



**MELATONİN AGONİSTLERİ İLE KOMBİNE QUANTUM
DOT SENTEZİ KARAKTERİZASYONU VE ÇEŞİTLİ
KANŞER HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özge BALPINAR

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU**

Doktora Tezi-2021

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MELATONİN AGONİSTLERİ İLE KOMBİNE QUANTUM
DOT SENTEZİ KARAKTERİZASYONU VE ÇEŞİTLİ
KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özge BALPINAR

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU**

**ERZURUM
2021**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser	3
2.2. Kanser Patogenezisi	3
2.3. Kansere Dair Tedavi Yaklaşımları	5
2.4. Nanoteknoloji ve Nanopartiküler Sistemler	6
2.5. Quantum Dotlar	8
2.6. Hücre Ölümü.....	9
2.6.1. Otofajik Hücre Ölümü	9
2.6.2. Nekrotik Hücre Ölümü	10
2.6.3. Apoptotik Hücre Ölümü	11
2.6.3.1. Apoptozun Aşamaları ve Düzenlenmesi.....	11
2.6.3.2. Apoptoz Mekanizmaları	13
2.7. Melatonin	15
2.7.1. Melatonin Sentezi	16
2.7.2. Melatonin Sentez ve Salınımına Etki Eden Faktörler.....	17
2.7.3. Melatonin Reseptörleri	18

2.7.4. Ramelteon	18
2.7.5. Melatonin, Ramelteon ve Kanser.....	19
3. MATERYAL VE METOT.....	22
3.1. Materyal	22
3.2. Metot.....	23
3.2.1. Quantum Dot Yeşil Sentezi	23
3.2.1.1. Bitki Örneklerinin Hazırlanması.....	23
3.2.1.2. Quantum Dotların Sentezi	23
3.2.1.3. Quantum Dotlara İlaç Bağlanması-PEG'leme İşlemi.....	23
3.2.1.4. Quantum Dotlarının Biyokimyasal Özellikleri.....	24
3.2.1.5. Quantum Dotların Karakterizasyonu	24
3.2.2. Hücre kültürü	25
3.2.2.1. Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması	26
3.2.2.2. Hücre Sayımı	27
3.2.2.3. Hücrelerin Dondurulması	27
3.2.3. MTT Hücre Canlılık Testi	28
3.2.4. Total Oksidan Durum (TOD) ve Total Antioksidan Kapasitelerinin (TAK) Belirlenmesi	28
3.2.5. Flow Sitometri	29
3.2.6. RNA İzolasyonu	29
3.2.7. cDNA Sentezi	30
3.2.8. Real Time PCR İşlemi	31
3.2.9. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Quantum Dot Sentezi ve Karakterizasyonu Bulguları.....	32

4.1.1. Quantum Dotların Yeşil Sentezi ve Pegilasyon İşlemi.....	32
4.1.2. Quantum Dotların Biyokimyasal Özellikleri.....	32
4.1.3. Quantum Dotların Karakterizasyonu	34
4.1.3.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	34
4.1.3.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM).....	38
4.1.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi (FTIR)	42
4.1.3.4. X Işını Kristalografisi (XRD)	46
4.2. Hücre Kültürü Uygulama Bulguları	49
4.2.1. MTT Hücre Canlılık Testi Bulguları	49
4.2.1.1. Nöroblastom (SH-SY5Y) Hücre Hattı.....	49
4.2.1.2. Prostat Kanseri (DU145) Hücre Hattı.....	51
4.2.1.3. Kolon Kanseri (HT-29) Hücre Hattı.....	53
4.2.2. Total Antioksidan Kapasite (TAK) Testi Bulguları	55
4.2.2.1. Nöroblastom (SH-SY5Y) Hücre Hattı.....	55
4.2.2.2. Prostat Kanseri (DU145) Hücre Hattı.....	57
4.2.2.3. Kolon Kanseri (HT-29) Hücre Hattı.....	59
4.2.3. Total Oksidan Durum (TOD) Testi Bulguları	61
4.2.3.1. Nöroblastom (SH-SY5Y) Hücre Hattı.....	61
4.2.3.2. Prostat Kanseri (DU145) Hücre Hattı.....	63
4.2.3.3. Kolon Kanseri (HT-29) Hücre Hattı.....	65
4.2.4. Flow Sitometri Bulguları	67
4.2.4.1. Nöroblastom (SH-SY5Y) Hücre Hattı.....	67
4.2.4.2. Prostat Kanseri (DU145) Hücre Hattı.....	75
4.2.5. Real Time PCR Bulguları.....	83
4.2.5.1. Nöroblastom (SH-SY5Y) Hücre Hattı.....	83

4.2.5.2. Prostat Kanseri (DU145) Hücre Hattı.....	87
5. TARTIŞMA.....	91
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	106
KAYNAKLAR	108
EKLER	126
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	126
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....	127
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	128



TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak hazırladığım bu çalışmam süresince, hem tecrübe ve katkılarından faydalanmamı sağladığı için hem de çalışmam boyunca sunmuş olduğu kapsamlı laboratuvar imkânları dolayısıyla danışmanım ve Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet Hacımüftüoğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Hem yüksek lisans eğitimim hem de doktora tezim süresince desteğini esirgemeksizin her anlamda her daim yanımda olan, bilgi ve deneyimleriyle akademik hayatta bana yol gösteren, laboratuvarının kapılarını bana açmaktan çekinmeyen Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa Nadaroğlu'na çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Bu çalışmayı TDK-2019-7401 BAP proje numarasıyla destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim. 2211-A Genel Yurtiçi Doktora Burs Programı ile doktora eğitimim süresince destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederim.

Her koşulda her zaman ellerini omuzlarımda hissettiğim çok değerli aileme minnetle, tüm kalbimle teşekkür ederim.

Özge BALPINAR

ÖZET

Melatonin Agonistleri İle Kombine Quantum Dot Sentezi Karakterizasyonu Ve Çeşitli Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Bu tez çalışması ile melatonin hormonunun ve melatonin reseptör alt tip agonistinin kanser tedavisindeki yerinin belirlenmesi, az maliyetli ve toksisitesi az olan yeşil sentez yöntemiyle bu agonistleri içeren quantum dotların elde edilmesi, melatonin reseptörlerinin etkili olduğu kanser tiplerine yönelik etkinliğin karşılaştırılması olarak gösterilmesi ve mevcut tedavilerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada yeşil sentez yöntemiyle hem CdS ve CoSr quantum dotlar hem de Ramelteon biyokonjuge edilmiş konjugatların sentezi ve karakterizasyonu yapılmıştır. Kolon, prostat ve nöroblastom kanser hücre hatları üzerinde sentezlenen tüm QD'ların etkisi incelenmiştir. Kanser hücre hatları üzerinde üçer farklı dozda uygulanmış, çalışma pozitif ve negatif kontrollerle desteklenmiştir. Sonuçlar MTT, TAK, TOD, Flow sitometri ve q-PCR testleri ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Sentezlenen quantum dotlar ile biyokonjuge nano yapıların gerçekleştirilen SEM, TEM, FTIR, XRD analizleri ile doğru bir biçimde sentezlendiği belirlenmiştir. Biyokonjuge quantum dotların ilk 24 saatte ilgili ilacın biyokonjuge CdS materyalinden %25.96'sı salınmışken, biyokonjuge CoS materyalinden ilacın % 30.6'sının salındığı görülmüştür. MTT sonuçlarına göre nöroblastom ve prostat kanser hatlarında CoS içerikli uygulamaların (% 46.7, % 51.82) daha etkili olduğu, kolon kanserinde CdS quantum dotlarının (% 37.58) daha etkin olduğu anlaşılmıştır. Tüm kanser hatlarında yapılan tüm uygulamalarda antioksidan etkinlik gözlenmezken, oksidatif etkinlik bazında nöroblastom (14.4) ve kolon hücre hatlarında (13.51) CdS quantum dot içeren uygulamalarda, prostat kanserinde ise melatonin uygulamasında (8.25) kontrole kıyasla yüksek değerler belirlenmiştir. Flow sitometri testinde, prostat kanser hattında uygulamalar arasında bir değişiklik tespit edilmemişken, nöroblastom hücre hattında apoptoz oranı en yüksek melatonin (% 31.69) ile Ramelteon gruplarında (% 32.7) bulunmuştur. Real time PCR testinde nöroblastom hücre hattının MTR1A gen ekspresyonunun arttığı, RORA gen ekspresyonunun azaldığı, BAX ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Prostat hücre hattında ise, MTN1A gen ekspresyonunun arttığı, RORA gen ekspresyonunun bazı uygulamalarda tamamen baskılandığı, BAX ekspresyonunda ise kontrole kıyasla azalma olduğu kaydedilmiştir.

Sonuç: Elde edilen sentez materyallerinin hedeflenen nano yapılar olduğu ispatlanmıştır. Tüm bulgular göz önünde bulundurulduğunda hem biyokonjuge edilmiş hem de edilmemiş nano materyallerin tüm hücre hatlarında daha etkili sonuçlar ortaya koyduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyokonjugasyon, kanser, melatonin, quantum dot

ABSTRACT

Quantum Dot Synthesis Characterization Combined with Melatonin Agonists and Investigation of Their Effects on Various Cancer Cell Lines

Aim: In this thesis, it was aimed to determine the role of melatonin hormone and melatonin receptor subtype agonist in cancer treatment, and to obtain quantum dots containing these agonists with low cost and low toxicity green synthesis method. In addition, it is aimed to show comparatively the effectiveness of cancer types in which melatonin receptors are effective and to develop existing treatments.

Material and method: In this study, both Cadmium Sulfide and Cobalt Sulfur quantum dots and Ramelteon bioconjugated conjugates were synthesized and characterized by green synthesis method. The effect of all QDs synthesized on colon, prostate and neuroblastoma cancer cell lines was investigated. It was applied at three different doses on cancer cell lines, and the study was supported by positive and negative controls. Results were analyzed by MTT, total antioxidant capacity (TAC), total oxidant status (TOS), Flow cytometry and q-PCR tests.

Results: It was determined that bioconjugated nanostructures with synthesized quantum dots were synthesized correctly by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscope (TEM), Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR), X-Ray Crystallography (XRD) analyzes. While 25.96% of the bioconjugated quantum dots were released from the bioconjugated CdS material of the relevant drug in the first 24 hours, it was observed that 30.6% of the drug was released from the bioconjugated CoS material. According to MTT results, it was understood that CoS-containing applications (46.7%, 51.82%) were more effective in neuroblastoma and prostate cancer lines, and CdS quantum dots (37.58%) were more effective in colon cancer. While no antioxidant activity was observed in all applications made in all cancer lines, higher values were determined on the basis of oxidative activity in neuroblastoma (14.4) and colon cell lines (13.51) in CdS quantum dot-containing applications, and in prostate cancer in melatonin application (8.25) compared to the control. In the flow cytometry test, no change was detected in the prostate cancer line between applications, while the highest rate of apoptosis in the neuroblastoma cell line was found in the melatonin (31.69%) and Ramelteon groups (32.7%). In real time PCR test, it was determined that MTR1A gene expression of neuroblastoma cell line increased, RORA gene expression decreased and BAX expression increased. In the prostate cell line, it was noted that MTN1A gene expression increased, RORA gene expression was completely suppressed in some applications, and BAX expression was decreased compared to the control.

Conclusion: It has been proven that the obtained synthesis materials are targeted nanostructures. Considering all the findings, it was determined that both bioconjugated and non-bioconjugated nanomaterials showed more effective results in all cell lines.

Key Words: Bioconjugation, cancer, melatonin, quantum dot

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	: Adenozintrifosfat
BH₄	: Tetrahidrobiopterin
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
CAD	: Kaspaz aktive edici DNaz
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
cDNA	: Complementer-Deoksirobinükleikasit
CdS	: Kadmiyumsülfür
CO₂	: Karbondioksit
CoS	: Kobaltsülfür
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DISC	: Death inducing singnaling complex
DK	: Dakika
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi
FBS	: Fötal bovin serum
GTP	: Guanozintrifosfat
IL-2	: İnterlökin-2
µg	: Mikrogram
ML	: Mililitre
MT	: Melatonin reseptörü
MTT	: 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
nm	: Nanometre
O₂	: Oksijen
PARP	: PoliADP-riboz polimeraz

PEG	: Polietilen glikol
POE	: Polioksietilen
QD	: Quantum Dot
RNA	: Ribon�kleikasit
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
Smac	: Second mitochondria-derived Activator of Caspase
TAS	: Total antioksidan status
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TOS	: Total Oksidan Status
TRH	: Trioid salgılatıcı hormon
UV	: Ultraviole
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
XRD	: X ışını kristalografisi
�C	: Santigrat derece
%	: Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.2. Ramelteon.....	19
Şekil 4.1. Quantum Dot ve pegilasyon işlemlerinin sentez fotoğrafları.....	32
Şekil 4.2. Sentezlenen quantum dotlar ve biyokonjuge materyallerin UV spektrofotometre ile tespit edilen absorbans verileri.....	33
Şekil 4.3. Sentezde kullanılan Ramelteon ilacının kalibrasyon eğrisi.....	33
Şekil 4.4. Biyokonjuge quantum dotların kümülatif salım profil grafiği.	34
Şekil 4.5. CdS quantum dotu SEM görüntüsü.....	35
Şekil 4.6. CoS quantum dot SEM görüntüsü.....	36
Şekil 4.7. Biyokonjuge CdS nano yapılarının SEM görüntüsü	37
Şekil 4.8. Biyokonjuge CoS nano yapılarının SEM görüntüsü	38
Şekil 4.9. CdS quantum dotlarının TEM görüntüsü	39
Şekil 4.10. CoS quantum dotlarının TEM görüntüsü	40
Şekil 4.11. Biyokonjuge CdS nano yapılarının TEM görüntüsü	41
Şekil 4.12. Biyokonjuge CoS nano yapılarının TEM görüntüsü	42
Şekil 4.13. CdS quantum dotlarının FTIR spektrumu	43
Şekil 4.14. CoS quantum dotlarının FTIR spektrumu	44
Şekil 4.15. Biyokonjuge CdS yapılarının FTIR spektrumu.....	45
Şekil 4.16. Biyokonjuge CoS yapılarının FTIR spektrumu.....	46
Şekil 4.17. CdS quantum dotlarının XRD grafiği	47
Şekil 4.18. CoS quantum dotlarının XRD grafiği	47
Şekil 4.19. Biyokonjuge CdS nano yapılarının XRD grafiği	48
Şekil 4.20. Biyokonjuge CoS nano yapılarının XRD grafiği	49

Şekil 4.21. SH-SY5Y hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların MTT testi sonuçları	51
Şekil 4.22. DU145 hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların MTT testi sonuçları	53
Şekil 4.23. HT-29 hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların MTT testi sonuçları	55
Şekil 4.24. SH-SY5Y hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların TAK testi sonuçları	57
Şekil 4.25. DU145 hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların TAK testi sonuçları	59
Şekil 4.26. HT-29 hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların TAK testi sonuçları	61
Şekil 4.27. SH-SY5Y hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların TOD testi sonuçları	63
Şekil 4.28. DU145 hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların TOD testi sonuçları	65
Şekil 4.29. HT-29 hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların TOD testi sonuçları	67
Şekil 4.30. SH-SY5Y hücre hattı flow sitometri analizi kontrol grubu	68
Şekil 4.31. SH-SY5Y hücre hattı flow sitometri analizi CdS-Biyokonjuge CdS uygulamaları grubu	70
Şekil 4.32. SH-SY5Y hücre hattı flow sitometri analizi CoS-Biyokonjuge CoS uygulamaları grubu.	72
Şekil 4.33. SH-SY5Y hücre hattı flow sitometri analizi Ramelteon, Melatonin, Sisplatin uygulamaları grubu.	74

Şekil 4.34. DU145 hücre hattı flow sitometri analizi kontrol grubu.	76
Şekil 4.35. DU145 hücre hattı flow sitometri analizi CdS-Biyokonjuge CdS uygulama grubu	78
Şekil 4.36. DU145 hücre hattı flow sitometri analizi CoS-Biyokonjuge CoS uygulama grubu.	80
Şekil 4.37. DU145 hücre hattı flow sitometri analizi Ramelteon, Melatonin uygulama grubu	82
Şekil 4.38. SH-SY5Y hücre hattı MTNR1A gen ekspresyon eğrisi	84
Şekil 4.40. SH-SY5Y hücre hattı BAX gen ekspresyon eğrisi	86
Şekil 4.41. DU145 hücre hattı MTNR1A gen ekspresyon eğrisi	88
Şekil 4.42. DU145 hücre hattı RORA gen ekspresyon eğrisi	89
Şekil 4.43. DU145 hücre hattı BAX gen ekspresyon eğrisi	90

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Quantum Dot Sentezi ve Hücre Kültürü İçin Kullanılan Materyaller	22
Tablo 4.1. Quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların SH-SY5Y flow sitometri testi ortalama verileri	67
Tablo 4.2. Quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların DU145 flow sitometri testi ortalama verileri	75
Tablo 4.3. Quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların SH-SY5Y real time PCR testi sonuçları	83
Tablo 4.4. Quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların DU145 real time PCR testi sonuçları	87

1. GİRİŞ

Kanser tıp dünyasında kaydedilen ilerlemelere rağmen hem dünyada hem de ülkemizde insanların ölümüne sebep olan hastalıklar arasında ilk sıralardaki yerini korumaktadır.^{1, 2} Kanser tedavisi günümüzde kemoterapi, radyoterapi, hormonal terapi gibi tedavi seçenekleriyle gerçekleştirilmektedir. Günümüz dünyasının en sık kullanılan kanser tedavi yöntemi olan kemoterapide, farmakolojik olarak aktif nitelik arz eden ilaçların çoklu ilaç direnci, hastanın alacağı ilaç miktarını sınırlayan toksisite seviyesi veya ilacın spesifik olarak kanserli dokuya hedeflemeye yaşanan zorluklar sebebiyle tedavi ideal bir doğrultuda ilerleyememektedir.^{3, 4} Bu noktada kemoterapötik ilaçların etkinliğini, tedavideki potansiyellerini artırabilmek, ilacın dozunu sınırlayan toksisitesini makul seviyelere düşürebilmek adına nanoteknolojik yöntemlerin etkili gelişmeler sergilediği görülmektedir.^{5, 6}

Nanoteknolojinin yoğun bir biçimde çalışılan konularından biri olan quantum dotlar, pek çok hastalığın teşhisi, tedavisi, görüntülenmesinde kullanımının mümkün olduğu nano boyutlu materyallerdir. Floresan problemler olarak kullanılan quantum dotlar, floresan işaretli proteinlere kıyasla optik ve elektrik özellikler bakımından benzersiz nitelikler taşımaktadır.⁷ Bu sebeple quantum dotlar kemoterapötik ajanlarla teranostik platformlarda kullanıma son derece uygundur.⁸ Toksik madde eklentisi olmaksızın yeşil yöntemle quantum dot sentezi ve bu şekilde sentezlenen parçacıkların kanser gibi yayılımı oldukça yüksek olan bir hastalıkta test edilmesi literatürde eksikliği hissedilmekte olan kıymetli konular arasında yer almaktadır.

Melatonin ise, pek çok kanser türü üzerinde etkin bir biçimde antiproliferatif, onkostatik etki sergileyen bir hormondur. Yapılan pek çok çalışmada melatoninin kanserin yayılımını, proliferasyonunu, angiogenesis sürecini engelleyen etkiler sergilediği görülmüştür.^{9, 10} Uyku bozukluğu olan veya melatonin salgı döngüsünde

probleme sahip olan hastalarda kanser görülme sıklığının fazla oluşu dikkat çekmektedir.¹¹ Bu sebeplerle kanserin oluşumunun önlenmesinde önemli bir yere sahip olan melatoninin kanserin tedavisinde de aktif bir yere sahip olabileceği düşünülmektedir. Melatonin hormonunun reseptör alt tiplerinden birine spesifik olarak agonist etki yapan Ramelteon ilacının ise, melatonin ile benzer reseptör profillerini etkileyerek melatonin gibi antikanser etkinlik sergileyebileceği düşünülmektedir.¹² Melatonin agonisti olarak Ramelteonun melatoninin hangi spesifik niteliklerini sergileceği, kanser hücrelerindeki etkilerinin gen ekspresyonu, oksidatif stres gibi parametreler ile ne derece ilişkili olduğu bilinmemektedir. Quantum dotlar ise bağlı oldukları ilaçların hücre membranından geçişini kolaylaştırmanın yanı sıra ilacın hücre içinde görüntülenmesini, etki ettiği bölgenin tespitini kolaylaştırabilmektedir.^{13, 14}

Bu amaçla, zararsız bir yöntemle sentezlenen ve akabinde karakterize edilen Kadmiyum Sülfür (CdS) ve Kobalt Sülfür (CoS) quantum dotların kanser tedavisinde melatonin agonisti Ramelteon ile birlikte kullanımı ve bu uygulamaların kanser türleri üzerindeki etkileri çeşitli yöntemlerle analiz edilmiştir. Bu sayede; insan vücudunda doğal olarak yer alan melatonin hormonu agonistinin kanser tedavisindeki yerinin belirlenmesi, az maliyetli ve toksisitesi az olan bir yöntemle quantum dotların elde edilmesi, quantum dotlarla uygulanan ilacın etkinliğinin artırılması, kansere yeni bir tedavi yaklaşımı geliştirilmesi, uygulanan ilaçların kanser hücrelerinin protein profillerinde ne derecede değişime neden olduğunun belirlenmesi ve bu doğrultuda yapılacak çalışmalarla var olan verilerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en fazla ölüm oranına sahip ikinci hastalıktır.⁴ Yapılan son araştırmaya göre 195 ülkede 32 farklı tip kansere rastlanmıştır. 2005'ten 2015'e kadar kanser görülme oranı %33 artış sergilemiştir. Sadece 2015 yılında 17.500.000 yeni kanser vakası bildirilirken, 8.700.000 kanserden ölüm vakası da rapor edilmiştir.¹⁵

KontROLSÜZ hücre çoğalmasının bir sonucu olarak oluşan kanserin yalnızca bulunduğu bölgede değil, aynı zamanda uzak doku ve organların da etkilenmesine sebep olduğu, işlev kayıplarına neden olduğu bilinmektedir. Bu hastalıkta ölümle sonuçlanan vakaların fazlalığı dolayısıyla kanserin doğru bir biçimde tedavi edilmesinin önemi gün geçtikçe artmaktadır.¹⁶ Kanseri hücreleri kontROLSÜZCE çoğalmaları ile bilinmektedir. Ancak bunun yanında kontROLSÜZCE çoğalan hücrelerin immün sistemin denetiminden kaçış yolları geliştirmesi ve akabinde bu hücrelerin çoğaldığı dokudan farklı doku ve organlara ulaşarak o bölgeleri işgal etmek suretiyle metabolik ve fonksiyonel değişikliklerin oluşmasına sebep olduğu çok basamaklı bir patolojik duruma sebebiyet vermektedir.¹⁷

Kanserin dünyadaki artış hızı oldukça yüksek bir seviyeye erişmiştir ve kanser hastası bireylerin sayısının 2025 yılına dek yaklaşık olarak 25 milyonu aşacağı düşünülmektedir. Bu sebeptendir ki kanser günümüzün en çok araştırılan, çalışılan konuları arasında ilk sıralarda yer almaktadır.¹⁸

2.2. Kanseri Patogenezi

Kanseri ortaya çıkmasını etkileyen faktörler arasında yaşam biçimi (alkol, sigara kullanımı), çevresel faktörler (kirlilik, radyasyon, kimyasal maddeler), beslenme tarzı (vitaminler, lifli/yağlı beslenme tarzı, antioksidan faktör içeriği) gibi olgular

sayılabilmektedir. Ama bunlara ek olarak kanserin tetiklenmesinde farklı etkenler de rol oynayabilmektedir.¹⁹ Farklı etkenler şu şekilde sıralanabilmektedir:

1. Yüksek seviyede reaktiviteye sahip UV ışınları, gama veya X ışınları gibi ışınlar, DNA zincirinde kopmalara sebep olmak suretiyle mutasyonlara sebebiyet verebilmektedir.

2. Belirli nitelik arz eden kimyasal maddeler (anilin boyaları gibi) mutasyon oluşturarak kanser oluşumuna neden olabilmektedir.

3. Fiziksel olarak tahribata sebep olan maddelerin de tümör oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Dokuda tahrişe sebep olan maddelerin dokuya teması neticesinde oluşturduğu harabiyet, hızlı bir biçimde gelişecek mitotik aktiviteyi tetikleyebilmekte, akabinde kanserli doku gelişimini uyarabilmektedir.

4. Kanser gelişimini etkileyen bir diğer faktör de kalıtsal yatkınlıktır. Birçok aile bireylerinin genomlarında kalıtsal olarak taşınabilen bir veya birden fazla mutant gen yer almaktadır. Bu sebeple bu bireylerde çok daha az mutasyon ilavesi kanserin gelişimini tetiklemek için yeterli olabilmektedir.

5. Bazı kanser tiplerinin oluşumunda bazı virüs tiplerinin rolünün de olduğu bilinmektedir. Bu durum DNA'lı virüslerin enfekte ettiği hücrelerin DNA zincirinin içerisine yerleşmek suretiyle mutasyona sebep olmasıyla gerçekleşmektedir. Ya da RNA içeren virüslerde DNA'ya çevrilen kopyaların enfekte edilmiş hücre genomuna entegre olmasıyla kanserin gelişimine zemin hazırlanmaktadır.^{20, 21}

Kanser hücreleri genel olarak anormal hücre büyümesi ve çoğalması ile karakterizedir. Buna ek olarak kanser hücrelerinin bir diğer ortak özelliği olarak yayılması ve metastazı görülmektedir.²⁰ Ancak kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak oldukça hızlı büyüyüp çoğalmaktadırlar. Mitoz bölünmeye uğramak için kanser hücreleri normal hücreler gibi belirli bir büyüme sınırına ulaşmayı beklemez. Bu

durumun kanser hücrelerinin normal hücreler gibi belirli büyüme faktörlerine ihtiyaç duymamasıyla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Aynı zamanda kanser hücreleri damar oluşumunu indükleyecek anjiyogenik faktörlerin üretimini de sağlayabilmektedir. Böylece kanser hücreleri kendilerine ihtiyaç duydukları besin materyallerini temin edebilmektedirler.^{20, 21}

Bazı kanser türleri oksidatif stres kaynaklı olarak ortaya çıkabilmektedir. Daha çok reaktif oksijen türevleri olan serbest radikaller, olması gerekenden fazla miktarda bulunduğu hücre içerisinde yer alan biyomoleküllerde hasarlara sebep olmaktadır. Bu şekilde DNA üzerinde meydana gelen bir hasarın onarımı gerçekleştirilemediğinde, DNA zinciri üzerinde bir veya birden çok nükleotidin değişimine ortam hazırlanmaktadır. Bu durum neticesinde rekombinasyon, mutasyonlar, dokularda hasar, harabiyet, yaşlanma ve kanser oluşumu gözlenebilmektedir.²²

Tüm bunlara ek olarak kanserli hücrelerin ortaya çıkması “onkogen” adı verilen genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler, yapı, fonksiyon veya aktivitelerine dair düzenlemelerin bozulması neticesiyle de olabilmektedir. Onkogenler, genelde yeni bir fonksiyon kazanmasına neden olan bir mutasyon veya farklı bir sebep dolayısıyla otozomal dominant etki göstermekte olan genlerdir.²²

2.3. Kansere Dair Tedavi Yaklaşımları

Kanserin tedavisinde hedeflenen ideal yaklaşım biçimi, spesifik olarak kanser hücrelerini hedefleyen, sağlıklı hücrelere zarar vermeksizin kanserli hücrelerin ölümüne neden olabilecek tedavi biçiminin sağlanabilmesidir. Bu sayede beklenen hastanın yaşam süresinin ve yaşam kalitesinin artırılmasıdır. Günümüzde kanser tedavisinin gerçekleştirilmesinde hastanın genel sağlık durumu, kanserin türü, evresi, bulunduğu konum ve diğer faktörler göz önünde bulundurulmaktadır. Bu doğrultuda gerçekleştirilen tedavi seçenekleri içerisinde temelde üç yöntem bulunmaktadır. Bu

yöntemler; cerrahi, immünoterapi, kemoterapi, radyasyon tedavisidir. Tedavi sürecinde bu yöntemlerden bir ya da birkaçı kombine bir biçimde kullanılır.

Tedavi sürecinde kanserli hücrelerin öncelikli olarak cerrahi veya radyoterapi ile azaltılması veya gelişiminde yavaşlamanın sağlanması hedeflenir. Akabinde kemoterapi ve immünoterapi ile tedavi sürdürülür. Bu tedavinin temel amacı kanserli dokunun büyümesinin engellenmesi, metastazın ortaya çıkmasının bloke edilmesi, tümörün genel itibarıyla baskılanması ve hatta tamamen ortadan kaldırılmasına yönelik olarak sitotoksik etkinin oluşturulmasıdır.²³

Gerçekleştirilen kemoterapi tedavisinde en temel problemlerden biri kemoterapötik ajanların yalnızca kanser hücresine değil, aynı zamanda sağlıklı hücrelere karşı da sitotoksik etki göstermesidir. Bir diğer problem ise kanser hücrelerinin bu kemoterapötik ajanlara karşı direnç geliştirmesi durumudur. Daha önce gerçekleştirilmiş bir çalışmada kanser hastalarında %20'lik bir kısmın kemoterapötik ajanlarla tedaviye direnç geliştirdiği veya ölümcül seviyede toksisite meydana getirdiği belirlenmiştir.^{20, 24}

2.4. Nanoteknoloji ve Nanopartiküler Sistemler

Nanoteknoloji 1 ile 100 nm arasında boyutlara sahip olan materyallerin tasarımı, ölçümü, işlenmesi gibi işlemleri hedefleyen bilim dalı olarak bilinmektedir. Bu bilim dalının temel hedefleri arasında, nano boyutta materyallerin kazandıkları yeni özellikleri, fonksiyonları kullanmak suretiyle nano boyutlu sistemlerin, yapıların veya teknolojik materyallerin geliştirilmesi, kullanımı ve çözümlenebilmesidir.²⁵

Nanoteknoloji ilk kez Richard Feynman tarafınca ele alınmıştır. Amerikalı Nobel ödüllü fizikçi bu teknolojiye 1959 yılında çalışmalar gerçekleştirmeye başladığında temel amacı küçük maddelerden başlamak suretiyle daha küçük maddeler, materyaller

elde etmek olmuştur. 1974 yılında ise Norio Taniguchi “Nanoteknoloji” kelimesini ilk kez hayata geçirmiştir.²⁶

Nanoboyutta ilaç materyallerinin kullanımının tıbbi açıdan pek çok avantajı bulunmaktadır.²⁷:

- Nanoboyutlu materyaller, sahip oldukları küçük boyutları sayesinde damarlardan kolayca geçmek suretiyle sirkülasyona karışabilirler.
- Küçük boyutlarından dolayı partiküller maddenin yüzey alanını artırmasından dolayı çözünürlüğüne de pozitif anlamda katkı sağlar.
- Çözünürlüğü artan maddenin absorpsiyonu artacak, dolayısıyla biyoyararlanımının da artışı sağlanacaktır.
- Nanopartiküler sistemler istendiği takdirde, spesifik bir bölgeye hedeflendirilebilmektedir.
- Nanoteknoloji yardımıyla daha uzun süre stabil kalabilen, daha uzun raf ömrüne sahip formülasyonlar geliştirilebilir.
- Biyolojik ve tıbbi tedaviler için nanofarmasötikler oldukça uygun nitelik arz etmektedir.
- Nanopartiküler sistemlere PEG (Polietilen glikol) veya POE (Polioksietilen) gibi moleküllerin bağlanması nanopartikül yapılarının dolaşımında daha uzun süre kalmalarını sağlayabilmektedir.²⁸
- Bir nanopartiküler sisteme birden fazla etkin madde yüklemesi gerçekleştirilebilmektedir ve aynı sistemler birden fazla hedeflendirici molekül taşıyabilmektedir.²⁹

Nanopartiküler sistemlerle taşınan etkin maddeler, nanotaşıyıcılar sayesinde parçalanmadan korunabilirler. Epitelyal tabakadan daha kolay geçiş sağlanacağından ilacın absorpsiyonunun da artmasını sağlayabilir. Nanopartiküler sistemler ilaçların

farmakokinetik niteliklerini ve ilaçların dokular arasında gösterdiği dağılım şemasını, intraselüler penetrasyonu değiştirebilir, düzenleyebilirler.³⁰

2.5. Quantum Dotlar

Quantum dotlar, dış bir kaynak (UV ışık gibi) uyarımı neticesinde parlama yapan, nano boyutta yer alan, yarı iletken nitelik arz eden kristal yapılardır.³¹ Yapısal olarak bakıldığında quantum dotlar, yarı metal kristal bir çekirdeği kaplayan kabuk ve bir “cap” oluşumlarını barındırmaktadır.³²

Quantum dotlar beyaz ışığı absorbe ederek, çok kısa bir süre içerisinde parçacıkların farklı kombinasyonu olarak yeniden yayabilirler. Bu yayılımı sağlayan ışığın hangi dalga boyunda olduğu quantum dotun boyutunda değişiklik oluşturularak sağlanabilmektedir. Quantum dotların bu özelliği görüntüleme tekniklerinde quantum dotların kullanımının oldukça avantajlı olduğunu ortaya koymaktadır.³³

Quantum dotlar genellikle 10 nm’den küçük boyutlara sahip, toksik etkisi az olan parçacıklardır. Biyouyumlu niteliğe sahip olan quantum dotların yapılan in vitro çalışmalarda toksisitesinin gözlenmediği, in vivo çalışmalarda ise görüntüleme amaçlı kullanılan dozun önemli derece toksik nitelik sergilemediği gösterilmiştir.³⁴ Kanser hücre hatlarında hücre canlılığına, proliferasyonuna tek başına etkinliğinin olmadığı tespit edilmesine rağmen, quantum dotların kanser hücrelerini hedef alan ilaçlarla birlikte kullanımında hem in vitro hem de in vivo olarak çok daha etkili olduğu ortaya konulmuştur.³⁵

Quantum dotların ilaç taşınması noktasında doksorubisin, sisplatin gibi pek çok antikanser ilaç ile kombine kullanıldığı görülmüştür. Doksorubisin ile nanokompleks oluşturan quantum dotların kanser hücrelerini öldürmede hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda oldukça etkili olduğu kaydedilmiştir.³⁶

Tirozinkinaz inhibitörü konjuge edilmiş quantum dotlarla yapılan bir çalışmada akciğer kanseri hücre hattı üzerinde test edilmiştir. A549 akciğer kanser hücre hattının kullanıldığı çalışmada, tek başına ilacın kullanıldığı uygulamalara kıyasla quantum dotlarla konjuge olan ilacın uygulamalarının kanserin üç boyutlu görünümünde gözle görülür bir küçülmeye yardımcı olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak konjuge ilacın uygulandığı bütün hücre hattı uygulamalarında oldukça etkili sonuçlar kaydedilmiştir.³⁷

2.6. Hücre Ölümü

Hücre ölümü, hem embriyonik gelişimde hem de dokulardaki hücresel bazdaki dengenin sağlanmasında oldukça önemlidir. Hücre ölümlerinin kontrolünde pek çok mekanizmanın aktif olarak rol oynadığı son yıllarda yapılan pek çok çalışma ile ortaya konulmuştur. Bir hücrenin ölüm süreci başladığında, aktiveleşen mekanizmaların, ortaya çıkan morfolojik değişikliklerin apoptoz neticesinde mi yoksa otofaji ile mi oluştuğunu belirlemek zor olabilmektedir.³⁸ Buna ek olarak hücrelerin apoptoz, otofaji aracılığı ile ölüm ihtimalleri olduğu kadar patolojik hücre ölümü biçimi olan nekrozla da hücrelerin ölümü gözlenebilmektedir.^{39, 40}

2.6.1. Otofajik Hücre Ölümü

Gerçekleştirilen çeşitli morfolojik analizler sonrasında, bazı doku ve hücrelerde ölüm zamanında otofajik etkinliğin arttığı tespit edilmiştir. Bu hücre ölümü tipinde hücre içeriğinde yer alan organellerin ve makro moleküllerin lizozomal aktivite ile parçalanması neticesinde gelişen bir ölüm gözlenmektedir. Bu hücre ölümü ile anabolizma-katabolizma dengesi kolaylık sağlanabilmektedir. Bu yolla gerçekleştirilen hücre ölümleri ile sindirim sonucunda elde edilen moleküller sonrasında geri dönüşüme uğratarak diğer hücrelerin büyüme ve gelişiminde kullanılabilmektedir. Bu hücre ölümünde etkin rol oynayan primer lizozomlar endoplazmik retikulumun ekstrasellüler

membranı ile birleşmek suretiyle sekonder lizozomu (otofajik vakuol) oluşturmaktadır.⁴¹

