diğerleri, 2013). Hastalık taramasına ek olarak, vücudun bir tedaviye ne kadar iyi yanıt verdiğini değerlendirmek için de biyobelirteç kullanılabilir. Bir biyobelirteç; DNA, ribonükleik asit (RNA), mikroRNA (miRNA), epigenetik değişiklikler, protein ve hatta antikor ekspresyonu ile ilgili olarak mevcut olabilir. Biyobelirteç keşfi genomik alanındaki modern tıbbi araştırmalarla birlikte artmaktadır. Günümüzde biyobelirteçler, mevcut tümör örneklerinin basit bir şekilde test edilmesiyle akciğer kanseri, meme kanseri ve kolon kanserinde teşhis amaçlı rutin olarak kullanılmaktadır (Langan ve diğerleri, 2013). Kullanılacak olan biyobelirteçlerin belirlenmesi, kanserin önlenmesi, taranması ve müdahalesi için önem arz etmektedir (Herrera ve diğerleri, 2021). Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle birlikte kanser biyobelirteçleri hastalık evresine göre 4 sınıfa ayrılmıştır (Joshi, Kaur, R. ve Kaur, H. 2016);

- 1.) Öngörücü biyobelirteçler: Hasta kişinin vücudunun belirli bir tedaviye verdiği cevabını tahmin etmek amaçlı kullanılmaktadır.
- 2.) Saptama (deteksiyon) biyobelirteçler: Kanser erken tespit edebilmek için hasta kişileri taramak amacıyla kullanılır.
- 3.) Tanı (diyagnoz) biyobelirteçler: Kanser var olup olmadığını saptamak için kullanılır.
- 4.) Prognostik biyobelirteçler: Hastaların iyileşme olasılığını hesaplar ve hastalığın seyrini analiz etmemize olanak sağlar.

### 2.6.6. Kanser biyobelirteçlerinin biyomoleküllere göre sınıflandırılması

#### a. DNA biyobelirteçleri

Tek Nükleotid Polimorfizmler (SNP) DNA belirteçlerinin başında gelmektedir. SNP içerek *BRCA1*, *BRCA2*, *CYP1A1* ve *RAD1* genleri meme kanserinde kullanılan biyobelirteçlere örnek olarak gösterilebilir. Bunun dışında; epigenetik modifikasyonlar, heterozigotluk kaybı (LOH), mikrosatellit instabilitesi (MSI) ve kopya gen sayısındaki varyasyonlar da DNA biyobelirteçlerine örnek verilebilir. Aynı zamanda *Ras*, *APC*, *p53*, hücre siklusunun düzenlenmesinde yer alan siklinler ve DNA onarımıyla alakalı genlerdeki nükleotid mutasyonları da çeşitli kanser türleriyle ilişkilidir (Joshi ve diğerleri, 2016).

#### b. Mikro RNA (miRNA) biyobelirteçleri

miRNA kısa ve kodlama yapmayan RNA dizileridir. Bu küçük kodlanmayan RNA'ların kolon, akciğer, meme ve pankreas gibi birçok kanserle bağlantısı bulunmaktadır (Ding ve diğerleri, 2018). Mikrodizilim ve Next-generation sequencing (NGS) teknolojilerindeki güncel gelişmelerle birlikte bu kodlama yapmayan kısa RNA dizilerinin tümör baskılayıcı ve tümör oluşumu etkileri ile kolorektal karsinogenezde ikili bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin kolon kanseri hastalarında miR-21'in yukarı regülasyonunun onkogenik özellik gösterdiği, miR-143 ve miR-145'in ise önemli tümör baskılayıcı miRNA olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (To, Tong, Wu ve Cho, 2018).

#### c. Protein biyobelirteçler

DNA ve RNA seviyelerinde kansere bağlı değişiklikler protein seviyesinde de gözlenir, ancak gen ekspresyonu mutlaka protein ekspresyonu ile ilişkili değildir. Karmaşık ve fizyolojik değişikliklere duyarlı oldukları ve işlevlerinin çeviri sonrası değişikliklere bağlı olduğu için proteinleri incelemek nükleik asitlere kıyasla daha zordur. Kanserdeki protein biyobelirteçleri, tümör dokusunda saptanabilen aşırı eksprese edilmiş proteinleri, mutasyona uğramış proteinleri veya tümöre özgü post-translasyonel modifikasyonlara sahip proteinleri içerir (Sarhadi ve Armengol, 2022).

#### d. Gliko biyobelirteçler

Azot bağı glikanlar ve oksijen bağı glikanların ekspresyonlarının değişmesi bazı kanser türlerinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bu tip biyobelirteçlerin analizinde kütle spektrometresi yaygın olarak kullanılmaktadır. Gliko belirteçler içeren doku örnekleri ya da kan serumu, beyin omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarının kullanılmasıyla birlikte kolon, meme, pankreas gibi çeşitli kanser türleri tespit edilmektedir. Gliko belirteçlerin DNA ve RNA'ya kıyasla daha kararlı olmaları epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaları için avantaj sağlar (Joshi ve diğerleri, 2016).

#### 2.6.7. Kanser araştırmalarında kullanılan genler

Kolon kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık görülen üçüncü kanser ve kansere bağı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir, bu da yeni hücrel hedeflerin keşfedilmesi ihtiyacını vurgulamaktadır (Wang ve diğerleri, 2019).

#### 2.6.8. Sitokrom p450 geni

*Sitokrom p450*, pek çok kanserojen ve sitotoksik bileşiğin metabolizmasından sorumlu olan bir enzim grubudur. P450 ailesindeki bazı enzimler için genetik polimorfizmler tanımlanmıştır. *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* ve *CYP2E1*'i kodlayan genler ön kanserojenlerin metabolik aktivasyonundan en çok sorumlu olanlar arasındadır. Bu polimorfizmler, P450 ailesinin çoklu kanserojenlerin detoksifikasyonunda ve kanser riskinde bireyler arası büyük bir değişkenliğe neden olabilir. Örneğin yapılan bir çalışmada *CYP2C8*'nin kolon kanserinde yukarı regüle edildiğini, patogeneze katkıda bulunduğunu ve kolon kanserini önlemek veya tedavi etmek için terapötik olarak araştırılabileceğini göstermiştir (Wang ve diğerleri, 2019).

### 2.6.9. *BCL-2* geni

Apoptoz genetik olarak düzenlenen ve hücrenin kontrollü bir şekilde ölümüne neden olan biyolojik bir olaydır. Apoptozun düzenlenmesi, antiapoptotik ve proapoptotik proteinler arasındaki denge ile sağlanmaktadır. Bu hücre ölümünü düzenleyen genlerin başında *BCL-2* gen ailesi gelmektedir. Kanser hücreleri genellikle antiapoptotik *BCL-2* proteinlerini yukarı regüle eder. *BCL-2* geninin ürünü, apoptozu inhibe eden 26-kDa'lık bir proteindir. *BCL-2* proteini mitokondrinin, nükleusun ve endoplazmik retikulumun membranında lokalize olmuştur. Tümör hücreleri, *BCL-2* gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonu ile apoptoza direnç kazanabilir. Bunun sonucunda kemoterapötik ajanlardan gelen sinyallerin varlığında bile kanser hücreleri apoptozdan kaçabilir. Bu nedenle *BCL-2* ilişkili proteinler yeni anti-kanser ajanlarının geliştirilmesi adına önemli hedeflerdir (Hassan, Watari, AbuAlmaaty, Ohba ve Sakuragi, 2014).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Nanomalzemelerin Sentezi

##### 3.1.1. *Cladonia foliacea* likeni ve nar kabuğu özütlerinin elde edilmesi

*Cladonia foliacea* likeni ve nar kabuğu bitkileri yıkanıp kurutulduktan sonra 10 g tartılmış ve 100 ml distile su ile 85 °C’de yaklaşık 1 saat demlenmiştir. 5000 rpm ile 5 dk boyunca santrifüjleme işleminden sonra Whatman No 1 filtre kâğıdı ile süzülen özütler çiçek sekilli hibrit nanoyapıların sentezinde kullanılmak amacıyla muhafaza edilmiştir.

##### 3.1.2. Çiçek şekilli hibrit nanoyapıların sentezi

Çiçek şekilli hibrit nanoyapıların sentezinde optimize sentez koşullarının belirlenmesi amacıyla *Cladonia foliacea* likeni ve nar kabuğu özütlerinin farklı hacimlerde (0.5 ml, 1.5 ml) alınarak, falkon tüplerinde farklı pH’larda hazırlanmış olan 10 mM PBS tamponunda Cu ( $8 \times 10^{-4}$  M, 0.35 ml) ile vorteksleme işlemine maruz bırakılmıştır. Elde edilen karışımın karanlık bir ortamda inkübasyonundan sonra (3 gün, 4 °C) falkon tüplerinin dibinde oluşan mavi renkli çözeltiler santrifüjlenerek (10000 rpm, 10 dk), distile su ile yıkandıktan sonra etüvde (1 gece, 70 °C) kurutulmuştur. Nanoyapılar FESEM, EDX ve FT-IR analizleri ile değerlendirilmiştir (Koca, Onmaz, Yılmaz ve Öçsoy, 2020).

#### 3.2. Nanomalzemelerin Karakterizasyonu

Sentez sürecinin tamamlanması ve örneklerin kurutulmasından sonra *Cladonia foliacea* likeni ve nar kabuğu özütleri ile sentezlenen Cu çiçek sekilli hibrit nanoyapıların karakterizasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon testleri Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde (ERÜTAUM) gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3. 1).

Çizelge 3. 1. Çiçek şekilli hibrit nanoyapıların karakterizasyonu

| <b>Analiz</b> | <b>Kullanım amacı</b>                                    |
|---------------|----------------------------------------------------------|
| FESEM         | Morfolojilerinin belirlenmesi                            |
| EDX           | Nanomateriyallerin elemental bileşimin değerlendirilmesi |

### 3.3. Hücre Kültürü

Çalışmamızda Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (AUMAULAB) yetiştirilen kolon kanseri hücreleri (DLD-1) ve sağlıklı kolon hücreleri (CCD18-Co) kullanılmıştır. Bu çalışmada, hücreler inverted tıp ışık mikroskobu altında kontrol edilerek yeterli miktarda pasajlandıktan sonra 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda analiz için hazırlanmıştır. Flask yüzeyindeki yapışkan hücreler 2 kez fosfat tamponu (PBS) ile yıkandıktan sonra 1X Tripsin/EDTA solüsyonu ile kaldırıldı, besiyeri ile nötralize edildikten sonra falkon tüplerine aktararak 1600 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Daha sonra süpernatant atılarak üzerine 1 ml besiyeri ilave edilip sayıma hazır bir duruma getirilmiştir. Hazırlanan süspanse hücre solüsyonunun 10 µl'si thoma lamı kullanılarak 10 s boyandıktan sonra sayımı ışık mikroskobunda yapılmıştır. Kuyucuk başına her bir plaka için 5x10<sup>3</sup> hücre/100 µl besiyeri olacak şekilde hücreler besiyeri ile seyreltilerek plakaya ekilmiştir. (Yapılan analizler için en çok tabanı düz 96 kuyucuklu, tek kullanımlık ve steril kapaklı plakalar kullanılmıştır). Ardından %5'lik CO<sub>2</sub> ortamında 37°C'de tutunması için inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücre besiyeri, 1, 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml Cu NP solüsyonu içeren besiyeri ile yer değiştirilmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyonun sonunda her bir kuyuya ışıktan korunarak MTT çözeltisinden (5 mg/ml PBS içinde çözülüp filtrelenen MTT solüsyonu) ilave edilmiştir ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücrelerin besiyerleri tamamen çekilerek 100 µl DMSO ilave edilmiş, plaka 15 dk boyunca formazan kristallerinin çözünmesi için karanlıkta çalkalandıktan sonra ELİSA plaka okuyucu cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur.

### 3.4. Moleküler Biyolojik Çalışmalar

#### 3.4.1 Total RNA izolasyonu

Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla; kontrol ve konsantrasyon gruplarından total RNA ekstraksiyonu, üretici tarafından önerilen prosedürlere göre Qiagen (Kat. No/ID: 74034) reaktifinden RNeasy Plus Kitine göre yapılmıştır. Daha sonra Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, ABD) ve %1 agaroz jel elektroforezi kullanılarak RNA miktarı ve saflığı belirlenmiştir.