2.6.2. Nekrotik Hücre Ölümü

Nekroz programlanmaksızın gerçekleşen, genetik kontrol altında olmayan bir ölüm sürecidir. Nekroz dış etkenler sonucunda hücrelerin rastgele bir biçimde ölmeleridir. Pek çok nedeni bulunmaktadır. En sık görülen sebebi hipoksidir. Toksik maddeler ile veya ağır metallerle muamele sonrasında da nekroz gözlenebilmektedir. Nekrotik hücre ölümünde mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin arttığı bilinmektedir. Buna ek olarak apoptotik olmayan proteazların aktivasyonu görülür. ATP üretiminde azalma ile birlikte Ca^{++} kanallarında açılma gözlenir.^{42, 43}

Nekrozun temel sebebi olan dış etkenler maruz kalan hücrenin iyon dengesinde bozulmalara sebep olmaktadır. DNA tamirinde aktif rol oynamakta olan PARP (Poli ADP-riboz polimeraz) enzimi NAD kaybına neden olmaktadır. Bu durum ATP eksikliğine sebebiyet verir. Bu durumda da iyon pompası yetersizliği ciddi bir sorun haline gelir. Hücre bu durumda sıvı almaya başlar ve organellerde şişmeler meydana gelir. Hücre içine kontrolsüzce dolan sıvı plazma bütünlüğüne zarar verir ve osmotik basınç etkisiyle hücre patlar. Patlayan hücrenin içeriği hücrelerarası boşluğa dağılır. Bu durum enflamasyonun ortaya çıkmasına neden olur. Enflamasyonun ortaya çıkması ile birlikte ortama makrofajların, nötrofillerin göçü başlar. Nekrotik hücre ölümünün en temel karakteristik özelliği enflamasyona eşlik eden hücrelerin gözlenmesidir. Bu hücreler nekrotik dokuda hücrelerarası boşluğa yayılmış olan hücre kalıntılarını fagosite ederler. Nekrotik ölüm olup olmadığı kontrol edilirken dikkat edilmesi gereken birincil unsur enflamasyon varlığıdır.^{42, 43}

2.6.3. Apoptotik Hücre Ölümü

Vücuttaki hücrelerin çoğalması ile ölümleri arasında bir denge mevcuttur. Kontrollü bir biçimde hücrelerin ölümlerinin düzenlenmesini sağlayan hücre ölümü tipi olan apoptoz kelime anlamı olarak ağaçtan düşen yaprak anlamına gelmektedir. Bu hücre ölümü tipi 1972 yılında J.F.K. Kerr isimli bir patalog tarafınca tanımlanmıştır.⁴⁴

Apoptozis, hücrelerin programlı bir biçimde kendi kendilerini yok ettikleri, genetik kontroller ile düzeni sağlanan, gerçekleşmesi için RNA sentezi, protein sentezi ve enerji ihtiyacı duyulan, organizmanın dengesinin korunmasında gerekli olan bir hücre ölümü biçimidir. Apoptoz ile ilgili ilk çalışmalar *Caenorhabditis elegans* nematodunda gerçekleştirilmiş ve apoptozun genlerin kontrolü altında olduğu tespit edilmiştir. İnsanlarda apoptozu kontrol eden kaspazlar, Apaf-1 ve Bcl-2 genlerinin bulunduğu belirlenmiştir.^{45, 46}

Apoptoz embriyonik dönemde görülebileceği gibi, postnatal hayatta da kan üretiminin dengede tutulması, deri hücrelerinin ölümü, etkisiz T hücrelerinin uzaklaştırılması gibi olaylarda apoptoza ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir.^{47, 48} Buna ek olarak apoptozis patolojik durumlarda da gözlenebilmektedir. Diyabet, Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklarda, viral enfeksiyonlarda, miyokard infarktüsünde, oksidatif stres durumlarında, aşırı alkol tüketimi, radyasyon maruziyeti gibi durumlarda da apoptozun ortaya çıktığı görülmektedir.⁴⁹⁻⁵¹

2.6.3.1. Apoptozun Aşamaları ve Düzenlenmesi

Apoptozda hücrenin kendisini yok etmek amacıyla programlı bir biçimde çeşitli metabolik ve fizyolojik süreçleri başlattığı bir olaylar dizisi gözlenir. Apoptoza uğraması planlanan ve bu doğrultuda sinyal almış olan hücre, etrafındaki komşu hücrelerle olan bağlarını koparır ve su kaybederek büzülür. Ardından içeriğinde yer alan kromatini yoğunlaşarak piknotik bir görünüm arz eder. Hücre organelleri yapısal

bütünlüklerini korurken DNA'sı nükleozomlardan kesilmiş bir halde bulunur. Hücre çekirdeğinin küçüldüğü, parçalandığı, hücreninse küçük apoptotik cisimciklere ayrıldığı görülür. Bu yapılar ise makrofajlarca tanınarak fagositozla ortadan kaldırılır. Ancak nekrotik dokularda olduğu gibi enflamasyon durumu ortaya çıkmamaktadır.^{39, 40}

Bu hücre ölümünün düzenlenmesinde pek çok faktörün etkisi gözlenmektedir. Bunlar; kalsiyum, seramid, Bcl-2 familyası gibi moleküler yapılar, çeşitli proteinler (p53, kaspazlar, sitokrom-c) ve mitokondriyon yapıları olarak sayılabilir. Apoptozun başlamasından bitişine dek hücreye devamlı olarak bir kalsiyum akışı gerçekleşir. Kalsiyum iyonu hücrede gen regülasyonundan, hücre iskeleti organizasyonuna, endonükleaz, proteaz gibi enzimlerin aktivasyonuna kadar çeşitli konumlarda görev almaktadır. Bcl-2 apoptozda hem proapoptotik, hem de antiapoptotik rol üstlenen üyelere sahip bir ailedir. Bu aile genlerinin homodimer veya heterodimer olması bir hücrenin apoptozla ilişkili olarak eğiliminin belirlenmesinde etkindir. Bcl-2 ailesinden Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma, Noxa gibi proapoptotik proteinlerin fazla olması bir hücrenin apoptoza eğilimli olduğunun göstergesidir. Bu proteinler apoptoz indükleyici faktörlerin salınımını indüklemektedir. Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ise antiapoptotik proteinlerdir. Antiapoptotik proteinler hücre içeriğine iyon akışının kontrolünü sağlayarak kalsiyum seviyesini kontrol altında tutmaktadır.⁵²⁻⁵⁴

P53, normalde bir hücrenin DNA'sında hasar görüldüğünde ortaya çıkarak hücre bölünmesini G1 fazında durdurmak suretiyle hücrenin DNA onarımı için zaman kazanmasını sağlayan bir protein yapısıdır. Ancak ilgili hasar onarılamaz durumda ise P53, proapoptotik Bax ile Apaf-1, Fas üretimini teşvik edip, antiapoptotik proteinlerin baskılanmasını sağlamaktadır.⁵⁵

Fas proteini de apoptozun uyarılmasında önemli bir etkindir. TNF reseptör ailesinin önemli bir üyesi olan Fas, sitotoksik T hücreleri ile natural killer hücreleri

üzerinde yer almaktadır. Fas proteini reseptörüne bağlandığında reseptör trimerizasyonunun gerçekleşmesini sağlar. Aktive olan reseptör ise FADD molekülü ile birleşerek prokaspazların aktivasyonunu sağlar, böylece apoptoz başlar.^{54, 56}

Apoptozun düzenlenmesinde etkin bir konuma sahip olan kaspazlar sistein proteaz yapılarıdır. Aspartik asitin ardında yer alan peptit bağı kırarak suretiyle etki gösterirler. Normalde hücre içerisinde inaktif olarak yer almaktadırlar. Birbirlerini proteolitik olarak aktive etmektedirler. Başlatıcı (Kaspaz 2,8,9,10), efektör (Kaspaz 3,6,7) ve inflammatuar (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) kaspazlar olmak üzere 3 ayrı tipte bulunurlar. DNA tamiri veya replikasyon için ihtiyaç duyulan enzimlerin inaktivasyonuna sebep olurlar. Buna ek olarak hücre iskeletinde yer alan proteinlerin kesilmesiyle hücre zarının tomurcuklanmasına sebep olmaktadır.⁵²⁻⁵⁴

2.6.3.2. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptozisin oluşumu için temelde iki ayrı mekanizmadan söz edilmektedir:

- İntrinsik Yol (Mitokondriyal yolak)
- Ekstrinsik Yol
 - Direkt mekanizma
 - İndirekt mekanizma

Her iki sinyal mekanizmasında da apoptozun gelişiminde kaspazların etkinliğinden söz edilmektedir. Hücre için sinyaller ile başlayan apoptoz intrinsik yoldan ilerlerken, hücrenin dışından gelen sinyaller neticesinde ekstrinsik yol ile apoptozun gelişimi sağlanmaktadır.⁵⁷⁻⁵⁹

A. İntrinsik Yol

Hücre içerisinde apoptozun başlatılmasına dair bir uyarı alındığında proapoptotik proteinlerden biri olan Bid, antiapoptotik protein özelliğinde olan Bcl-2'yi inaktive ederek Bax ve Bak'un aktivasyonunu sağlar. Bu noktada aktive olan Bax ve Bak

mitokondri membranında porların oluşumunu teşvik etmek suretiyle zarda potansiyel fark oluşumuna sebep olur.⁵⁴ Bu durum mitokondriyon membranından bazı maddelerin salınımını uyarır. Bunlar; sitokrom-c, Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonükleaz G), Kalsiyum ve AIF (apoptoz indükleyici faktör)'dir. AIF çekirdeğe taşınarak o kısmın parçalanmasına neden olur. Endo-G ise DNA'nın parçalanmasında rol oynar. Mitokondriden salgılanan sitokrom-c bu noktada Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör) ve ATP ile birleşmek suretiyle sitoplazmada bir apoptozom kompleksi oluşturmaktadır.⁶⁰ Oluşan apoptozom Kaspaz-9'u, Kaspaz-9 prokaspaz-3'ü aktif hale getirir. Aktifleşen Kaspaz-3 CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbest hale getirir. CAD çekirdekte kromalinin yoğunlaşmasına ve akabinde DNA fragmentasyonuna sebep olmaktadır.^{59, 61}

B. Ekstrinsik Yol

Fas, TNFR, DR5 gibi hücre yüzeylerinde yer alan reseptörlere ölüm sinyalleri olan FasL, TNF-alfa, TRAIL yapılarının bağlanması ile reseptörlerin trimerik bir yapıya erişmesi ile bu yolak başlar. Trimerik forma erişen reseptör prokaspazlar ve adaptör moleküller eşliğinde DISC (Death inducing singnaling complex) yapısını ortaya çıkarır. Bu birleşme prokaspaz-8'in Kaspaz-8'e aktifleşmesine neden olur. Bu noktada Kaspaz-8, Kaspaz-3'ü aktive eder. Ancak bunu 2 yolla yapabilir: Ya direkt yolla kaspaz-3'ü aktive eder, ya da Bid'i kesip dolaylı yoldan Kaspaz-9'un aktivasyonunu, akabinde kaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlar. Her iki yolda da sonuç olarak CAD aktivasyonu gözlenir. DNA fragmentasyonu ile bu yol son bulur.^{52, 54, 56}

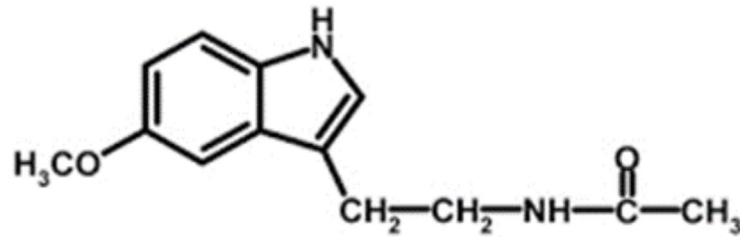
Bu başlık içerisinde yer alan bir diğer yol ise sfingolipid yoludur. Bu yolda hücre zarının yapı taşlarından biri olan sfingomyelin, çeşitli sebepler neticesinde aktive olan sfingomyelinaz ile seramid'e çevrilir. Seramid yapısı ise seramidaz aracılığıyla

sfingozine dönüştürülmektedir. Sfingozin Bid üretimini artırmak suretiyle apoptozun indüklenmesine sebep olmaktadır.⁶²

Bu başlık içerisinde ifade edilmesi gereken bir diğer yol ise Perforin-Granzim B sistemidir. Bahsi geçen yapıların her ikisi de serin proteazlardır. Sitotoksik T lenfositleri ile natural killer hücrelerin sitoplazmasında salgı granülleri içerisinde yer almaktadırlar. Hedef hücreye bağlanan ilgili immün sistem hücresi perforin salgılamaktadır. Perforin proteazı hücre zarında bir por oluşumunu indükler. Oluşan pordan hedef hücre içerisine kalsiyum iyonu akışı gerçekleşir. Bu durum da hedef hücre granüllerinden Granzim B salgılanmasına, o da kaspaz aktivasyonu aracılığı ile DNA fragmentasyonuna, dolayısıyla apoptozise neden olmaktadır.⁶²

2.7. Melatonin

Melatonin hormonunun keşfi 1958 yılında Lerner tarafınca gerçekleştirilmiştir. Lerner hipofizden elde etmiş olduğu melatoninin cilt renginde değişikliklere sebep olduğunu fark etmesi nedeniyle bu hormona Latince siyah anlamındaki “melas” ve iş anlamındaki “tosos” kelimelerinin birleşiminden oluşan melatonin ismini vermiştir.^{63, 64}



Şekil 2.1. Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin)

Karanlık ortamda salınımının arttığı bilinen melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) güçlü bir antioksidan etkinliğe sahip bir hormondur. Buna ek olarak melatonin hücrelerin yenilenmesinde, immün sistemin güçlendirilmesinde, sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde, vücut ısısının kontrol edilmesinde başrolde yer almaktadır.⁶⁵

(Şekil 2.1)

Melatonin pineal bezden salgılanmaktadır. Melatonin salgılanmasında önemli rolü olan sirkadiyen ritmin yaşa bağlı olarak düzenlendiği bilinmektedir. Ayrıca yalnızca fizyolojik şartların değil, duyguduruma dair bozukluklar gibi klinik olumsuz koşulların da temelinde melatonin sirkadiyen ritminde oluşan düzensizliklerin yer alabileceği düşünülmektedir. İnsan vücudunda yer alan en küçük endokrin bez olarak tanımlanan pineal bez, çam kozalağını anımsatan görüntüsü sebebiyle bu ismi almıştır. Bu endokrin bezde kan beyin bariyeri bulunmamaktadır. Böbreklerden sonra damarsal yapı bakımından en zengin doku olarak bilinmektedir.⁶⁴⁻⁶⁶ Pineal bezin yapısında yer alan pinealositler yalnızca melatonin değil, aynı zamanda serotonin, noradrenalin, histamin, dopamin gibi biyolojik aminlere ek olarak trioid stimüle edici hormon (TRH), somatostatin, arginin, vazopressin gibi peptitlerin üretiminde de görev almaktadır.⁶⁴

Pineal bezde 3.aya kadar nöroglial hücrelerin yoğunluğu mevcutken, sonrasında pinealositlerin bez içerisinde % 95 oranında baskınlığa eriştiği bilinmektedir.⁶³ Melatonin pineal bez harici başka bölgelerden de salgılanmaktadır. Bu bölgeler; lakrimal bez, retina, eritrositler, trombositler ve gastrointestinal sistemdeki bazı hücreler olarak sıralanabilir. Pineal bez harici sentezlendiği bölgelerden salınan melatoninin plazma melatonin seviyesine etkisi çok azdır.⁶⁵ Doğal bir nörotransmitter olan melatonin karanlıkla birlikte salgısının artması dolayısıyla “karanlıklar hormonu” olarak da adlandırılmaktadır. Antioksidan, hücre yenileyici, biyo-ritm düzenleyici özelliklerinin yanı sıra melatoninin büyüme hormonunun sentezini artırıcı ve ergenliği başlatıcı nitelikleri de bulunmaktadır.^{67, 68}

2.7.1. Melatonin Sentezi

Melatonin sentezinde ana materyal triptofandır. Melatoninin sentezi pinealositlerde temel biyomolekül olan triptofan aminoasitinden gerçekleştirilir. Triptofan ilk olarak triptofan hidroksilaz enzimi yardımıyla 5-hidroksitriptofana çevrilir.

5-hidroksitriptofan aminoasit dekarboksilaz enzimi yardımıyla serotonine dönüştürülür. Akabinde serotonin N-asetil transferaz kataliziyle N-asetil serotonine, N-asetil serotonin ise metiltransferaz enzimi yardımıyla melatonine çevrilmektedir.⁶³ Triptofan hidroksilaz enzimi reaksiyonu katalizlerken tetrahidrobiopterin (BH₄) ile O₂'nin kofaktörlüğüne ihtiyaç duymaktadır. Aynı reaksiyonda B₆ vitamininin koenzim olarak görev yaptığı bilinmektedir.⁶⁹

Sentezde ara metabolit olarak yer almakta olan 5-hidroksitriptofan kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilir niteliktedir.^{70, 71} Serotonine dönüşümü ardından aynı geçiş kolaylığına sahip olmaz. Karanlıkla birlikte de serotonin melatonine dönüşmeye başlar. Saat 19.00-20.00 aralığında karanlıkla birlikte artmaya başlayan melatonin salgısı, gece 02.00-04.00 saatleri arasında zirve noktasına ulaşır. 29 mg/gün hızında salgılanır.^{66, 70}

2.7.2. Melatonin Sentez ve Salınımına Etki Eden Faktörler

Melatoninin sentezlenmesinde etki eden faktörlerin başında ışık gelmektedir. Aydınlık-karanlık, gece ve gündüz döngüleri melatonin sentezinde kontrol sağlayan temel etkindir. Bu kontrol mekanizması “fotonöroendokrin kontrol” olarak ifade edilmektedir. Işık yalnızca sirkadiyen ritmin senkronizasyonunu gerçekleştirmez, aynı zamanda melatoninin akut olarak sentezinin baskılanmasında da etkindir. Baskılanma gücünün belirlenmesinde ışığın parlaklık derecesinin oldukça büyük önemi vardır. Işık parlaklığı arttıkça melatonin sentezinin baskılanma gücünde artış görülmektedir.⁷²⁻⁷⁴ Melatoninin üretimi ve salgılanmasında ışığın etkisi, ışığın dalga boyu ve şiddeti ile yakın seviyede bağlantılıdır. Melatonin sentezini, kandaki seviyesini değiştiren bir diğer etken ise yaştır. Yenidoğanlarda plazmadaki melatonin seviyesi düşüktür. Üçüncü aydan sonra bebeklerde melatonin salgısı ritmik bir düzene girer. Buna ek olarak alkol, sigara, fazla kahve-çay, gürültü, uyumadan önce karnın tok olması, depresyon ilaçları,

sedatif ilaçlar ve beta blokörler de melatonin sentezinde yavaşlamaya sebep olmaktadır.^{75, 76}

2.7.3. Melatonin Reseptörleri

Melatonin reseptörleri temel olarak 3 adet olarak tespit edilmiştir. Bunlar, MT1, MT2 ve MT3 reseptörleridir. Melatonin reseptörlerinin üçüncüsü olan MT3 yakın zamanda keşfedilmiştir.

MT1 reseptörü yüksek afiniteye sahip, GTP bağlama proteinleri familyasının üyesi olan bir reseptördür. Bu reseptörler aktive olduğunda reseptöre sahip hücrede adenilat siklaz aktivasyonunun baskılanması durumu ortaya çıkmaktadır. MT2 ve MT3 reseptörleri ise MT1'den farklı olarak düşük afiniteye sahip reseptörlerdir. Bu reseptörler fosfoinositol hidrolizi sonucunda etki ortaya koyarlar. Dokulardaki dağılımları ise kesin olarak tespit edilememiştir.^{77, 78}

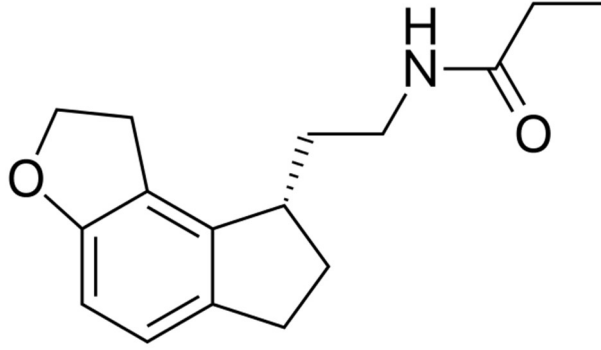
MT1 reseptörleri G proteini kenetli olmaları dolayısıyla adenilat siklazın inhibisyonuna sebep olarak cAMP seviyesinde azalmaya neden olurlar. Bu reseptörün daha çok renal aktivite, uyku, sirkadyen döngü ve üreme ile ilişkili işlevlerde aktif olduğu bilinmektedir. Ayrıca MT1 reseptörlerinin Mel11 ve Mel1b olacak şekilde iki ayrı alt tipi mevcuttur.⁷⁹

MT3 reseptörü hamster hayvanlarının böbreklerinde tespit edilmiş ve MT2 reseptörüne olan benzerliğinden dolayı MT2 olarak isimlendirilmiştir. Bu reseptöre ilişkin çok fazla veri bulunmamaktadır.⁸⁰

2.7.4. Ramelteon

Ramelteon (Rozerem©, Takeda, Japonya; TAK-375), hem MT1 hem de MT2 reseptörlerine agonist etki sergileyen bir ilaçtır. 2005 yılında kullanım onayı alan Ramelteon, uykuya dalmada güçlük çeken kişiler için uykusuzluk tedavisi amacıyla kullanıma girmiştir. Gastrointestinal sistemden %84 oranında emilen Ramelteonun kan

dolaşımadaki yarılanma ömrünün 1-2 saat olduğu bilinmektedir. CYP1A1, CYP1A2 ve CYP2C9 karaciğer enzimleri tarafınca metabolize edilmektedir.⁸¹



Şekil 2.2. Ramelteon

2.7.5. Melatonin, Ramelteon ve Kanser

Kanserin tedavi sürecinde melatonin daha çok IL-2 ile kombine bir biçimde yer almaktadır. IL-2 tek başına etkin anti-tümörojenik etki gösterebilmesi için çok yüksek dozlarda uygulanması gerekmektedir ve bu yüksek dozlarda IL-2'nin toksik etkilere sebep olduğu bilinmektedir. Ancak IL-2 melatonin ile kombine uygulandığında melatoninin IL-2'nin istenilen etkilerini ortaya çıkardığı ve yüksek dozlarda uygulanmadan da antikanserojen etki gösterebilmesini sağladığı görülmektedir. Buna ek olarak melatoninin sağlıklı hücrelerde apoptozu engelleyici etkisinin olduğu bilinmektedir.⁸²

Melatoninin kanser üzerindeki etkisi son 80 yıldır araştırmalara konu olmaktadır. Pek çok epidemiyolojik çalışma ile de melatoninin antikanser etkisi kanıtlanmıştır.^{83, 84} Göğüs kanseri hücre hatları olan MCF-7 ve CMT-U229 üzerinde yapılan in vitro çalışmada, melatoninin hem kanser hücrelerinin canlılığını yok ettiğı hem de kanserin yayılımını önleyecek nitelikte etki gösterdiği tespit edilmiştir. Buna ek olarak melatonin göğüs kanser hücrelerinin radyasyon tedavisine duyarlılığını da artırmaktadır.⁸⁵

Prostat kanser hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada; kullanılan melatoninin kanser hücrelerinin metastaz süreçlerinde ve beslenmelerinde etkin role sahip olan anjiogenesis proteinlerinin üretimini engellediği belirlenmiştir. LNCaP ve 22Rv1 prostat kanser hücre hatları üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise melatoninin anti-proliferatif niteliği tespit edilmiştir.⁸⁶

Karaciğer HepG2 kanser hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışma melatoninin kanser hücrelerinin canlılığını azalttığını ortaya koymuştur. Buna ek olarak MT1 reseptörü sayesinde melatoninin akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunu da inhibe ettiği tespit edilmiştir. cAMP seviyesindeki düşüşle birlikte ERK maddesinin aktivasyon uyarımının artışı ile de melatoninin inhibitör etkisi açıklanmaktadır.⁸⁷

Akciğer kanseri hücre hattında gerçekleştirilen bir çalışmada; melatoninin varlığında uyarımlı inhibisyonu artırarak tümör hücrelerinin başka bir bölgeye göç etmesini ve çoğalmasını engellediği belirlenmiştir. Bunlara ek olarak melatoninin radyoterapi ile bazı anti-kanser ilacın etkinliğini artırdığı tespit edilmiştir.⁸⁸

PANC-1 pankreas kanser hücre hattında yapılan çalışmada 1 mM konsantrasyonda uygulanan melatonin hormonunun oldukça yüksek bir oranda inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu inhibisyonun VEGF miktarının azalmasıyla ilgili olduğu ifade edilmiştir.⁸⁹ Kolon kanseri türü olan HT-29 hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada melatoninin anti-inflamatuvar ve antioksidan etkileri dolayısıyla tümör hücrelerinin gelişimini durdurduğu kaydedilmiştir. Hücre içerisinde reaktif oksijen türlerini artırıp ve hücre canlılığını azaltarak da etki gösterebildiği kaydedilmiştir.^{90, 91}

Endometriyal kanser hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada Ramelteonun antiproliferatif etki sergilediği tespit edilmiştir. Oldukça düşük dozlarda etki sergileyen Ramelteonun, kontrol ve melatonin gruplarına kıyasla hücre canlılığını özellikle 10-8 M dozunda ciddi oranda baskıladığı ifade edilmektedir.⁹²

Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilen bir çalışmada ise, Ramelteon ilacının hem antiproliferatif hem de antiinvazif etkinlik sergilediği tespit edilmiştir. Ramelteonun etkisine Caco-2 hücrelerinin HT-29'a kıyasla daha duyarlı olduğu belirlenmiştir.⁹³

Bahsedilen literatür verileri ışığında, melatonin hormonunun ve agonistinin kanser hücre hatları üzerindeki etkileri gözle görülür niteliktedir. Bu doğrultuda melatonin hormonu ve agonistinin etkinliğini artırma niteliğine sahip olan quantum dotlarla kombinasyonunun oldukça etkin sonuçlar vereceği düşünülmektedir. Quantum dotlara immobilize melatonin ve melatonin agonisti ilacın kanser hatları üzerindeki konjuge kullanımına dair yapılmış bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Literatür verileri ışığında, bilim dünyasındaki bu eksikliği gidermek, çeşitli kanser türlerine yeni bir tedavi yaklaşımı belirleyebilmek adına bu çalışmanın gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Tablo 3.1. Quantum Dot Sentezi ve Hücre Kültürü İçin Kullanılan Materyaller

Sıra	Materyal	Menşei
1	Santrifüj	Allegra, ABD
2	Saf Su Cihazı	Isolab, Türkiye
3	Spektrofotometre	Epoch, ABD
4	Çalkalayıcı	Heidolph, Almanya
5	Hassas Terazı	Weightlab Instruments, Türkiye
6	Evaporatör	IKA, Almanya
7	pH-metre	Isolab, Türkiye
8	Yüksek devirli santrifüj:	Beckman coulter, ABD
9	Vorteks	Isolab, Türkiye
10	+4°C ve -20°C buzdolapları	Bosch, Almanya
11	Kabin: class II	Labor ildam, Türkiye
12	Otoklav	Lica, Meksika
13	CO ₂ Etüvü	Nüve, Hollanda
14	İnverted Mikroskop	Leica, Almanya
15	-80 °C dolap	Nu Aire, İngiltere
16	Elisa Okuyucu	Biotek, ABD
17	Mikropipetler:	Eppendorf, Almanya
18	RT-PCR Cihazı:	Qiagen, Almanya
19	Nanodrop UV-VIS spektrofotometre	Epoch, ABD
20	Nanodrop:	Roche, İsviçre
21	Total Antioksidan Kapasite Kiti	Rel Assay Diagnostic, Türkiye
22	Total Oksidan Durum Kiti	Rel Assay Diagnostic, Türkiye
23	Annexin V/PI Apoptosis Detection Kit	Thermo, ABD
24	Purelink RNA Mini Kit	Thermo, ABD
25	Human Double-Dye(Taqman) Gene Detection Kıt	Thermo, ABD
26	QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Almanya
27	MTT	Sigma, ABD

3.2. Metot

3.2.1. Quantum Dot Yeşil Sentezi

3.2.1.1. Bitki Örneklerinin Hazırlanması

Bu çalışmada nar bitkisi *Punica granatum*'dan faydalanılmak suretiyle CdS ve CoS quantum dotlarının sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Erzurum yerel marketlerinden temin edilen bitkinin hedeflenen nar bitkisi olduğu, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde çalışan taksonomistlerin yardımıyla tanımlandı. Ardından nar bitkisi tohumları seçildi, 25 g miktarındaki tohum 10 ml saf suda blender yardımıyla karıştırıldı. Elde edilen karışım öncelikle filtre kağıdından geçirildi, ardından da 5000 G hızında 10 dk süreyle olmak üzere santrifüj cihazında kalıntılardan arındırıldı. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant yeşil sentez için kullanıldı.

3.2.1.2. Quantum Dotların Sentezi

Sentezi gerçekleştirilecek CdS ve CoS quantum dot bileşiklerinin çözeltisi hazırlandı. Yeşil sentezde kullanılmak üzere hazırlanmış bitki süpernatantından 2 ml miktarında alındı. Reaksiyon ortamı ilgili materyaller hazırlandı ve çözeltilerin karıştırılması ile reaksiyon kuruldu. Ardından reaksiyon ortamı kontrollü bir biçimde manyetik karıştırıcı üzerinde ısıya maruz bırakıldı. Gece boyu devam eden reaksiyon ile nanopartiküllerin sentezi sağlandı. Akabinde bu karışım çöken partikülleri uzaklaştırmak için santrifüj edildi.

Quantum dotlar liyofilizasyon işleminin ardından çalışmalarda kullanılmak üzere uygun ortam koşullarında saklandı.⁹⁴

3.2.1.3. Quantum Dotlara İlaç Bağlanması-PEG'leme İşlemi

CdS ve CoS quantum dotlarına hem ilgili ilacın bağlanması hem de PEG ile kaplanması işlemi için, daha önceden sentezlenen quantum dot, ilgili ilaç ve PEG belirli miktarlarda balon joje içerisine alındı. İçerisine belirli miktarda kloroform ilavesi

gerçekleştirildi. Soğutucu bir düzenek eşliğinde balon jojeler sonikatöre yerleştirildi. Reaksiyon ısı 55°C'ye gelinceye kadar düzenek ısıtıldı. Ultrasonikasyon ile birlikte reaksiyon bu şekilde 4 saat süreyle devam etmesi sağlandı. Ardından reaksiyonun organik çözücüsü evaporatör yardımıyla uçuruldu. İlaç bağlanmış ve PEG ile kaplanmış quantum dotlar elde edildi.⁹⁵

3.2.1.4. Quantum Dotlarının Biyokimyasal Özellikleri

CdS ve CoS quantum dotlarının yeşil sentezi ve pegilasyon işlemleri süresince, gerçekleştirilen reaksiyonların biyokimyasal nitelikleri ile bağlanma, salım profillerine ilişkin ölçümler gerçekleştirildi.

Quantum dotlara ilaç bağlanması işlemi esnasında belirli aralıklarla reaksiyon içeriğinden örnekler alındı, numune içeriğinde serbest ilaç miktarı spektrofotometrik olarak belirlendi. Her uygulama için ayrı ayrı UV visible spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapıldı.

Spektrofotometrik ölçümler ile sentezde kullanılan ilacın kalibrasyon eğrisi elde edildi. Bunun için ne kadar ilaç içerdiği bilinen ilaç çözeltisinin seri dilüsyonunun UV visible spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapıldı.

Quantum dotlara konjuge edilmiş ilacın salım profilinin belirlenmesinde insan vücudunu taklit edebilen bir ortam içerisinde ilgili sentez materyalinin çözünmesi sağlandı. Akabinde belirli aralıklarla spektrofotometrik ölçüm yapılması suretiyle çözelti içeriğindeki serbest kalmış ilaç miktarı tespit edildi. Bu işlem 96 saat boyunca devam ettirildi.

3.2.1.5. Quantum Dotların Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında yapılacak quantum dot karakterizasyon işlemleri DAYTAM bünyesinde hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda yeşil sentezle üretilen quantum dotların Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), X Işını

Kristalografisi (XRD), Geçirimli Elektron Mikroskobisi (TEM), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ölçümleri yapıldı.

TEM mikroskobu (Transmission Electron Microscope) ile sentezlenen quantum dotların nano boyutlu görüntüleri elde edildi. SEM yani taramalı elektron mikroskobundan elde edilen görüntüler ise nano yapıların yüzey morfolojisinin tespitinde kullanılmıştır.

XRD cihazı kullanılarak quantum dotların ve ilaç konjuge edilmiş quantum dotların kristal yapılarının belirlenmesi sağlandı. FT-IR spektrofotometresinde ise 1 cm uzunluğunda olan quartz küvetlerin kullanılacağı analiz ile hem absorpsiyon hem de emisyon ölçümü yapıldı.

3.2.2. Hücre kültürü

Bu çalışmada nöroblastom (SH-SY5Y), prostat kanseri (DU145), kolon kanser, (HT-29) hücre hatları üzerinde çalışmalar yapıldı. Kanser hücre hatları sıvı azot tankından çıkarılarak çözüldü. 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında hücrelerin çoğalması için; %10 FBS (fötal sıgır serumu), %1 L-glutamin, 100 IU/mL penisilin ve 10 mg/mL streptomisin içeriğine sahip DMEM F12 besi ortamına ekimi gerçekleştirildi. Flask içerisinde yeterli sayıya ulaşan hücreler 96’lık well-plate’lere uygun ortam koşulları gözetilerek ekildi.

Hücre hatları well plate’lere ekildikten sonra, hücreler kuyucuklarda % 80 konfluensi seviyesine eriştiklerinde uygulamalar gerçekleştirildi. Uygulama dozlarının tespitinde literatür bilgisine ek olarak, sentezlenen nano yapılarla ile gerçekleştirilen ön çalışmalardan faydalanılmıştır. Yapılan uygulamalar aşağıdaki tabloda verilmiştir. (Tablo 3.2)

Tablo 3.2. Hücre Kültürü Uygulamaları ve Dozları

Sıra	Uygulama	Doz
1	Kontrol	
2	CdS Quantum Dot	1 µg/ml
3	CdS Quantum Dot	25 µg/ml
4	CdS Quantum Dot	50 µg/ml
5	Biyokonjuge CdS (Quantum Dot + Ramelteon + PEG)	50 µg/ml
6	Biyokonjuge CdS (Quantum Dot + Ramelteon + PEG)	100 µg/ml
7	Biyokonjuge CdS (Quantum Dot + Ramelteon + PEG)	200 µg/ml
8	CoS Quantum Dot	1 µg/ml
9	CoS Quantum Dot	25 µg/ml
10	CoS Quantum Dot	50 µg/ml
11	Biyokonjuge CoS (Quantum Dot + Ramelteon + PEG)	50 µg/ml
12	Biyokonjuge CoS (Quantum Dot + Ramelteon + PEG)	100 µg/ml
13	Biyokonjuge CoS (Quantum Dot + Ramelteon + PEG)	200 µg/ml
14	Ramelteon	1 mM
15	Ramelteon	500 µM
16	Ramelteon	100 µM
17	Melatonin	1 mM
18	PBS Kontrol	

3.2.2.1. Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması

Sıvı azottan çıkarılan hücrelerin (SH-SY5Y, DU145, HT-29) DMEM/F12 besi ortamında flasklara ekimi yapılmıştır ve 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında iki günde bir defa olacak şekilde besi ortamları yenilenerek gelişimi sağlanmıştır. Kanser hücrelerinin öncelikle flask yüzeyinden ayrılması işlemini gerçekleştirmek için besi ortamları flasklardan alındı, PBS yardımıyla hücre yüzeyindeki kirlilikler yıkandı. Hücre yüzeyine 2,5 ml miktarında tripsin ilavesiyle flaskların 5 dk süreyle inkübatörde beklemesi sağlandı. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı kontrol edildi.

Tüm hücrelerin yüzeyden ayrıldıklarından emin olunduktan sonra flask içerisine 5 ml serum içeren besi ortamı ilavesi yapıldı. Ardından flaskın tüm içeriği 15 ml’lik

santrifüj tüpüne alındı. 1500 g'de 5 dakika süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre kütlesi üzerine 1 ml besi ortamı ilavesi yapıldı. Ardından pipetaj işlemi ile hücrelerin homojen dağılımı hedeflendi. 75 cm² yüzey alanına sahip flasklara önce 10 ml besi ortamı ilave edilip, üzerine homojen dağılmış hücrelerden 100 µl miktarında eklendi. Akabinde flasklar hücre gelişimi için inkübatöre bırakıldı.

3.2.2.2. Hücre Sayımı

Bu işlem için tripan mavisi kullanılır. Tripan mavisinin ölü hücrelerin zarlarından kolaylıkla geçebildiği bilinmektedir. Pasajlama işleminde olduğu gibi öncelikle hücreler tripsin ile yüzeyden ayrıldı. Akabinde içerisine besi ortamı ilavesi yapılarak 1500 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Aynı şekilde süpernatant uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine 1 ml besi ortamı ilave edildi. Pipetaj işlemi ile hücrelerin homojen dağılımı sağlandı. Elde edilen hücreli sıvıdan 100 µl alınarak 400 µl PBS ilavesiyle seyreltme işlemi yapıldı. Pipetaj yapılarak hücrelerin homojen dağıldığından emin olundu. Hazırlanan hücrelerin üzerine 1 µl tripan mavisi ilave edildi. Ardından bu sıvı içeriğinden 10 µl alınarak thoma lamına bırakıldı. Işık mikroskobu altında canlı hücrelerin sayımı yapıldı.

3.2.2.3. Hücrelerin Dondurulması

Flask içerisinde bulunan hücrelerin tripsinizasyon yapılarak yüzeyden ayrılması sağlandı. Santrifüj tüpü içerisine alınan hücrelerin aynı şekilde santrifüj ile çökmesi gerçekleştirildi. Her bir santrifüj tüpü için hazırlanan 1,5 ml hacimli kriyo tüpler hazır halde bekletildi. 9:1 oranında serum:DMSO karışımı da hazırlandı. Süpernatant kısımları uzaklaştırılan hücreler buz yüzeyine alındı. Üzerlerine 500 µl serumlu karışım ilave edildi. Akabinde hücrelerin hazırlanan kriyo tüplere koyulması ile işlem sonlandırıldı. Kriyo tüpler kademeli olarak soğutuldu. Öncelikle -20°C'de bir saat,

ardından -80°C’de gece boyu bekletilen hücreler işlem sonunda sıvı azot içerisine -196°C’ye alındı.

3.2.3. MTT Hücre Canlılık Testi

Bu testin temelinde MTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) adlı suda çözünebilir bir madde bulunmaktadır. Canlı hücreler bu maddeyi işleyerek formazan kristallerine indirgerler. 24 saatlik uygulama süresi sonunda ilave edilen MTT solüsyonu ile hücreler, 4 saat süreyle 37°C’de % 5 CO₂ içeren ortamda, karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda formazan kristallerinin çözücüsü olarak her bir kuyucuğa 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) çözücüsü ilave edildi. Ortaya çıkan turuncu renkli boya da spektrofotometre cihazı yardımıyla 570 nm dalga boyunda ölçüldü.⁹⁴

3.2.4. Total Oksidan Durum (TOD) ve Total Antioksidan Kapasitelerinin (TAK) Belirlenmesi

Bu test için hücre kültüründe hücrelerin gelişikleri plazma sıvılarından faydalanıldı. İşlemi gerçekleştirmek için Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen ticari TAK (Total Antioksidan Kapasite, TAK) TOD (Total Oksidan Durum) ticari kitleri kullanıldı. TAK ölçümünün prensibi, test edilen numune içeriğindeki antioksidanların mavi yeşil renge sahip ABTS radikalini renksiz forma getirmesi ile ilişkilidir.⁹⁴

30 µl örnek içeren kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan eklenerek 660 nm’de ilk absorbans okundu. Daha sonra aynı kuyucuklara 75 µl Reaktif 2 eklenerek 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme sonunda 660 nm’de ikinci absorbans değeri okundu. Elde edilen absorbans değerleri mmol Trolox Equiv./L cinsinden tespit edilmiştir. Bu amaçla aşağıdaki formülden faydalanılmıştır.

$$\text{mmol Troloks Eşdeğeri/L} = \frac{(\Delta \text{Standart Absorbansı}) - (\Delta \text{Örnek Absorbansı})}{(\Delta \text{Standart Absorbansı}) - (\Delta \text{Standart2 Absorbansı})}$$

TOD düzeyi ölçümün prensibi numune içeriğindeki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksinin ferrik iyonla dönüşümü sağlaması ve bunun da asidik bir ortamda kromojen ile reaksiyona girerek absorbans artışına sebep olmasına dayanmaktadır. Spektrofotometrik olarak izlenen absorbans artışı örnekteki oksidan moleküllerle doğru orantılıdır. 75 µl plazma örneğinin bulunduğu kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 530 nm’de ilk absorbansı okundu. Daha sonra aynı küvete 25 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Bekleme sonunda 530 nm’de ikinci kez absorbansı okundu. Elde edilen absorbans değerleri Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi. Bu amaçla aşağıdaki formülden faydalanılmıştır.

$$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eşdeğeri/L} = \left(\frac{\Delta\text{Örnek Absorbansı}}{\Delta\text{Standart Absorbansı}} \right) * \text{Standart Konsantrasyonu} \left(20 \mu \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right)$$

3.2.5. Flow Sitometri

Hücre kültüründe gerçekleştirilen uygulamaların ardından hücrelerin apoptoz ile mi, yoksa nekrotik şekilde de öldüğünü tespit etmek için kullanılır. Bu amaçla Annexin V-FITC boyasından faydalanıldı. İşlem Annexin V/PI Apoptosis Detection Kit (Thermo Fisher, ABD) ile gerçekleştirildi. Kit bileşenleri oda sıcaklığında bekletildi. Ardından Annexin V Binding Buffer 10 kat dilüe edilerek 1x buffer elde edildi. 1x PBS ile 1×10^6 hücre/ml oranında hücreler hazırlandı. Toplanan hücreler 2 kez PBS ile 300 g’de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Ardından hücre peleti 100 µl 1x Annexin Binding Buffer ile sulandırıldı.⁹⁶

100 µl hücre süspansiyonuna 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl PI eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında karanlık koşullarda inkübe edildi. Akabinde 400 µl 1x Annexin Binding Buffer eklendi. Flow sitometri cihazında 1 saat içinde analiz edildi.

3.2.6. RNA İzolasyonu

Bu işlem için Purelink RNA Mini Kit (Thermo Fisher, ABD) ticari kitinden

faýdalanılmıştır.⁹⁷ Flasktan tripsinizasyon ile kaldyılan ve santrifüj tüpü dibine santrifüj ile çökmesi sağlanan hücrelerin üzerine uygun miktarda lizis buffer solüsyonu eklendi. Hücrelerin birbirinden ayrılması ve parçalanması için vortekslendi. Vorteks sonrası hücreler 1600 g’de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant RNaz-free tüplere alındı. Üzerine sıvı hacmi kadar %70 etanol maddesi ilave edildi. Yeniden vorteksleme işlemi yapıldı. Ardından 700 µl kadar sıvı kolon içeren koleksiyon tüpüne aktarıldı. Devamında 12000 g’de 15 saniye süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Bu basamak bir kez daha tekrar edildi. Akabinde 700 µl Wash Buffer I solüsyonu kolona eklendi. Kolon 12000 g’de 15 saniye boyunca santrifüj edildi. Sonrasında etanol içeren Wash Buffer II solüsyonundan 500 µl kolona eklendi. Yeniden 12000 g’de 15 saniye boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem ardından kolon 1,5 ml’lik başka bir tüpe aktarılır. Kolon üzerine 30-50 µl RNase free su ilavesi gerçekleştirilerek kapak kapatıldı. 2 dakika boyunca 12000 g’de santrifüj edildi. İşlem yapılınca kadar izole edilen RNA’lar -20°C’de muhafaza edildi.

3.2.7. cDNA Sentezi

cDNA sentezi işlemi için QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Almanya) ticari kitinden faydalanılmıştır. Bu amaçla 14 µl’lik bir karışım solüsyon hazırlandı. Bu solüsyon içeriğinde 2 µl genomik DNA wipeout buffer 7x solüsyonu, 1 µl RNA, 11 µl de RNase free su bulunmaktadır. Bu karışım öncelikle 2 dakika boyunca 42°C’de tutuldu. Akabinde yeniden buz üzerine koyuldu. Sonrasında reverstranskripsiyon master mix karışımından 1 µl, Quantscript RT buffer 5x solüsyonundan 4 µl, RT primer mix’ten 1 µl olacak şekilde alınarak 14 µl’lik başlangıç karışımı 20 µl’ye tamamlandı. Akabinde tüpler RT-PCR cihazına yerleştirildi. 42°C’de 15 dakika, 95°C’de 3 dakika olacak şekilde ısı işlem başlatıldı. İşlemin ardından cDNA içeren tüpler -20°C’ye kaldırıldı.⁹⁸

3.2.8. Real Time PCR İşlemi

Sentezlenen cDNA'ların okunması için her bir tüpe 0,25 µl forward, 0,25 µl reverse primer, 0,15 µl prob, 3 µl cDNA, 3 µl master mix ve 12,75 µl saf su ilavesi gerçekleştirilerek son hacim 20 µl'ye tamamlandı. 95°C'de 5 dakika süreyle bekleme işlemi akabinde; 45 döngü olacak şekilde 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 30 saniye döngüsü başlatılarak ekspresyon seviyeleri ölçüldü.

3.2.9. İstatistiksel Analiz

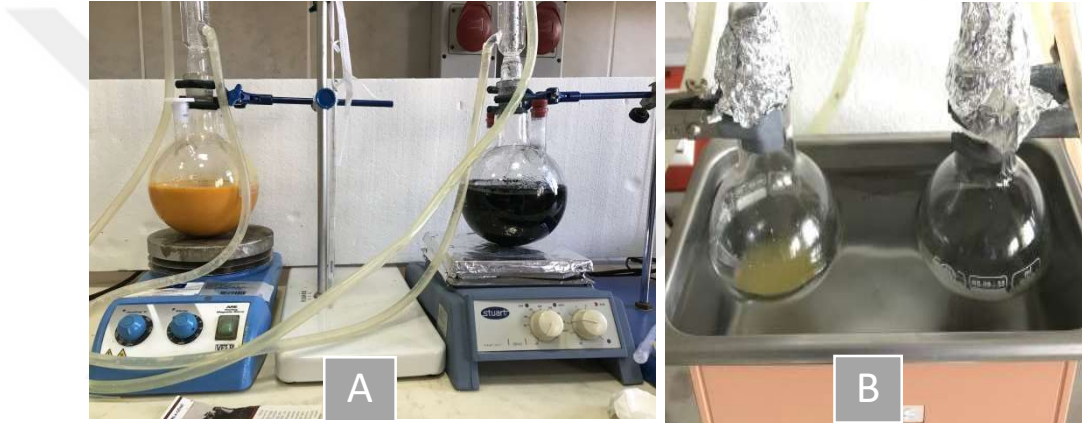
Tüm verilerin istatistiksel olarak analizi IBM SPSS 20.0 software programı yardımıyla gerçekleştirildi. One-Way ANOVA testine göre yapılacak analizde uygulamalar arasındaki farklılıklar Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile tespit edildi.

4. BULGULAR

4.1. Quantum Dot Sentezi ve Karakterizasyonu Bulguları

4.1.1. Quantum Dotların Yeşil Sentezi ve Pegilasyon İşlemi

Kadmiyum sülfür (CdS) ve Kobalt sülfür (CoS) quantum dotları *Punica granatum* nar bitkisi ekstresi kullanılarak sentezlenmiştir. Yeşil sentezin her iki quantum dot için de reaksiyonun başladığı ilk 15 dk içerisinde gerçekleştiği belirlenmiştir. Quantum dotların sentez reaksiyonlarına dair fotoğraflar Şekil 4.1’de verilmiştir.

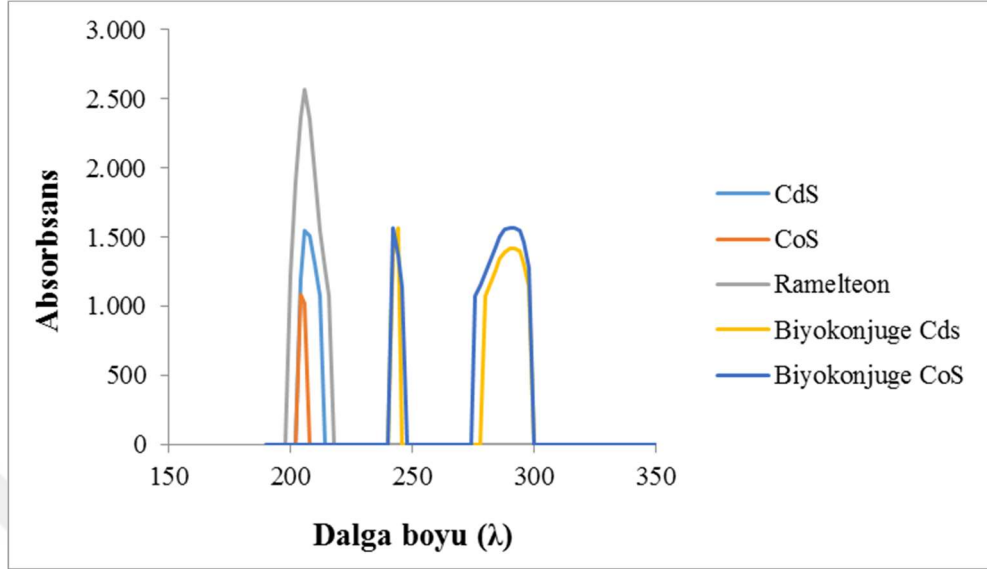


Şekil 4.1. Quantum Dot ve pegilasyon işlemlerinin sentez fotoğrafları. A: Sırasıyla CdS, CoS quantum dotlarının yeşil sentezi. B: Sırasıyla CdS, CoS quantum dotlarının biyokonjugasyon/pegilasyon reaksiyonları.

4.1.2. Quantum Dotların Biyokimyasal Özellikleri

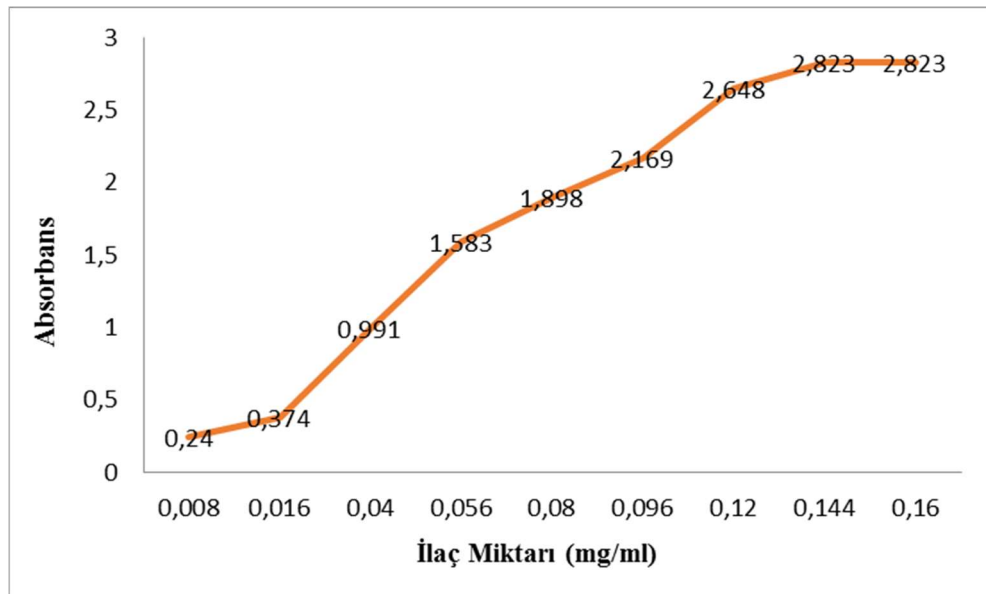
Quantum dota ilaç bağlanması ile ilişkili spektrofotometrik ölçümler neticesinde elde edilen grafik Şekil 4.2’de verilmiştir. Her uygulama için ayrı ayrı gerçekleştirilen UV visible spektrofotometre ile absorbans ölçümü neticesinde, CoS quantum dotları 204 nm’de, CdS quantum dotları 206 nm’de absorbans verirken, Ramelteon ilacının da absorbans verdiği dalga boyu 206 nm olarak kaydedilmiştir. Biyokonjuge CdS materyali 244 ve 292 nm dalga boylarında yüksek seviyede absorbans verirken, biyokonjuge CoS materyalinin absorbans verdiği dalga boyları 242 ve 294 nm olarak belirlenmiştir. Biyokonjugasyon işlemi sonrasında serbest ilacın miktarının tayini için

206 nm’de gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçüme göre, reaksiyon çözeltisinde serbest ilaç tespit edilememiştir.



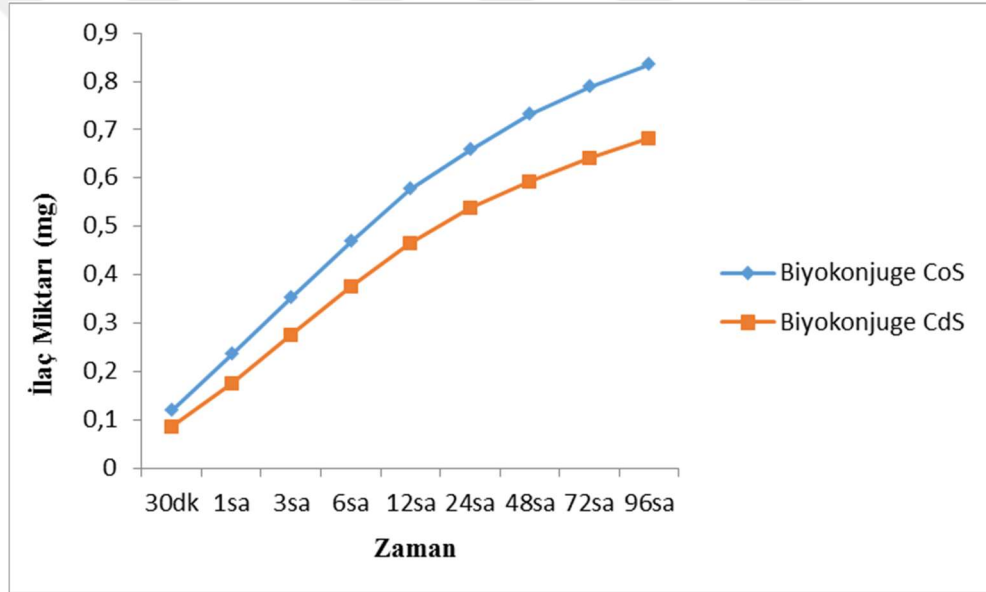
Şekil 4.2. Sentezlenen quantum dotlar ve biyokonjuge materyallerin UV spektrofotometre ile tespit edilen absorbans verileri.

Spektrofotometrik ölçümler neticesinde elde edilen sentezde kullanılan ilacın kalibrasyon eğrisi Şekil 4.3.’te verilmiştir. Ne kadar ilaç içerdiği bilinen ilaç çözeltisinin seri dilüsyonunun UV visible spektrofotometre ile 206 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılması sonucunda elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Sentezde kullanılan Ramelteon ilacının kalibrasyon eğrisi.

Quantum dotlara konjuge edilmiş ilacın salım profilinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçüm neticesinde elde edilen kümülatif grafik Şekil 4.4.'te verilmiştir. Bu grafiğe göre ilk 24 saatte biyokonjuge CdS materyalinde 2.0775 mg ilaç salınımı gerçekleşirken, biyokonjuge CoS materyalinden 2.448 mg ilaç salınımı gerçekleşmiştir. İlk 24 saatlik dilimde ilgili ilacın biyokonjuge CdS materyalinden %25.96'sı salınmışken, biyokonjuge CoS materyalinden ilacın % 30.6'sının salındığı görülmüştür. 96 saat sonunda salımı gerçekleşen ilaç miktarları biyokonjuge CdS nano materyali için 5.95 mg (% 74.5), biyokonjuge CoS materyali için ise 7.103 mg (% 88.78) olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.4. Biyokonjuge quantum dotların kümülatif salım profil grafiği.

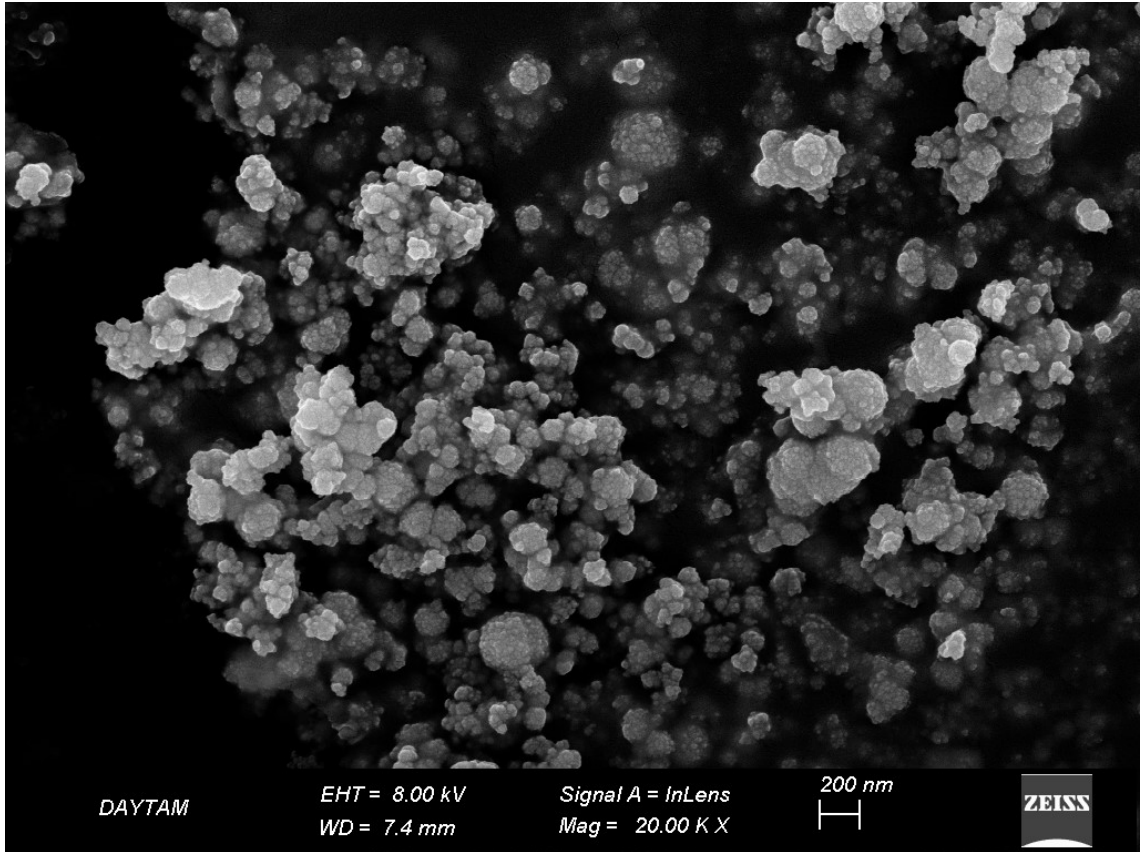
4.1.3. Quantum Dotların Karakterizasyonu

4.1.3.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM (Scanning Electron Microscope), elektronlar yardımıyla ilgili materyalin yüzey görüntüsünün elde edilmesini sağlayan bir ileri görüntüleme tekniğidir. Bu görüntüleme tekniğinde tungsten uç kaynağından çıkan elektronların yüzeye gönderilmesi ve saçılım sonrasında dedektör vasıtasıyla tespiti sonucunda görüntüler

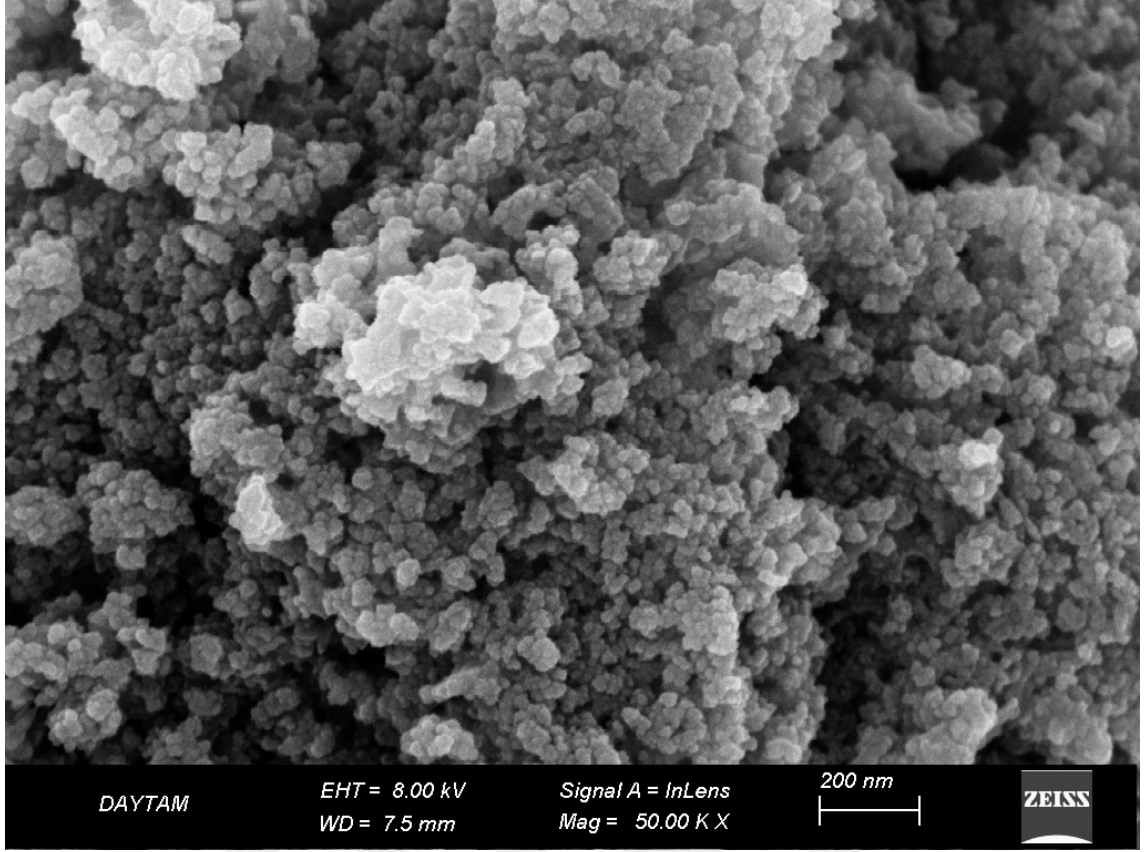
elde edilir.

CdS quantum dotlarına ait 200 nm ölçeğinde elde edilen görüntü Şekil 4.5'te verilmiştir. Görüntüden elde edilen veriler doğrultusunda CdS quantum dotlarının küresel şekilli, dairesel formda yapılar olduğu tespit edilmiştir. Yüzey karakterizasyonu sağlayan SEM işlemi ile CdS quantum dotlarının 100 nm'nin altında boyutlara sahip olduğu belirlenmiştir.



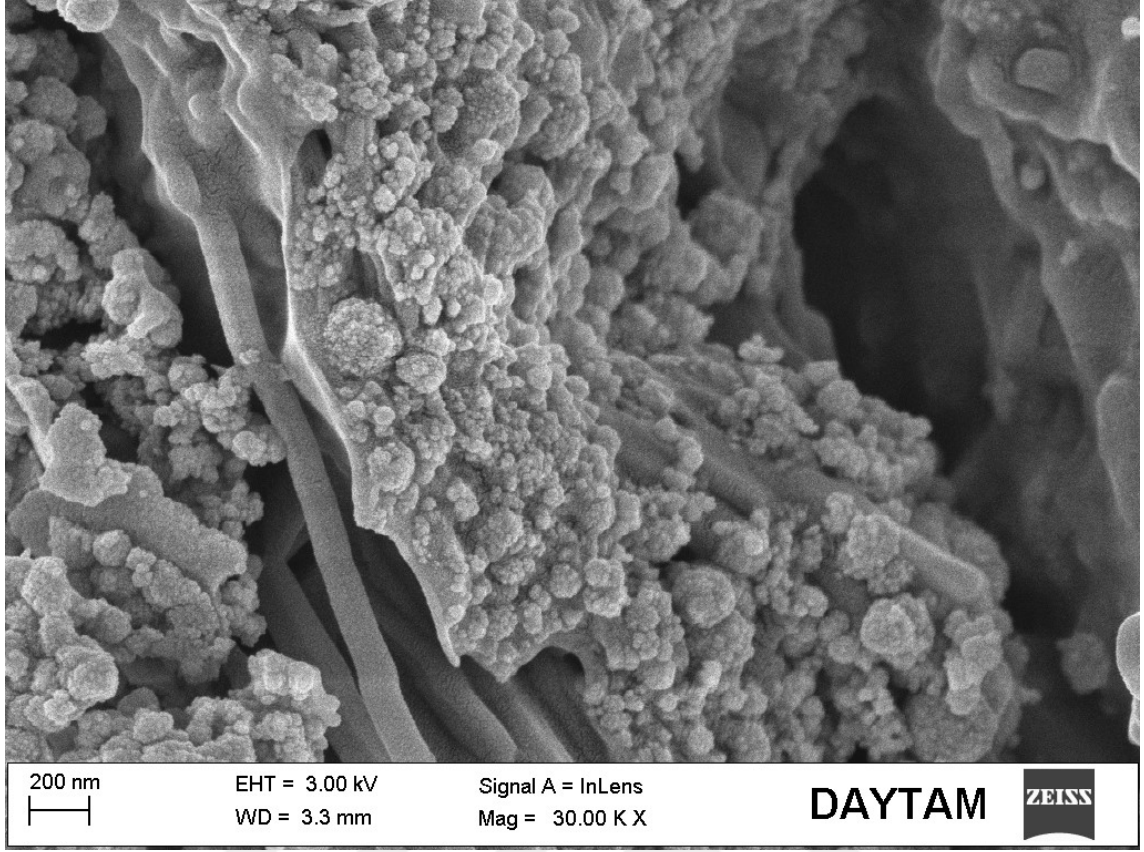
Şekil 4.5. CdS quantum dotu SEM görüntüsü

CoS quantum dotlarına ait 200 nm ölçeğinde elde edilen görüntü Şekil 4.6'da verilmiştir. Görüntüden elde edilen veriler doğrultusunda CoS quantum dotlarının pek çok küçük dairesel formda yapılardan oluştuğu tespit edilmiştir. Küresel şekilli yapıların agrege olarak daha büyük küresel morfolojide görüntüler ortaya koyduğu belirlenmiştir. Yüzey karakterizasyonu sağlayan SEM işlemi ile CoS quantum dotlarının 100 nm'nin altında boyutlara sahip olduğu belirlenmiştir.



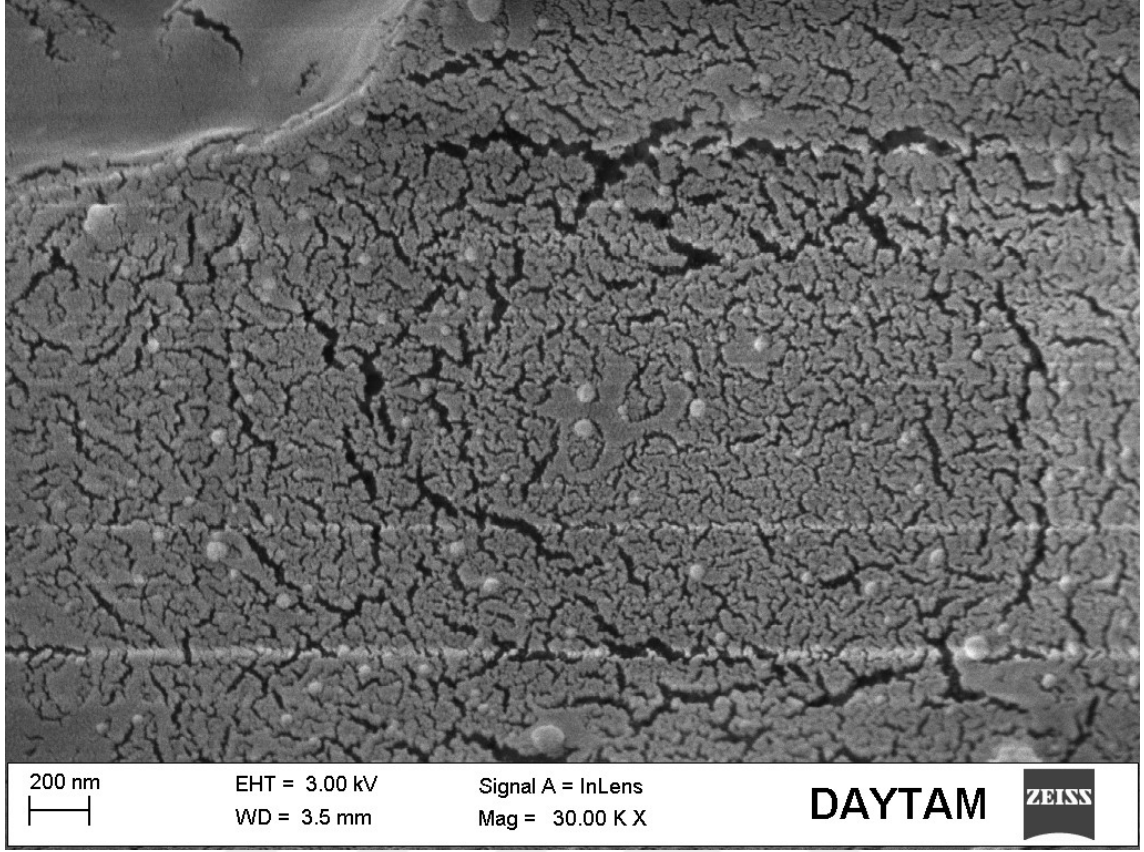
Şekil 4.6. CoS quantum dot SEM görüntüsü

Biyokonjuge CdS nano yapılarına ait 200 nm ölçeğinde elde edilen görüntü Şekil 4.7’de verilmiştir. Görüntüden elde edilen veriler doğrultusunda biyokonjuge CdS nano yapılarının küresel şekilli, pürüzlü yüzeylere sahip yapılar olduğu tespit edilmiştir. Yüzey karakterizasyonu sağlayan SEM işlemi ile biyokonjuge CdS nano yapılarının 100 nm’nin altında boyutlara sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Biyokonjuge CdS nano yapılarının SEM görüntüsü

Biyokonjuge CoS nano yapılarına ait 200 nm ölçeğinde elde edilen görüntü Şekil 4.8’de verilmiştir. Görüntüden elde edilen veriler doğrultusunda biyokonjuge CoS nano yapılarının küresel şekilli, minik boncuklara benzer nitelikte yapılar olduğu tespit edilmiştir. Yüzey karakterizasyonu sağlayan SEM işlemi ile biyokonjuge CoS nano yapılarının 100 nm’nin altında boyutlara sahip olduğu belirlenmiştir.