#### 3.4.2 DNaz uygulaması

İzole edilen tüm RNA örnekleri oluşabilecek DNA kontaminasyonuna karşı DNase enzimi (Thermo Scientific EN0521) ile muameleye tabii tutulmuştur. DNaz uygulama basamakları aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

- RNase free tüpe aşağıdaki tabloda yer alan bileşenler sırasıyla eklenir (Çizelge 3. 2.)

Çizelge 3. 2. RNase free tüpe eklenen bileşenler

| Bileşenler                                              | Miktar      |
|---------------------------------------------------------|-------------|
| RNA                                                     | 3 µL (1 µg) |
| 10 X Reaksiyon tamponu (MgCl <sub>2</sub> 'lü)          | 1 µL        |
| DNase enzimi (1U)                                       | 1 µL        |
| DEPC2'li ultra saf su ile son hacim 10 µL'ye tamamlanır |             |

- 37 °C'de 1 saat inkübe edilir.
- Üzerine 1 µL 50 mM EDTA eklenir.
- Daha sonra DNase inhibasyonu için 65 °C'de 10 dk inkübe edilir.

#### 3.4.3. cDNA (Tamamlayıcı Zincir) sentezi

İzole edilen tek zincirli total RNA'ların komplementer zincirleri, oligo d(T) primeri ve revers transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak, 'QuantiTec® Reverse Transcriptase Kit Qiagen, Germany' ile sentezlenmiş ve cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA sentezi için 42°C'de 1

saat inkübasyon sonrası enzimi inhibe etmek için 70°C’de 5 dk bekletilmiştir. *CYP1A1* ve *BCL-2* gen bölgelerinin uzun olması nedeni ile anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> primeri kullanılmıştır. cDNA sentezinin ilk aşamasında hazırlanan total RNA-primer karışımı ve bu karışımın içerisinde bulunan bileşenler ve son konsantrasyonları verilmiştir. Sentezlenen cDNA’lar, qPCR yapmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir (Çizelge 3. 3.)

Çizelge 3. 3. Total RNA ve primer karışımının bileşenleri ve son konsantrasyonları

| Bileşenler                              | Son Konsantrasyonlar             |
|-----------------------------------------|----------------------------------|
| Total RNA                               | 1-6 µL (1µg’a kadar)             |
| anchored-oligo(dT) <sub>18</sub> (50µM) | 2 µL                             |
| ddH <sub>2</sub> O                      | Toplam hacim 12 µL’ye tamamlanır |

cDNA sentez protokolü aşağıdaki gibi uygulanmıştır;

- Çizelge 3. 3’ de verilen bileşenler soğuk zincir içinde 0,2 mL’lik tüpe sırasıyla eklenmiştir.
- Total RNA-primer karışımı Thermo marka ısı döngü cihazında 65 °C’ de 10 dk bekletilmiş ve RNA’nın ikincil yapısının denatürasyonu sağlanmıştır.
- Sonrasında örnekler hemen buz üzerine alınmıştır. Ters transkripsiyon reaksiyonunu gerçekleştirmek için diğer bileşenler sırasıyla buz üzerinden almadan eppendorf tüpe eklenmiştir (Çizelge 3. 4.).

Çizelge 3. 4. Ters transkripsiyon reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları

| Bileşenler               | Miktar                           |
|--------------------------|----------------------------------|
| Reaction Buffer (5X)     | 4 µL                             |
| Ribolock RNase Inhibitör | 1 µL                             |
| 10 mM dNTP Mix           | 2 µL                             |
| ReversAid RT Enzyme Mix  | 1 µL                             |
| ddH <sub>2</sub> O       | Toplam hacim 12 µL’ye tamamlanır |

- Yukarda belirtilen bileşenlerle hazırlanan tüpler pipetaj işleminden sonra santrifüj edilmiştir.

- e) Ters transkripsiyon reaksiyonu Çizelge 3. 5.' te verilen program kullanılarak, Thermo marka ısı döngü cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 5. Ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirildiği program

| Primer                      | Hedef mRNA   | İnkübasyon Süresi |
|-----------------------------|--------------|-------------------|
| Anchored-oligo(dT)18 primer | 4 kb'a kadar | 65 °C'de 5 dk     |
|                             |              | 42 °C'de 60 dk    |
|                             |              | 70 °C'de 5 dk     |

- f) Elde edilen cDNA'lar Real time PCR reaksiyonu gerçekleştirilene kadar -20 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

#### 3.4.4. Primer dizaynı

Proje çalışmasında housekeeping gen olarak kullanılan *Beta-actin* ve *CYP1A1* ve *BCL-2* gen bölgelerine ait primerlerin tasarımı gen bankasında (NCBI; [National Center for Biotechnology Information](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) bulunan diziler kullanılarak yapılmıştır (Çizelge 3. 6.).

Çizelge 3. 6. Çalışmada kullanılan genler için tasarlanan Real-Time PCR primer dizileri

| Genler/<br>Primerler | Uzunluk | Gen Bank No | Sekans (5'-3')           | Tm (°C)  |
|----------------------|---------|-------------|--------------------------|----------|
| CYP1A1               | 2586 bp | BC_023019.1 | F: GAACATCCCTATTCTTCGGGG | 58-60 °C |
|                      |         |             | R: GCCATGTGGCCCTTCTGTC   |          |
| BCL-2α               | 6492 bp | NM_000633.2 | F: CCGTGGGATGCCTTTGACC   | 58-60 °C |
|                      |         |             | R: CGGAAACTGAGCAGAGTGTT  |          |
| β-Actin              | 1812 bp | NM_001101.5 | F: GGAGGCACCCAGCACTTA    | 58-60 °C |
|                      |         |             | R: GCCGATCCACACGGAGTTGA  |          |

### 3.4.5. Real-Time PCR reaksiyonu

cDNA sentezini takiben Real-Time PCR uygulamaları Thermo-Pico Real Time cihazı aracılığıyla SYBR Green-I Master boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada belirlenen hedef genlere ait diziler NCBI veritabanından araştırılmış/belirlenmiş ve bu bölgelere özgü primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler ticari olarak sentezletirilmiştir. Ayrıca normalizasyon işlemi için kullanılmak üzere housekeeping gen olarak *Beta-actin* geni seçilmiştir. Real-Time PCR reaksiyonu esnasında SYBR Green I boyası kullanılarak gerçekleştirilen kantitasyonu (miktar belirleme = ekspresyon miktarının tespiti) takiben PCR'ın etkinliğini saptamak ve herhangi bir dimer oluşumu olup olmadığını gözlemlemek amacıyla Melting Curve (Erime Eğrisi) Analizi yapılmıştır. Gıda katkı maddelerinin belirlenen en etkin dozunun kanser ile ilintili genlerin ekspresyonuna olan etkisini belirlemek amacıyla *CYP1A1* ve *BCL-2*'nin mRNA düzeyleri qPCR yöntemiyle belirlenmiştir. MTT analizinde en etkin olan dozlar için gen ekspresyon analizi yapılmıştır.

Çalışmalara başlamadan önce reaksiyon koşullarının optimizasyonu sağlanmıştır. Bunun için ön denemeler yapılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda en uygun primer ile cDNA konsantrasyonları belirlenmiştir. Real-Time PCR ön denemeleri esnasında belirlenen koşullar arasında en iyi cq (quantification of cycle) değerini veren koşullar çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Elde edilen optimal koşullar kullanılarak Real-Time PCR reaksiyonları üç teknik tekrar gerçekleştirilmiştir. Real-Time PCR reaksiyonları esnasında kullanılan bileşenleri ve konsantrasyonları ile kullanılan koşullarının verildiği çizelgeler aşağıdaki gibidir (Çizelge 3. 7. ve Çizelge 3. 8.)

Çizelge 3. 7. Optimize edilen ve kullanılan Real-Time PCR bileşenleri ve bunların konsantrasyonları

| Bileşen                 | Son Konsantrasyon  |
|-------------------------|--------------------|
| cDNA                    | 2 µL (~1,5-2,0 µg) |
| Forward Primer          | 0,5 µM             |
| Reverse Primer          | 0,5 µM             |
| SYBR Green 1 Master     | 2X                 |
| Toplam hacim 10 µl'dir. |                    |

Çizelge 3. 8. Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program

| Primer                    | Sıcaklık | Süre          | Döngü sayısı |
|---------------------------|----------|---------------|--------------|
| <b>Ön denatürasyon</b>    | 95 °C    | 10 dk         | 1            |
| <b>Denatürasyon</b>       | 95 °C    | 15 s          | 40           |
| <b>Bağlanma</b>           | 60 °C    | 30 s          |              |
| <b>Uzama</b>              | 72 °C    | 30 s          |              |
| <b>Erime Eğri Analizi</b> | 60 °C    | Sürekli Okuma | 1            |

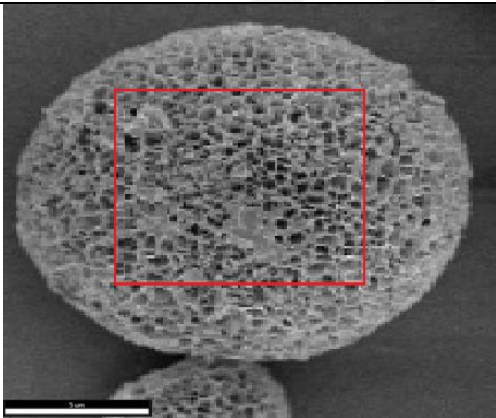
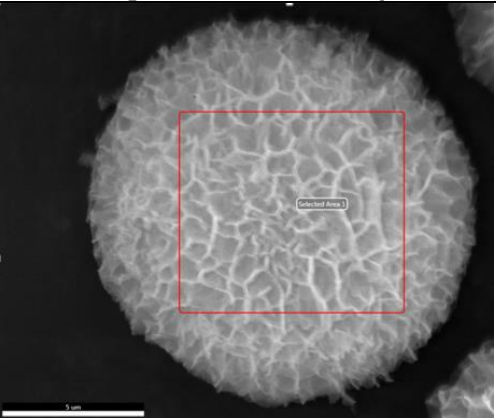
MTT analizinde en etkin olan dozlar için *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin Real-Time PCR reaksiyonu eş zamanlı olarak izlenmiş ve pik profilleri kaydedilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda Ct (Cycle Treshold) değeri reaksiyona ait pik profilinde logaritmik artış fazına geçilen döngüyü (ilk noktayı) ifade etmektedir. Her bir örneğe ait Ct değerleri elde edilen bu pik profilleri sayesinde belirlenmiştir. Sentezlenen gen ürünlerinin mRNA seviyeleri elde edilen bu Ct değerleri ve Erime Eğri Analizi aracılığıyla kantitatif olarak tespit edilmiştir.

## 4. BULGULAR

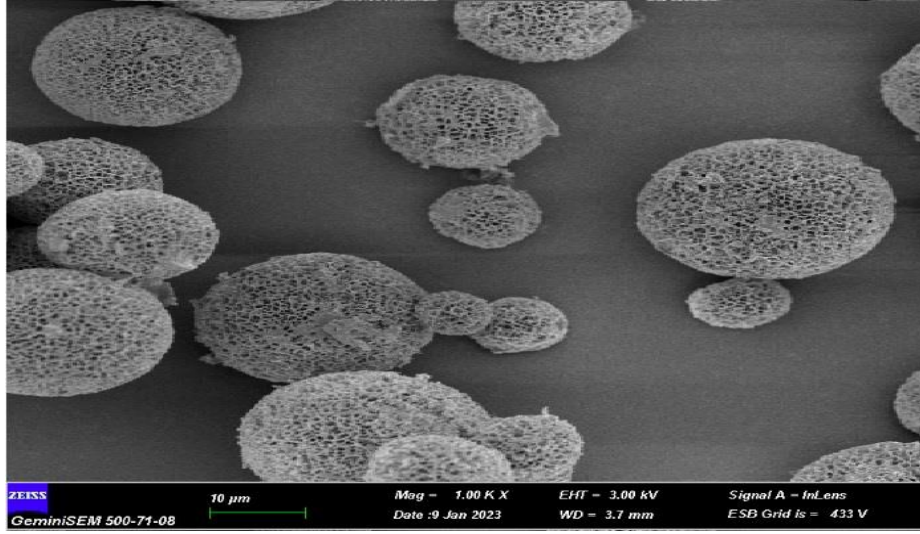
### 4.1. Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyon Sonuçları

Biyosentezi gerçekleştirilen Cu-çiçek şekilli hibrit nanoyapıların karakterizasyonu Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ve Enerji yayımlı X-Işını (EDX) analizleri ile belirlenmiştir. EDX analizi ile Cu metal varlığı ve FE-SEM analizi ile morfolojik özellikleri tespit edilmiştir. pH: 7 ve su ortamı kullanılarak sentezi yapılan Cu-çiçek şekilli hibrit nanoyapı en iyi değerleri verdiği için çalışmanın devamında bu koşulda elde edilen nano yapı tercih edilmiştir. Elde edilen Cu-çiçek şekilli nano yapıya ait karakterizasyon (FE-SEM, EDX) sonuçları Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1 ve 4.2’de verilmiştir.