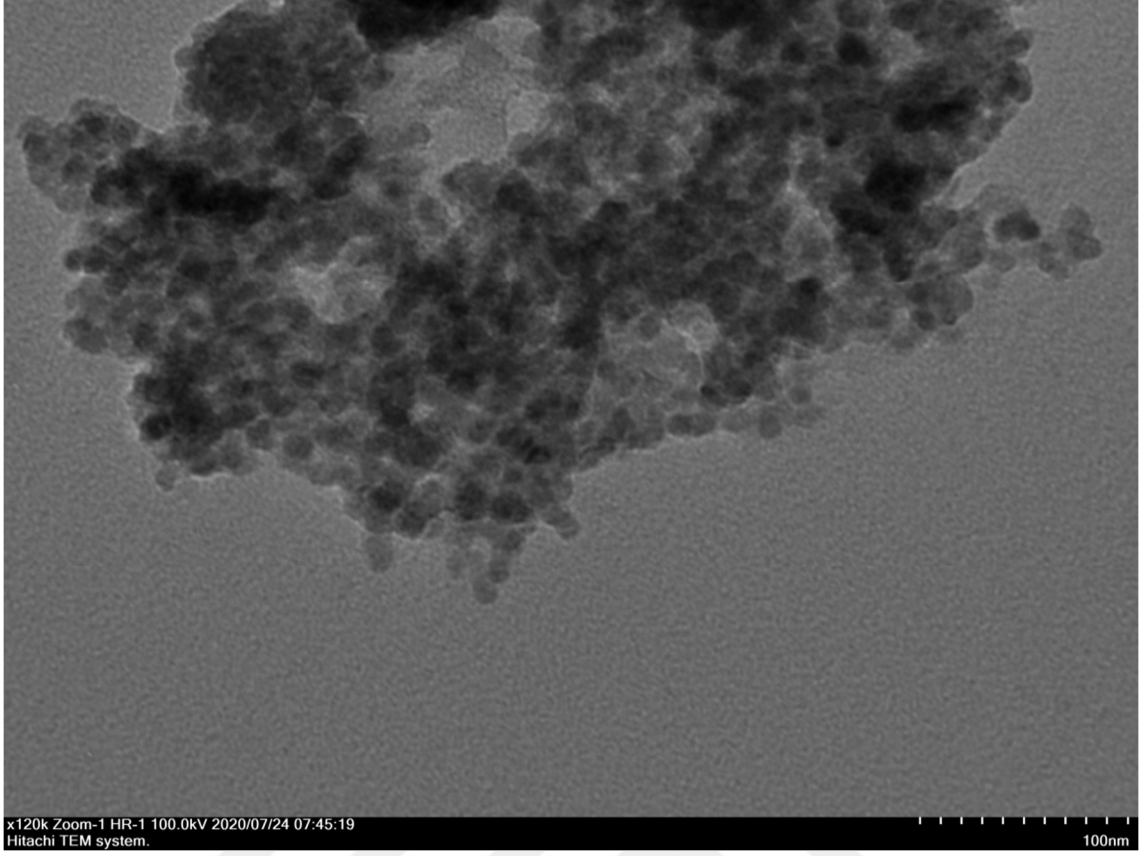


Şekil 4.8. Biyokonjuge CoS nano yapılarının SEM görüntüsü

4.1.3.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

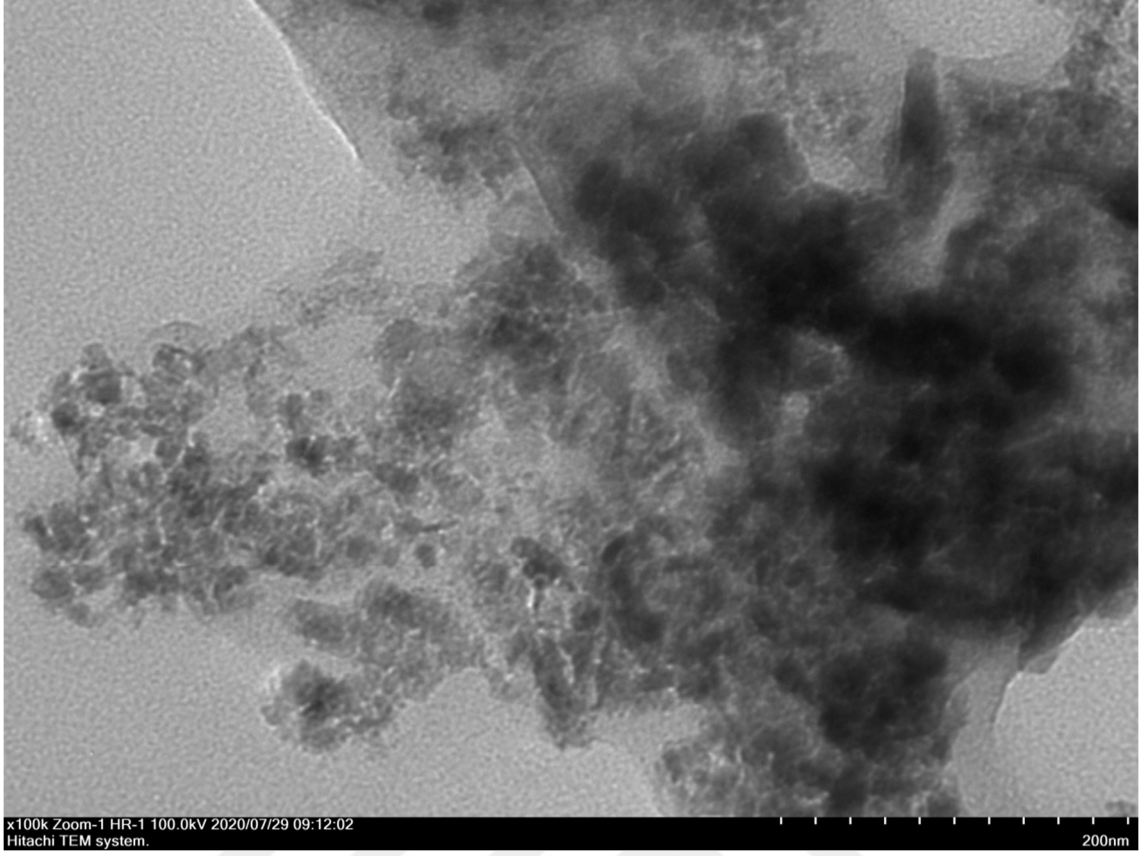
Geçirimli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope), ilgili materyalin içerisinde geçirilen elektronların dedektör vasıtasıyla tespit edilmesi prensibine dayanan bir ileri görüntüleme tekniğidir. CdS, CoS quantum dotları ile biyokonjuge CdS ve CoS nano yapılarının TEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12’de verilmiştir.

CdS quantum dotlarının elde edilen TEM görüntüsü incelendiğinde, sentezlenen quantum dot yapılarının yuvarlak, küresel şekilli materyaller olduğu belirlenmiştir. 100 nm ölçeğinde elde edilen görüntü, SEM görüntüsünde gözlenen CdS quantum dotlarının hem küresel görünümünü hem de 100 nm altında boyutlara sahip olduğunu destekler niteliktedir.



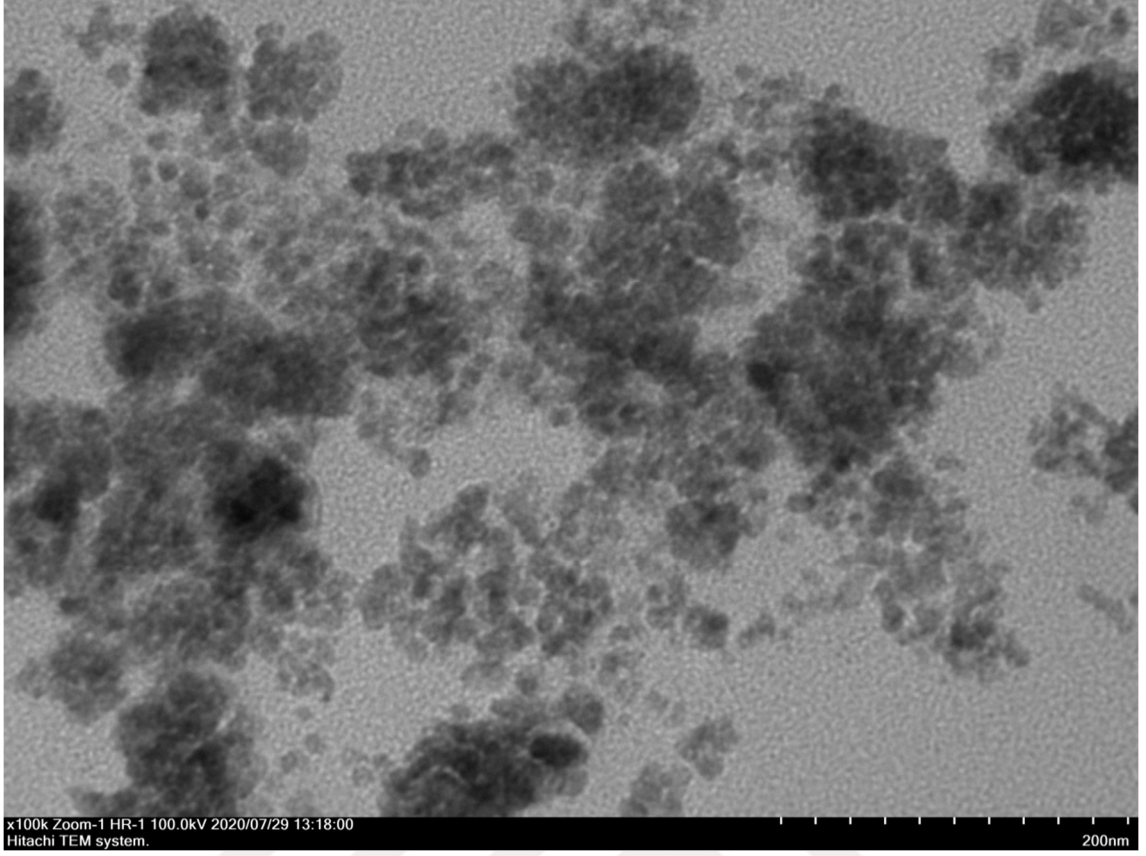
Şekil 4.9. CdS quantum dotlarının TEM görüntüsü

CoS quantum dotlarının elde edilen TEM görüntüsü incelendiğinde, sentezlenen quantum dot yapılarının yuvarlak, küresel şekilli materyaller olduğu ancak quantum dotların dış görünüşleri bakımından nispeten heterojen bir görünüm sergilediği belirlenmiştir. 200 nm ölçeğinde elde edilen görüntü ile CoS quantum dotlarının 100 nm altında boyutlara sahip olduğu desteklenmiştir.



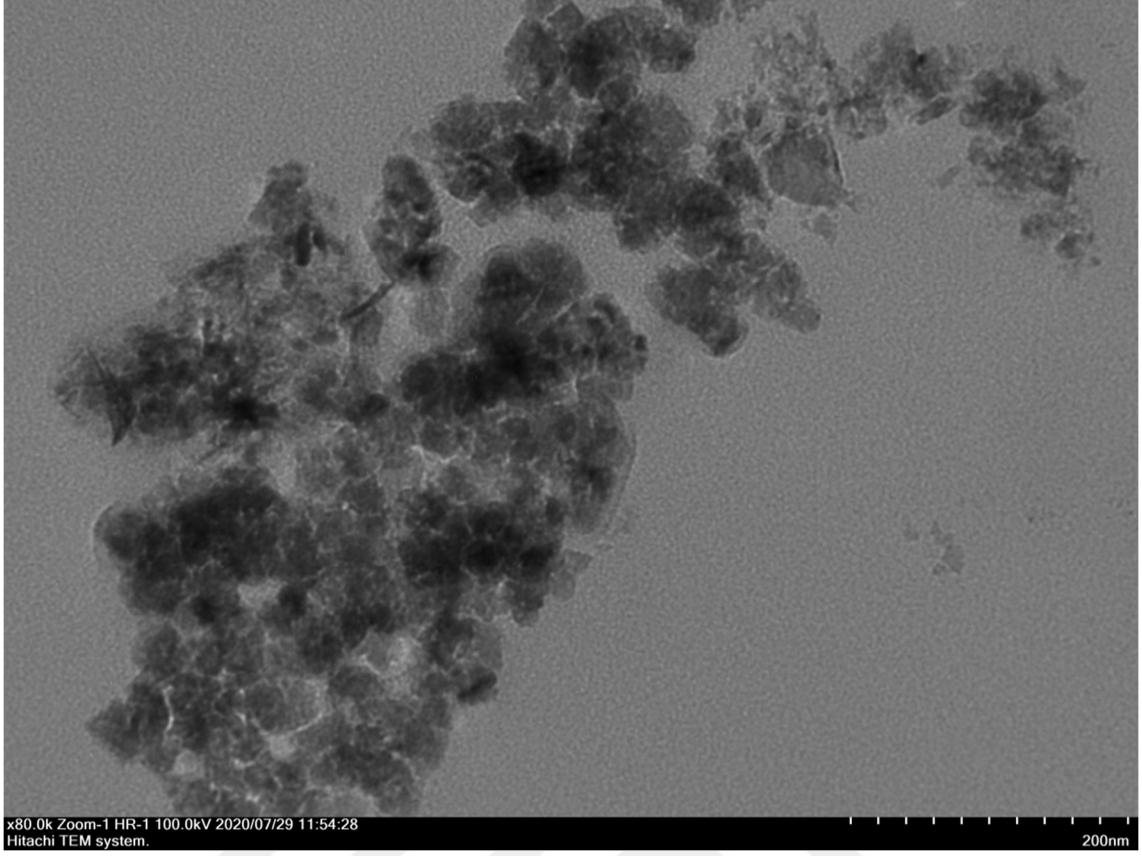
Şekil 4.10. CoS quantum dotlarının TEM görüntüsü

Biyokonjuge CdS nano yapılarının elde edilen TEM görüntüsü incelendiğinde, biyokonjugasyonu gerçekleştirilen quantum dot yapılarının küçük boncuk benzeri küresel yapılı materyaller olduğu belirlenmiştir. 200 nm ölçeğinde elde edilen görüntü, SEM görüntüsünde gözlenen biyokonjuge CdS nano yapılarının hem küresel görünümünü hem de 100 nm altında boyutlara sahip olduğunu destekler niteliktedir.



Şekil 4.11. Biyokonjuge CdS nano yapılarının TEM görüntüsü

Biyokonjuge CoS nano yapılarının elde edilen TEM görüntüsü incelendiğinde, biyokonjugasyonu gerçekleştirilen quantum dot yapılarının küresel yapılı materyaller olduğu kadar görünümde heterojenite sergileyen materyaller olduğu da ortaya koyulmuştur. 200 nm ölçeğinde elde edilen görüntü, SEM görüntüsünde gözlenen biyokonjuge CoS nano yapılarının 100 nm altında materyaller olduğu bilgisini desteklemiştir.



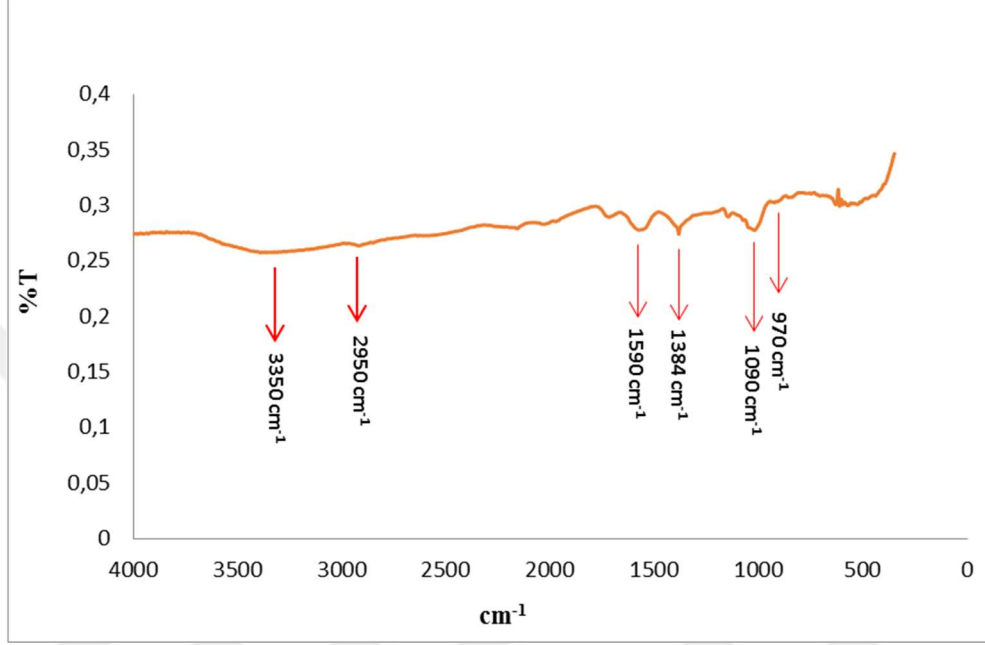
Şekil 4.12. Biyokonjuge CoS nano yapılarının TEM görüntüsü

4.1.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi (FTIR)

Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrofotometresi (FTIR) kullanılarak araştırma konusu olan materyalin içeriğinde yer alan elementler arası bağ oluşumlarının tespiti sağlanmaktadır. Her bir bağın kendisine spesifik olarak belirli bir frekansta yaydığı titreşim ölçülmekte ve bu sayede numunelerin içerdiği fonksiyonel gruplarla birlikte yapısal içeriğinin ortaya koyulması mümkün olmaktadır.

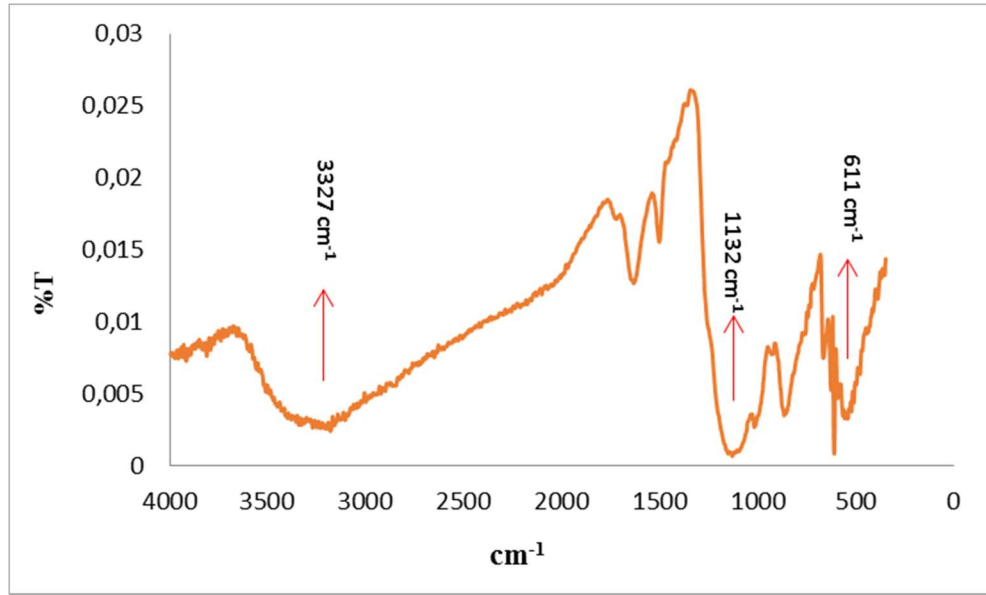
CdS quantum dotuna ait FTIR spektrumu Şekil 4.13'te verilmiştir. Spektrumda tespit edilen bantlar, fonksiyonel grupları belirlemek adına standart değerlerle karşılaştırılmıştır. Yeşil sentez yöntemiyle sentezi gerçekleştirilen CdS quantum dotlarının 3350, 2950, 1590, 1400, 1090 ve 970 cm^{-1} dalga boylarında spektrumlar sergilediği kaydedilmiştir. Bu spektrumlar içerisinde 1090 cm^{-1} ve 970 cm^{-1} dalga boylarında gözlenen pikler, SO_4^{2-} fonksiyonel grubundan kaynaklı oluşan titreşimler

dolayısıyla C-S bağ oluşumunu ortaya koymaktadır. 1400 cm^{-1} ve 1590 cm^{-1} spektrumları C-H ile COO^- fonksiyonel gruplarına dair bağ oluşumunu göstermektedir. 2950 cm^{-1} spektrumu NH_3^+ titreşimini ortaya koyarken, 3350 cm^{-1} spektrum piki ise O-H bağının varlığını göstermektedir.



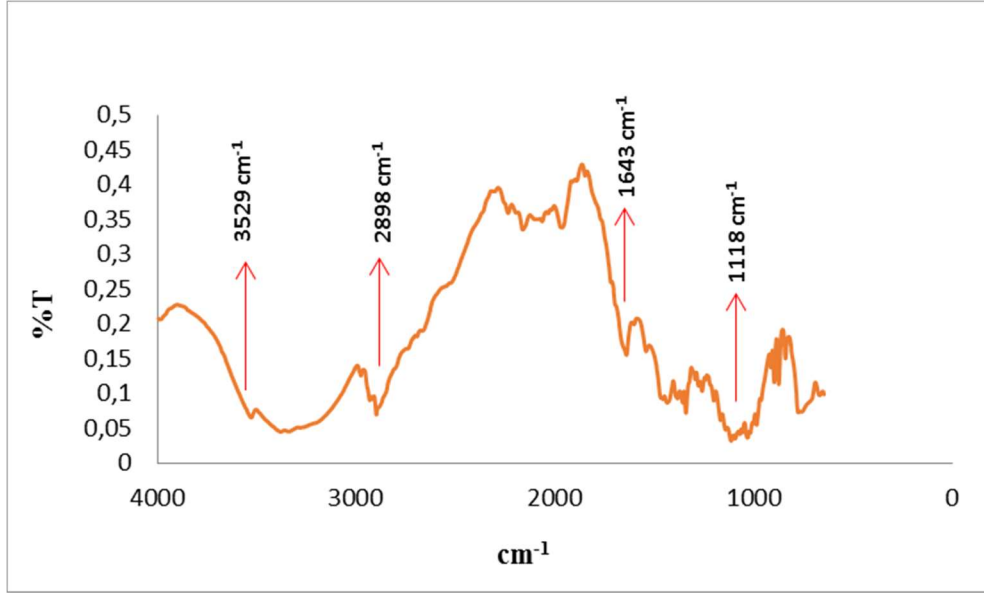
Şekil 4.13. CdS quantum dotlarının FTIR spektrumu

CoS quantum dotuna ait FTIR spektrumu Şekil 4.14’te verilmiştir. Spektrumda tespit edilen bantlar, fonksiyonel grupları belirlemek adına standart değerlerle karşılaştırılmıştır. Yeşil sentez yöntemiyle sentezi gerçekleştirilen CoS quantum dotlarının 3327 , 1635 , 1132 , 881 ve 611 cm^{-1} dalga boylarında spektrumlar sergilediği kaydedilmiştir. 3327 cm^{-1} dalga boyunda görülen salınım O-H bağını ifade ederken, 1635 cm^{-1} dalga boyunda görülen pik C=O bağını ortaya koymuştur. 1132 cm^{-1} dalga boyunda görüntülenen salınım C-O-H fonksiyonel grubunu ifade ederken, 881 cm^{-1} dalga boyunda görülen salınım quantum dot içerisinde yer alan S-C bağına dair bulgular ortaya koymaktadır. 611 cm^{-1} dalga boyundaki pik ise CH_2 fonksiyonel grubunun varlığını göstermektedir.



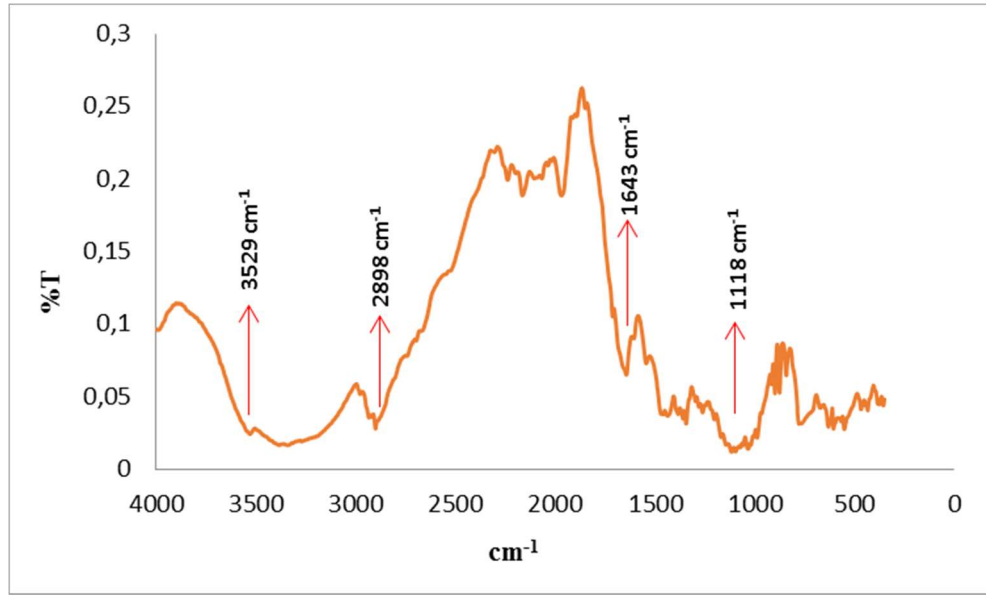
Şekil 4.14. CoS quantum dotlarının FTIR spektrumu

Biyokonjuge CdS quantum dotuna ait FTIR spektrumu Şekil 4.15’te verilmiştir. Spektrumda tespit edilen bantlar, fonksiyonel grupları belirlemek adına standart değerlerle karşılaştırılmıştır. Biyokonjugasyon ile ilaç, CdS quantum dotları ve PEG bileşiminin reaksiyonu sonucunda elde edilen Biyokonjuge CdS quantum dotlarının 3529, 2898, 1643 ve 1118 cm^{-1} dalga boylarında spektrumlar sergilediği kaydedilmiştir. 3529 dalga boyunda gözlenen salınım O-H bağıını ifade ederken, 2898 dalga boyunda görülen pik ise C-H bağıını göstermektedir. 1118 dalga byunda gözlenen salınım C-O etkileşimini ortaya koyarken, 1643 dalga boyunda seyreden salınım ise C=O veya C-O-C gruplarının varlığını işaret etmektedir.



Şekil 4.15. Biyokonjuge CdS yapılarının FTIR spektrumu

Biyokonjuge CoS quantum dotuna ait FTIR spektrumu Şekil 4.16’da verilmiştir. Spektrumda tespit edilen bantlar, fonksiyonel grupları belirlemek adına standart değerlerle karşılaştırılmıştır. Biyokonjugasyon ile ilaç, CoS quantum dotları ve PEG bileşiminin reaksiyonu sonucunda elde edilen Biyokonjuge CoS quantum dotlarının 3529, 2897, 1643 ve 1114 cm⁻¹ dalga boylarında spektrumlar sergilediği kaydedilmiştir. 3529 dalga boyunda gözlenen salınım O-H bağıını ifade ederken, 2897 dalga boyunda görülen pik ise C-H bağıını göstermektedir. 1114 dalga byunda gözlenen salınım C-O etkileşimini ortaya koyarken, 1643 dalga boyunda seyreden salınım ise C=O veya C-O-C gruplarının varlığını işaret etmektedir.

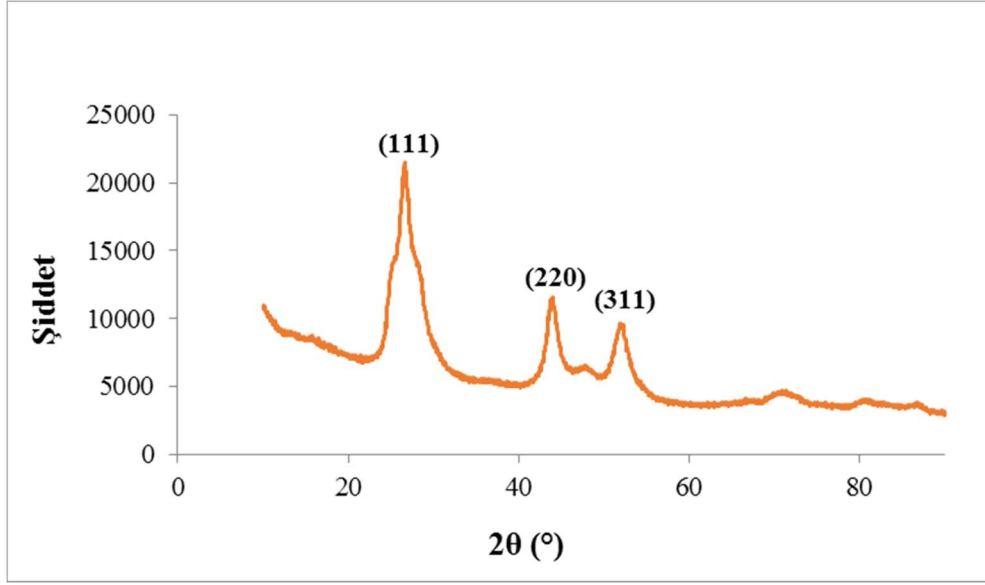


Şekil 4.16. Biyokonjuge CoS yapılarının FTIR spektrumu

4.1.3.4. X Işını Kristalografisi (XRD)

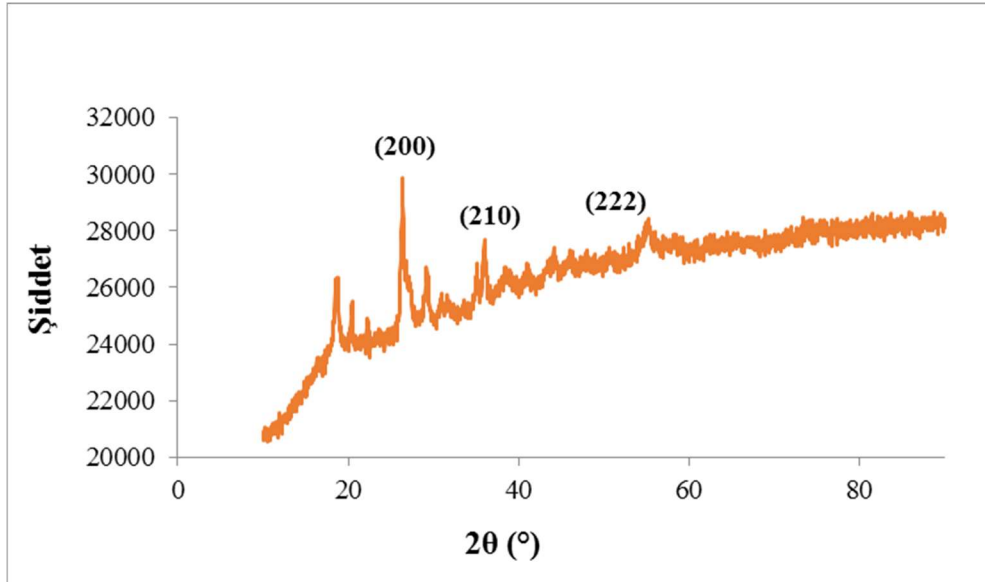
Çalışmada kullanılan quantum dotların ve biyokonjuge nano materyallerinin kristalize yapı analizleri için X- Işını Kırınım Distalografisi metodundan faydalanılmıştır. Bu yöntemde temelde her numunenin kendisine özgü olan kırınım desenleri ile elementlerin ortaya koyduğu düzlemsel yapıların belirlenmesi sağlanmaktadır.

Yeşil sentez ile sentezlenmiş CdS quantum dotlarının kristalize yapısını ortaya koymak adına gerçekleştirilen XRD analizi grafiği Şekil 4.17’de verilmiştir. Gerçekleştirilen analiz ile bu yapı içeriğinde 111, 220, 311 düzlemlerinin yer aldığı belirlenmiştir. CdS quantum dot yapısında yer alan atomların düzlem uzaklıklarına 26.7° , 43.99° ve 51.7° 2θ açısı değerleri karşılık gelmektedir.



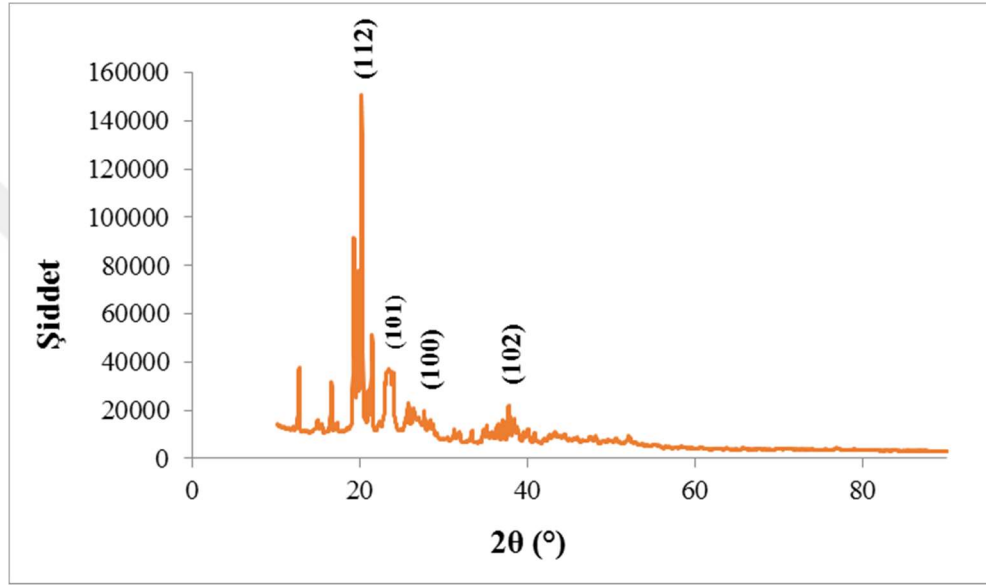
Şekil 4.17. CdS quantum dotlarının XRD grafiği

Yeşil sentez ile sentezlenmiş CoS quantum dotlarının kristalize yapısını ortaya koymak adına gerçekleştirilen XRD analizi grafiği Şekil 4.18’de verilmiştir. Gerçekleştirilen analiz ile bu yapı içeriğinde 200, 210, 222 düzlemlerinin yer aldığı belirlenmiştir. CoS quantum dot yapısında yer alan atomların düzlem uzaklıklarına 35.90° , 39.47° ve 47.43° 2θ açı değerleri karşılık gelmektedir.



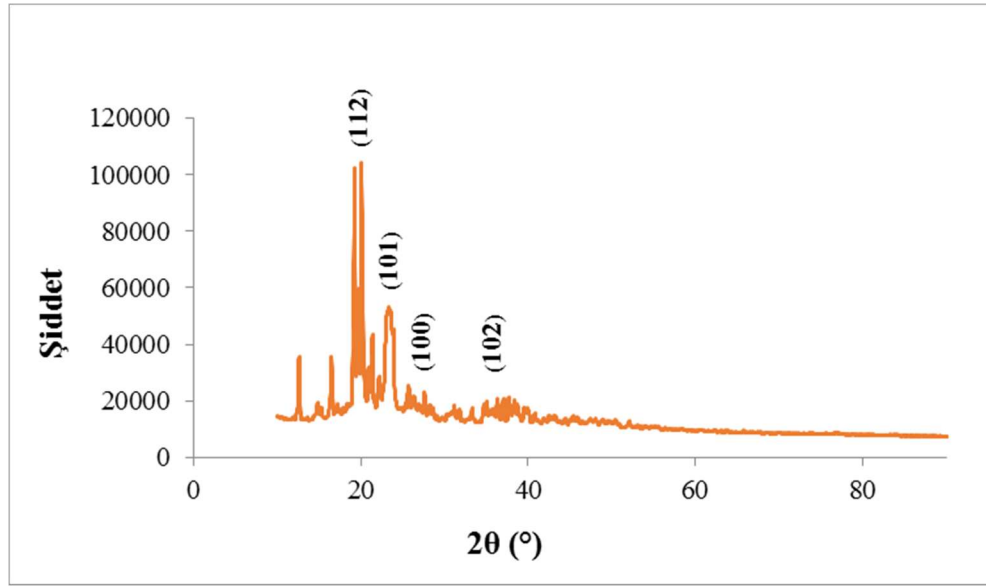
Şekil 4.18. CoS quantum dotlarının XRD grafiği

Biyokojugasyon reaksiyonu ile Ramelteon ilacı, PEG ve CdS quantum dotlarının biyokojugasyon materyalinin kristalize yapısını ortaya koymak adına gerçekleştirilen XRD analizi grafiği Şekil 4.19’da verilmiştir. Gerçekleştirilen analiz ile bu yapı içeriğinde 112, 101, 100, 102 düzlemlerinin yer aldığı belirlenmiştir. Biyokonjuge CdS nano yapısında yer alan atomların düzlem uzaklıklarına 20.17° , 23.35° , 25.76° ve 37.71° 2θ açısı değerleri karşılık gelmektedir.



Şekil 4.19. Biyokonjuge CdS nano yapılarının XRD grafiği

Biyokojugasyon reaksiyonu ile Ramelteon ilacı, PEG ve CoS quantum dotlarının biyokojugasyon materyalinin kristalize yapısını ortaya koymak adına gerçekleştirilen XRD analizi grafiği Şekil 4.20’de verilmiştir. Gerçekleştirilen analiz ile bu yapı içeriğinde 112, 101, 100, 102 düzlemlerinin yer aldığı belirlenmiştir. Biyokonjuge CoS nano yapısında yer alan atomların düzlem uzaklıklarına 20.07° , 23.30° , 25.66° ve 35.03° 2θ açısı değerleri karşılık gelmektedir.