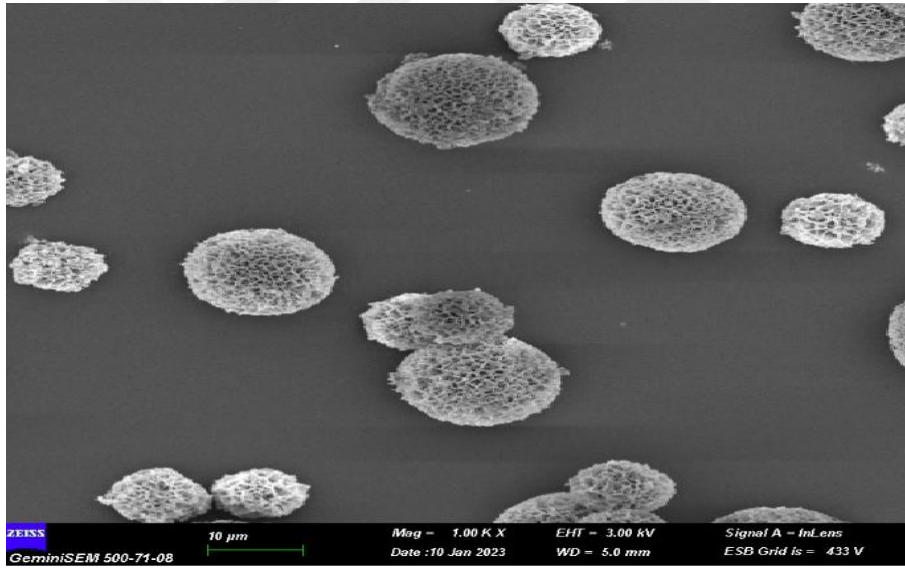
Çizelge 4. 1. Elde edilen Cu-çiçek şekilli nano yapılara ait karakterizasyon (FE-SEM, EDX) sonuçları

| Sample Name: Nar Kabuğu                                                             |  | Cu-base nanoflower       |          |          |          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--|--------------------------|----------|----------|----------|
|  |  | eZAF Smart Quant Results |          |          |          |
|                                                                                     |  | Element                  | Weight % | Atomic % | Net Int. |
|                                                                                     |  | C K                      | 33.18    | 56.7     | 1493.27  |
|                                                                                     |  | O K                      | 25.17    | 38.31    | 2764.67  |
|                                                                                     |  | NaK                      | 6.01     | 4.31     | 1362.81  |
|                                                                                     |  | P K                      | 9.06     | 5.97     | 2162.26  |
|                                                                                     |  | ClK                      | 3.77     | 2.36     | 1916.39  |
|                                                                                     |  | CuK                      | 21.83    | 3.34     | 2925.9   |
| Sample Name: <i>Cladonia foliacea</i>                                               |  | Cu-base nanoflower       |          |          |          |
|  |  | eZAF Smart Quant Results |          |          |          |
|                                                                                     |  | Element                  | Weight % | Atomic % | Net Int. |
|                                                                                     |  | C K                      | 36.17    | 48.3     | 1534.24  |
|                                                                                     |  | O K                      | 31.12    | 36.61    | 3956.72  |
|                                                                                     |  | NaK                      | 5.24     | 6.11     | 1337.74  |
|                                                                                     |  | P K                      | 6.11     | 4.57     | 2928.66  |
|                                                                                     |  | ClK                      | 3.57     | 2.56     | 1773.23  |
|                                                                                     |  | CuK                      | 17.43    | 3.12     | 2363.46  |





Şekil 4. 1. Nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli nano yapıya ait karakterizasyon (FE-SEM) sonuçları



Şekil 4. 2. *Cladonia foliacea* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli nano yapıya ait karakterizasyon (FE-SEM) sonuçları

#### 4. 2. MTT Analiz Sonuçları

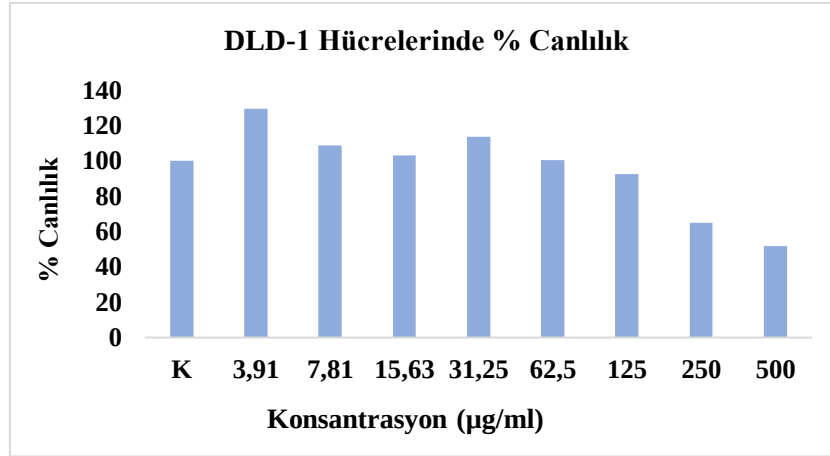
MTT sonuçları Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılık eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri hesaplanmıştır. (Sitotoksite=test absorbans değeri/kontrol absorbans değeri ortalamasıx100). Deneyler üçer kez tekrarlanmıştır ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 2.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 2. DLD-1 ve CCD18-Co hücre hatlarında *Clodonia foliacea* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulamasının MTT sonuçları

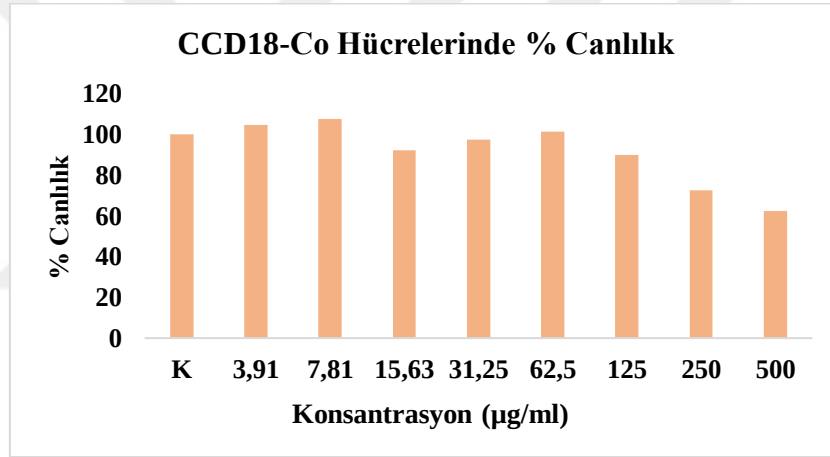
| DLD-1                                   |           |            |                                | CCD18-Co                                |           |            |                                |
|-----------------------------------------|-----------|------------|--------------------------------|-----------------------------------------|-----------|------------|--------------------------------|
| Konsantrasyon ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Absorbans | % Canlılık | IC50 ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Konsantrasyon ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Absorbans | % Canlılık | IC50 ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) |
| <b>Kontrol</b>                          | 2,224     | 100        | <b>409,370</b>                 | <b>Kontrol</b>                          | 2,295     | 100        | <b>541,078</b>                 |
| <b>500</b>                              | 1,153     | 51,809     |                                | <b>500</b>                              | 1,429     | 62,228     |                                |
| <b>250</b>                              | 1,444     | 64,920     |                                | <b>250</b>                              | 1,667     | 72,630     |                                |
| <b>125</b>                              | 2,058     | 92,508     |                                | <b>125</b>                              | 2,066     | 90,003     |                                |
| <b>62,5</b>                             | 2,234     | 100,427    |                                | <b>62,5</b>                             | 2,325     | 101,298    |                                |
| <b>31,25</b>                            | 2,528     | 113,628    |                                | <b>31,25</b>                            | 2,239     | 97,543     |                                |
| <b>15,63</b>                            | 2,292     | 103,007    |                                | <b>15,63</b>                            | 2,117     | 92,220     |                                |
| <b>7,81</b>                             | 2,416     | 108,571    |                                | <b>7,81</b>                             | 2,471     | 107,632    |                                |
| <b>3,91</b>                             | 2,880     | 129,422    |                                | <b>3,91</b>                             | 2,404     | 104,735    |                                |

Bu sonuçlara göre, *Clodonia foliacea* liken bitkisinden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulamasının DLD-1 ve CCD18-Co hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. DLD-1 hücrelerinde likenden edilen Cu-çiçek şekilli NP'nin IC50 dozu  $409,37 \mu\text{g ml}^{-1}$  iken CCD18-Co hücrelerinde likenden edilen Cu-çiçek şekilli NP'nin IC50 dozu  $541,07 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Bunun için [Test Maddesi Absorbans(ortalama) / Kontrol Absorbans (ortalama)] x100 formülü kullanılmıştır.

*Clodonia foliacea* liken türünden biyolojik sentez yoluyla elde edilen farklı konsantrasyonlardaki Cu-çiçek şekilli NP uygulaması sonucu, DLD-1 ve CCD18-Co üzerindeki sitotoksik etkileri ve buna bağlı elde edilen % canlılık değerleri ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4. 3. ve Şekil 4. 4.).



Şekil 4. 3. *Cladonia foliacea* liken türünden biyolojik sentez yoluyla elde edilen Cu-çiçek şekilli NP'nin 24 saatlik uygulaması sonucunda DLD-1 hücrelerinde ( $5 \times 10^3$  hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi



Şekil 4. 4. *Cladonia foliacea* liken türünden biyolojik sentez yoluyla elde edilen Cu-çiçek şekilli NP'nin 24 saatlik uygulaması sonucunda CCD18-Co hücrelerinin ( $5 \times 10^3$  hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi

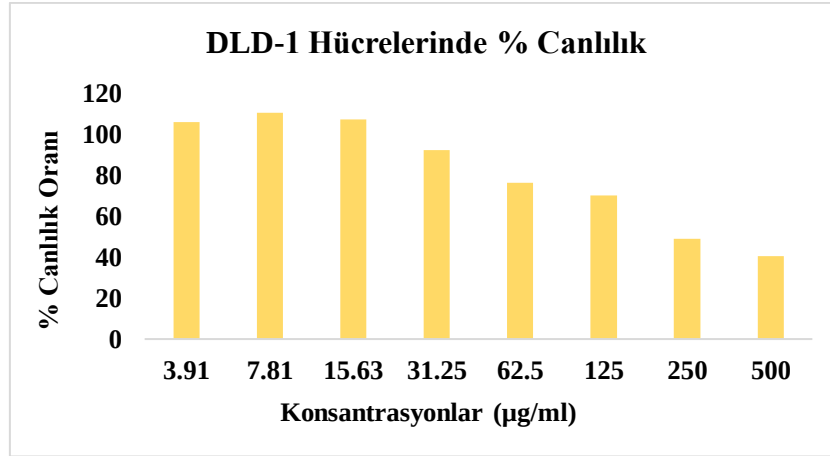
DLD-1 ve CCD18-Co hücre hatlarında nar kabuğu bitkisinden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulamasının MTT sonuçları Çizelge 4. 3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 3. DLD-1 ve CCD18-Co hücre hatlarında nar kabuğu bitkisinden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulamasının MTT sonuçları