Şekil 4.20. Biyokonjuge CoS nano yapılarının XRD grafiği

4.2. Hücre Kültürü Uygulama Bulguları

4.2.1. MTT Hücre Canlılık Testi Bulguları

4.2.1.1. Nöroblastom (SH-SY5Y) Hücre Hattı

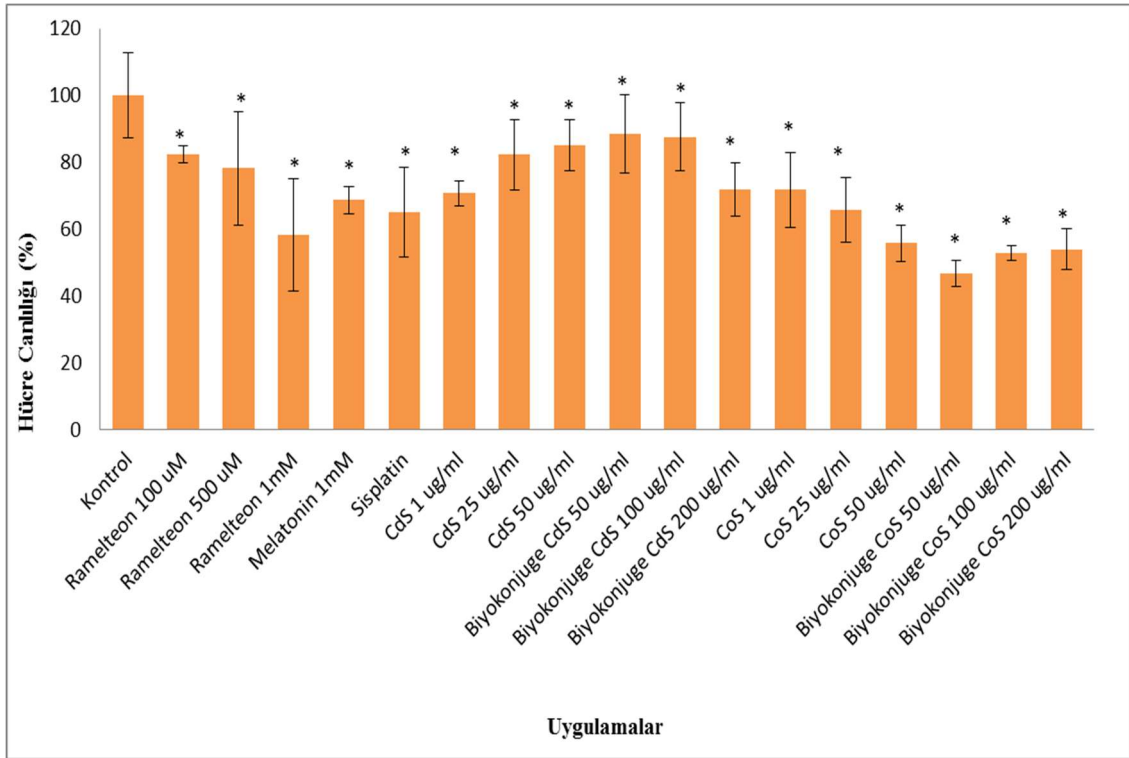
SH-SY5Y hücre hattında hem CdS hem CoS quantum dotları hem de bu quantum dotların biyokonjuge formları uygulanmıştır. 24 saat sonunda uygulama sonuçları MTT testi ile ortaya koyulmuştur. Nöroblastom hücre hattına ait hücre canlılığı grafiği Şekil 4.21’de verilmiştir.

CdS quantum dotlarından 1 µg/ml uygulama dozu kontrole kıyasla hücre canlılığını % 70.79 ± 3.71 seviyesine düşürmüştür. Hücre canlılığı 25 µg/ml dozunda % $82,27 \pm 10,48$ olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 85.02 ± 7.75 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda hücre canlılığı % 88.48 ± 11.83 seviyesine düşerken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 87.57 ± 10.16 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise hücre canlılığı seviyesinin % 71.98 ± 7.99 olduğu tespit edilmiştir. CdS içerikli uygulamaların tamamı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak bulunmuştur.

CoS quantum dotlarının 1 µg/ml dozu hücre canlılığının % 71.80 ± 11.2

seviyesine inmesine yardımcı olmuştur. CoS QD'larının 25 µg/ml dozu % 65.73±9.5 seviyesinde etkili olmuşken, 50 µg/ml dozu % 55.8±5.48 seviyesinde etkili olmuştur. Biyokonjuge olarak uygulanmış CoS uygulamalarının en düşük dozu olan 50 µg/ml dozu hücre canlılığını % 46.7±3.9 seviyesine kadar düşürürken, 100 µg/ml dozu % 52.85±2.26, 200 µg/ml dozu ise % 54.01±5.98 seviyesine kadar hücre canlılığını azaltmayı başarmıştır. CoS quantum dot uygulamaları ile biyokonjuge CoS uygulamalarının tamamı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) nitelik arz etmiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına hücre canlılığını 1 mM uygulama dozunda % 58.22±16.7 kadar azaltmıştır. Buna ek olarak ilacın 500 µM dozu hücre canlılığı üzerinde % 78.17±8.51 seviyesinde etkili olurken 100 µM dozu ise hücre canlılığını % 82.4±2.65 seviyesine kadar azaltmıştır. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki etki seviyesi % 68.7±4.04 aralığında olmuştur. Bunlara ek olarak kontrol ilaç olarak etkisi incelenen sisplatin hücre canlılığını % 65.04±13.33 seviyesinde azaltmıştır. Bu uygulamaların tamamı kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.21. SH-SY5Y hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların MTT testi sonuçları. (* p≤0.05)

4.2.1.2. Prostat Kanseri (DU145) Hücre Hattı

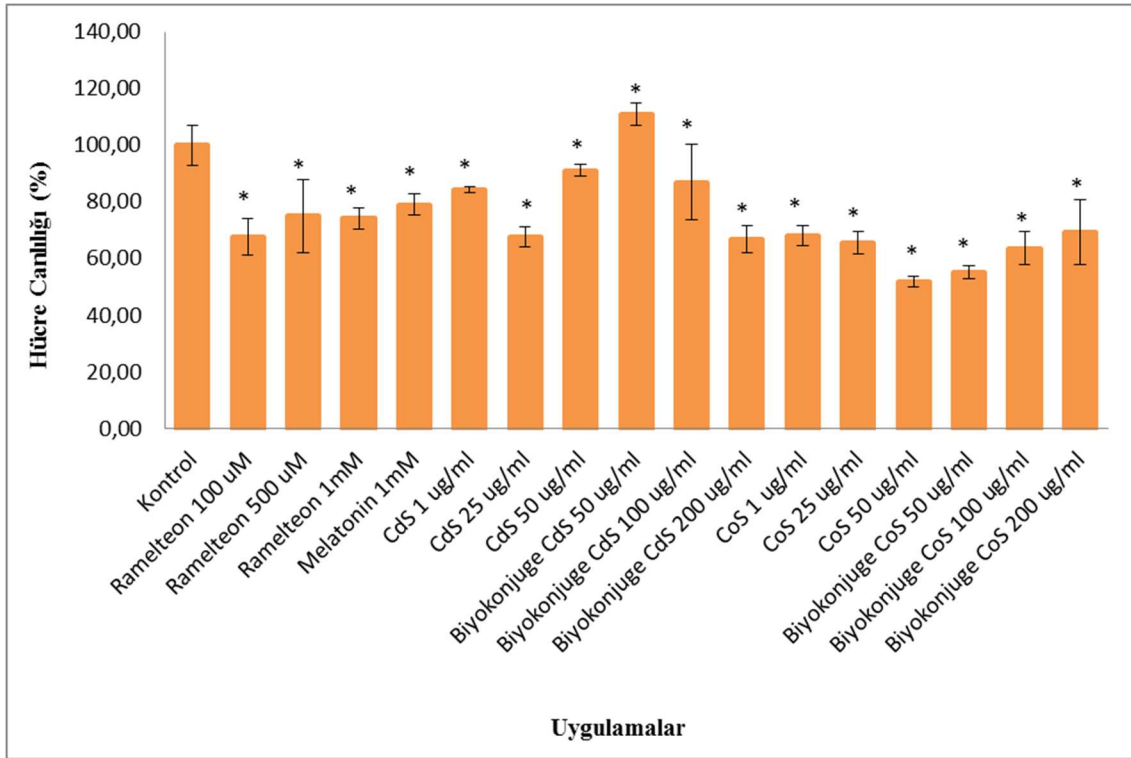
Prostat kanseri DU145 hücre hattında hem CdS hem CoS quantum dotları hem de bu quantum dotların biyokonjuge formları uygulanmıştır. 24 saat sonunda uygulama sonuçları MTT testi ile ortaya koyulmuştur. Prostat kanseri hücre hattına ait hücre canlılığı grafiği Şekil 4.22’de verilmiştir.

CdS quantum dotlarından 1 µg/ml uygulama dozu kontrole kıyasla hücre canlılığını % 84.31±0.86 seviyesine düşürmüştür. Hücre canlılığı 25 µg/ml dozunda % 67.84±3.58 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 91.14±2.00 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda hücre canlılığı % 111.05±3.85 seviyesine ulaşmışken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 86.94±13.25 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise hücre canlılığı seviyesinin % 66.89±2.42 olduğu tespit edilmiştir. CdS 50 µg/ml quantum dot dozu dışında tüm CdS quantum dotu içeren uygulamalar kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan

anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak bulunmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir. CdS 50 $\mu\text{g/ml}$ quantum dot dozunun uygulaması sonucunda elde edilen hücre canlılık verisi istatistiksel olarak bir önem arz etmemiştir.

CoS quantum dotlarının 1 $\mu\text{g/ml}$ dozu hücre canlılığının % 68.15 ± 3.54 seviyesine inmesine yardımcı olmuştur. CoS QD'lerinin 25 $\mu\text{g/ml}$ dozu % 65.48 ± 3.99 seviyesinde etkili olmuşken, 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu % 51.82 ± 1.9 seviyesinde etkili olmuştur. Biyokonjuge olarak uygulanmış CoS uygulamalarının en düşük dozu olan 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu hücre canlılığını % 55.19 ± 2.23 seviyesine kadar düşürürken, 100 $\mu\text{g/ml}$ dozu % 63.73 ± 5.96 , 200 $\mu\text{g/ml}$ dozu ise % 69.37 ± 11.27 seviyesine kadar hücre canlılığını azaltmayı başarmıştır. CoS quantum dot uygulamaları ile biyokonjuge CoS uygulamalarının tamamı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) nitelik arz etmiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına hücre canlılığını 1 mM uygulama dozunda % 74.27 ± 3.79 kadar azaltmıştır. Buna ek olarak ilacın 500 μM dozu hücre canlılığı üzerinde % 75.06 ± 13.01 seviyesinde etkili olurken 100 μM dozu ise hücre canlılığını % 67.79 ± 6.5 seviyesine kadar azaltmıştır. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki etki seviyesi % 79.03 ± 3.83 aralığında olmuştur. Bu uygulamaların tamamı istatistiki olarak çok anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.22. DU145 hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların MTT testi sonuçları. (* $p \leq 0.05$)

4.2.1.3. Kolon Kanseri (HT-29) Hücre Hattı

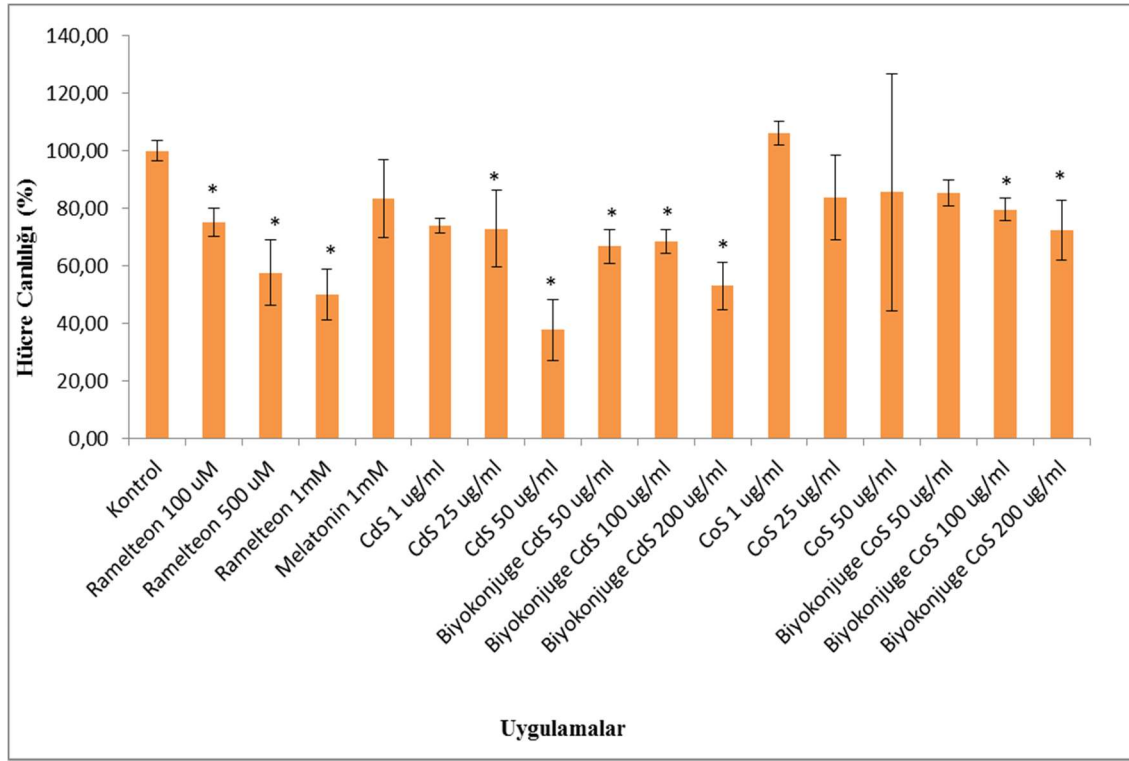
Kolon kanseri HT-29 hücre hattında hem CdS hem CoS quantum dotları hem de bu quantum dotların biyokonjuge formları uygulanmıştır. 24 saat sonunda uygulama sonuçları MTT testi ile ortaya koyulmuştur. Kolon kanseri hücre hattına ait hücre canlılığı grafiği Şekil 4.23'te verilmiştir.

CdS quantum dotlarından 1 $\mu\text{g/ml}$ uygulama dozu kontrole kıyasla hücre canlılığını % 74.08 ± 2.57 seviyesine düşürmüştür. Hücre canlılığı 25 $\mu\text{g/ml}$ dzunda % 72.84 ± 13.45 olurken, 50 $\mu\text{g/ml}$ dozunda ise % 37.57 ± 10.71 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 $\mu\text{g/ml}$ dozunda hücre canlılığı % 66.73 ± 3.85 seviyesine düşmüşken, 100 $\mu\text{g/ml}$ dozunda bu rakam % 68.44 ± 4.16 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 $\mu\text{g/ml}$ dozunda ise hücre canlılığı seviyesinin % 52.99 ± 8.23 olduğu tespit edilmiştir. CdS 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ dozları ile biyokonjuge CdS uygulama formlarının tamamı (50, 100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ dozları) kontrol grubuna kıyasla

istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak bulunmuştur. CdS 1 $\mu\text{g/ml}$ quantum dot dozunun uygulaması sonucunda elde edilen hücre canlılık verisi istatistiksel olarak ($p \geq 0.05$) bir önem arz etmemiştir.

CoS quantum dotlarının 1 $\mu\text{g/ml}$ dozu hücre canlılığına etkisi % 106.18 ± 4.21 olarak bulunmuştur. CoS QD'lerinin 25 $\mu\text{g/ml}$ dozu % 83.75 ± 14.87 seviyesinde etkili olmuşken, 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu % 85.59 ± 41.37 seviyesinde etkili olmuştur. Biyokonjuge olarak uygulanmış CoS uygulamalarının en düşük dozu olan 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu hücre canlılığını % 85.22 ± 4.48 seviyesine kadar düşürürken, 100 $\mu\text{g/ml}$ dozu % 79.5 ± 53.97 , 200 $\mu\text{g/ml}$ dozu ise % 72.43 ± 10.33 seviyesine kadar hücre canlılığını azaltmayı başarmıştır. Biyokonjuge CoS uygulama formlarının 100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ dozu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) bulunmuştur. Hem CoS quantum dot uygulamalarının hem de biyokonjuge CoS uygulamalarının diğer dozları ile elde edilen hücre canlılık verileri istatistiksel olarak ($p \geq 0.05$) bir önem arz etmemiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına hücre canlılığını 1 mM uygulama dozunda % 49.92 ± 8.96 kadar azaltmıştır. Buna ek olarak ilacın 500 μM dozu hücre canlılığı üzerinde % 57.58 ± 11.27 seviyesinde etkili olurken 100 μM dozu ise hücre canlılığını % 75.08 ± 4.8 seviyesine kadar azaltmıştır. Bu uygulamaların tamamı istatistiki olarak çok anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak kaydedilmiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki etki seviyesi % 83.36 ± 13.62 aralığında olmuştur. Melatonin uygulaması neticesinde elde edilen hücre canlılık verisi istatistiksel olarak ($p \geq 0.05$) bir önem arz etmemiştir.



Şekil 4.23. HT-29 hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların MTT testi sonuçları. (* $p \leq 0.05$)

4.2.2. Total Antioksidan Kapasite (TAK) Testi Bulguları

4.2.2.1. Nöroblastom (SH-SY5Y) Hücre Hattı

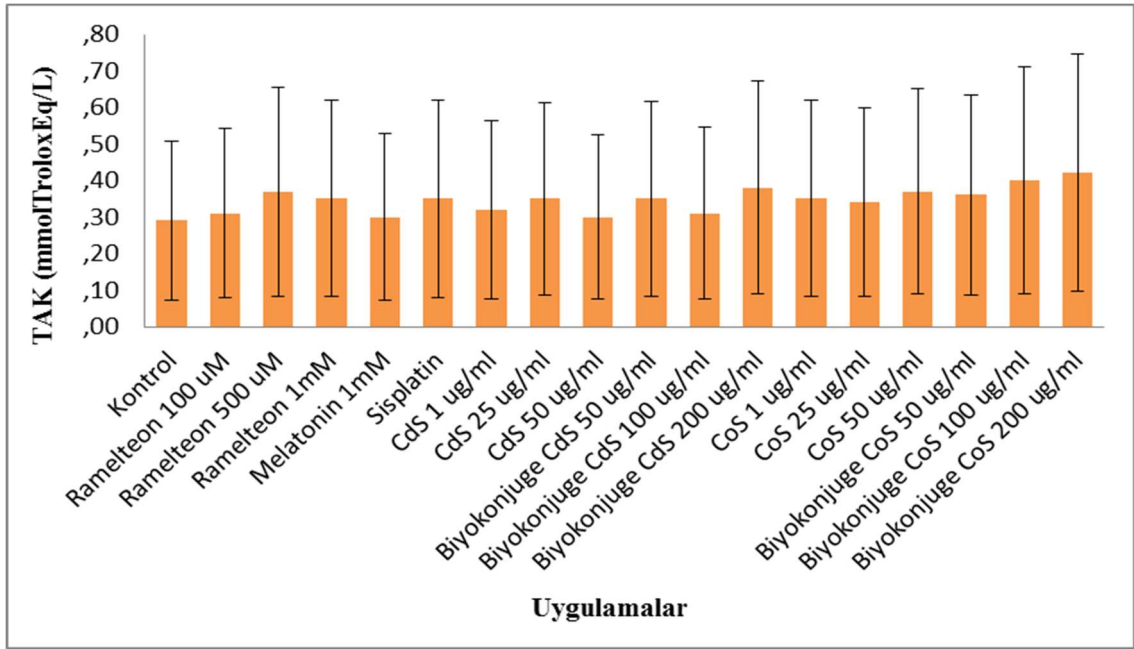
Nöroblastom kanseri SH-SY5Y hücre hattında hem CdS hem CoS quantum dotları hem de bu quantum dotların biyokonjuge formları uygulanmıştır. 24 saat sonunda uygulamaların total antioksidan etkileri üzerine sonuçlar, hücre sıvılarından TAK testi ile ortaya koyulmuştur. Nöroblastom hücre hattına ait total antioksidan test bulguları grafiği Şekil 4.24'te verilmiştir. Elde edilen verilere göre, kontrol grubunun total antioksidan etkinlik değeri 0.29 ± 0.22 olarak tespit edilmiştir.

CdS quantum dotlarının $1 \mu\text{g/ml}$ uygulama dozu 0.32 ± 0.24 seviyesinde antioksidan etkinlik sergilemiştir. Antioksidan etkinlik $25 \mu\text{g/ml}$ dozunda 0.35 ± 0.26 olurken, $50 \mu\text{g/ml}$ dozunda ise 0.30 ± 0.22 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının $50 \mu\text{g/ml}$ dozunda antioksidan etkinlik 0.35 ± 0.27 olarak tespit edilmişken, $100 \mu\text{g/ml}$ dozunda bu rakam 0.31 ± 0.24 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek

dozu olan 200 µg/ml dozunda ise antioksidan etkinlik seviyesinin 0.38 ± 0.29 olduğu tespit edilmiştir. Bahsedilen uygulamaların hiçbirisi kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan ($p \geq 0.05$) bir önem arz etmemiştir.

CoS quantum dotlarının 1 µg/ml dozunu antioksidan seviyeye etkisi 0.35 ± 0.27 olarak bulunmuştur. CoS QD'lerinin 25 µg/ml dozu 0.34 ± 0.26 seviyesinde etkili olmuşken, 50 µg/ml dozu 0.37 ± 0.28 seviyesinde etki göstermiştir. Biyokonjuge olarak uygulanmış CoS uygulamalarının en düşük dozu olan 50 µg/ml dozu antioksidan etkinlik olarak 0.36 ± 0.27 aralığında etki sergilerken, 100 µg/ml dozu 0.4 ± 0.31 , 200 µg/ml dozu ise 0.42 ± 0.32 seviyesinde antioksidan etkinlik sergilemiştir. Bahsedilen uygulamaların hiçbirisi kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki açıdan ($p \geq 0.05$) bir önem arz etmemiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına antioksidan etkinlik olarak 1 mM uygulama dozunda 0.35 ± 0.27 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 µM dozu antioksidan etkinlik üzerinde 0.37 ± 0.29 seviyesinde etkili olurken 100 µM dozu ise bu parametrede 0.31 ± 0.23 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki antioksidan etki seviyesi 0.3 ± 0.23 aralığında olmuştur. Bunlara ek olarak kontrol ilaç olarak etkisi incelenen sisplatin antioksidan seviyeyi 0.35 ± 0.27 seviyesinde etkilemiştir. Bu uygulama verileri kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki olarak ($p \geq 0.05$) bir anlam ifade etmemektedir.



Şekil 4.24. SH-SY5Y hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların TAK testi sonuçları. (* $p \leq 0.05$)

4.2.2.2. Prostat Kanseri (DU145) Hücre Hattı

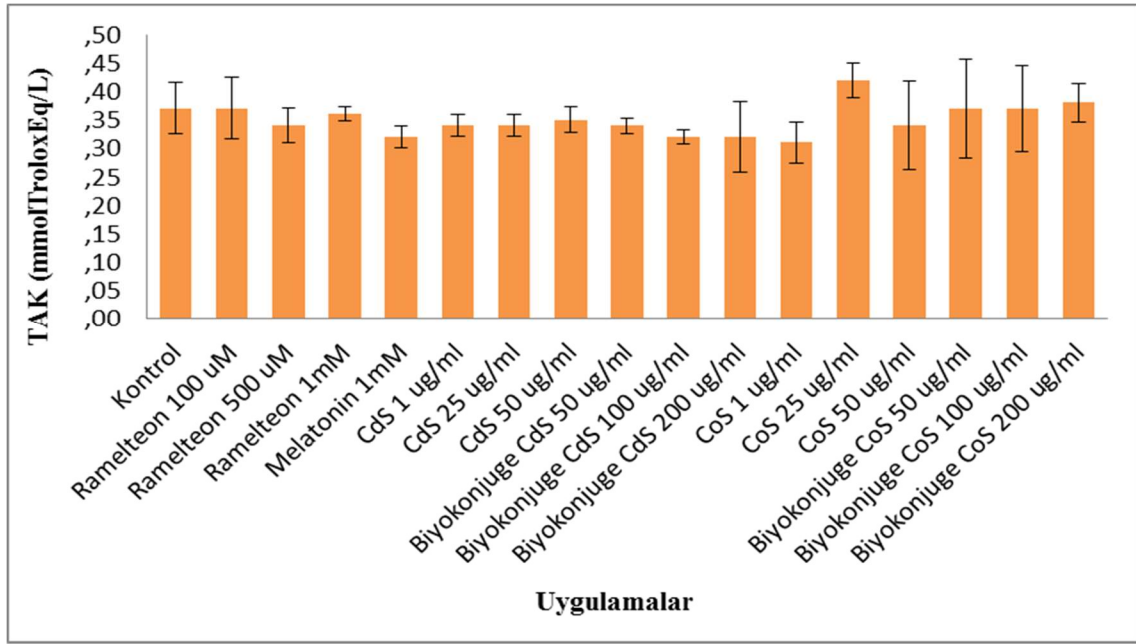
Prostat kanseri DU145 hücre hattında hem CdS hem CoS quantum dotları hem de bu quantum dotların biyokonjuge formları uygulanmıştır. 24 saat sonunda uygulamaların total antioksidan etkileri üzerine sonuçlar, elde edilen hücre sıvılarından TAK testi yapılması ile ortaya koyulmuştur. Prostat kanseri hücre hattına ait total antioksidan test bulguları grafiği Şekil 4.25'te verilmiştir. Elde edilen verilere göre, kontrol grubunun total antioksidan etkinlik değeri 0.37 ± 0.05 olarak tespit edilmiştir.

CdS quantum dotlarının 1 $\mu\text{g/ml}$ uygulama dozu 0.34 ± 0.02 seviyesinde antioksidan etkinlik sergilemiştir. Antioksidan etkinlik 25 $\mu\text{g/ml}$ dozunda 0.34 ± 0.02 olurken, 50 $\mu\text{g/ml}$ dozunda ise 0.35 ± 0.03 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 $\mu\text{g/ml}$ dozunda antioksidan etkinlik 0.34 ± 0.02 olarak tespit edilmişken, 100 $\mu\text{g/ml}$ dozunda bu rakam 0.32 ± 0.02 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 $\mu\text{g/ml}$ dozunda ise antioksidan etkinlik seviyesinin 0.32 ± 0.07 olduğu

tespit edilmiştir. Bahsedilen uygulamaların hiçbirisi kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan bir önem ($p \geq 0.05$) arz etmemiştir.

CoS quantum dotlarının 1 $\mu\text{g/ml}$ dozunu antioksidan seviyeye etkisi 0.31 ± 0.04 olarak bulunmuştur. CoS QD'lerinin 25 $\mu\text{g/ml}$ dozu 0.42 ± 0.04 seviyesinde etkili olmuşken, 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu 0.34 ± 0.08 seviyesinde etki göstermiştir. Biyokonjuge olarak uygulanmış CoS uygulamalarının en düşük dozu olan 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu antioksidan etkinlik olarak 0.37 ± 0.09 aralığında etki sergilerken, 100 $\mu\text{g/ml}$ dozu 0.37 ± 0.08 , 200 $\mu\text{g/ml}$ dozu ise 0.38 ± 0.04 seviyesinde antioksidan etkinlik sergilemiştir. Bahsedilen uygulamaların hiçbirisi kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki açıdan bir önem arz etmemiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına antioksidan etkinlik olarak 1 mM uygulama dozunda 0.36 ± 0.02 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μM dozu antioksidan etkinlik üzerinde 0.34 ± 0.03 seviyesinde etkili olurken 100 μM dozu ise bu parametrede 0.37 ± 0.06 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki antioksidan etki seviyesi 0.32 ± 0.02 aralığında olmuştur. Bu uygulama verileri kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki olarak ($p \geq 0.05$) önemli bulunmamıştır.



Şekil 4.25. DU145 hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların TAK testi sonuçları. (* $p \leq 0.05$)

4.2.2.3. Kolon Kanseri (HT-29) Hücre Hattı

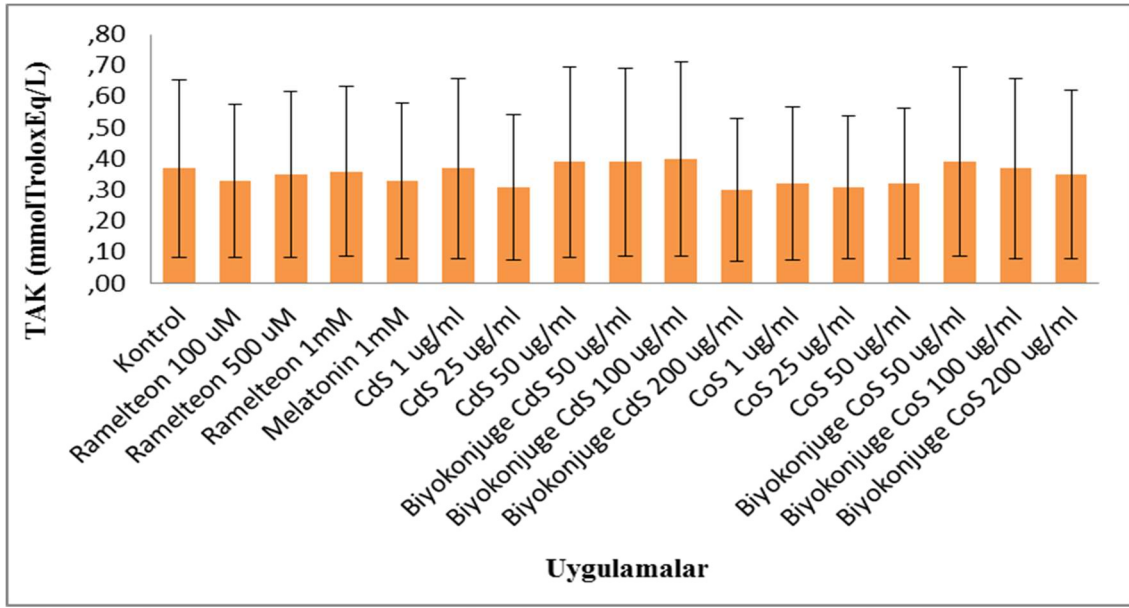
Kolon kanseri HT-29 hücre hattında hem CdS hem CoS quantum dotları hem de bu quantum dotların biyokonjuge formları uygulanmıştır. 24 saat sonunda uygulamaların total antioksidan etkileri üzerine sonuçlar, elde edilen hücre sıvılarından TAK testi yapılması ile ortaya koyulmuştur. Kolon kanseri hücre hattına ait total antioksidan test bulguları grafiği Şekil 4.26'da verilmiştir. Elde edilen verilere göre, kontrol grubunun total antioksidan etkinlik değeri 0.37 ± 0.29 olarak tespit edilmiştir.

CdS quantum dotlarının $1 \mu\text{g/ml}$ uygulama dozu 0.37 ± 0.29 seviyesinde antioksidan etkinlik sergilemiştir. Antioksidan etkinlik $25 \mu\text{g/ml}$ dozunda 0.31 ± 0.24 olurken, $50 \mu\text{g/ml}$ dozunda ise 0.39 ± 0.31 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının $50 \mu\text{g/ml}$ dozunda antioksidan etkinlik 0.39 ± 0.31 olarak tespit edilmişken, $100 \mu\text{g/ml}$ dozunda bu rakam 0.40 ± 0.32 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan $200 \mu\text{g/ml}$ dozunda ise antioksidan etkinlik seviyesinin 0.30 ± 0.23 olduğu

tespit edilmiştir. Bahsedilen uygulamaların hiçbirisi kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan önemli ($p \geq 0.05$) bulunmamıştır.

CoS quantum dotlarının 1 $\mu\text{g/ml}$ dozunu antioksidan seviyeye etkisi 0.32 ± 0.25 olarak bulunmuştur. CoS QD'lerinin 25 $\mu\text{g/ml}$ dozu 0.31 ± 0.23 seviyesinde etkili olmuşken, 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu 0.32 ± 0.25 seviyesinde etki göstermiştir. Biyokonjuge olarak uygulanmış CoS uygulamalarının en düşük dozu olan 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu antioksidan etkinlik olarak 0.39 ± 0.31 aralığında etki sergilerken, 100 $\mu\text{g/ml}$ dozu 0.37 ± 0.29 , 200 $\mu\text{g/ml}$ dozu ise 0.35 ± 0.27 seviyesinde antioksidan etkinlik sergilemiştir. Bahsedilen uygulamaların hiçbirisi kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki açıdan bir önem arz etmemiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına antioksidan etkinlik olarak 1 mM uygulama dozunda 0.36 ± 0.28 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μM dozu antioksidan etkinlik üzerinde 0.35 ± 0.27 seviyesinde etkili olurken 100 μM dozu ise bu parametrede 0.33 ± 0.27 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki antioksidan etki seviyesi 0.33 ± 0.26 aralığında olmuştur. Bu uygulama verileri kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki olarak bir anlamlı ($p \geq 0.05$) bulunmamıştır.



Şekil 4.26. HT-29 hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların TAK testi sonuçları. (* $p \leq 0.05$)

4.2.3. Total Oksidan Durum (TOD) Testi Bulguları

4.2.3.1. Nöroblastom (SH-SY5Y) Hücre Hattı

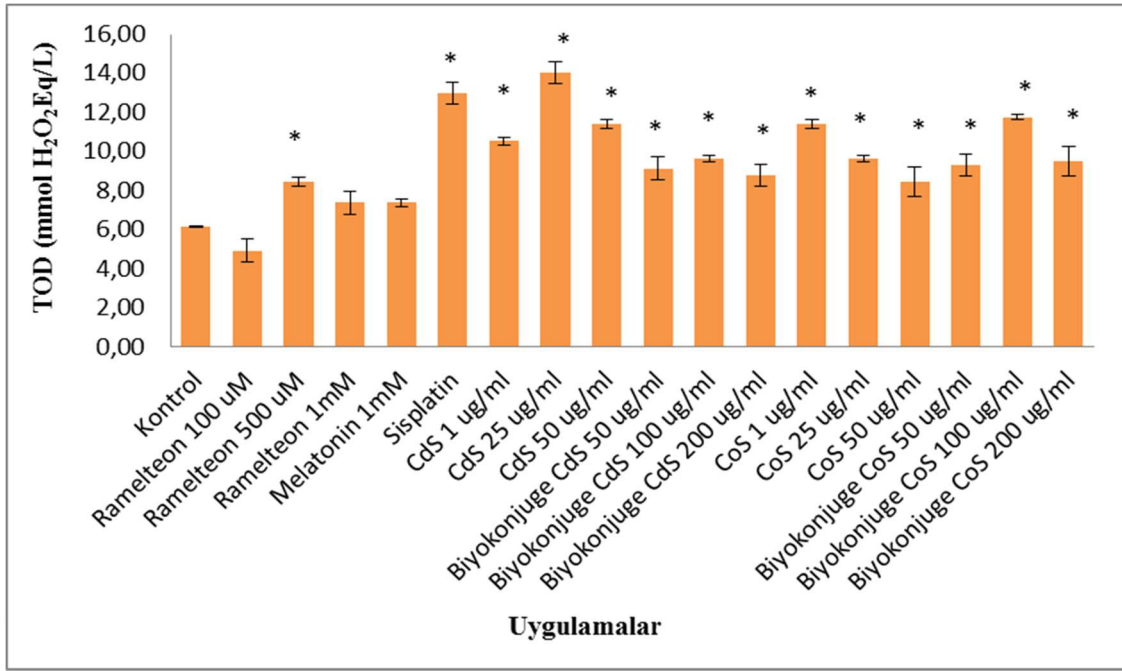
Nöroblastom kanseri SH-SY5Y hücre hattında hem CdS hem CoS quantum dotları hem de bu quantum dotların biyokonjuge formları uygulanmıştır. 24 saat sonunda uygulamaların total oksidan etkileri üzerine sonuçlar, hücre sıvılarından TOD testi ile ortaya koyulmuştur. Nöroblastom hücre hattına ait total oksidan test bulguları grafiği Şekil 4.27’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, kontrol grubunun total oksidan etkinlik değeri 6.15 ± 0.06 olarak tespit edilmiştir.