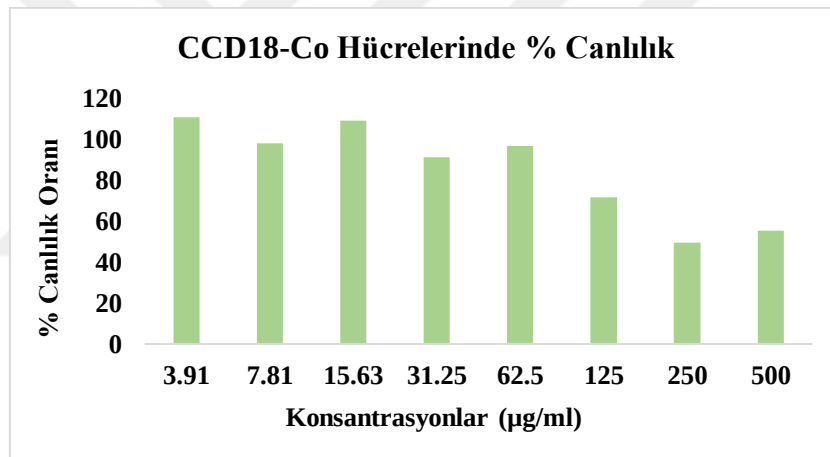
| DLD-1                                   |           |            |                                | CCD18-Co                                |           |            |                                |
|-----------------------------------------|-----------|------------|--------------------------------|-----------------------------------------|-----------|------------|--------------------------------|
| Konsantrasyon ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Absorbans | % Canlılık | IC50 ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Konsantrasyon ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Absorbans | % Canlılık | IC50 ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) |
| <b>Kontrol</b>                          | 2,66      | 100        | <b>304,338</b>                 | <b>Kontrol</b>                          | 2,240     | 100        | <b>342,852</b>                 |
| <b>500</b>                              | 1,078     | 40,475     |                                | <b>500</b>                              | 1,240     | 55,300     |                                |
| <b>250</b>                              | 1,300     | 48,812     |                                | <b>250</b>                              | 1,111     | 49,554     |                                |
| <b>125</b>                              | 1,864     | 69,949     |                                | <b>125</b>                              | 1,605     | 71,589     |                                |
| <b>62,5</b>                             | 2,034     | 76,360     |                                | <b>62,5</b>                             | 2,162     | 96,453     |                                |
| <b>31,25</b>                            | 2,455     | 92,132     |                                | <b>31,25</b>                            | 2,038     | 90,925     |                                |
| <b>15,63</b>                            | 2,854     | 107,136    |                                | <b>15,63</b>                            | 2,441     | 108,914    |                                |
| <b>7,81</b>                             | 2,944     | 110,488    |                                | <b>7,81</b>                             | 2,196     | 97,957     |                                |
| <b>3,91</b>                             | 2,822     | 105,938    |                                | <b>3,91</b>                             | 2,475     | 110,435    |                                |

Bu sonuçlara göre, nar kabuğu bitkisinden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulamasının DLD-1 ve CCD18-Co hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. DLD-1 hücrelerinde nardan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP'nin IC50 dozu  $304,33 \mu\text{g ml}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte CCD18-Co hücrelerinde nardan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP'nin IC50 dozu  $342,85 \mu\text{g ml}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Bunun için [Test Maddesi Absorbans(ortalama) / Kontrol Absorbans (ortalama)] x100 formülü kullanılmıştır.

Nar kabuğundan biyolojik sentez yoluyla elde edilen farklı konsantrasyonlardaki Cu-çiçek şekilli NP'nin uygulaması sonucu, DLD-1 ve CCD18-Co üzerindeki sitotoksik etkileri ve buna bağlı elde edilen % canlılık değerleri ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir (Şekil 4.5. ve Şekil 4. 6.).



Şekil 4. 5. Nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP'nin 24 saatlik uygulaması sonucunda DLD-1 hücrelerinde ( $5 \times 10^3$  hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi



Şekil 4. 6. Nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP'nin 24 saatlik uygulaması sonucunda CCD18-Co hücrelerinin ( $5 \times 10^3$  hücre) (%) canlılık oranlarının konsantrasyona bağlı değişimi

#### 4.3. Moleküler Biyolojik Analiz Sonuçları

*Cladonia foliacea* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulamasının DLD-1 ve CCD18-Co hücre hattı üzerindeki sitotoksik analizleri sonucunda; DLD-1 hücrelerinde Cu-çiçek şekilli NP'nin IC50 dozu  $409,370 \mu\text{g ml}^{-1}$ , CCD18-Co hücrelerinde ise IC50 dozu  $541,078 \mu\text{g ml}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Moleküler biyolojik analizler için 500, 250, 125, 62,5, 31,25 ng/ml dozlarına ve kontrol gruplarına ait izole edilen RNA'lerden elde edilen saflık ve miktar sonuçları çizelge 4.3. ve 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4. 4. MTT analizi sonucu belirlenen dozlara göre *Cladonia foliacea* ile elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulanan hücrelerden elde edilen total RNA'ların saflık ve miktar tayinleri

| Konsantrasyon<br>(ng/ml) | Saflık | ng/μl | Konsantrasyon<br>(ng/ml) | Saflık | ng/μl |
|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|
| Kontrol                  | 2,06   | 371,5 | Kontrol                  | 1,99   | 247,2 |
| 31,25                    | 2,01   | 534,9 | 31,25                    | 2,08   | 431,2 |
| 62,5                     | 2,08   | 443,1 | 62,5                     | 1,99   | 620,6 |
| 125                      | 2,02   | 524,3 | 125                      | 1,98   | 758,1 |
| 250                      | 2,00   | 325,6 | 250                      | 2,01   | 548,6 |
| 500                      | 1,99   | 447,9 | 500                      | 1,98   | 687,6 |
| DLD-1                    |        |       | CCD18-Co                 |        |       |

Çizelge 4. 5. MTT analizi sonucu belirlenen dozlara göre nar kabuğu ile elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulanan hücrelerden elde edilen total RNA'ların saflık ve miktar tayinleri

| Konsantrasyon<br>(ng/ml) | Saflık | ng/μl | Konsantrasyon<br>(ng/ml) | Saflık | ng/μl |
|--------------------------|--------|-------|--------------------------|--------|-------|
| Kontrol                  | 1,96   | 438,3 | Kontrol                  | 2,01   | 397,6 |
| 31,25                    | 1,99   | 555,2 | 31,25                    | 1,95   | 384,8 |
| 62,5                     | 1,99   | 549,9 | 62,5                     | 1,99   | 447,2 |
| 125                      | 2,03   | 284,9 | 125                      | 1,99   | 448,8 |
| 250                      | 2,08   | 404,6 | 250                      | 2,07   | 365,9 |
| 500                      | 2,10   | 587,8 | 500                      | 2,01   | 645,8 |
| DLD-1                    |        |       | CCD18-Co                 |        |       |

#### 4. 4. Real-Time PCR Sonuçlarının Normalizasyonu ve Analizi

Ct değeri olarak belirlenen gen ekspresyonu sonuçları housekeeping gen olarak çalışmada kullanılan *beta-aktin* ve kontrol şartları dikkate alınarak normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001). MTT analizinde en etkin olan dozlar için *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin Real-Time PCR reaksiyonu eş zamanlı olarak izlenmiş ve transkript profilleri housekeeping gen olarak seçilen *Beta-actin* ile karşılaştırılması yapılmıştır. Elde edilen veriler Livak ve Schmittgen'in  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metoduna göre normalize edilmiştir (Livak ve diğerleri, 2001). Bu verilerin ortalama, standart sapma, standart hata ve istatistiksel anlamlılığı SPSS 25.0 (IBM SPSS, Inc., Chicago, IL) istatistik programı ile hesaplanmıştır.

Çizelge 4. 6. *Cladonia foliacea* likeninden elde edilen nanopartikül uygulaması sonucunda DLD-1 hücrelerine ait normalize edilmiş Real-Time PCR sonuçları

| Konsantrasyon<br>(ng/ml) | <i>BCL-2</i> |       |       | <i>CYP1A1</i> |       |       |
|--------------------------|--------------|-------|-------|---------------|-------|-------|
| 31,25                    | 1,567        | 2,349 | 1,601 | 0,726         | 0,767 | 0,809 |
| 62,5                     | 3,392        | 2,432 | 4,003 | 3,350         | 3,089 | 3,002 |
| 125                      | 2,862        | 5,930 | 2,068 | 3,789         | 5,684 | 3,380 |
| 250                      | 2,392        | 2,183 | 2,757 | 1,292         | 1,494 | 0,707 |
| 500                      | 2,817        | 1,475 | 1,265 | 0,131         | 0,110 | 0,064 |

Çizelge 4. 7. *Cladonia foliacea* likeninden elde edilen nanopartikül uygulaması yapılan DLD-1 hücrelerine ait normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları

| <b>DLD-1</b>                     |                     |                      |                     |                      |                     |                      |
|----------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|                                  | Ortalama            |                      | Standart Sapma      |                      | Standart Hata       |                      |
| <b>Konsantrasyon<br/>(ng/ml)</b> | <b><i>BCL-2</i></b> | <b><i>CYP1A1</i></b> | <b><i>BCL-2</i></b> | <b><i>CYP1A1</i></b> | <b><i>BCL-2</i></b> | <b><i>CYP1A1</i></b> |
| <b>Kontrol</b>                   | <b>1</b>            | <b>1</b>             | -                   | -                    | -                   | -                    |
| <b>31,25</b>                     | <b>1,84</b>         | <b>1,56</b>          | 0,442               | 0,041                | 0,255               | 0,024                |
| <b>62,5</b>                      | <b>3,28</b>         | <b>3,26</b>          | 0,792               | 0,181                | 0,457               | 0,104                |
| <b>125</b>                       | <b>3,62</b>         | <b>3,93</b>          | 2,040               | 1,229                | 1,178               | 0,710                |
| <b>250</b>                       | <b>2,44</b>         | <b>2,08</b>          | 0,291               | 0,409                | 0,168               | 0,236                |
| <b>500</b>                       | <b>1,85</b>         | <b>0,96</b>          | 0,842               | 0,034                | 0,486               | 0,020                |

Çizelge 4. 8. Nar kabuğundan elde edilen nanopartikül uygulaması sonucunda DLD-1 hücrelerine ait normalize edilmiş Real-Time PCR sonuçları

| <b>Konsantrasyon<br/>(ng/ml)</b> | <b><i>BCL-2</i></b> |       |       | <b><i>CYP1A1</i></b> |       |       |
|----------------------------------|---------------------|-------|-------|----------------------|-------|-------|
| <b>31,25</b>                     | 1,884               | 1,219 | 1,866 | 5,736                | 0,198 | 0,454 |
| <b>62,5</b>                      | 0,708               | 2,141 | 6,440 | 1,612                | 0,980 | 3,127 |
| <b>125</b>                       | 1,970               | 4,053 | 0,849 | 0,780                | 6,152 | 3,249 |
| <b>250</b>                       | 1,779               | 2,422 | 0,810 | 1,916                | 2,299 | 2,198 |
| <b>500</b>                       | 1,506               | 0,449 | 0,951 | 1,347                | 0,860 | 1,260 |



Çizelge 4. 9. Nar Kabuğundan elde edilen nanopartikül uygulaması yapılan DLD-1 hücrelerine ait normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları

| <b>DLD-1</b>                     |                     |                      |                     |                      |                     |                      |
|----------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|                                  | Ortalama            |                      | Standart Sapma      |                      | Standart Hata       |                      |
| <b>Konsantrasyon<br/>(ng/ml)</b> | <b><i>BCL-2</i></b> | <b><i>CYP1A1</i></b> | <b><i>BCL-2</i></b> | <b><i>CYP1A1</i></b> | <b><i>BCL-2</i></b> | <b><i>CYP1A1</i></b> |
| <b>Kontrol</b>                   | <b>1</b>            | <b>1</b>             | -                   | -                    | -                   | -                    |
| <b>31,25</b>                     | <b>1,66</b>         | <b>2,13</b>          | 0,379               | 3,126                | 0,219               | 1,805                |
| <b>62,5</b>                      | <b>3,10</b>         | <b>1,91</b>          | 2,983               | 1,104                | 1,722               | 0,637                |
| <b>125</b>                       | <b>2,29</b>         | <b>3,39</b>          | 1,626               | 2,689                | 0,939               | 1,552                |
| <b>250</b>                       | <b>1,67</b>         | <b>2,14</b>          | 0,811               | 0,199                | 0,468               | 0,115                |
| <b>500</b>                       | <b>0,97</b>         | <b>1,16</b>          | 0,529               | 0,260                | 0,305               | 0,150                |

Çizelge 4. 10. *Cladonia foliacea* likeninden elde edilen nanopartikül uygulaması sonucunda CCD18-Co hücrelerine ait normalize edilmiş Real-Time PCR sonuçları

| <b>Konsantrasyon<br/>(ng/ml)</b> | <b><i>BCL-2</i></b> |       |       | <b><i>CYP1A1</i></b> |       |       |
|----------------------------------|---------------------|-------|-------|----------------------|-------|-------|
| <b>31,25</b>                     | 3,709               | 1,823 | 1,968 | 0,724                | 2,986 | 1,419 |
| <b>62,5</b>                      | 4,669               | 3,645 | 0,120 | 2,062                | 1,444 | 0,083 |
| <b>125</b>                       | 2,088               | 4,592 | 4,810 | 0,846                | 1,815 | 3,861 |
| <b>250</b>                       | 2,045               | 1,854 | 2,058 | 1,163                | 0,473 | 0,367 |
| <b>500</b>                       | 0,238               | 0,499 | 3,494 | 0,010                | 0,026 | 0,019 |