CdS quantum dotlarının $1 \mu\text{g/ml}$ uygulama dozu 10.53 ± 0.18 seviyesinde oksidan etkinlik sergilemiştir. Oksidan etkinlik $25 \mu\text{g/ml}$ dozunda 14.04 ± 0.58 olurken, $50 \mu\text{g/ml}$ dozunda ise 11.41 ± 0.24 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının $50 \mu\text{g/ml}$ dozunda oksidan etkinlik 9.13 ± 0.58 olarak tespit edilmişken, $100 \mu\text{g/ml}$ dozunda bu rakam 9.65 ± 0.18 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan $200 \mu\text{g/ml}$ dozunda ise oksidan etkinlik seviyesinin 8.78 ± 0.58 olduğu tespit edilmiştir. Bahsedilen

uygulamaların tamamı kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

CoS quantum dotlarının 1 $\mu\text{g/ml}$ dozunu oksidan seviyeye etkisi 11.41 ± 0.24 olarak bulunmuştur. CoS QD'lerinin 25 $\mu\text{g/ml}$ dozu 9.65 ± 0.18 seviyesinde etkili olmuşken, 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu 8.43 ± 0.76 seviyesinde etki göstermiştir. Biyokonjuge olarak uygulanmış CoS uygulamalarının en düşük dozu olan 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu oksidan etkinlik olarak 9.3 ± 0.38 aralığında etki sergilerken, 100 $\mu\text{g/ml}$ dozu 11.76 ± 0.12 , 200 $\mu\text{g/ml}$ dozu ise 9.51 ± 0.78 seviyesinde oksidan etkinlik sergilemiştir. Bahsedilen uygulamaların tamamı kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına oksidan etkinlik olarak 1 mM uygulama dozunda 7.37 ± 0.58 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μM dozu oksidan etkinlik üzerinde 8.43 ± 0.24 seviyesinde etkili olurken 100 μM dozu ise bu parametrede 4.92 ± 0.58 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki oksidan etki seviyesi 7.37 ± 0.18 aralığında olmuştur. Bunlara ek olarak kontrol ilaç olarak etkisi incelenen sisplatin oksidan seviyeyi 12.99 ± 0.58 seviyesinde etkilemiştir. Ramelteon 500 μM dozu ile Sisplatin uygulamasının istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olduğu tespit edilirken, Ramelteon 1 mM ve 100 μM uygulama grupları ile melatonin uygulamasının istatistiki olarak anlamlı ($p \geq 0.05$) bulunmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.27. SH-SY5Y hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların TOD testi sonuçları. (* $p \leq 0.05$)

4.2.3.2. Prostat Kanseri (DU145) Hücre Hattı

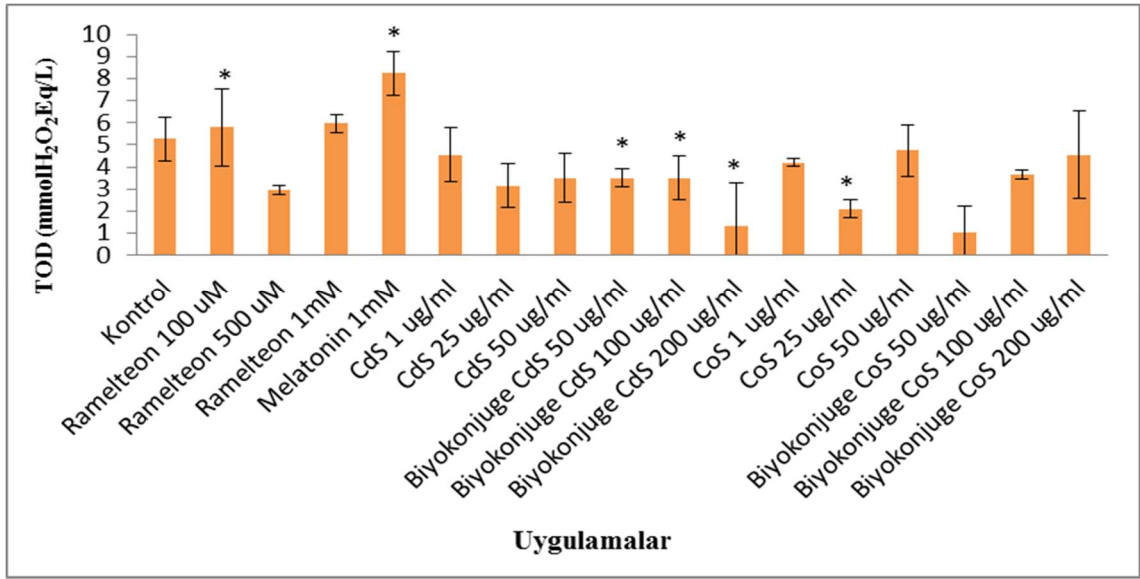
Prostat kanseri DU145 hücre hattında hem CdS hem CoS quantum dotları hem de bu quantum dotların biyokonjuge formları uygulanmıştır. 24 saat sonunda uygulamaların total oksidan etkileri üzerine sonuçlar, hücre sıvılarından TOD testi ile ortaya koyulmuştur. Prostat kanseri hücre hattına ait total oksidan durum bulguları grafiği Şekil 4.28’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, kontrol grubunun TOD değeri 5.26 ± 1.01 olarak tespit edilmiştir.

CdS quantum dotlarının $1 \mu\text{g/ml}$ uygulama dozu 4.56 ± 1.75 seviyesinde oksidan etkinlik sergilemiştir. Oksidan etkinlik $25 \mu\text{g/ml}$ dozunda 3.16 ± 0.20 olurken, $50 \mu\text{g/ml}$ dozunda ise 3.51 ± 0.4 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının $50 \mu\text{g/ml}$ dozunda oksidan etkinlik 3.51 ± 1 olarak tespit edilmişken, $100 \mu\text{g/ml}$ dozunda bu rakam 3.51 ± 1.2 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan $200 \mu\text{g/ml}$ dozunda ise oksidan etkinlik seviyesinin 1.32 ± 1 olduğu tespit edilmiştir. Biyokonjuge CdS uygulamalarından 50 , 100 ve $200 \mu\text{g/ml}$ dozlarının kontrolle kıyaslandığında istatistiki

açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olduğu bulunmuştur. Kalan uygulamaların tamamı kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \geq 0.05$) bulunmadığı olarak tespit edilmiştir.

CoS quantum dotlarının 1 $\mu\text{g/ml}$ dozunu oksidan seviyeye etkisi 4.21 ± 1.09 olarak bulunmuştur. CoS QD'lerinin 25 $\mu\text{g/ml}$ dozu 2.11 ± 0.4 seviyesinde etkili olmuşken, 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu 4.74 ± 1 seviyesinde etki göstermiştir. Biyokonjuge olarak uygulanmış CoS uygulamalarının en düşük dozu olan 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu oksidan etkinlik olarak 1.05 ± 1.93 aralığında etki sergilerken, 100 $\mu\text{g/ml}$ dozu 3.68 ± 0.20 , 200 $\mu\text{g/ml}$ dozu ise 4.56 ± 0.4 seviyesinde oksidan etkinlik sergilemiştir. CoS quantum dotlarının 25 $\mu\text{g/ml}$ dozu kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak belirlenmiştir. Kalan uygulamaların tamamı kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamsız ($p \geq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına oksidan etkinlik olarak 1 mM uygulama dozunda 5.96 ± 0.2 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μM dozu oksidan etkinlik üzerinde 2.98 ± 1.18 seviyesinde etkili olurken 100 μM dozu ise bu parametrede 5.79 ± 1.18 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki oksidan etki seviyesi 8.25 ± 2 aralığında olmuştur. Ramelteon 1 mM dozu ve melatonin 1 mM uygulamaları istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilirken, kalan uygulama gruplarının istatistiki olarak bir anlam ifade etmediği ($p \geq 0.05$) tespit edilmiştir.



Şekil 4.28. DU145 hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların TOD testi sonuçları. (* p≤0.05)

4.2.3.3. Kolon Kanseri (HT-29) Hücre Hattı

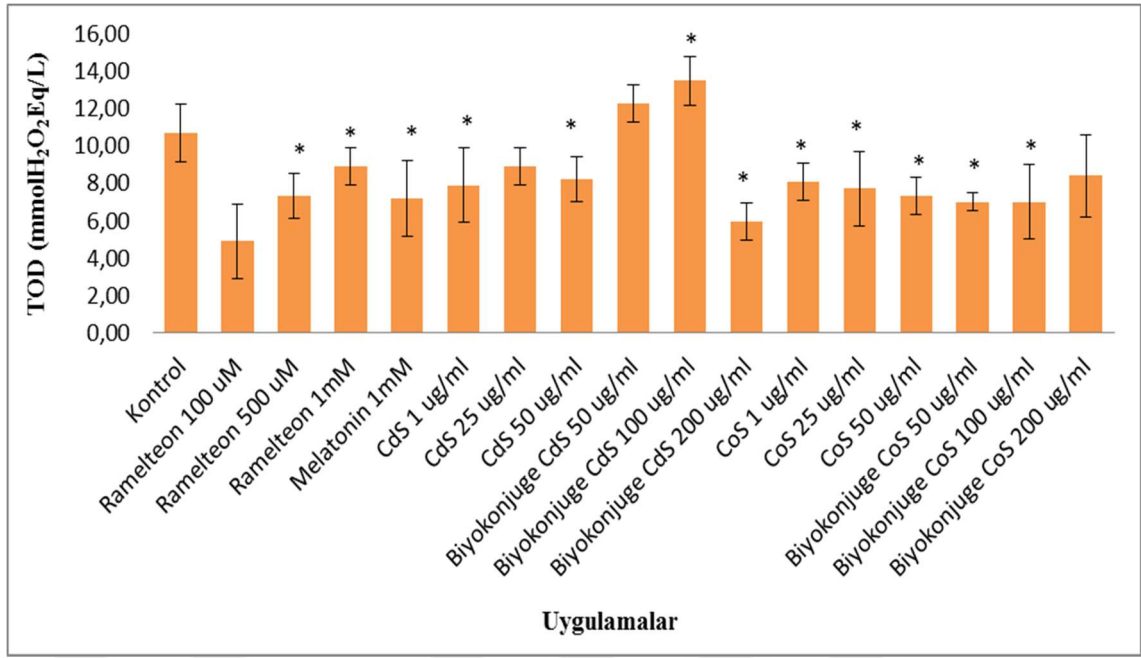
Kolon kanseri HT-29 hücre hattında hem CdS hem CoS quantum dotları hem de bu quantum dotların biyokonjuge formları uygulanmıştır. 24 saat sonunda uygulamaların total oksidan etkileri üzerine sonuçlar, hücre sıvılarından TOD testi ile ortaya koyulmuştur. Kolon kanseri hücre hattına ait total oksidan test bulguları grafiği Şekil 4.29'da verilmiştir. Elde edilen verilere göre, kontrol grubunun total oksidan etkinlik değeri 10.72 ± 1.53 olarak tespit edilmiştir.

CdS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozu 7.9 ± 2 seviyesinde oksidan etkinlik sergilemiştir. Oksidan etkinlik 25 µg/ml dozunda 8.95 ± 1 olurken, 50 µg/ml dozunda ise 8.25 ± 1.2 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda oksidan etkinlik 12.29 ± 1 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam 13.51 ± 1.3 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise oksidan etkinlik seviyesinin 5.97 ± 1 olduğu tespit edilmiştir. CdS quantum dot uygulamalarından 1 ve 50 µg/ml dozları ile biyokonjuge CdS uygulamalarından 100 ve 200 µg/ml dozunun kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$)

olduğu bulunmuştur. Kalan uygulamaların kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamsız ($p \geq 0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

CoS quantum dotlarının 1 $\mu\text{g/ml}$ dozunu oksidan seviyeye etkisi 8.08 ± 1 olarak bulunmuştur. CoS QD'lerinin 25 $\mu\text{g/ml}$ dozu 7.72 ± 2 seviyesinde etkili olmuşken, 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu 7.37 ± 1 seviyesinde etki göstermiştir. Biyokonjuge olarak uygulanmış CoS uygulamalarının en düşük dozu olan 50 $\mu\text{g/ml}$ dozu oksidan etkinlik olarak 7.02 ± 0.5 aralığında etki sergilerken, 100 $\mu\text{g/ml}$ dozu 7.02 ± 2 , 200 $\mu\text{g/ml}$ dozu ise 8.43 ± 2.2 seviyesinde oksidan etkinlik sergilemiştir. CoS quantum dotlarının 1 ve 25 $\mu\text{g/ml}$ dozları ile biyokonjuge CoS 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ uygulamaları kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak belirlenmiştir. Kalan uygulamanın kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamsız ($p \geq 0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına oksidan etkinlik olarak 1 mM uygulama dozunda 8.95 ± 1 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μM dozu oksidan etkinlik üzerinde 7.37 ± 1.2 seviyesinde etkili olurken 100 μM dozu ise bu parametrede 4.92 ± 2 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki oksidan etki seviyesi 7.2 ± 2 aralığında olmuştur. Ramelteon 500 ve 100 μM dozları ile melatonin 1 mM uygulamaları istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilirken, kalan uygulama gruplarının istatistiki olarak anlamlı bulunmadığı ($p \geq 0.05$) tespit edilmiştir.



Şekil 4.29. HT-29 hücre hattında quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların TOD testi sonuçları. (* p≤0.05)

4.2.4. Flow Sitometri Bulguları

4.2.4.1. Nöroblastom (SH-SY5Y) Hücre Hattı

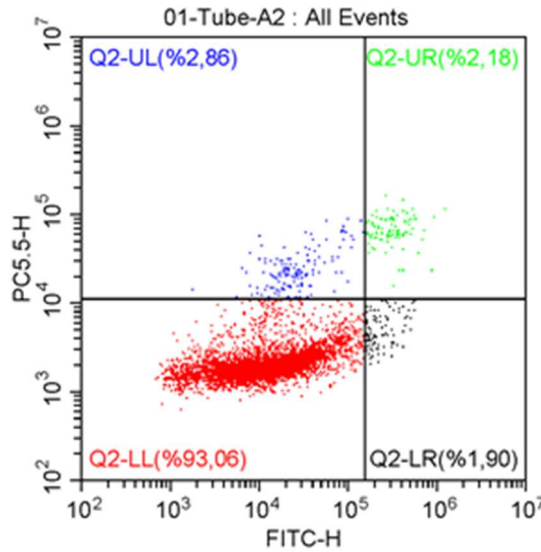
Tablo 4.1. Quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların SH-SY5Y flow sitometri testi ortalama verileri. (* p≤0.05)

Uygulamalar	Canlı Hücre (%)	Erken Apoptotik Hücre (%)	Geç Apoptotik Hücre (%)	Nekrotik Hücre (%)
Kontrol	93.50	1.65	2.02	2.83
Ramelteon 100 uM	69.94*	13.13*	10.83*	6.10
Ramelteon 500 uM	60.01*	13.08*	19.62*	7.29
Ramelteon 1mM	73.23*	10.86*	14.48*	1.43
Melatonin 1mM	67.195*	19.75*	11.945*	1.11
Sisplatin	65.42*	17.385*	13.29*	3.91
CdS 1 ug/ml	75.31*	12.27*	9.91*	2.51
CdS 25 ug/ml	84.98	4.78	8.16*	2.08
CdS 50 ug/ml	83.81*	4.40	9.12*	2.67
Biyokonjuge CdS 50 ug/ml	87.08	4.50	6.19*	2.23
Biyokonjuge CdS 100 ug/ml	84.42*	5.53*	7.5*	2.55
Biyokonjuge CdS 200 ug/ml	75.78*	8.08*	9.81*	6.33
CoS 1 ug/ml	90.81	3.15	4.03	2.01

Tablo 4.1.(Devamı). Quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların SH-SY5Y flow sitometri testi ortalama verileri.

Uygulamalar	Canlı Hücre (%)	Erken Apoptotik Hücre (%)	Geç Apoptotik Hücre (%)	Nekrotik Hücre (%)
CoS 25 ug/ml	71.03*	10.78*	12.4*	5.79
CoS 50 ug/ml	91.50	2.77	3.82	1.91
Biyokonjuge CoS 50 ug/ml	85.27	4.40	5.82*	4.56
Biyokonjuge CoS 100 ug/ml	91.38	2.24	4.51*	1.87
Biyokonjuge CoS 200 ug/ml	92.88	2.11	3.29	1.39

Nöroblastom kanseri SH-SY5Y hücre hattında hem CdS hem CoS quantum dotları hem de bu quantum dotların biyokonjuge formları uygulanmıştır. 24 saat sonunda uygulamaların hücre ölümünün hangi şekilde olduğuna dair etkileri, anneksin FITC flow sitometri analizi ile ortaya koyulmuştur. Nöroblastom hücre hattına ait flow sitometri bulguları grafiği Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33'te verilmiştir. Elde edilen verilere göre, kontrol grubunun hücre canlılığı oranı % 93.5±0.62 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubundan erken apoptoz seviyesi % 1.65±0.35 olurken, geç apoptotik hücre seviyesi % 2.02±0.23 olmuştur. Kontrol grubunda nekrotik hücre yüzdesi ise % 2.83±0.04 olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.30. SH-SY5Y hücre hattı flow sitometri analizi kontrol grubu. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

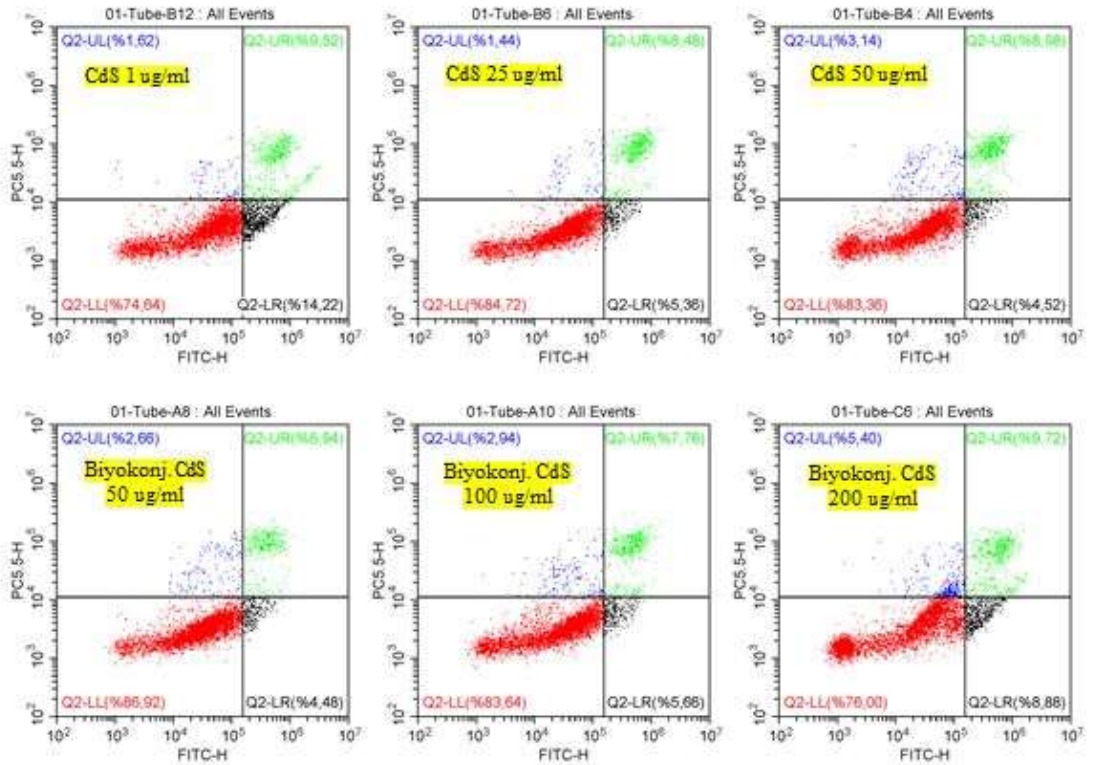
CdS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda hücre canlılığı % 71.31±0.95 seviyesinde belirlenmiştir. Hücre canlılık seviyesi 25 µg/ml dozunda % 84.98±0.37 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 83.81±0.64 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda hücre canlılık seviyesi % 87.08±0.23 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 84.42±1.11 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise hücre canlılığı seviyesinin % 75.78±0.31 olduğu tespit edilmiştir. CdS 1 ve 50 µg/ml ile biyokonjuge CdS 100 ve 200 µg/ml uygulamaları kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

CdS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda erken apoptotik hücre oranı % 12.27±2.76 seviyesinde belirlenmiştir. Erken apoptoza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 25 µg/ml dozunda % 4.78±0.82 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 4.4±0.17 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda erken apoptotik hücre seviyesi % 4.5±0.28 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 5.53±0.18 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise erken apoptotik hücre seviyesinin % 8.08±1.13 olduğu tespit edilmiştir. CdS 1 µg/ml ile biyokonjuge CdS 100 ve 200 µg/ml uygulamaları kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

CdS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda geç apoptotik hücre oranı % 9.91±0.55 seviyesinde belirlenmiştir. Geç apoptoza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 25 µg/ml dozunda % 8.16±0.45 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 9.12±0.2 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda geç apoptotik hücre seviyesi % 6.19±0.35 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 7.5±0.37 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise geç apoptotik hücre seviyesinin % 9.81±0.13 olduğu tespit edilmiştir. Bahsedilen geç

apoptotik hücre oranı verilen uygulamaların tamamı kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

CdS quantum dotlarının 1 $\mu\text{g/ml}$ uygulama dozunda nekrotik hücre oranı % 2.51 ± 1.26 seviyesinde belirlenmiştir. Nekroza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 25 $\mu\text{g/ml}$ dozunda % 2.08 ± 0.91 olurken, 50 $\mu\text{g/ml}$ dozunda ise % 2.67 ± 0.66 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 $\mu\text{g/ml}$ dozunda nekrotik hücre seviyesi % 2.23 ± 0.61 olarak tespit edilmişken, 100 $\mu\text{g/ml}$ dozunda bu rakam % 2.55 ± 0.55 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 $\mu\text{g/ml}$ dozunda ise nekrotik hücre seviyesinin % 6.33 ± 1.32 olduğu tespit edilmiştir. Nekrotik hücre oranı bakımından elde edilen veriler kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \geq 0.05$) sonuçlar elde edilmediği görülmüştür.



Şekil 4.31. SH-SY5Y hücre hattı flow sitometri analizi CdS-Biyokonjuge CdS uygulamaları grubu. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

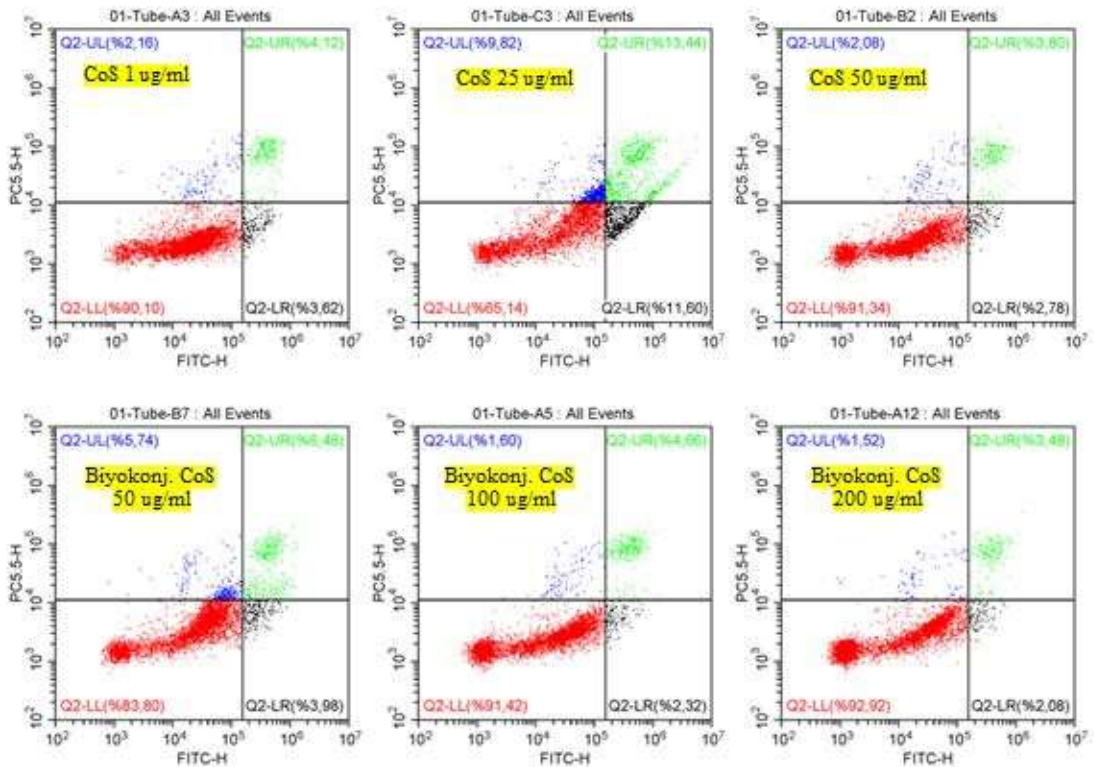
CoS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda hücre canlılığı % 90.81±1.04 seviyesinde belirlenmiştir. Hücre canlılık seviyesi 25 µg/ml dozunda % 71.03±8.33 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 91.5±0.23 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda hücre canlılık seviyesi % 85.27±2.08 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 91.38±0.06 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise hücre canlılığı seviyesinin % 92.88±0.88 olduğu tespit edilmiştir. CoS 25 µg/ml uygulamasının kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir. Diğer uygulamaların istatistiki açıdan anlamsız ($p \geq 0.05$) olduğu belirlenmiştir.

CoS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda erken apoptotik hücre oranı % 3.15±0.66 seviyesinde belirlenmiştir. Erken apoptoza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 25 µg/ml dozunda % 10.78±1.16 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 2.77±0.01 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda erken apoptotik hücre seviyesi % 4.4±0.59 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 2.24±0.11 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise erken apoptotik hücre seviyesinin % 2.11±0.04 olduğu tespit edilmiştir. CoS 25 µg/ml uygulamasının kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir. Diğer uygulamaların istatistiki açıdan anlamsız ($p \geq 0.05$) olduğu belirlenmiştir.

CoS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda geç apoptotik hücre oranı % 4.03±0.13 seviyesinde belirlenmiştir. Geç apoptoza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 25 µg/ml dozunda % 12.4±1.47 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 3.82±0.02 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda geç apoptotik hücre seviyesi % 5.82±0.93 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 4.51±0.21 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda

ise geç apoptotik hücre seviyesinin $\% 3.29 \pm 0.27$ olduğu tespit edilmiştir. CoS 25 $\mu\text{g/ml}$ ile biyokonjuge CdS 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ dozları kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

CoS quantum dotlarının 1 $\mu\text{g/ml}$ uygulama dozunda nekrotik hücre oranı $\% 2.01 \pm 0.21$ seviyesinde belirlenmiştir. Nekroza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 25 $\mu\text{g/ml}$ dozunda $\% 5.79 \pm 5.7$ olurken, 50 $\mu\text{g/ml}$ dozunda ise $\% 1.91 \pm 2.4$ olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının 50 $\mu\text{g/ml}$ dozunda nekrotik hücre seviyesi $\% 4.56 \pm 1.67$ olarak tespit edilmişken, 100 $\mu\text{g/ml}$ dozunda bu rakam $\% 1.87 \pm 0.38$ olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 $\mu\text{g/ml}$ dozunda ise nekrotik hücre seviyesinin $\% 1.39 \pm 0.18$ olduğu tespit edilmiştir. Nekrotik hücre oranı bakımından elde edilen veriler kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı sonuçlar elde edilmediği ($p \geq 0.05$) görülmüştür.



Şekil 4.32. SH-SY5Y hücre hattı flow sitometri analizi CoS-Biyokonjuge CoS uygulamaları grubu. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

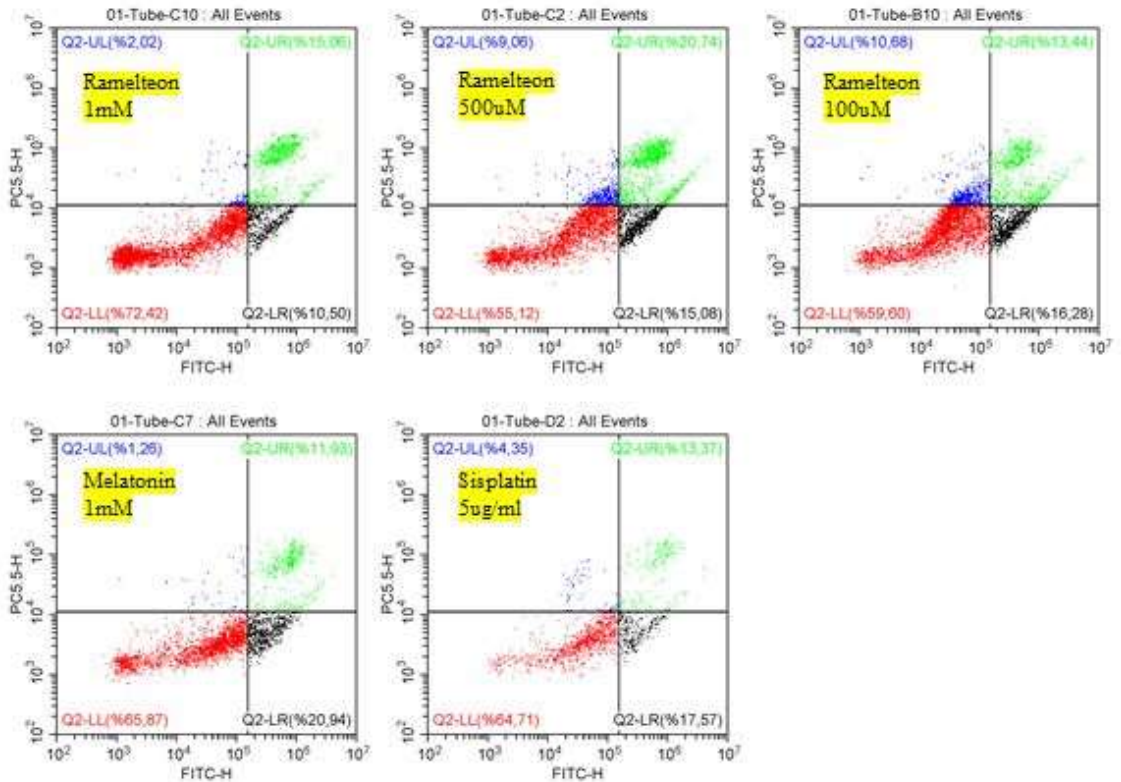
Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına hücre canlılığı bakımından 1 mM uygulama dozunda % 73.23 ± 1.15 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μM dozu hücre canlılığı üzerinde % 60.01 ± 6.92 seviyesinde etkili olurken 100 μM dozu ise bu parametrede % 69.94 ± 14.62 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki hücre canlılığı seviyesi % 67.2 ± 1.87 aralığında olmuştur. Bunlara ek olarak kontrol ilaç olarak etkisi incelenen sisplatin hücre canlılığı oranını % 65.42 ± 1 seviyesinde etkilemiştir. Bahsedilen uygulamaların tamamı istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına erken apoptotik hücre seviyesi bakımından 1 mM uygulama dozunda % 10.86 ± 0.51 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μM dozu erken apoptotik hücre oranı üzerinde % 13.08 ± 2.83 seviyesinde etkili olurken 100 μM dozu ise bu parametrede % 13.13 ± 4.45 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki erken apoptotik hücre seviyesi % 19.75 ± 1.68 aralığında olmuştur. Bunlara ek olarak kontrol ilaç olarak etkisi incelenen sisplatin erken apoptotik hücre oranını % 17.39 ± 0.26 seviyesinde etkilemiştir. Bahsedilen uygulamaların tamamı istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına geç apoptotik hücre seviyesi bakımından 1 mM uygulama dozunda % 14.48 ± 0.82 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μM dozu geç apoptotik hücre oranı üzerinde % 19.62 ± 1.58 seviyesinde etkili olurken 100 μM dozu ise bu parametrede % 10.83 ± 3.69 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki geç apoptotik hücre seviyesi % 11.95 ± 0.02 aralığında olmuştur. Bunlara ek olarak kontrol ilaç olarak etkisi incelenen sisplatin geç apoptotik hücre oranını % 13.29 ± 0.11 seviyesinde etkilemiştir.

Bahsedilen uygulamaların tamamı istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına nekrotik hücre seviyesi bakımından 1 mM uygulama dozunda % 1.43 ± 0.83 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μ M dozu nekrotik hücre oranı üzerinde % 7.29 ± 2.5 seviyesinde etkili olurken 100 μ M dozu ise bu parametrede % 6.1 ± 6.48 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki nekrotik hücre seviyesi % 1.11 ± 0.21 aralığında olmuştur. Bunlara ek olarak kontrol ilaç olarak etkisi incelenen sisplatin nekrotik hücre oranını % 3.91 ± 0.63 seviyesinde etkilemiştir. Nano yapıların çözünmesi için kullanılan PBS kontrol uygulamasının ise nekrotik hücre oranını % 6.31 ± 0.88 seviyesinde etkilediği kaydedilmiştir. Bahsedilen uygulamaların tamamı istatistiki açıdan anlamsız ($p \geq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.



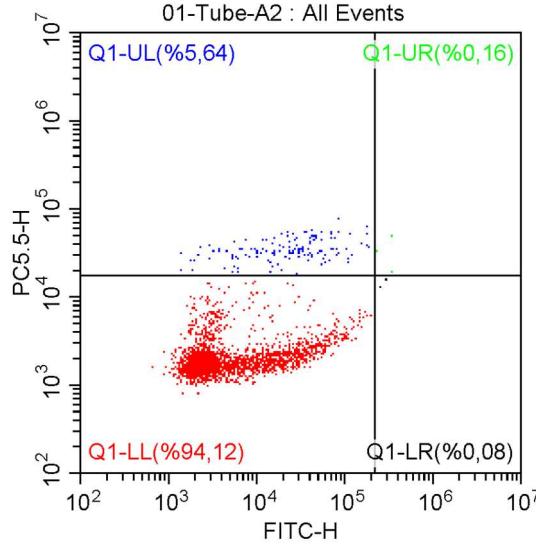
Şekil 4.33. SH-SY5Y hücre hattı flow sitometri analizi Ramelteon, Melatonin, Sisplatin uygulamaları grubu. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

4.2.4.2. Prostat Kanseri (DU145) Hücre Hattı

Tablo 4.2. Quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların DU145 flow sitometri testi ortalama verileri. (* $p \leq 0,05$)

Uygulamalar	Canlı Hücre (%)	Erken Apoptotik Hücre (%)	Geç Apoptotik Hücre (%)	Nekrotik Hücre (%)
Kontrol	94.84	0.08	0.08	5.00
Ramelteon 100 uM	95.98	0.38	0.32*	3.32*
Ramelteon 500 uM	96.36*	0.16	0.04	3.42*
Ramelteon 1mM	97.26*	0.02	0.14	2.58*
Melatonin 1mM	94.08	0.14	0.12	5.66
CdS 1 ug/ml	97.9*	0.30	0.4*	1.4*
CdS 25 ug/ml	97.08*	0.36	0.26	2.3*
CdS 50 ug/ml	96.68*	0.4*	0.36*	2.56*
Biyokonjuge CdS 50 ug/ml	96.56*	0.64*	0.20	2.6*
Biyokonjuge CdS 100 ug/ml	96.6*	0.30	0.12	2.8*
Biyokonjuge CdS 200 ug/ml	96.06	0.14	0.22	3.58
CoS 1 ug/ml	97*	0.58*	0.38*	2.04*
CoS 25 ug/ml	98.22*	0.44*	0.26	1.08*
CoS 50 ug/ml	96.9*	0.26	0.08	2.76*
Biyokonjuge CoS 50 ug/ml	97.06*	0.5*	0.32*	2.12*
Biyokonjuge CoS 100 ug/ml	97.04*	0.36	0.16	2.44*
Biyokonjuge CoS 200 ug/ml	97*	0.6*	0.32*	2.08*

Prostat kanseri DU145 hücre hattında hem CdS hem CoS quantum dotları hem de bu quantum dotların biyokonjuge formları uygulanmıştır. 24 saat sonunda uygulamaların hücre ölümünün hangi şekilde olduğuna dair etkileri, anneksin FITC flow sitometri analizi ile ortaya koyulmuştur. Prostat kanseri hücre hattına ait flow sitometri bulguları grafiği Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, kontrol grubunun hücre canlılığı oranı % 94.84 ± 1.02 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubundan erken apoptoz seviyesi % 0.08 ± 0.0 olurken, geç apoptotik hücre seviyesi % 0.08 ± 0.11 olmuştur. Kontrol grubunda nekrotik hücre yüzdesi ise % 5 ± 0.91 olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.34. DU145 hücre hattı flow sitometri analizi kontrol grubu. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

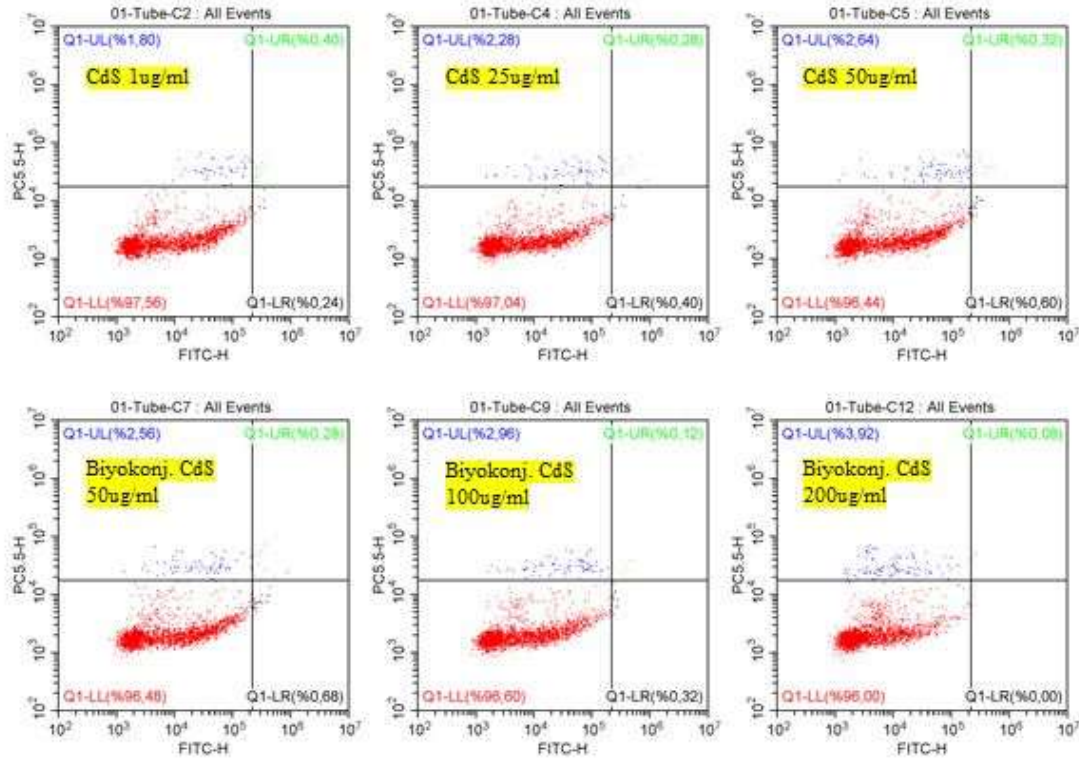
CdS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda hücre canlılığı % 97.9±0.48 seviyesinde belirlenmiştir. Hücre canlılık seviyesi 25 µg/ml dozunda % 97.08±0.06 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 96.68±0.34 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda hücre canlılık seviyesi % 96.56±0.11 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 96.6±0.0 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise hücre canlılığı seviyesinin % 96.06±0.08 olduğu tespit edilmiştir. CdS 1, 25 ve 50 µg/ml ile biyokonjuge CdS 50 ve 100 µg/ml dozları kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

CdS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda erken apoptotik hücre oranı % 0.3±0.84 seviyesinde belirlenmiştir. Erken apoptoza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 25 µg/ml dozunda % 0.36±0.06 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 0.4±0.28 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda erken apoptotik hücre seviyesi % 0.64±0.06 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 0.3±0.03 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise erken apoptotik hücre seviyesinin % 0.14±0.2 olduğu tespit edilmiştir. CdS 50 µg/ml

uygulaması ile biyokonjuge CdS 50 µg/ml uygulaması kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

CdS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda geç apoptotik hücre oranı % 0.4 ± 0.0 seviyesinde belirlenmiştir. Geç apoptoza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 25 µg/ml dozunda % 0.26 ± 0.03 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 0.36 ± 0.06 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda geç apoptotik hücre seviyesi % 0.2 ± 0.11 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 0.12 ± 0.0 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise geç apoptotik hücre seviyesinin % 0.22 ± 0.2 olduğu tespit edilmiştir. Bahsedilen geç apoptotik hücre oranı verilen uygulamalardan CdS 1 ve 50 µg/ml dozlarının verileri kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

CdS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda nekrotik hücre oranı % 1.4 ± 0.57 seviyesinde belirlenmiştir. Nekroza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 25 µg/ml dozunda % 2.3 ± 0.03 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 2.56 ± 0.11 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda nekrotik hücre seviyesi % 2.6 ± 0.06 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 2.8 ± 0.23 olmuştur. Biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise nekrotik hücre seviyesinin % 3.6 ± 0.48 olduğu tespit edilmiştir. Nekrotik hücre oranı bakımından elde edilen veriler kontrolle kıyaslandığında biyokonjuge CdS 200 µg/ml uygulaması hariç tüm uygulamaların istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) sonuçlar olduğu görülmüştür.



Şekil 4.35. DU145 hücre hattı flow sitometri analizi CdS-Biyokonjuge CdS uygulama grubu. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

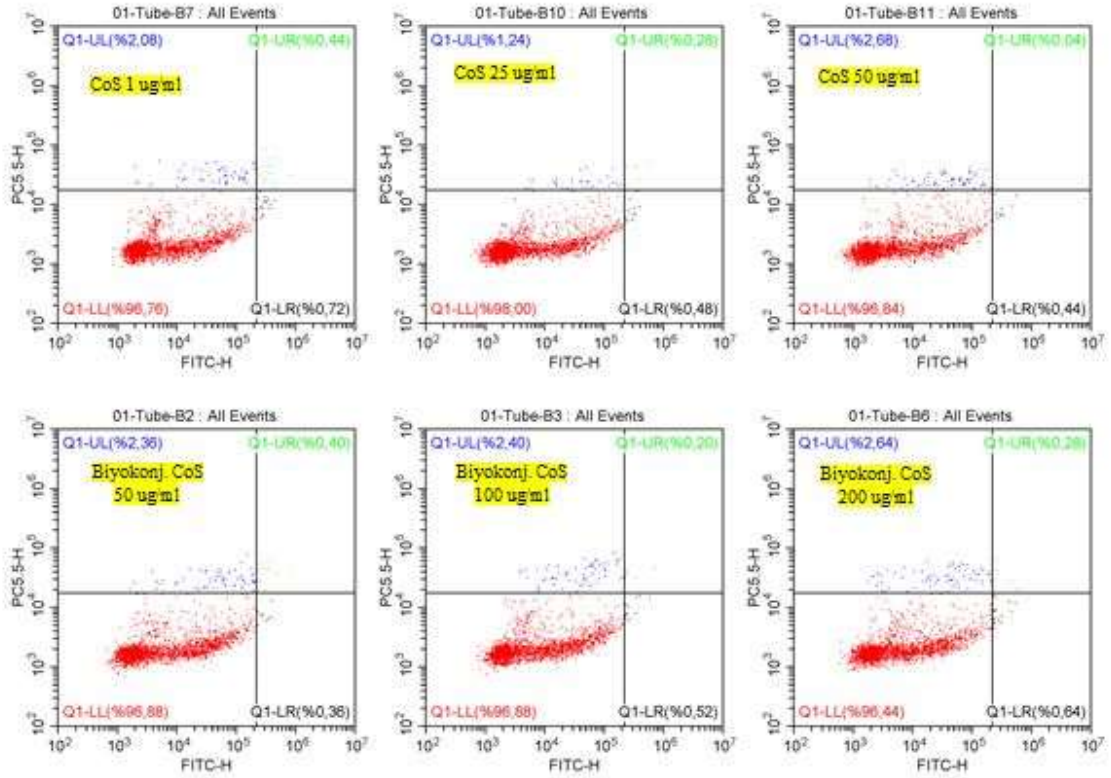
CoS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda hücre canlılığı % 97 ± 0.34 seviyesinde belirlenmiştir. Hücre canlılık seviyesi 25 µg/ml dozunda % 98.22 ± 0.31 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 96.9 ± 0.8 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda hücre canlılık seviyesi % 97.06 ± 0.25 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 97.04 ± 0.23 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise hücre canlılığı seviyesinin % 97 ± 0.79 olduğu tespit edilmiştir. Bahsedilen uygulamaların tamamı kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

CoS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda erken apoptotik hücre oranı % 0.58 ± 0.2 seviyesinde belirlenmiştir. Erken apoptoza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 25 µg/ml dozunda % 0.44 ± 0.06 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 0.26 ± 0.25 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda erken apoptotik hücre seviyesi %

0.5±0.2 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 0.36±0.23 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise erken apoptotik hücre seviyesinin % 0.6±0.06 olduğu tespit edilmiştir. CoS 1 ve 25 µg/ml ile biyokonjuge CoS 50 ve 200 µg/ml uygulamaları kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

CoS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda geç apoptotik hücre oranı % 0.38±0.08 seviyesinde belirlenmiştir. Geç apoptoza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 25 µg/ml dozunda % 0.26±0.02 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 0.08±0.06 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda geç apoptotik hücre seviyesi % 0.32±0.11 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 0.16±0.06 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise geç apoptotik hücre seviyesinin % 0.32±0.06 olduğu tespit edilmiştir. CoS 1 µg/ml ile biyokonjuge CoS 50 ve 200 µg/ml uygulamaları kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan çok anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

CoS quantum dotlarının 1 µg/ml uygulama dozunda nekrotik hücre oranı % 2.04±0.06 seviyesinde belirlenmiştir. Nekroza sürüklenen hücrelerin yüzdesi 25 µg/ml dozunda % 1.08±0.23 olurken, 50 µg/ml dozunda ise % 2.76±0.11 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının 50 µg/ml dozunda nekrotik hücre seviyesi % 2.12±0.34 olarak tespit edilmişken, 100 µg/ml dozunda bu rakam % 2.44±0.06 olmuştur. Biyokonjuge CoS uygulamalarının en yüksek dozu olan 200 µg/ml dozunda ise nekrotik hücre seviyesinin % 2.08±0.79 olduğu tespit edilmiştir. Nekrotik hücre oranı bakımından elde edilen tüm veriler kontrolle kıyaslandığında istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) sonuçlar elde edildiği görülmüştür.



Şekil 4.36. DU145 hücre hattı flow sitometri analizi CoS-Biyokonjuge CoS uygulama grubu. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

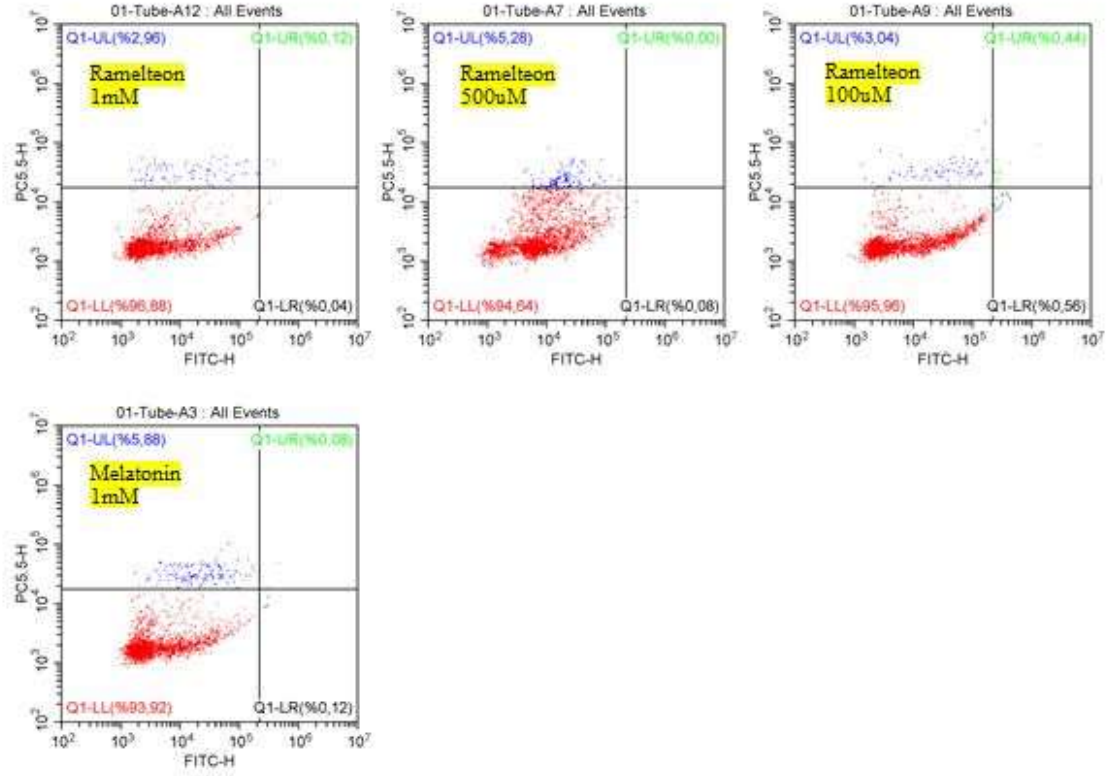
Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına hücre canlılığı bakımından 1 mM uygulama dozunda % 97.26 ± 0.54 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μ M dozu hücre canlılığı üzerinde % 96.36 ± 2.49 seviyesinde etkili olurken 100 μ M dozu ise bu parametrede % 95.98 ± 0.03 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki hücre canlılığı seviyesi % 94.08 ± 0.23 aralığında olmuştur. Ramelteon 500 μ M ve 1 mM uygulama dozları istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına erken apoptotik hücre seviyesi bakımından 1 mM uygulama dozunda % 0.02 ± 0.03 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μ M dozu erken apoptotik hücre oranı üzerinde % 0.16 ± 0.11 seviyesinde etkili olurken 100 μ M dozu ise bu parametrede % 0.38 ± 0.25 seviyesine

kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki erken apoptotik hücre seviyesi % 0.14 ± 0.03 aralığında olmuştur. Nano yapıların çözünmesi için kullanılan Bahsedilen uygulamaların tamamının istatistiki açıdan anlamsız olduğu tespit edilmiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına geç apoptotik hücre seviyesi bakımından 1 mM uygulama dozunda % 0.14 ± 0.03 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μ M dozu geç apoptotik hücre oranı üzerinde % 0.04 ± 0.06 seviyesinde etkili olurken 100 μ M dozu ise bu parametrede % 0.32 ± 0.17 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki geç apoptotik hücre seviyesi % 0.12 ± 0.06 aralığında olmuştur. Bahsedilen uygulamalardan yalnızca Ramelteon 100 μ M dozunun istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

Uygulanan Ramelteon ilacı tek başına nekrotik hücre seviyesi bakımından 1 mM uygulama dozunda % 2.58 ± 0.54 seviyesinde etki göstermiştir. Buna ek olarak ilacın 500 μ M dozu nekrotik hücre oranı üzerinde % 3.42 ± 2.63 seviyesinde etkili olurken 100 μ M dozu ise bu parametrede % 3.32 ± 0.4 seviyesine kadar etki sergilemiştir. Melatoninin 1 mM dozunda bu hücre hattı üzerindeki nekrotik hücre seviyesi % 5.66 ± 0.31 aralığında olmuştur. Ramelteon 1 mM, 500 ve 100 μ M uygulama dozlarının istatistiki açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.37. DU145 hücre hattı flow sitometri analizi Ramelteon, Melatonin uygulama grubu. LL kadranı: Canlı hücre, LR kadranı: Erken apoptotik hücre, UR kadranı: Geç apoptotik hücre, UL kadranı: Nekrotik hücre.

4.2.5. Real Time PCR Bulguları

4.2.5.1. Nöroblastom (SH-SY5Y) Hücre Hattı

Tablo 4.3. Quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların SH-SY5Y real time PCR testi sonuçları. (* $p \leq 0.05$)

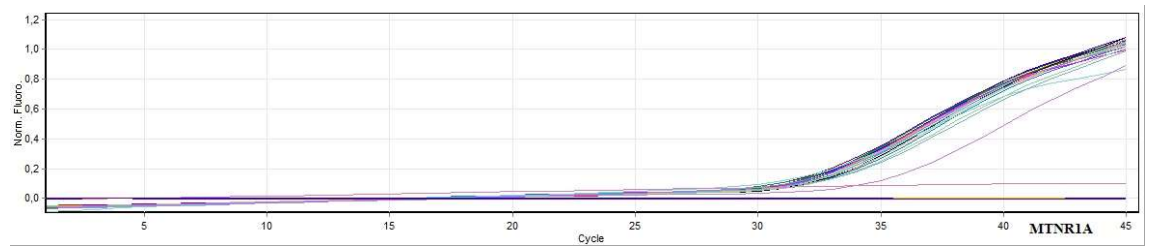
Uygulamalar	Ortalama CT Değeri				Standart Sapma			
	ACTB	MTNR1	RORA	BAX	ACTB	MTNR1	RORA	BAX
		A				A		
Kontrol	26.97	0.00	35.93	32.25	0.03	0.00	0.03	0.05
Ramelteon 100 uM	19.94	30.08*	0.00*	23.19*	0.34	0.08	0.00	0.10
Ramelteon 500 uM	19.69	31.45*	0.00*	23.38*	0.16	0.03	0.00	0.30
Ramelteon 1mM	19.73	31.04*	0.00*	23.01*	0.22	0.04	0.00	0.06
Melatonin 1mM	19.99	31.63*	0.00*	24.16*	0.09	0.13	0.00	0.10
Sisplatin	20.43	30.62*	0.00*	23.35*	0.03	0.12	0.00	0.05
CdS 1 ug/ml	20.47	30.51*	0.00*	24.24*	0.07	0.30	0.00	0.02
CdS 25 ug/ml	20.95	30.50*	0.00*	23.83*	0.61	0.10	0.00	0.28
CdS 50 ug/ml	20.12	30.44*	0.00*	23.22*	0.10	0.04	0.00	0.11
Biyokonjuge CdS	20.54	29.88*	0.00*	23.48*	0.06	0.08	0.00	0.04
50 ug/ml								
Biyokonjuge CdS	20.31	30.56*	0.00*	23.32*	0.31	0.06	0.00	0.02
100 ug/ml								
Biyokonjuge CdS	19.27	31.41*	0.00*	24.38*	0.25	0.10	0.00	0.08
200 ug/ml								
CoS 1 ug/ml	20.14	30.69*	0.00*	23.44*	0.04	0.09	0.00	0.04
CoS 25 ug/ml	20.37	31.41*	0.00*	23.07*	0.03	0.05	0.00	0.07
CoS 50 ug/ml	20.23	30.15*	0.00*	23.23*	0.03	0.10	0.00	0.03
Biyokonjuge CoS	20.30	30.99*	0.00*	23.31*	0.10	0.09	0.00	0.01
50 ug/ml								
Biyokonjuge CoS	20.05	31.49*	0.00*	23.63*	0.03	0.05	0.00	0.13
100 ug/ml								
Biyokonjuge CoS	20.09	31.20*	0.00*	23.37*	0.08	0.20	0.00	0.15
200 ug/ml								

Melatonin reseptörü 1a'yı kodlayan MTNR1A geninin nöroblastom hücre hattının kontrol grubunda ekspresyonu tespit edilmemiştir. Ancak gerçekleştirilen uygulamalar neticesinde bu hücre hattında MTNR1A gen ekspresyonu gözlenmiştir. Nöroblastom hücre hattına ait MTNR1A genine ait Real Time PCR ekspresyon eğrisi

Şekil 4.38’de verilmiştir. CdS quantum dotu 1, 25 ve 50 µg/ml dozları ekspresyon CT değerini sırasıyla 30.51, 30.5 ve 30.44 seviyesine çıkarmıştır. Biyokonjuge CdS 50, 100 ve 200 µg/ml uygulamalarının ise ortalama CT değerini 29.88, 30.56, 31.44 seviyelerine ulaştırdığı tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen uygulamaların tamamı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) bulunmuştur.

CoS quantum dotu 1, 25 ve 50 µg/ml dozları ekspresyon CT değerini sırasıyla 30.69, 31.41 ve 30.15 seviyesine çıkarmıştır. Biyokonjuge CoS 50, 100 ve 200 µg/ml uygulamalarının ise ortalama CT değerini 30.99, 31.49, 31.20 seviyelerine ulaştırdığı tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen uygulamaların tamamı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) bulunmuştur.

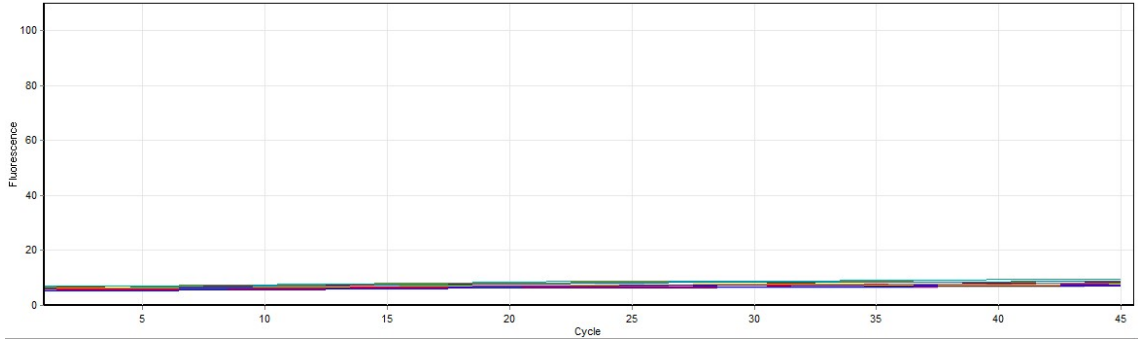
Ramelteon 1 mM, 500 ve 100 µM uygulama dozlarında ortalama CT değerleri sırasıyla 31.04, 31.45 ve 30.08 olarak bulunmuştur. Uygulanan Melatonin 1mM dozu ortalama CT değerini 31.63 seviyesine ulaştırırken, sisplatin bu değeri 30.62’ye ulaştırmıştır. Uygulaması gerçekleştirilen bu verilerin kontrolle kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) oldukları kaydedilmiştir.



Şekil 4.38. SH-SY5Y hücre hattı MTNR1A gen ekspresyon eğrisi

Nöroblastom hücre hattına ait RORA genine ait Real Time PCR ekspresyon eğrisi Şekil 4.39’da verilmiştir. Sirkadiyen ritimde yer alan bazı genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde etkin rol oynayan Ror alfa proteinini kodlayan RORA geninin nöroblastom hücre hattında kontrol grubunda 35.93 döngüde ekspresyon

verdiği gözlenmiştir. Uygulamalar sonrası tüm dozlarda RORA geni ekspresyonu tespit edilmemiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak belirlenmiştir.

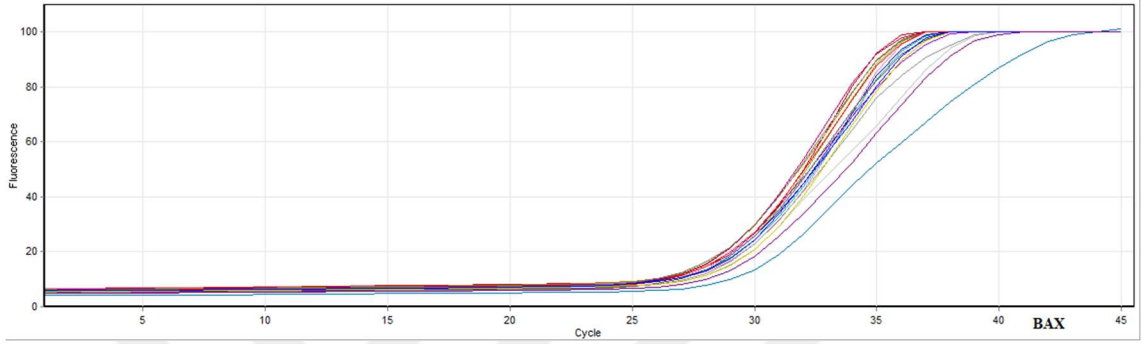


Şekil 4.39. SH-SY5Y hücre hattı RORA gen ekspresyon eğrisi

Nöroblastom hücre hattına ait BAX genine ait Real Time PCR ekspresyon eğrisi Şekil 4.40'ta verilmiştir. Proapoptotik bir gen olma özelliği ile hücrenin apoptoza ilerleyişinde önemli rol oynamakta olan BAX geni nöroblastom hücre hattında kontrol grubunda 32.25 döngüde ekspresyon vermiştir. Uygulanan quantum dot ve biyokonjuge quantum dot dozları akabinde BAX gen ekspresyon seviyelerinde değişimler olmuştur. CdS quantum dotu 1, 25 ve 50 $\mu\text{g/ml}$ dozları ekspresyon CT değerini sırasıyla 24.24, 23.83 ve 23.22 seviyesine ulaştırmıştır. Biyokonjuge CdS 50, 100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ doz uygulamaları sonrası CT değeri sırasıyla 23.48, 23.32 ve 24.38 olarak kaydedilmiştir. Elde edilen verilerin tamamı kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak bulunmuştur.

CoS quantum dotu 1, 25 ve 50 $\mu\text{g/ml}$ dozları ekspresyon CT değerini sırasıyla 24.44, 23.07 ve 23.23 seviyesine ulaştırmıştır. Biyokonjuge CoS 50, 100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ doz uygulamaları sonrası CT değeri sırasıyla 23.31, 23.63 ve 23.37 olarak kaydedilmiştir. Elde edilen verilerin tamamı kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak bulunmuştur.

Ramelteon 1 mM, 500 ve 100 μ M uygulama dozlarında ortalama CT değerleri sırasıyla 23.01, 23.38 ve 23.19 olarak bulunmuştur. Uygulanan Melatonin 1mM dozu ortalama CT değerini 24.16 seviyesine ulaştıırken, sispilin bu değeri 23.35'e ulaştırmıştır. Uygulaması geręekleştirilen bu verilerin kontrolle kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) oldukları kaydedilmiştir.



Şekil 4.40. SH-SY5Y hücre hattı BAX gen ekspresyon eğrisi

4.2.5.2. Prostat Kanseri (DU145) Hücre Hattı

Tablo 4.4. Quantum dot ve biyokonjuge uygulamaların DU145 real time PCR testi sonuçları. (* p≤0.05)

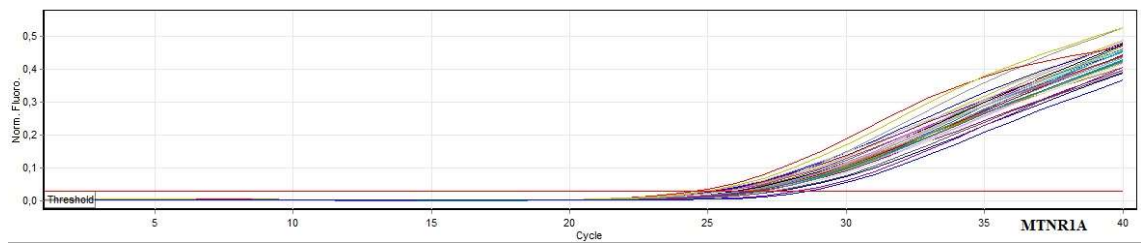
Uygulamalar	Ortalama CT Değerleri				Standart Sapma			
	ACTB	MTNR1 A	RORA	BAX	ACTB	MTN R1A	RORA	BAX
Kontrol	11.95	25.90	26.75	17.17	0.10	0.23	0.10	0.17
Ramelteon 100 uM	12.32	27.27**	0**	17.37	0.32	0.25	0.00	0.12
Ramelteon 500 uM	12.00	25.41**	0**	18.08**	0.01	0.25	0.00	0.08
Ramelteon 1mM	11.33	27.05**	0**	17.13	0.07	0.19	0.00	0.03
Melatonin 1mM	12.67	24.83**	0**	17.86**	0.06	0.15	0.00	0.06
CdS 1 ug/ml	11.80	25.32**	26.77	17.13	0.13	0.09	0.26	0.03
CdS 25 ug/ml	12.58	26.61**	26.79	18.1**	0.14	0.20	0.27	0.20
CdS 50 ug/ml	12.67	26.29*	27.49**	18.28**	0.06	0.06	0.46	0.16
Biyokonjuge CdS 50 ug/ml	12.80	25.91	27.79**	17.88**	0.04	0.14	0.20	0.06
Biyokonjuge CdS 100 ug/ml	12.22	26.18	27.60**	18.26**	0.41	0.04	0.25	0.14
Biyokonjuge CdS 200 ug/ml	13.09	26.56**	28.14**	18.18**	0.84	0.35	0.14	0.08
CoS 1 ug/ml	12.60	26.45**	28.22**	18.12**	0.48	0.00	0.30	0.03
CoS 25 ug/ml	13.01	26.32**	28.21**	18.41**	0.04	0.02	0.39	0.03
CoS 50 ug/ml	14.85	26.49**	28.08**	18.00	3.20	0.02	0.30	0.26
Biyokonjuge CoS 50 ug/ml	13.47	26.59**	28.53**	18.42**	0.60	0.11	0.05	0.21
Biyokonjuge CoS 100 ug/ml	13.14	26.74**	27.98**	18.42**	0.12	0.15	0.06	0.02
Biyokonjuge CoS 200 ug/ml	11.77	27.94**	0**	17.35	0.08	0.39	0.00	0.10

Prostat kanseri hücre hattına ait MTNR1A genine ait Real Time PCR ekspresyon eğrisi Şekil 4.41’de verilmiştir. Melatonin reseptörü 1a’yı kodlayan MTNR1A geninin DU145 hücre hattının kontrol grubunda ekspresyonu CT değeri 25.9 olarak belirlenmiştir. CdS quantum dotu 1, 25 ve 50 µg/ml dozları ekspresyon CT değerini

sırasıyla 25,32, 26,61 ve 26,29 seviyesine çıkarmıştır. Biyokonjuge CdS 50, 100 ve 200 µg/ml uygulamalarının ise ortalama CT değerini 26.29, 26.18, 26.56 seviyelerine ulaştırdığı tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen uygulamalardan CdS quantum dotu 1, 25 ve 50 µg/ml dozları ile biyokonjuge CdS 200 µg/ml dozu kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) bulunmuştur.

CoS quantum dotu 1, 25 ve 50 µg/ml dozları ekspresyon CT değerini sırasıyla 26.45, 26.32 ve 26.49 seviyesine çıkarmıştır. Biyokonjuge CoS 50, 100 ve 200 µg/ml uygulamalarının ise ortalama CT değerini 26.59, 26.74, 27.94 seviyelerine ulaştırdığı tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen uygulamaların tamamı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) bulunmuştur.

Ramelteon 1 mM, 500 ve 100 µM uygulama dozlarında ortalama CT değerleri sırasıyla 27.05, 25.41 ve 27.27 olarak bulunmuştur. Uygulanan Melatonin 1mM dozu ortalama CT değerini 24.83 seviyesine ulaştırmıştır. Uygulaması gerçekleştirilen bu verilerin kontrolle kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) oldukları kaydedilmiştir.



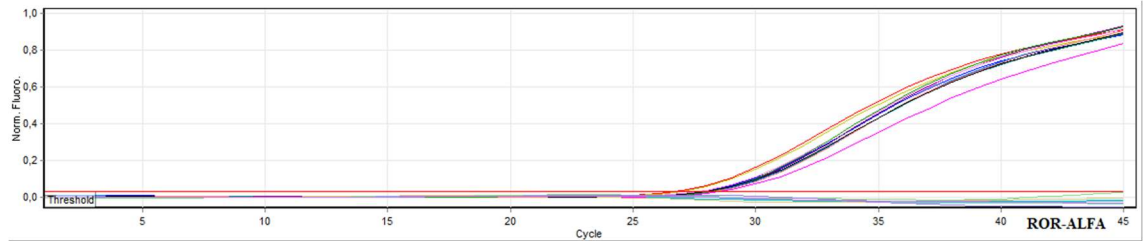
Şekil 4.41. DU145 hücre hattı MTNR1A gen ekspresyon eğrisi

Prostat kanseri hücre hattına ait RORA genine ait Real Time PCR ekspresyon eğrisi Şekil 4.42’de verilmiştir. Sirkadiyen ritimde yer alan bazı genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde etkin rol oynayan Ror alfa proteinini kodlayan RORA geninin DU145 hücre hattında kontrol grubunda 26.75 döngüde ekspresyon verdiği gözlenmiştir. CdS quantum dotu 1, 25 ve 50 µg/ml dozları ekspresyon CT

değerini sırasıyla 26.77, 26.79 ve 27.49 seviyesine ulaştırmıştır. Biyokonjuge CdS 50, 100 ve 200 µg/ml uygulamalarının ise ortalama CT değerini 27.79, 27.6, 28.14 seviyelerine ulaştırdığı tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen uygulamalardan CdS quantum dotu 50 µg/ml dozu ile biyokonjuge CdS uygulamalarının tüm dozları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) bulunmuştur.

CoS quantum dotu 1, 25 ve 50 µg/ml dozları ekspresyon CT değerini sırasıyla 28.22, 28.21 ve 28.08 seviyesine çıkarmıştır. Biyokonjuge CoS 50 ve 100 µg/ml uygulamalarının ise ortalama CT değerini 28.53 ve 27.98 seviyelerine ulaştırdığı tespit edilmiştir. Biyokonjuge CoS 200 µg/ml uygulaması sonrasında RORA geninde ekspresyon tespit edilmemiştir. Gerçekleştirilen uygulamaların tamamı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) bulunmuştur.

Ramelteon 1 mM, 500 ve 100 µM, Melatonin 1 mM uygulamalarının tamamında RORA gen ekspresyonu görülmemiştir. Uygulaması gerçekleştirilen bu verilerin kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) oldukları kaydedilmiştir.



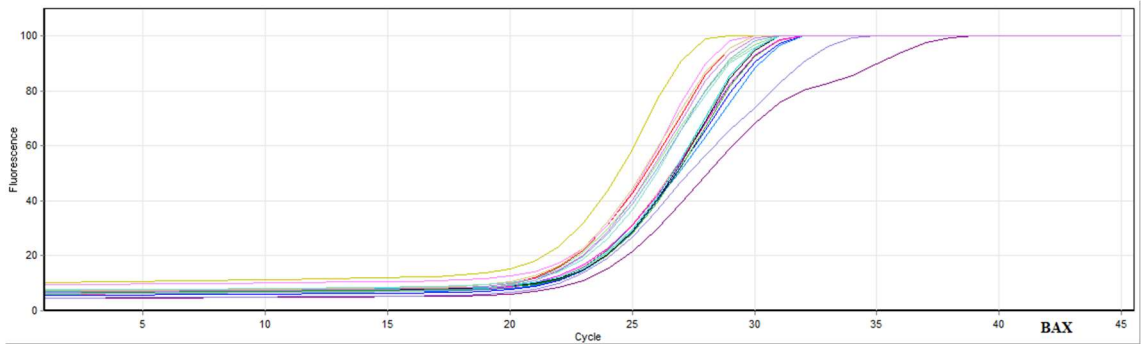
Şekil 4.42. DU145 hücre hattı RORA gen ekspresyon eğrisi

Prostat kanseri hücre hattına ait BAX genine ait Real Time PCR ekspresyon eğrisi Şekil 4.43'te verilmiştir. Proapoptotik bir gen olma özelliği ile hücrenin apoptoza ilerleyişinde önemli rol oynamakta olan BAX geni DU145 hücre hattında kontrol grubunda 17.17 döngüde ekspresyon vermiştir. Uygulanan quantum dot ve biyokonjuge quantum dot dozları akabinde BAX gen ekspresyon seviyelerinde değişimler olmuştur. CdS quantum dotu 1, 25 ve 50 µg/ml dozları ekspresyon CT değerini sırasıyla 17.13,

18.1 ve 18.28 seviyesine ulaştırmıştır. Biyokonjuge CdS 50, 100 ve 200 µg/ml doz uygulamaları sonrası CT değeri sırasıyla 17.88, 18.26 ve 18.18 olarak kaydedilmiştir. Elde edilen verilerin tamamı kontrol grubuyla kıyaslandığında CdS quantum dotu 1 µg/ml dozu hariç istatistiki olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak bulunmuştur.