Çizelge 4. 11. *Cladonia foliacea* likeninden elde edilen nanopartikül uygulaması yapılan CCD18-Co hücrelerine ait normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları

| CCD18-Co                 |              |               |                |               |               |               |
|--------------------------|--------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
|                          | Ortalama     |               | Standart Sapma |               | Standart Hata |               |
| Konsantrasyon<br>(ng/ml) | <i>BCL-2</i> | <i>CYP1A1</i> | <i>BCL-2</i>   | <i>CYP1A1</i> | <i>BCL-2</i>  | <i>CYP1A1</i> |
| <b>Kontrol</b>           | <b>1</b>     | <b>1</b>      | -              | -             | -             | -             |
| <b>31,25</b>             | <b>2,50</b>  | <b>1,51</b>   | 1,050          | 1,158         | 0,606         | 0,669         |
| <b>62,5</b>              | <b>2,81</b>  | <b>1,94</b>   | 2,386          | 1,012         | 1,378         | 0,584         |
| <b>125</b>               | <b>3,83</b>  | <b>3,42</b>   | 1,513          | 1,539         | 0,873         | 0,889         |
| <b>250</b>               | <b>1,99</b>  | <b>1,69</b>   | 0,114          | 0,432         | 0,066         | 0,249         |
| <b>500</b>               | <b>1,41</b>  | <b>1,33</b>   | 1,809          | 0,008         | 1,045         | 0,005         |

Çizelge 4. 12. Nar kabuğundan elde edilen nanopartikül uygulaması sonucunda CCD18-Co hücrelerine ait normalize edilmiş Real-Time PCR sonuçları

| Konsantrasyon<br>(ng/ml) | <i>BCL-2</i> |       |       | <i>CYP1A1</i> |       |       |
|--------------------------|--------------|-------|-------|---------------|-------|-------|
| <b>31,25</b>             | 3,338        | 3,608 | 3,371 | 2,996         | 3,401 | 2,326 |
| <b>62,5</b>              | 6,233        | 6,530 | 2,828 | 4,147         | 4,672 | 3,331 |
| <b>125</b>               | 3,281        | 2,757 | 3,121 | 4,675         | 3,306 | 0,754 |
| <b>250</b>               | 2,858        | 1,434 | 1,344 | 2,780         | 1,139 | 1,110 |
| <b>500</b>               | 0,834        | 1,848 | 1,032 | 1,203         | 1,837 | 0,850 |

Çizelge 4. 13. Nar Kabuğundan elde edilen nanopartikül uygulaması yapılan CDD18-Co hücrelerine ait normalizasyon sonucu elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları

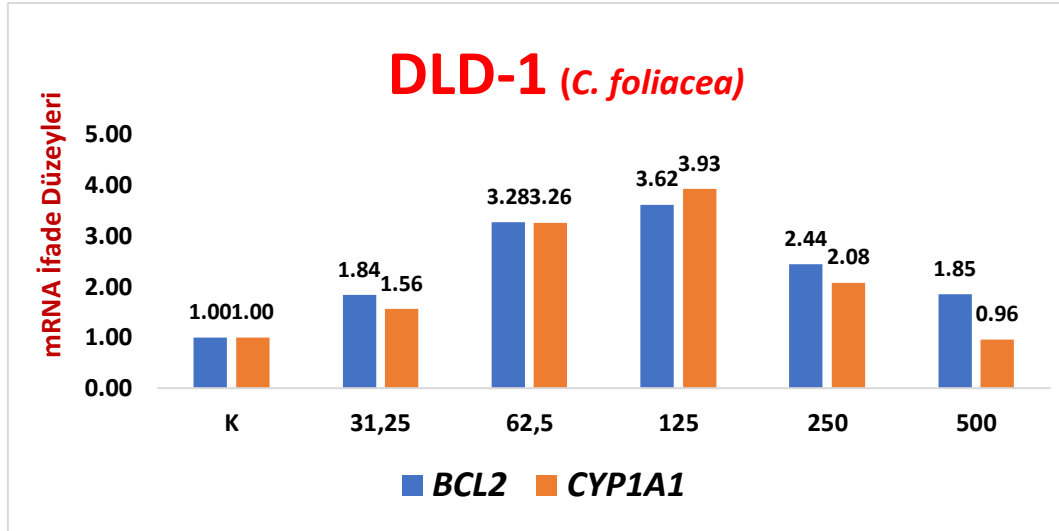
| CCD18-Co                 |              |               |                |               |               |               |
|--------------------------|--------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
|                          | Ortalama     |               | Standart Sapma |               | Standart Hata |               |
| Konsantrasyon<br>(ng/ml) | <i>BCL-2</i> | <i>CYP1A1</i> | <i>BCL-2</i>   | <i>CYP1A1</i> | <i>BCL-2</i>  | <i>CYP1A1</i> |
| <b>Kontrol</b>           | <b>1</b>     | <b>1</b>      | -              | -             | -             | -             |
| <b>31,25</b>             | <b>3,44</b>  | <b>2,91</b>   | 0,147          | 0,543         | 0,085         | 0,313         |
| <b>62,5</b>              | <b>5,20</b>  | <b>4,05</b>   | 2,057          | 0,676         | 1,187         | 0,390         |
| <b>125</b>               | <b>3,05</b>  | <b>2,91</b>   | 0,269          | 1,990         | 0,155         | 1,149         |
| <b>250</b>               | <b>1,88</b>  | <b>1,68</b>   | 0,849          | 0,956         | 0,490         | 0,552         |
| <b>500</b>               | <b>1,24</b>  | <b>1,30</b>   | 0,538          | 0,500         | 0,310         | 0,289         |

Normalize edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınmış ve elde sonuçlara göre Cu-çiçek şekilli NP uygulaması yapılmış hücrelerde *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin belirlenen doz konsantrasyonuna bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler şekiller üzerinde gösterilmiştir (şekil 4. 7., 4. 8., 4. 9. ve 4. 10.).

*Cladonia foliacea* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulanan DLD-1 örneklerinde konsantrasyona bağlı *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler ayrı ayrı değerlendirilmiştir. *BCL-2* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 ng/ml dozunda yaklaşık 3,62 katlık bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 31,25 ng/ml’ de 1,84 kat ile en düşük seviyeye ulaşmıştır. (Şekil 4. 7.). *CYP1A1* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 ng/ml dozunda yaklaşık 3,93 katlık bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 500 ng/ml’ de 0,96 kat ile en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4. 7.).

Sonuçlar göstermektedir ki, DLD-1 hücrelerinde *Cladonia foliacea* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması hiçbir konsantrasyonda *BCL-2* geni kontrol grubuna kıyasla düşmemiştir. 125 ng/ml konsantrasyonunda en yüksek seviyede eksprese olmuştur. Böylelikle 125 ng/ml konsantrasyonda daha fazla eksprese olmuş ve uygulama sayesinde

kanser hücrelerinde görülen programsız hücre çoğalması olayında etkili *BCL-2* geninin eksprese düzeyini arttırarak antikanser özellik göstermiştir. *CYP1A1* geni ise özellikle 3,93 ng/ml konsantrasyonunda en yüksek eksprese seviyesine ulaşmış ve antikanser özellik göstermiştir.

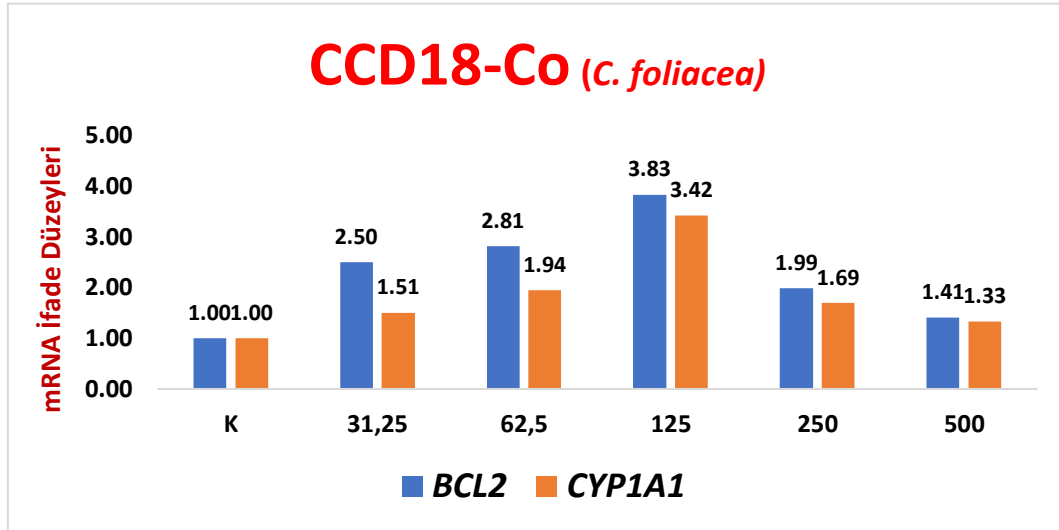


Şekil 4. 7. *Cladonia foliacea* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması yapılmış DLD-1 hücre örneklerinde belirlenen dozlara bağlı *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler

*Cladonia foliacea* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulanan CCD18-Co örneklerinde konsantrasyona bağlı *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler ayrı ayrı değerlendirilmiştir. *BCL-2* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 ng/ml dozunda yaklaşık 3,83 katlık artış tespit edilmiştir. Bununla birlikte *CYP1A1* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 ng/ml dozunda yaklaşık 3,42 katlık bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 500 ng/ml’de 1,33 kat ile en düşük seviyeye ulaşmıştır. 31,25 ng/ml doz uygulamasında ise yaklaşık 1,34 kat artış göstermiştir (Şekil 4. 8.). *Cladonia foliacea* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması yapılmış CCD18-Co hücrelerinde *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin belirlenen doz konsantrasyonuna bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler Şekil 4. 8.’de gösterilmiştir.

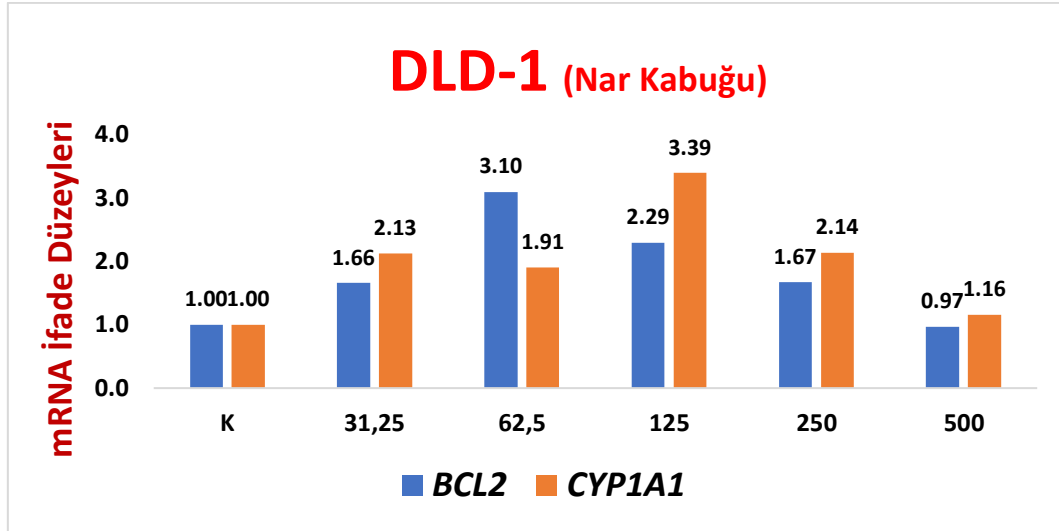
Sonuçlar değerlendirildiğinde, CCD18-Co hücrelerinde *Cladonia foliacea* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması bütün konsantrasyonda *BCL-2* ve *CYP1A1* geni kontrol grubuna kıyasla artmıştır. Böylelikle bütün konsantrasyonlarda daha çok eksprese

olmuş ve uygulama sayesinde kanser hücrelerinde görülen programsız hücre çoğalması olayında koruyucu etkisi olan *BCL-2* ve *CYP1A1* geninin eksprese düzeyini arttırarak antikanser özellik göstermiştir.



Şekil 4. 8. *Cladonia foliacea* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması yapılmış CCD18-Co hücre örneklerinde belirlenen dozlara bağlı *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler

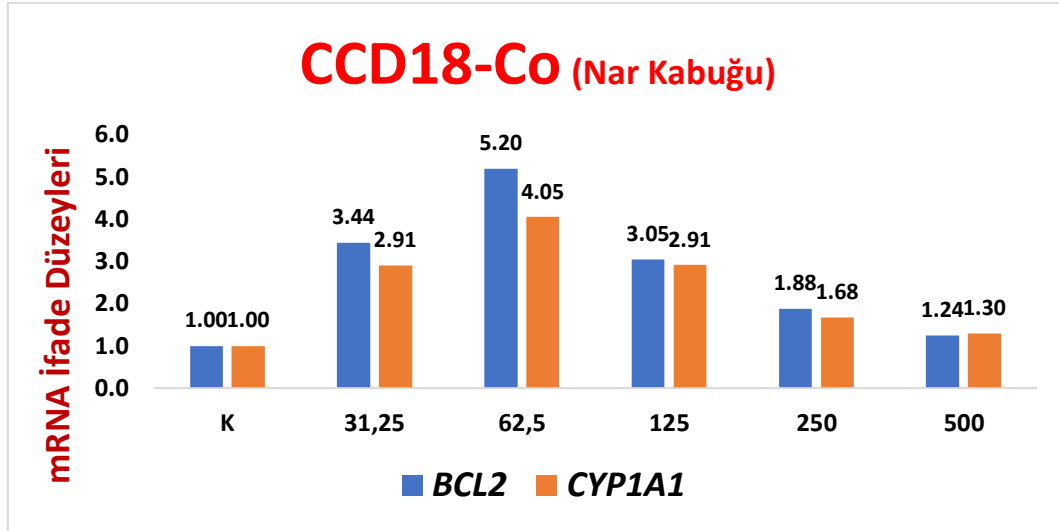
Nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulanan DLD-1 örneklerinde konsantrasyona bağlı *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler ayrı ayrı değerlendirilmiştir. *BCL-2* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 62,5 ng/ml dozunda yaklaşık 3,10 katlık bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 500 ng/ml’ de 0,97 kat ile en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4. 9.) *CYP1A1* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 ng/ml dozunda yaklaşık 3,39 katlık bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 500 ng/ml’de 1,16 kat ile en düşük seviyeye ulaşmıştır (Şekil 4. 9.). Sonuçlar göstermektedir ki, DLD-1 hücrelerinde nar kabuğundan Cu-çiçek şekilli NP uygulaması 500 ng/ml konsantrasyonda *BCL-2* geni kontrol grubuna kıyasla düşmüş ve değeri 1’in altında tespit edilmiştir. Ancak istatistiksel anlamlılık ifade etmemektedir. Diğer konsantrasyonlarda ise ifade düzeyi artmış. *CYP1A1* geni ise tüm konsantrasyonlarda daha fazla eksprese olmuştur. Bu sayede kanser hücrelerinde görülen programsız hücre çoğalması olayında etkili *BCL-2* ve *CYP1A1* geninin eksprese düzeyini artırarak antikanser özellik göstermiştir.



Şekil 4. 9. Nar Kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması yapılmış DLD-1 hücre örneklerinde belirlenen dozlara bağlı *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler

Nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulanan CCD18-Co örneklerinde konsantrasyona bağlı *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler ayrı ayrı değerlendirilmiştir. *BCL-2* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 62,5 ng/ml dozunda yaklaşık 5,20 katlık değişim tespit edilmiştir. Bu değişim 500 ng/ml doz uygulamasında ise yaklaşık 1,24 katlık değişimle en düşük seviye belirlenmiştir. *CYP1A1* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 62,5 ng/ml dozunda yaklaşık 4,05 katlık bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 500 ng/ml'de 1,30 kat ile en düşük seviyeye ulaşmıştır. Nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması yapılmış CCD18-Co hücrelerinde *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin belirlenen doz konsantrasyonuna bağlı ekspresyon düzeyindeki değişimler Şekil 4. 10.' da verilmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, CCD18-Co hücrelerinde nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması bütün konsantrasyonda *BCL-2* ve *CYP1A1* geni kontrol grubuna kıyasla artmıştır. Böylelikle bütün konsantrasyonlarda daha çok eksprese olmuş ve uygulama sayesinde kanser hücrelerinde görülen programsız hücre çoğalması olayında etkili *BCL-2* ve *CYP1A1* geninin eksprese düzeyini artırarak antikanser özellik göstermiştir.



Şekil 4. 10. Nar Kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması yapılmış CCD18-Co hücre örneklerinde belirlenen dozlara bağlı *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler

## 5. TARTIŞMA

Kanser çağımızın en önemli hastalıklarının başında yer alan ölümcül bir hastalıktır. Dünya üzerinde her yıl milyonlarca birey bu hastalığa yakalanmaktadır ve tedavi sürecinin ölümle sonuçlanma ihtimali çok yüksektir (Ferlay ve diğerleri, 2012; Kalunzy ve O'Brien, 2019). Günümüzde radyoterapi ve kemoterapi gibi tedaviler kanser hastalığına karşı sık kullanılmakta ancak maliyet ve aşırı dozların alımı ile birlikte sağlıklı dokulara zarar verebilmesi gibi nedenlerinden dolayı dezavantajlarının olduğu yapılan çalışmalarla bilinmektedir (Çeşmeli ve Avcı, 2019; Hossen ve diğerleri, 2019).

Bu nedenlerden dolayı kanser tedavi yöntemlerinin daha düşük maliyetle ve yan etkilerinin minimuma indirgenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. NP'ler eşsiz yapılarından dolayı hedefe yönelik tedaviyi sunabilmektedir. Biz bu çalışmamızda biyosentez yöntemini kullanarak elde ettiğimiz düşük maliyetli, verimli ve çevreye zararsız NP'lerin kolon kanserine karşı göstermiş olduğu antikanser özelliklerini inceledik.

Bu çalışmada; bakır-nano-flower kompozit malzemenin biyolojik sentezi için *Cladonia foliacea* likeni ve nar kabuğu bitkisi kullanılmıştır. Sentezlenen Cu-çiçek şekilli NP'nin DLD-1 ve CCD18-Co üzerine etkileri, kanser yolağında yer alan *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerinin ifade düzeyindeki değişimlerin tespiti ile belirlenmiştir. Belirlenen hücrelere, bakır tabanlı nanoyapıların 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonları ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. MTT analizinde belirlenen dozlara göre NP uygulaması yapılan DLD-1 ve CCD18-Co hücrelerinde *CYP1A1* ve *BCL-2* genlerine ait ifade değişimleri belirlenmiştir.

*C. foliacea* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulamasıyla DLD-1 hücre hattında, *BCL-2* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 ng/ml dozunda yaklaşık 3,62 katlık bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 31,25 ng/ml'de 1,84 kat ile en düşük seviyeye ulaşmıştır. *CYP1A1* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 ng/ml dozunda yaklaşık 3,93 katlık bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 500 ng/ml'de 0,96 kat ile en düşük seviyeye ulaşmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, *C. foliacea* likeninden elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması bütün konsantrasyonda *BCL-2* ve *CYP1A1* geni kontrol grubuna kıyasla



artmıştır. Böylelikle bütün konsantrasyonlarda daha çok eksprese olmuş ve uygulama sayesinde kanser hücrelerinde görülen programsız hücre çoğalması olayında etkili *BCL-2* ve *CYP1A1* geninin eksprese düzeyini artırarak antikanser özelliği göstermiştir.

Nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulamasıyla DLD-1 hücre hattında, *BCL-2* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 62,5 ng/ml dozunda yaklaşık 3,10 katlık bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 500 ng/ml’de 0,97 kat ile en düşük seviyeye ulaşmıştır. *CYP1A1* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 125 ng/ml dozunda yaklaşık 3,39 katlık bir artış tespit edilmiştir. Bu artış 500 ng/ml’de 1,16 kat ile en düşük seviyeye ulaşmıştır. CCD18-Co hücrelerinde ise; *BCL-2* gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre 62,5 ng/ml dozunda yaklaşık 5,20 katlık değişim tespit edilmiştir. Bu değişim 500 ng/ml doz uygulamasında ise yaklaşık 1,24 katlık değişimle en düşük seviye belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, CCD18-Co hücrelerinde nar kabuğundan elde edilen Cu-çiçek şekilli NP uygulaması bütün konsantrasyonda *BCL-2* ve *CYP1A1* geni kontrol grubuna kıyasla artmıştır. Böylelikle bütün konsantrasyonlarda daha çok eksprese olmuş ve uygulama sayesinde kanser hücrelerinde görülen programsız hücre çoğalması olayında etkili *BCL-2* ve *CYP1A1* genlerinin eksprese düzeyini arttırarak antikanser özelliği göstermiştir.

CuNP’ler ile birlikte Au ve AgNP’ler de kendilerine özgü kimyasal ve fiziksel özellikleri ile ön plana çıkan NP’lerdendir. Dey ve arkadaşları *Wedelia trilobata* bitkisi ile biyosentezlenen AuNP’lerin HCT-15 insan kolon hücreleri üzerinde doza bağlı toksisite gösterdiği ve verimliliğin ortalama %30’a kadar çıktığını bulunmuştur (Dey, Yogamoorthy ve Sundarapandian, 2018).

Acar ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, kuşburnu özütü ile sentezlenmiş AgNP’lerin insan kolon adenokarsinoma hücre hattı (HT29) üzerindeki antikanser etkisi değerlendirilmiştir. AgNP’lerin doza bağımlı bir şekilde hücre hareketliliğinde önemli bir azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Acar vd., 2019).

González-Ballesteros ve arkadaşları ise; *Cystoseira baccata* (deniz yosunu) özütü ile elde ettikleri AuNP’lerin HT29 hattı üzerindeki antikanser etkisini test etmiş ve apoptozu

indüklediğini göstermiştir (González-Ballesteros, Prado-López, Rodríguez-González, Lastra, Rodríguez-Argüelles, 2017).

Alqahtani ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada *Xanthoria parietina* liken özütü ile sentezledikleri AgNP'lerin HT29 üzerinde antikanser aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir (Alqahtani, Al Othman ve Mohammed, 2020).

Yapılan bir başka çalışmada *S. frutescens* yaprağında sentezlenen AgNP'lerin insan kolon kanseri hücre hattına (COLO205) karşı önemli antikanser aktivite gösterdiği belirtilmiştir. (Reddy ve diğerleri, 2021).

Salehi ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada *Artemisia marschalliana* bitkisini kullanarak elde ettikleri AgNP'ye maruz kalan insan mide karsinomu (AGS) ve insan embriyonik böbrek (HEK293) hücre dizilerinin, anti-apoptotik *BCL-2* gen ifadesinin ise önemli ölçüde arttığını göstermiştir (Salehi ve diğerleri, 2016).

Ghasemi ve arkadaşları CuNP'lerin insan kolorektal kanser hücre hattı (SW480) üzerinde oksidatif stres ve apoptozun indüksiyonu üzerindeki etkisini araştırmıştır. Yapılan çalışmayla birlikte MTT tahlili sonuçları, CuNP'lerin SW480 hücrelerinin canlılığını inhibe ettiğini göstermiştir. (Ghasemi ve diğerleri, 2022).

Al-Radadi yapmış olduğu çalışmada Ajwa ve Barni hurma ekstraktları kullanılarak sentezlenen PtNP'lerin HCT kolon kanseri hücre hatlarına karşı güçlü sitotoksikite gösterdiğini bildirilmiştir (Al-Radadi, 2019).

Miri ve Sarani *Prosopis farcta* bitkisini kullanarak sentezlemiş oldukları AgNP'nin akciğer (A549) ve kolon (HT29) hücre hatlarına karşı sitotoksik ve apoptotik aktivitelerini değerlendirmiştir. A549'un MTT sonuçları, AgNP'lerin 250 µg/ml'den fazla konsantrasyonlarında %50 hücre tahribatının olduğunu göstermiştir. HT29 ise 500 µg/ml'nin üzerindeki konsantrasyonlarda tam apoptoz sergilemiştir (Miri ve Sarani, 2018).

Al-Zharani ve arkadaşları CuNP'lerin insan meme kanseri hücresi (MCF-7) ve kolon kanseri hücre hattında (LoVo) sitotoksisteyi indüklediğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bu çalışmada CuNP'lerin *Bax*, *P53* ve *Caspases 9*, *8* ve *3* genlerinde önemli bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (Al-Zharani ve diğerleri, 2021).

Dadhwal ve arkadaşları *Hippophae rhamnoides L.* (Yabani iğde) bitkisini kullanarak sentezlemiş oldukları CuNP'nin 100 µg/mL dozunda kanser hücre canlılığını %28,18'e kadar düşürdüğünü göstermiştir (Dadhwal ve diğerleri, 2023).

Sulaiman ve arkadaşları zeytin yaprağı özütünü kullanarak sentezlemiş oldukları CuNP'nin meme kanseri hücresine (AMJ-13) ve yumurtalık kanseri hücresine (SKOV-3) karşı doza bağlı bir şekilde hücre büyümesini durdurduğu ve apoptoz yoluyla hücre ölümünü indüklediği bulundu. Bu bulgular araştırmacılara CuNP'lerin antikanser ajanları olma potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmüştür (Sulaiman, Tawfeeq ve Jaaffer, 2018).

Sankar ve arkadaşları *Ficus religiosa* yaprak ekstraktını kullanarak sentezlemiş oldukları bakır oksit NP'nin (CuONP) apoptoz yoluyla A549 hücrelerine karşı sitotoksisteyi indüklediğini göstermiştir (Sankar ve diğerleri, 2017).

Gnanavel ve arkadaşları *Ormocarpum cochinchinense* yaprak özütlerini kullanarak sentezledikleri CuONP'lerin 40 µg/mL<sup>-1</sup> IC50 değeri ile insan kolon kanseri hücre dizi hattı (HCT-116) üzerinde yüksek antikanser özellik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Gnanavel, Palanichamy ve Roopan, 2017).

Yapılan bir başka çalışmada *Bacillus coagulans* ile sentezlenmiş olan CuONP'nin meme kanseri hücrelerine karşı büyük sitotoksik etkisinin olduğu gösterilmiştir. Biyosentezlenen CuONP'ler, MCF-7 ve SKBR3 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını zamana ve doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde inhibe etti. Sitotoksiste sonuçlarına göre CuONP'ler, MCF-7 hücrelerine karşı SKBR3 hücrelerine göre daha fazla anti-proliferatif aktivite göstermiştir (Dolati ve diğerleri, 2023).

Chung ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada *Eclipta prostrata* yaprak özütüyle sentezlemiş oldukları CuNP'nin karaciğer kanser hücre hattına (HEPG2) karşı önemli sitotoksikite etki gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır (Chung ve diğerleri, 2017).

Yaqub ve arkadaşları *Zingiber officinale* ve *Allium sativum* bitki ekstraktlarını kullanarak sentezlemiş oldukları CuNP'lerin HeLa ve HepG2 hücre hatlarına karşı antikanser davranış sergilediğini göstermiştir (Yaqub ve diğerleri, 2020).

ELhabal ve arkadaşları *Salvadora persica* meyve ekstraktlarından sentezledikleri CuNP'lerin MCF-7 hücre hattına karşı AuNP'lerden daha iyi antikanser aktiviteye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (ELhabal ve diğerleri, 2022).

Rehana ve arkadaşları; MCF-7, HeLa ve A549 kanser hücre hatlarında *Hibiscus rosa-sinensis*, *Murraya koenigii*, *Moringa oleifera* ve *Tamarindus indica* yapraklarından elde ettikleri farklı bitki ekstraktlarını kullanarak yeşil yöntemle sentezlenen CuONP'lerin, kimyasal yöntemle sentezlenenlere göre daha yüksek sitotoksikite sergilediğini göstermişti (Rehana, Mahendiran, Kumar ve Rahiman, 2017).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİ

Cu NP'ler son yıllarda çeşitli alanlardaki geniş uygulamaları sebebiyle araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Kendilerine özgü boyut ve morfolojilere sahip NP'ler kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılarak kolayca sentezlenebilmektedir. Bu yöntemler uygulanırken indirgeyici ajanlar veya toksik kimyasallar kullanıldığından dolayı çevremiz için potansiyel olarak tehlike oluşturmaktadır. Günümüzde biyolojik kaynaklar kullanılarak yeşil NP'leri elde etmek için bakteri, maya, mantar ve bitkiler de dâhil olmak üzere temiz, toksik olmayan, uygun maliyetli ve çevre dostu olarak kabul edilen kaynaklar tercih edilmektedir (Zayed ve diğerleri, 2012).

NP'lerin sentezi için bitki ve liken özütlerinin kullanımı ölçek büyütme kolaylığı, düşük biyolojik tehlike ve daha az maliyet sebebiyle yaygınlaşmaktadır. Çiçek sekilli hibrit nanoyapıların sentezinde organik bileşen olarak enzim, DNA ve aminoasit gibi maliyeti yüksek ve elde edilmesi zor süreç içeren moleküller yerine liken ve nar bitkisi özütleri kullanılmıştır. Aynı özütler kullanılarak CuNP'lerin fiziksel ve kimyasal sentez yöntemlerine kıyasla ucuz, kimyasal ajan kullanmadan ve çevre dostu yöntemle sentezlenmiştir.

CuNP'lerin biyolojik sentezi *Clodonia foliacea* likeni ve nar kabuğu özütü diğer sentez yöntemlerine göre kolay, ucuz, kısa sürede ve kimyasal ajan kullanılmadan gerçekleştirilmiştir. *Clodonia foliacea* likeni ve nar kabuğu özütünde bulunan fonksiyonel gruplar, sentez sürecinde indirgeyici ve kaplayıcı ajan olarak NP'lerin yapısına katılmıştır. *Clodonia foliacea* likeni ve nar kabuğu özütü CuNP'lerin sentezi için uygun bulunmuştur.

Sentezlenen NP'lerin programsız hücre çoğalması olayında etkili *BCL-2* ve *CYP1A1* geninin eksprese düzeyini arttırarak antikanser özellik gösterdiği kaydedilmiştir. Yaptığımız çalışma sayesinde yeşil yolla sentezlenen NP'lerin kolon kanseri hücreleri üzerinde antikanser özellik gösterdiğini söyleyebiliriz. Sonuç olarak, belirtilen bulgular biyosentezlenen NP'lerin insan kolon kanserinin tedavisi için umut verici yeni terapötik ajanlar olabileceğini düşündürmektedir.

CuNP'lerin liken ve bitki özütleri ile sentezi kolay, ucuz ve güvenilir olması gibi avantajlara sahiptir. Dolayısıyla sentez sürecinde bitkisel atıkların (meyve kabuğu gibi) kullanılması, atık malzemelerin değerlendirilmesi üzerinde durulması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca yapılan literatür çalışmasında biyolojik yöntemle sentezlenen NP'lerin toksisite araştırmalarının sınırlı olduğu görülmüştür. Çevre ve insan sağlığı için çok önemli bir yeri olan bu konu üzerinde gereken hassasiyet gösterilerek, NP'lerin toksisiteleri farklı dokular ve hücre dizileri için değerlendirilmelidir.



## KAYNAKLAR

- Alqahtani, M. A., Al Othman, M. R. and Mohammed, A. E. (2020). Bio fabrication of silver nanoparticles with antibacterial and cytotoxic abilities using lichens. *Scientific Reports*, 10(1), 16781.
- Al-Radadi, N. S. (2019). Green synthesis of platinum nanoparticles using Saudi's Dates extract and their usage on the cancer cell treatment. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(3), 330-349.
- Al-Zharani, M., Qurtam, A. A., Daoush, W. M., Eisa, M. H., Aljarba, N. H. et. al. (2021). Antitumor effect of copper nanoparticles on human breast and colon malignancies. *Environmental Science Pollution Research International*, 28(2), 1587-1595.
- Annu, Ahmed, S., Kaur, G., Sharma, P., Singh, S. Et. al. (2018). Evaluation of the antioxidant, antibacterial and anticancer (lung cancer cell line A549) activity of Punica granatum mediated silver nanoparticles. *Toxicology Research (Cambridge)*, 7(5), 923-930.
- Arun, G., Eyini, M. and Gunasekaran, P. (2014). Green Synthesis of silver nanoparticles using the mushroom fungus *Schizophyllum commune* and its biomedical applications. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19(6), 1083-1090.
- Ateş, H. (2015). Nano Parçacıklar ve Nano Teller. *Gazi University Journal of Science Part C: Design and Technology*, 3(1), 437-442.
- Baran, M. F. (2018). Green Synthesis of Silver Nanoparticles (AGNPs) Using Pistacia Terebinthus Leaf Extract: Antimicrobial Effect And Characterization. *International Journal on Mathematic, Engineering and Natural Sciences*, 5, 67–75.
- 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.
- Biswas, P., Polash, S. A., Dey, D., Kaium, M. A., Mahmud, A. R. et al. (2023). Advanced implications of nanotechnology in disease control and environmental perspectives. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 158, 114172.
- Boroumand Moghaddam, A., Namvar, F., Moniri, M., Md. Tahir, P., Azizi, S. Et. al. (2015). Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical Applications. *Molecules*, 20(9), 16540-65.
- Castro, L., Blázquez, M. L., Muñoz, J. A., González, F. and Ballester, A. (2013). Biological synthesis of metallic nanoparticles using algae. *IET Nanobiotechnology*, 7, 109–116.
- Çeşmeli, S. and Avcı, B. C. (2019). Application of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in cancer therapies. *Journal of drug targeting*, 27(7), 762-766.

- Chung, I. M., Abdul-Rahuman, A., Marimuthu, S., Kirthi, A. V., Anbarasan, K. et. al. (2017). Green synthesis of copper nanoparticles using *Eclipta Prostrata* leaves extract and their antioxidant and cytotoxic activities. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(1), 18-24.
- Dadhwal, P., Dhingra, H. K., Dwivedi, V., Alarifi, S., Kalasariya, H. et. al. (2023). *Hippophae rhamnoides* L. (sea buckthorn) mediated green synthesis of copper nanoparticles and their application in anticancer activity. *Frontiers in molecular biosciences*, 24(10), 1246728.
- Dahoumane, S. A., Jeffryes, C., Mechouet, M. and Agathos, S. N. (2017). Biosynthesis of inorganic nanoparticles: a fresh look at the control of shape, size and composition. *Bioengineering (Basel)*, 4(1), 14.
- Denkbaşı, E. B. (2015). Nanotechnology in Turkey. *The Informatics Association of Turkey Informatics Magazine*, 172, 78–87.
- Dey, A., Yogamoorthy, A. and Sundarapandian, S. (2018). Green synthesis of gold nanoparticles and evaluation of its cytotoxic property against colon cancer cell line. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 4, 1-17.
- Ding, L., Lan, Z., Xiong, X., Ao, H., Feng, Y. et al. (2018). The dual role of microRNAs in colorectal cancer progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9): 2791.
- Dolati, M., Tafvizi, F., Salehipour, M., Komeili-Movahed, T. and Jafari, P. (2023). Biogenic copper oxide nanoparticles from *Bacillus coagulans* induced reactive oxygen species generation and apoptotic and anti-metastatic activities in breast cancer cells. *Scientific Reports*, 13(1), 3256.
- ELhabal, S. F., Elwy, H. M., Hassanin, S., El-Rashedy, A. A., Hamza, A. A. et. al. (2022). Biosynthesis and Characterization of Gold and Copper Nanoparticles from *Salvadora persica* Fruit Extracts and Their Biological Properties. *International Journal Nanomedicine*, 7(17), 6095-6112.
- Esmeeta, A., Adhikary, S., Dharshnaa, V., Swarnamughi, P., Ummul Maqsummiya, Z., et. al. (2022). Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. *Biomed Pharmacother*, 153, 113384.
- Faivre, J. (1994). Colon cancer Epidemiology pathological anatomy diagnosis course treatment and prevention. *La Revue du Praticien*, 44, 533–7.
- Fawzy, M., Khairy, G. M., Hesham, A., Rabaan, A. A., El-Shamy, A. G. et. al. (2021). Nanoparticles as a novel and promising antiviral platform in veterinary medicine. *Arch Virol*, 166(10), 2673-2682.



- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C. et al. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136, E359-E386.
- Ghasemi, P., Shafiee, G., Ziamajidi, N. et al. (2023). Copper Nanoparticles Induce Apoptosis and Oxidative Stress in SW480 Human Colon Cancer Cell Line. *Biological Trace Element Research*, 201(8), 3746–3754.
- Gnanavel, V., Palanichamy, V. and Roopan, S. M. (2017). Biosynthesis and characterization of copper oxide nanoparticles and its anticancer activity on human colon cancer cell lines (HCT-116). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 171, 133-138.
- González-Ballesteros, N., Prado-López, S., Rodríguez-González, J. B, Lastra, M., Rodríguez-Argüelles, M. C. (2017). Green synthesis of gold nanoparticles using brown algae *Cystoseira baccata*: Its activity in colon cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 1(153), 190-198.
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. and Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Research International*, 150845.
- Herrera, M., Berral-González, A., López-Cade, I., Galindo-Pumariño, C., Bueno-Fortes, S. et al. (2021). Cancer-associated fibroblast-derived gene signatures determine prognosis in colon cancer patients. *Molecular Cancer*, 20(1), 73.
- Hossen, S., Hossain, M. K., Basher, M. K., Mia, M. N. H., Rahman, M. T. et al. (2019). Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. *Journal of advanced research*, 15, 1-18.
- Husseiny M. I., El-Aziz M. A., Badr Y. and Mahmoud M. A. (2007). Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67, 1003–1006.
- Jassal, S. P., Kaur, D., Prasad, R. and Singh, J. (2022). Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles: Development and applications. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10, 100361.
- Jena, J., Pradhan, N., Nayak, R. R., Dash, B. P., Sukla, L. B. Et. al. (2014). Microalga *Scenedesmus* sp.: A Potential low-cost green machine for silver nanoparticle synthesis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(4), 522–533.
- Johnston, C. W., Wyatt, M. A., Li, X., Ibrahim, A., Shuster, J. Et. al. (2013). Gold biomineralization by a metallophore from a gold-associated microbe. *Nature Chemical Biology*, 9(4), 241-3.
- Joshi, G., Kaur, R. and Kaur, H. (2016). Biomarkers in cancer. *International Research Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 3, 29-44.

- Kaluzny, A. D. and O'Brien, D. M. (2019). The expanding role of cancer control & the U.S. National Cancer Institute: Policy implications for global cancer care. *Journal of Cancer Policy*, 20, 100187.
- Keum, N. and Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*, 16(12), 713-732.
- Khan, A. A., Alanazi, A. M., Alsaif, N., Wani, T. A. and Bhat, M. A. (2021). Pomegranate peel induced biogenic synthesis of silver nanoparticles and their multifaceted potential against intracellular pathogen and cancer. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8), 4191-4200.
- Koca, F. D., Yilmaz, D. D., Onmaz, N. E., Yilmaz, E. and Öçsoy, İ. (2020). Green synthesis of allicin based hybrid nanoflowers with evaluation of their catalytic and antimicrobial activities. *Biotechnology Letters*, 42(9), 1683-1690.
- Kreeger, P. K. and Lauffenburger, D. A. (2010). Cancer systems biology: a network modeling perspective. *Carcinogenesis*, 31(1), 2-8.
- Langan, R. C., Mullinax, J. E., Raiji, M. T., Upham, T., Summers, T. Et. al. (2013). Colorectal cancer biomarkers and the potential role of cancer stem cells. *Journal of Cancer*, 241–250.
- Lewandowska, A. M., Rudzki, M., Rudzki, S., Lewandowski, T. and Laskowska, B. (2019). Environmental risk factors for cancer-review paper. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 26(1), 1-7.
- Liao, C., Li, Y. and Tjong, S. C. (2019). Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 449.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C (T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-8.
- Mahdavi, M., Namvar, F., Ahmad, M. B. and Mohamad, R. (2013). Green biosynthesis and characterization of magnetic iron oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles using seaweed (*Sargassum muticum*) aqueous extract. *Molecules*, 18(5), 5954-5964.
- Malhotra, B. D. and Ali, M. A., (2018). Nanomaterials in Biosensors: Fundamentals and Applications. *Nanomaterials in Biosensors*, 1–74.
- Mbonyirivuze, I., Omollo, B. D., Ngom, B., Mwakikunga, S. M., Dhlamini, E. Park et. al. (2015). "Natural dye sensitizer for Grätzel cells: Sepia melanin," *Physics and material chemistry*, 3, 1-6.
- Miri, A. and Sarani, M. (2018). Silve Nanoparticles: Cytotoxic and Apoptotic Activity on HT-29 and A549 Cell Lines. *Journal of New Developments in Chemistry*, 1(4), 1-6.

- Mittal, A. K., Chisti, Y., Banerjee, U. C., 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2): 346–356.
- Miyazawa, T., Itaya, M., Burdeos, G. C., Nakagawa, K. and Miyazawa, T. (2021). A Critical Review of the Use of Surfactant-Coated Nanoparticles in Nanomedicine and Food Nanotechnology. *International Journal of Nanomedicine*, 9(16), 3937-3999.
- Mohammadinejad, R., Shavandi, A., Raie, D. S., Sangeetha, J., Soleimani, M. et al. (2019). Plant molecular farming: Production of metallic nanoparticles and therapeutic proteins using green factories. *Green Chemistry*, 21, 1845–1865.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55-63.
- Nabi, G., Aain, Q., Khalid, N. R., Bilal Tahir, M., Rafique, M. Et. al. (2018). A review on novel eco-friendly green approach to synthesis  $\text{TiO}_2$  nanoparticles using different extracts. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 28(4), 1552-1564.
- Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D. and Cummings, B. S. (2020). Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *International*, 22(1), 385.
- Nisha, H. M., Tamileswari, R., Jesurani, S., Kanagesan, S., Hashim, M. et al. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles from pomogranate (*Punica granatum*) and analysis of anti-bacterial activity. *International Journal of Advanced Technology in Engineering and Science*, 3, 297.
- Panpatte, D. G., Jhala, Y. K., Shelat, H. N. and Vyas, R. V. (2016). Nanoparticles: The next generation technology for sustainable agriculture. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*, 289–300.
- Pokropivny, V. V. and Skorokhod, V. V. (2007). Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science. *Materials Science and Engineering: C*, 27, 990–993.
- Rattan, R., Shukla, S., Sharma, B. and Bhat, M. (2021). A Mini-Review on Lichen-Based Nanoparticles and Their Applications as Antimicrobial Agents. *Frontiers in Microbiology*, 12, 633090.
- Reddy, N. V., Li, H., Hou, T., Bethu, M. S., Ren, Z. Et. al. (2021). Phytosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Perilla frutescens* Leaf Extract: Characterization and Evaluation of Antibacterial, Antioxidant, and Anticancer Activities. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 15-29.
- Reed, J. C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 17(9), 2941-53.

- Rehana, D., Mahendiran, D., Kumar, R. S. and Rahiman, A. K. (2017). Evaluation of antioxidant and anticancer activity of copper oxide nanoparticles synthesized using medicinally important plant extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 1067-1077.
- Salehi, S., Shandiz, S. A., Ghanbar, F., Darvish, M. R., Ardestani, M. S. Et. al. (2016). Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia marschalliana* Sprengel aerial part extract and assessment of their antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. *International Journal Nanomedicine*, 11, 1835-46.
- Sankar, R., Maheswari, R., Karthik, S., Shivashangari, K. S. and Ravikumar, V. (2014). Anticancer activity of *Ficus religiosa* engineered copper oxide nanoparticles. *Materials science and engineering C. materials for biological applications*, 44, 234-9.
- Sarhadi, V. K. and Armengol, G. (2022). Molecular Biomarkers in Cancer. *Biomolecules*, 12(8), 1021.
- Senapati, S., Syed, A., Moez, S., Kumar, A. and Ahmad, A. (2012). Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga *Tetraselmiskochinensis*. *Materials Letters*, 79, 116–118.
- Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K. and Poinern, GEJ. (2015). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. *Materials (Basel)*, 8(11), 7278-7308.
- Sivaraj, R., Rahman, P. KSM., Rajiv, P., Narendhran, S. and Venckatesh, R. (2014). Biosynthesis and characterization of *Acalypha indica* mediated copper oxide nanoparticles and evaluation of its antimicrobial and anticancer activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 129, 255-258.
- Subashini, G. and Bhuvaneswari, S. (2018). Fungi and their role in sustainable Development: current perspectives. *NPs from Fungi (MycoNPs)*, 753–779.
- Sulaiman, G. M., Tawfeeq, A. T. and Jaaffer, M. D. (2018). Biogenic synthesis of copper oxide nanoparticles using *olea europaea* leaf extract and evaluation of their toxicity activities: An in vivo and in vitro study. *Biotechnology Progress*, 34(1), 218-230.
- Svokos, K., Salhia, B. and Toms, S. (2014). Molecular biology of brain metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 9519-9530.
- Tarannum, N., Divya, Gautam, Y. K. (2019). Facile green synthesis and applications of silver nanoparticles: a state-of-the-art review. *Royal Society of Chemistry Advances*, 9(60), 34926-34948.

- Tavassoli, F. A. and Devilee, P. (2003). World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of the Breast And Female Genital Organs. *Lyon IARC*, 4, 227-228.
- Thamima, M. and Karuppuchamy, S. (2014). "Biosynthesis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles from natural sources: A review," *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 6, 1-8.
- To, K. K., Tong, C. W., Wu, M. and Cho, W. C. (2018). MicroRNAs in the prognosis and therapy of colorectal cancer: From bench to bedside. *World Journal of Gastroenterol*, 24(27), 2949-2973.
- Ustaalioglu, B. B., Bilici, A., Seker, M., Salman, T., Gumus, M. et al. (2009). Metastasis of lobular breast carcinoma to the uterus in a patient under anastrozole therapy. *Onkologie*, 32(7): 424-426.
- Wang, W., Yang, J., Edin, M. L., Wang, Y., Luo, Y. et al. (2019). Targeted Metabolomics Identifies the Cytochrome P450 Monooxygenase Eicosanoid Pathway as a Novel Therapeutic Target of Colon Tumorigenesis. *Cancer Research*, 79(8), 1822-1830.
- Wong, G. Y. M., Diakos, C., Hugh, T. J. and Molloy, M. P. (2022). Proteomic Profiling and Biomarker Discovery in Colorectal Liver Metastases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6091.
- Yang, Y., Zheng, X., Chen, L., Gong, X., Yang, H. Et. al. (2022). Multifunctional Gold Nanoparticles in Cancer Diagnosis and Treatment. *International Journal of Nanomedicine*, 6(17), 2041-2067.
- Yaqub, A., Malkani, N., Shabbir, A., Ditta, S. A., Tanvir, F. Et. al. (2020). Novel Biosynthesis of Copper Nanoparticles Using *Zingiber officinale* and *Allium sp.* with Synergic Effect of Doxycycline for Anticancer and Bactericidal Activity. *Current Microbiology*, 77(9), 2287-2299.
- Zayed, M. F., Eisa, W. H. and Shabaka, A. A. (2012). Malva parviflora extract assisted green synthesis of silver nanoparticles, *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 98, 423–428.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Fulya NURÇİN ÇIĞIR

### Bilimsel Faaliyetler (Yayınlar, Bildiriler, Katıldığı Projeler)

1. Nurçin-Çığır, F., Bölükbaşı, E. Koca, F.D. (2023). Investigation Of The Anticancer Effects And Molecular Biological Evaluation Of Flower-Shaped Copper Nanoparticles Obtained With *Cladonia Foliacea* Lichen Extract In DLD-1 Cells. 5th International Harran Congress on Scientific Research, 8-10 December 2023, Online, Şanlıurfa, Turkey.
2. Nurçin-Çığır, F., Bölükbaşı, E. Koca, F.D. (2023). Investigation Of The Anticancer Effects And Molecular Biological Assessment Of Flower-Shaped Hybrid Nanoparticles Derived From Pomegranate Peel. 12th International Eurasian Summit Scientific Research and Current Developments Congress, 29-30 November 2023, Online, Baku, Azerbaijan.
3. P.4. Lobaria pulmonaria Liken Özütü ile Çiçek Şekilli Hibrit Nanoyapıların Sentezi, Karakterizasyonu, Antimikrobiyal ve Antikanser Aktivitesinin Belirlenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Ekrem Bölükbaşı, Araştırmacı: Fatih Dogan Koca, Araştırmacı: Fulya Nurçin, 01/07/2021 - 22/06/2023.
4. Nurçin-Çığır F. and Bölükbaşı, E. (2022). Determination of in vitro cytotoxicity of black cumin (*Nigella sativa* L.) oil. 5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 23-25 November, Ankara, Turkey.