CoS quantum dotu 1, 25 ve 50 µg/ml dozları ekspresyon CT değerini sırasıyla 18.12, 18.41 ve 18 seviyesine ulaştırmıştır. Biyokonjuge CoS 50, 100 ve 200 µg/ml doz uygulamaları sonrası CT değeri sırasıyla 18.42, 18.42 ve 17.35 olarak kaydedilmiştir. Elde edilen verilerin tamamı kontrol grubuyla kıyaslandığında CoS 50 µg/ml dozu ile biyokonjuge CoS 200 µg/ml dozu hariç olmak üzere istatistiki olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak bulunmuştur.

Ramelteon 1 mM, 500 ve 100 µM uygulama dozlarında ortalama CT değerleri sırasıyla 17.13, 18.08 ve 17.37 olarak bulunmuştur. Uygulanan Melatonin 1mM dozu ortalama CT değerini 17.86 seviyesine ulaştırmıştır. Uygulaması gerçekleştirilen bu verilerin kontrolle kıyaslandığında Ramelteon 1 mM ve 100 µM dozları hariç olmak üzere istatistiki olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) oldukları kaydedilmiştir.



şekil 4.43. DU145 hücre hattı BAX gen ekspresyon eğrisi

5. TARTIŞMA

Literatürde yeni ilaç geliştirmeye yönelik çalışmalarda sıklıkla kendisine yer bulan nanoteknolojide, düşük maliyetlerle, çevreye zarar vermeksizin ve toksik yan ürünlerin minimum seviyede olduğu sentez yöntemleri ile ilaç araştırma çalışmaları gerçekleştirmek oldukça önem arz etmektedir. Buna ek olarak, her ne kadar kemoterapötik ajanlarla tedavisi gerçekleştiriliyor olsa da, 21.yüzyılın en büyük sağlık sorunlarından biri haline gelmiş olan kansere yönelik spesifik bir tedavinin eksikliği duyumsanmaktadır. Bu doğrultuda bu tez çalışmasının ilk aşamasında doğa dostu bir yöntem olan yeşil sentez ile CdS ve CoS quantum dotlarının sentezi gerçekleştirilmiştir. İlaç araştırmalarında toksik materyal ilavesi oldukça düşük olan materyal eldesi son derece kıymetli olduğu için, bu tez çalışmasında hem yeşil sentezle sentezlenen quantum dotlar hem de bu sentez sonucunda elde edilen quantum dotların Ramelteon ilacı ile biyokojugasyon ürünlerinin araştırmaları gerçekleştirilmiştir.

Yeşil sentez ile sentezi gerçekleştirilen quantum dotların ve biyokonjuge nano yapıların, spektrofotometrik ölçümler neticesinde optik niteliklerinin belirlenmesi hedefiyle UV-spektrofotometre ile absorbans verileri elde edilmiştir. CdS ve CoS quantum dotların absorbans verileri sırasıyla 206 ve 204 nm olarak kaydedilmiştir. Literatürde sentezi gerçekleştirilen CdS ve CoS quantum dotların absorbans sergilediği dalga boylarının çeşitlilik gösterdiği görülmektedir. CdS quantum dotlarının 290 nm ile 467 nm aralığında değişen farklı absorbans değerleri sergilediği ^{99, 100}, CoS quantum dotlarının ise 252 ile 350 arasında değişen değerlerde absorbans verileri sergilediği belirlenmiştir.^{101, 102} Literatürde sözü edilen quantum dotlara dair absorbans verilerinde farklılık gözlenmesinin nedeninin, hem ilgili yapıların boyutlarındaki farklılıklarla hem de yeşil sentez, dolayısıyla da sentezde kullanılan yeşil materyalin farklılık arz etmesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Biyokonjuge nano yapıların her ikisi de

birbirlerine yakın bir biçimde, iki ayrı dalga boyunda absorbands sergilemiştir. PEG ile kaplanmış nano yapıların çoğunluğunda, UV spektrofotometre ile optik taramaların bir sonucu olarak iki farklı dalga boyunda absorbands gözlenmiştir.^{103, 104} Biyokonjugasyon reaksiyonu öncesinde elde edilen absorbands verileri ile sonrasında elde edilen verilerin farklı olması, biyokonjugasyon/pegilasyon reaksiyonlarının başarılı olduğunu düşündürmektedir. Reaksiyon sonrasında iki farklı absorbands piki görülmesi ise, PEG ile kaplanmamış biyokonjuge materyallerin de ikinci bir dalga boyunda absorbands sergilemiş olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında biyokonjugasyon reaksiyonunda kullanılan Ramelteon ilacının kalibrasyon eğrisi de elde edilmiştir. Bu eğrinin elde edilmesinin amacı; biyokonjuge ilaç formlarının salım profilleri belirlenirken, salımı gerçekleşen serbest ilaç miktarının mg olarak hesaplanmasını sağlamaktır. Buna ek olarak, biyokonjuge CdS ve CoS nano materyallerinin salım profilleri de elde edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen hücre kültürü uygulamalarının süresince, yani ilk 24 saatte ilacın sırasıyla %25.96'sı ile %30.6'sı salınmıştır. 96 saatlik sürenin sonunda, ise her iki ilacın da $\frac{3}{4}$ 'lük kısmının (sırasıyla %74.5 ile %88.78) salındığı görülmektedir. Bu durum Ramelteonun plazmada temel seviyeye ulaşmak adına ihtiyaç duyduğu bir haftalık süreyle uyumlu bir salım profili sergilendiğini ortaya koymaktadır.¹⁰⁵

Dört ayrı nano materyalin yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir. Hem CdS hem de CoS quantum dotlarının boyutları 100 nm'nin altında olarak tespit edilmiştir. Elde edilen görüntülerden tespit edilen yüzey morfolojileri literatürde farklı araştırmacılar tarafından elde edilen görüntülerle uyumlu nitelik arz etmektedir.^{94, 106, 107} Buna ek olarak CdS ve CoS quantum dotlarının PEG ile kaplanmış biyokonjuge formlarının da 100 nm altında boyut sergilediği, aynı zamanda

literatürde birebir aynısı olmasa dahi benzer nitelikler taşıyan çalışmalarda elde edilen SEM görüntüleri ile uyumlu görsellere sahip olduğu kaydedilmiştir.^{107, 108}

Yeşil sentez ile elde edilen CdS ve CoS quantum dotlarının her ikisi de geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülenmiştir. Elde edilen görüntülerde iki quantum dotun da şekil, boyut ve formasyon bakımından nanoteknolojik sınırlar içerisinde yer alan yapılar olduğu tespit edilmiştir. Hem CdS hem de CoS quantum dotlarının literatürde farklı araştırmacılar tarafından elde edilen TEM görüntülerine benzer görüntüleri elde edilmiştir.¹⁰⁹⁻¹¹² PEG ile kaplanmış biyokojuge quantum dotların TEM görüntülerinin, hem boyut hem de şekil bakımından nanoteknolojik sınırlar içerisinde olduğu düşünülmektedir. PEG ile kaplanmış biyokojuge materyaller barındıran CdS ve CoS quantum dotlarına dair benzer literatür çalışmalar son derece az olmasına rağmen, elde edilen veriler az sayıdaki literatür çalışmalarıyla bütünlük arz etmektedir.^{113, 114}

Hem yeşil sentez ile elde edilmiş hem de biyokonjugasyon reaksiyonundan elde edilmiş nano materyallerin içeriklerinde yer alan bağ oluşumlarını, fonksiyonel gruplarını tespit etmek amacıyla Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrofotometresi (FT-IR) ile analizler gerçekleştirilmiştir. CdS quantum dotlarının FTIR spektrumunda 3350, 2950, 1590, 1400, 1090 ve 970 cm^{-1} dalga boylarında spektrumlar görülmüştür. Elde edilen pikler, spektrumda gözlenen frekans dalgalanmaları ve bu spektrumların işaret ettiği fonksiyonel gruplar saf CdS quantum dotu içeren bir ürün elde edildiğini ortaya koymaktadır.^{115, 116} Yeşil sentez ile elde edilmiş CoS quantum dotlarının ise 3327, 1635, 1132, 881 ve 611 cm^{-1} dalga boylarında salınım gösterdiği kaydedilmiştir. Spektrumda gözlenen frekans dalgalanmaları ve keskin pikler sentezi gerçekleştirilen ilgili quantum dotun saf bir CoS nano yapısı olduğunu ortaya koymaktadır. Literatürde farklı araştırmacılar tarafından ortaya koyulan bulgular da elde edilen sonucun netliğini kanıtlar niteliktedir.^{117, 118} Hem biyokonjuge CdS hem de biyokonjuge CoS nano

yapılarının FTIR spektrumlarında 3529, 2897, 1643 ve 1114 cm^{-1} dalga boyları civarlarında keskin pikler gözlenmiştir. Elde edilen her iki spektrumda da PEG-2000 yapısının ağırlıklı bir biçimde kendisini gösterdiği görülmektedir. PEG, PLGA gibi polimerlerin içerisinde yoğun bir biçimde yer alan ester grupları ile bu polimerlerin karakteristik absorpsiyon bantları olarak görülen hidroksil gruplarına ait salınımların varlığı, biyokonjuge yapıların başarılı bir biçimde PEG ile kaplandığını ortaya koymaktadır.¹¹⁹⁻¹²¹

Sentezi gerçekleştirilen quantum dotlar ile biyokonjuge nano yapıların kristal formlarını belirlemek adına X ışını kristalografisinden (XRD) faydalanılmıştır. Elde edilen CdS quantum dotunun sergilediği düzlem verileri göz önünde bulundurulduğunda, CdS quantum dotlarının hekzagonal kristal yapısına sahip olduğu anlaşılmaktadır. Buna ek olarak gözlemlenen pikler, CdS quantum dotlarının partikül boyutlarının da nano aralıkta olduğunu ortaya koymaktadır.^{122, 123} CoS quantum dotlarının ise XRD verilerinden iki farklı kristal yapının karışımı halinde olduğu anlaşılmaktadır. Bu nano yapılar içerisinde hem hekzagonal CoS quantum dotlarını görmenin hem de yüzey merkezli kübik nano CoS yapılarını gözlemlemenin mümkün olduğu düşünülmektedir. Literatürde gerçekleştirilen farklı çalışmalar da elde edilen bulguları destekler niteliktedir.^{124, 125} Biyokonjuge CdS nano yapısının kristal formuna dair veriler incelendiğinde, son ürünün CdS quantum dotlarının kristal formuyla tutarlı hekzagonal bir kristal form halinde olduğu tespit edilmiştir. Güçlü ve yüksek yoğunluktaki pikler, ilgili materyalin iyi kristalize olduğunu ortaya koymaktadır.¹¹⁴ Biyokonjuge CoS nano yapılarının kristal formlarına dair verilere bakıldığında ise, hem CoS quantum dotlarının kristal yapılarına dair belirtiler hem de PEG yapısına dair kristal düzlemleri belirten açılar gözlenmektedir. Daha önce literatürde benzeri bir çalışma gerçekleştirilmediği için bu biyokonjuge quantum dota dair tam bir kıyaslama

gerçekleştirilememektedir.¹²⁶

Yeşil sentezle sentezlenen quantum dotlar ve bu quantum dotların Ramelteon ilacı ile konjuge formlarının pegilasyonu neticesinde elde edilen biyokonjuge quantum dotların hücre kültüründe *in vitro* uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasının ikinci kısmında bu sebeple nöroblastom, prostat ve kolon kanseri hücre hatları üzerinde hem CdS ve CoS quantum dotlarının hem de Ramelteon biyokonjuge edilmiş dotların etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda kanser hatları üzerinde gerçekleştirilen uygulamalar sonrasında MTT hücre canlılık testi, flow sitometri, total antioksidan/oksidan testler (TAK/TOD), real time PCR ile ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. MTT ve flow sitometri analizleri, gerçekleştirilen biyokonjugat ve quantum dot uygulamalarının hücre canlılığına etkisi ile apoptoz/nekroz oranlarının belirlenmesi hedefiyle gerçekleştirilmiştir. Total antioksidan/oksidan testlerin (TAK/TOD) bu çalışma kapsamında gerçekleştirilmesinin sebebi, biyokonjugat ve quantum dot uygulamalarının oksidatif ve antioksidatif etkilerinin tespit edilmesinin sağlanmasıdır. Antioksidan bir hormon olduğu bilinen melatonin ve agonisti Ramelteonun, antioksidan etkinliğini doğrulamak, oksidatif profillerini belirlemek bu testlerin gerçekleştirilmesinin hedefleri arasındadır. Real time PCR ile biyokonjugat ve quantum dot uygulamalarının ilgili kanser hücrelerinin gen ekspresyon profillerinde oluşturduğu değişikliği görmek hedeflenmektedir. Özellikle melatoninin etki mekanizmalarında rol oynayan reseptörlerin ekspresyon seviyelerindeki değişikliğin ortaya koyulması ile melatonin reseptörleri ve kanser arasında muhtemel bir ilişki kurulabileceği düşünülmektedir.

Tüm uygulamalarda hem quantum dotlar hem PEG ile kaplanmış biyokojuge quantum dot formülasyonları hem de tek başına Ramelteon ilacı 3 farklı doz halinde 8 tekrerr ile test edilmiştir. Nöroblastom kanseri hücre hattında 24 saatlik uygulama

sonucunda gerçekleştirilen MTT testi sonucuna göre, biyokonjuge CoS uygulamaları kanser hattının klinik tedavisinde yer alan sisplatinden dahi daha etkili sonuçlar ortaya koymuştur. CoS quantum dotları ve biyokonjuge formlarının, CdS quantum dot ve biyokonjuge formlarından daha başarılı sonuçlar ortaya koyduğu görülmektedir. Test edilen tüm uygulamaların istatistiksel olarak önem arz ettiği görülmektedir. CdS quantum dot uygulamaları ile biyokonjuge formlar arasında hücre canlılığına etki bakımından dikkat çeken bir farklılık gözlenmezken, biyokonjuge CoS quantum dotlarının CoS quantum dotlarına ve tüm CdS nano uygulamalarına kıyasla daha etkili sonuçlar ortaya koyduğu görülmektedir. Uygulamaların hemen hepsi doza bağımlı bir biçimde hücre canlılığında artış veya azalmaya sebep olmuştur. Hücre canlılığı en etkili şekilde azaltan uygulamanın %46.7 oranı ile biyokonjuge CoS uygulamasının 50 µg/ml dozu olduğu kaydedilmiştir. CoS nanopartiküllerinin gerçekleştirilen literatür verileri de bu çalışmanın literatürle benzer kısımlarını destekler niteliktedir.⁹⁴ Biyokonjuge CoS nano yapılarına en yakın etki Ramelteon ilacının en yüksek dozu olan 1 mM uygulamasında görülmektedir. PEG ile kaplanmış biyokonjuge uygulamalarda daha etkili sonucun görülmesinin, etkili olan CoS quantum dotlarının ilaç ve PEG ile etkisinin artmış olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Test edilen CdS ve CoS quantum dot ve biyokonjuge nano yapıların DU145 prostat kanseri hücre hattının canlılığı üzerindeki etkileri 24 saat sonunda MTT testi ile belirlenmiştir. Test sonucuna göre uygulamaların etkilerin büyük çoğunluğunun doza bağımlı bir biçimde elde edildiği kaydedilmiştir. Buna ek olarak yine aynı şekilde uygulamaların hepsinin kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak önem arz eden sonuçlar ortaya koyduğu görülmektedir. Nöroblastom hücre hattıyla paralel bir biçimde DU145 hücre hattında da CoS quantum dotu ve biyokonjuge formlarının daha etkili sonuçlar ortaya koyduğu belirlenmiştir. En etkili sonucu CoS quantum dotunun 50

$\mu\text{g/ml}$ uygulama dozu ortaya koymuştur. Ancak CoS quantum dotları ile biyokonjuge formlarının en etkili doza yakın sonuçlar ortaya koyduğu g r lm ştur. Sentezlenen quantum dotlar ile biyokonjuge uygulamaların genel anlamda melatonin ve Ramelteon ilacından etkili olduklarını söylemek mümkündür. Literatürde DU145 prostat kanseri hücre hattında ilgili quantum dotlarla gerçekleştirilen herhangi bir çalışma mevcut değildir.

CdS ve CoS quantum dotları ile bunların biyokonjuge formlarının 24 saatlik uygulaması neticesinde hücre canlılığının MTT ile test edildiği bir diğer hücre hattı HT-29 kolon kanseri hücre hattı olmuştur. Bu hücre hattında, diğer iki hücre hattının aksine CdS quantum dotları ve biyokonjuge nano yapılarının daha etkin sonuçlar sergilediği g r lm ştur. En etkili sonucu CdS quantum dotunun $50 \mu\text{g/ml}$ doz uygulaması ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçların büyük çoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, CdS quantum dotlarına kıyasla biyokonjuge yapıların genel anlamda daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu hücre hattında CdS nano yapısıyla ilişkili tüm uygulamalara en yakın sonuçları Ramelteon ilacına ait uygulamalar sergilemiştir. Ramelteon ilacı en yüksek dozu olan 1 mM dozunda, en etkili hücre canlılığı etkisine ulaşmıştır. Biyokonjuge CdS uygulamalarının ise daha düşük miktarda Ramelteon ilacı ile birlikte benzer başarıya ulaştığı görülmektedir. Bunun quantum dotların sahip olduğu küçük boyutlar ve PEG ile kaplamanın hücreye giriş için sağladıkları kolaylıkla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

 ikinci kısmında CdS ve CoS quantum dotların ve biyokonjuge nano formlarının kanser hücre hatları üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bu tez çalışmasında, tüm uygulamaların kanser hatlarındaki total antioksidan etkinliği total antioksidan kapasite (TAK) testi ile incelenmiştir. TAK testinin gerçekleştirildiği tüm hücre hatlarında, ilgili uygulamaların tamamının total antioksidan etkinlikleri genel anlamda kontrole yakın

değerlerde seyretmiştir. Elde edilen sonuçların hiçbirisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0.05$). Elde edilen TAS verileri literatürde nöroblastom hücre hattında gerçekleştirilen bir başka çalışma ile de benzerlik göstermektedir.⁹⁴

CdS ve CoS quantum dotları ve bu nano dotlardan elde edilen biyokonjuge nano materyallerle gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda, ilgili nano materyallerin kanser hücre hatları üzerinde total oksidan etkinlikleri total oksidan durum (TOD) testi ile araştırılmıştır. Uygulamalardan 24 saat sonra gerçekleştirilen TOD testi sonuçları incelendiğinde nöroblastom hücre hattında en yüksek oksidan etkinliği sergileyen uygulamanın CdS 25 µg/ml dozu olduğu kaydedilmiştir. Bu uygulamanın kontrole kıyasla iki kattan fazla oksidan etki gösterdiği görülmüştür. Genel olarak bu parametre sonuçları incelendiğinde gerçekleştirilen uygulamaların neredeyse tamamının kontrol grubundan daha fazla olacak şekilde oksidan etki oluşturduğu tespit edilmiştir. Total oksidan durum testi bir molekülün hücrede reaktif oksidan türlerinin oluşumuna etkisini, reaktif oksijen türlerinin oluşum seviyesini belirleyen bir testtir. Bu doğrultuda gerçekleştirilen TOS testi, nöroblastom kanser hattında hücre içeriğindeki reaktif oksijen türlerinin normalden fazla bir yoğunluğa eriştiğini ortaya koymaktadır. CdS 25 µg/ml dozundan sonra en etkin oksidatif stres oluşumunu indükleyen uygulamanın sisplatin uygulaması olduğu belirlenmiştir. Alkilleyici bir ajan olan sisplatinin DNA hasarı oluşturduğu süreçte oksidatif stres oluşturduğu, apoptozu indüklediği ve hatta sisplatinin oksidatif stres oluşturmak adına indükleyici bir ajan olarak kullanıldığı bilinmektedir.¹²⁷⁻¹²⁹ Bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda etkisi incelenen nano materyallerin, hangi etki ile hücrelerin ölümüne sebep olduğu bilinmemesine rağmen, oksidatif stresi artıracak bir mekanizmayı indüklediği aşikar görünmektedir.

24 saat süreyle uygulaması yapılan nano materyallerin prostat hücre hattı üzerinde oksidan etkilerinin incelendiği TOS testi sonuçlarına göre, kontrol grubuna

kıyasla en yüksek oksidan etkiyi sergileyen uygulama melatonin 1mM uygulaması olmuştur. Genel anlamda prostat kanseri hücre hattı üzerinde elde edilen verilerde uygulamaların kontrol grubuna yakın veya daha az oksidan etkinliğe sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda sentezlenen nano materyallerin genel anlamda prostat kanseri hücre hattı olan DU145 üzerinde kontrole kıyasla oksidatif etkisi olmadığı düşünülmektedir. İlgili nano materyallerin hücre canlılığına oksidatif etki ile değil, daha farklı mekanizmal yollar ile etki edebileceği ihtimal dahilinde görülmektedir. Kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin artışı kanser hücrelerinin çoğalmasını, metastazını, agresifliğini artıran bir parametre olarak değerlendirildiği gibi, aynı zamanda apoptoz sürecinin süregeldiğine dair bir belirteç olarak da görülebilmektedir.¹³⁰ Bu doğrultuda, uygulanan nano materyallerin prostat kanseri DU145 hattı hücrelerinde hücrelerin proliferasyonunu teşvik etmediğini söylenebilmektedir.

HT-29 kolon kanseri hücre hattında uygulaması yapılan nano materyallerin 24 saatlik uygulama sonucunda total oksidan durum testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, kontrole kıyaslandığında en yüksek oksidan etkiyi sergileyen uygulamanın biyokonjuge CdS 100 µg/ml olduğu kaydedilmiştir. Genel anlamda uygulamaların büyük çoğunluğunun total oksidan seviyelerinin kolon kanseri hücre hattında kontrol grubundan daha düşük seviyelerde kaldığı kaydedilmiştir. Melatonin ve agonistlerinin kolon kanseri hücre hatlarında antiproliferatif etkisinin mekanizmaları tam anlaşılmamış olsa da, bu etkisinin melatonin reseptörleri 1 ve 2, nükleer reseptör ROR-α üzerinden gerçekleştiği bilinmektedir.⁹³ Uygulanan nano materyallerin de melatonin gibi oksidatif stresi indüklemediği, farklı yollar ile hücre ölümüne sebep olduğu ihtimali göz önünde bulundurulmaktadır. Nanopartikül yapılarının ilgili hücre hattında antiproliferatif etkilerinin Poli-ADP-riboz polimeraz (PARP) enzimi üzerinden

gerçekleşiyor olabileceği öne sürülmüştür.¹³¹ Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen uygulamaların PARP enzimine yönelik bir etkiye sahip olup olmadıkları bilinmemekle birlikte, ileride gerçekleştirilecek çalışmalar için ihtiyaç duyulacak temel verileri sağladığı düşünülmektedir.

CdS ve CoS nano materyalleri içeren uygulamaların hücre hatları üzerindeki etkilerini araştırma amacıyla gerçekleştirilen bir diğer test flow sitometridir. Flow sitometri ile hücrelerin apoptoz, nekroz hücresel ölüm biçimlerine yönelimlerinin oranları belirlenmiştir. Gerçekleştirilen uygulamaların 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda nöroblastom hücre hattında belirlenen apoptoz, nekroz oranları incelendiğinde, en başarılı uygulamanın hücre canlılığını % 60.01'e düşüren Ramelteon 500 µM uygulaması olduğu görülmüştür. Melatonin ve agonistlerinin antioksidan etkinliği dolayısıyla hücreleri oksidatif stresten koruduğu ve dolayısıyla apoptoz yollarına yönelimi de azalttığına dair bulgular mevcuttur.¹³² Ancak bu uygulamalarda melatonin ve agonistleri hücreleri neredeyse sisplatine benzer oranlarda apoptozise sürüklemiştir. Buna ek olarak nano materyallerin hücre canlılığına etkilerinin son derece yetersiz olduğu görülmüştür. Bu durumun birkaç şekilde izah edilebilir olduğu düşünülmektedir: Uygulanan nano materyallerin yeterli ölçüde çözünmesinin sağlanmamış olması, salınan ilaç miktarının hücre canlılığına etki edebilecek seviye için yeterli olmaması. Genel olarak uygulanan tüm materyal ve ilaçların kontrol grubuna benzer nekroz oranları sergilediği görülmektedir. Tüm uygulamaların az veya çok, bir şekilde nekrozisten ziyade apoptozis ile hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. MTT ile oldukça farklılık arz eden hücre canlılığına dair veriler, testlerin güvenilirliğine gölge düşürmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında sentezi gerçekleştirilmiş nano materyallerin tamamı, 24 saat inkübasyon süresi boyunca DU145 hücre hattı üzerinde test edilmiş ve süre sonunda hücrelerin apoptozis, nekrozis oranlarını belirleyebilmek adına flow

sitometri testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgulara DU145 hücre hattı üzerinde test edilen nano materyaller ile Ramelteon, melatonin ilaçlarının tamamının kontrol grubuna yakın değerlerde sonuçlar ortaya koyduğu görülmektedir. Literatürde DU145 hattında uygulanan melatonin maddesinin MTT testi sonucunda antiproliferatif etki sergilediği görülmüştür.¹³³ Bu tez çalışmasında elde edilen verilerde melatonin ve agonistinin kontrol grubuna oldukça yakın değerler sergilediği görülmektedir. Bu durum ve MTT testi ile aralarında gözlenen tutarsızlıklar testin doğruluğundan şüphe etmeye sebep olmaktadır. Testin doğruluğuna dair ortaya çıkan şüphelerin yanında, nano yapıların etkisizliğine dair açıklamalar yine nöroblastom hücre hattında ifade edildiği şekildedir.

Uygulanan nano materyaller ile melatonin ve agostinin gen ekspresyon seviyesinde hücre hatları üzerindeki etkilerini görüntüleyebilmek adına real time PCR çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda melatonin reseptörü 1A, nükleer reseptör alfa (ROR α) ve proapoptotik bir protein olan BAX'ın mRNA seviyesinde değişimleri ölçülmüştür. Nöroblastom hücre hattında gerçekleştirilen real time PCR ekspresyon analizleri neticesinde melatonin reseptörü 1A (MTNR1A) gen ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. SH-SY5Y hücre hattında normal şartlarda, hiçbir uygulama yapılmamış hücrelerde MTNR1A geninin ekspresyonunun mevcut olmadığı belirlenmiştir. Ancak 24 saat süreyle gerçekleştirilen uygulamalar neticesinde, tüm gruplarda ilgili genin ekspresyonu tespit edilmiştir. Elde edilen tüm ekspresyon verilerinin çok anlamlı olduğu bu analizde, melatonin reseptörü 1A geninin tüm gruplarda upregüle olduğu görülmektedir. Bu durum melatonin reseptörü 1A'ya daha fazla oranda ihtiyaç duyulduğu, ortamda ilgili ligandın eksikliğinin hissedildiği anlamına gelmektedir.¹³⁴ Nano materyallerin test edildiği uygulamalarda melatonin ve agonistinin ilgili reseptörü kullanmaksızın, küçük boyutlu yapılarla birlikte olmanın avantajlarından faydalanarak

ve farklı yollar kullanarak hücre içerisine girdiği; bu sebeple de reseptörün ilgili liganda ulaşamadığı sonuçları çıkarılabilmektedir. Daha düşük dozlarda melatonin uygulaması yapılmış nöroblastom hücre hattında yine benzer şekilde MTNR1A ekspresyonunun görüldüğü kaydedilmiştir.¹³⁵ Gruplar arasında ciddi seviyede farklılıklar olmadığı en yüksek ekspresyon seviyesinin ise biyokonjuge CdS 50 µg/ml uygulamasında elde edildiği görülmüştür.

Nöroblastom hücre hattında ekspresyon seviyesi araştırılan bir diğer gen, nükleer reseptör alfa (RORA) olarak belirlenmiştir. Melatoninin orphan nükleer retinoid gen ailesinden olan RORA için bir ligand olduğu bilinmektedir.¹³⁶ Otizm ile ilişkili olabilecek bir gen olduğu düşünülen RORA'nın, normalde nöroblastom hücre hattında ekspresyonu görülmekte olan bir gen olduğu bilgisi literatürde mevcuttur.¹³⁷ Bu tez çalışması kapsamında da ilgili genin ekspresyonunun az da olsa mevcut olduğu söylenebilmektedir. Uygulaması gerçekleştirilen hem nano materyaller hem de melatonin ve agonisti ilaçların ardından, ilgili genin eksprese edilmediği kaydedilmiştir. Benzer veriler melatonin uygulaması gerçekleştirilen meme kanseri hücre hattında da gözlenmiştir.¹³⁸ Gruplar arasında bir farklılık gözlenmeksizin bulunan tüm sonuçlar istatistiksel olarak çok anlamlı olduğu belirlenmiştir.

Nöroblastom hücre hattında gen ekspresyon seviyesi incelenen bir diğer gen ailesi BAX olmuştur. 24 saatlik uygulamaların ardından tüm gruplarda ilgili genin ekspresyon seviyesi, kontrol grubuna göre artış kaydetmiştir. Elde edilen tüm verilerin istatistiksel olarak çok anlamlı olarak bulunduğu bu gen ekspresyon analizinde, proapoptotik bir gen olduğu bilinen BAX'ın ekspresyon artışının, apoptozun indüklenmesine yönelik bir işaret olduğu düşünülmektedir. Literatürde sitotoksik ajanlara karşı koruyucu etkisinin belirlenmesi adına toksik ajanlarla birlikte verildiğinde, melatoninin BAX'ın ekspresyon seviyesini düşürdüğü, hücreye yönelik

koruyucu etki sergilediği görülmektedir.^{139, 140} Toksik ajan olmaksızın daha düşük dozlarda uygulaması gerçekleştirildiğinde ise hücredeki ekspresyon seviyesinde bir değişiklik yaratmadığı belirlenmiştir.¹⁴¹ Bu tez çalışmasında ise kemoterapötik bir ajan olarak test edilmesi hedeflenen melatonin ve agonisti ilacın, uygulanan nano materyallerle birlikte antikanser etki sergilemek suretiyle apoptozu indükleyecek BAX proteininin ekspresyon seviyesinde artışa sebep olduğu görülmektedir.

Nano materyaller ile melatonin/agonist ilaçların uygulaması ardından melatonin reseptörü 1A, nükleer reseptör alfa ve BAX ekspresyon seviyelerinin incelendiği bir diğer hücre hattı DU145 prostat kanseri hücre hattı olmuştur. Bu hücre hattında gerçekleştirilen uygulamanın 24.saati sonunda, gen ekspresyon seviyelerinin tespiti için mRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Uygulamaların ardından DU145 hücre hattında ekspresyon seviyesi incelenen ilk gen melatonin reseptörü 1A geni (MTNR1A) olmuştur. İlgili genin prostat kanser hattında eksprese olduğu literaür verileriyle de desteklenmektedir.¹⁴² Uygulanan hem nano materyaller hem de melatonin/agonist ilaçlar ilgili genin ekspresyonunu az da azalmasına sebep olmuştur. İlgili genin ekspresyon bazında downregüle olması, ilgili liganda erişiminin nispeten kolaylaştığını ortaya koymaktadır. Elde edilen verilerin büyük çoğunluğu istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$).

DU145 hücre hattında 24 saatlik uygulamaların ardından ekspresyon seviyesi incelenen bir diğer gen nükleer reseptör alfa olarak ifade edilen RORA genidir. Bu genin immün sistemden, sirkadiyen ritmin düzenlenmesine kadar pek çok mekanizmada rol sahibi olduğu bilinmektedir.^{143, 144} Buna ek olarak RORA geninin standart bir biçimde DU145 prostat kanseri hücrelerinde eksprese edildiği bilgisi literatürde mevcuttur.¹⁴⁵ Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen uygulamaların ardından, RORA gen ekspresyon seviyelerinde değişiklikler kaydedilmiştir. CdS qaantum dotu ve

biyokonjuge formlarında gen ekspresyon seviyesi kontrole (26,75) kıyasla ya çok az miktarda azalmış ya da değişmeden kalmıştır. Ancak CoS quantum dotlarında ekspresyon seviyesi kontrole kıyasla nispeten azalmış, hatta biyokonjuge CoS uygulamasının en yüksek dozu olan 200 µg/ml uygulamasında bu ekspresyonun tamamen sonlandığı verisi elde edilmiştir. Elde edilen bu bulgular istatistiksel olarak çok anlamlı olarak kaydedilmiştir. CoS uygulamalarının biyokonjuge CdS uygulamalarının en yüksek dozunda olduğu gibi ekspresyon seviyesini CT değeri bakımından 28 bandına çektiği görülmektedir. En yüksek biyokonjuge CoS uygulama dozunda ekspresyon verisinin elde edilememesinin nedeni olarak; nispeten yüksek Ramelteon içeriği ile birlikte CoS quantum dotunun etkisinin kombine bir sonuca erişmiş olabileceği ihtimali düşünülmektedir. Çünkü uygulamalar içerisinde yer alan Ramelteon dozları ile melatonin uygulamalarında da ilgili genin ekspresyonu tespit edilememiştir. Bu durumda melatonin ve benzeri ilaçların, kullanılan dozlarda RORA gen ekspresyonunu baskıladığı söylenebilmektedir. Daha önce literatürde benzer bir çalışma olmaması sebebiyle ilgili veriyi destekleyecek bir literatür bulgusu bulunmamaktadır. Bu durum, ilgili tez çalışmasının literatüre yeni verilerin kazandırılmasında etkin olduğu ortaya koymaktadır.

DU145 hücre hattında uygulaması gerçekleştirilen nano materyaller ile melatonin ve benzeri ilacın etkinliğini tespit etmek amacıyla ekspresyon seviyesi incelenen bir diğer gen proapoptotik protein sentezinde rol oynayan BAX genidir. 24 saatlik uygulamalar neticesinde kontrol grubuna kıyasla BAX gen ekspresyonunda oldukça ufak değişimler meydana gelmiştir. Gen ekspresyon seviyesini ortalama 1 CT değeri seviyesinde azaltan uygulamaların genel olarak apoptoza ciddi bir etkisinin olduğu düşünülmemektedir. Normalde BAX geninin ilgili hücre hattında eksprese edildiği literatürde daha önce yayınlanmış verilerde de görülmüştür. ¹⁴⁶ Ancak bu tez

alışması kapsamında uygulaması gerçekleştirilen tüm nano materyaller ile birlikte melatonin ve Ramelteonun ilgili hücre hattında test edildiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu tez çalışmasında kapsamında gerçekleştirilen karakterizasyon yöntemleri ile CdS ve CoS quantum dotlarının doğru bir biçimde, literatür örneklerine benzer nitelikte sentezlendiği, biyokonjugasyon neticesinde elde edilen yapıların da hedeflenen ürünler olduğu tespit edilmiştir.
- MTT sonuçlarına göre nöroblastom hücre hattında en etkin uygulamalar; Ramelteon ilacı biyokonjuge edilmiş CoS uygulamaları, prostat kanser hattında da benzer şekilde CoS quantum dotları ile Ramelteon biyokonjuge edilmiş CoS dozlarını içeren uygulamalar, kolon kanseri hattında ise CdS quantum dotlarının Ramelteonla benzer biçimde etkin sonuçlar ortaya koyduğu belirlenmiştir.
- Tüm uygulamaların tüm hücre hatlarında dikkat çekici bir antioksidan etkinliği olmadığı görülmüştür.
- Oksidan etkinlik bazında, SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında CdS quantum dotlarının, DU145 prostat hücre hattında melatonin, HT-29 kolon kanseri hücre hattında ise biyokonjuge CdS uygulamalarının oksidatif etkinliklerinin kontrole kıyasla yüksek olduğu saptanmıştır.
- Flow sitometri ile gerçekleştirilen apoptoz analizinde nöroblastom hücre hattında en etkili sonucun melatonin, Ramelteon dozları ile PBS kontrol uygulamalarında olduğu, prostat kanseri hücre hattında ise uygulamalar arasında apoptozis ile ilişkili bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.
- Real time PCR ile mRNA seviyesi bazında nöroblastom hücre hattında uygulamaların melatonin reseptör 1A geninin ekspresyonunu artırdığı, ROR-alfa gen ekspresyonunu azalttığı, apoptoz proteini salgılayan BAX geninin ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir.
- Real time PCR ile mRNA seviyesi bazında prostat kanseri hücre hattında

uygulamaların melatonin reseptör 1A geninin ekspresyonunu kontrole kıyasla az miktarda azalttığı, ROR-alfa gen ekspresyonunun bazı uygulamalarda tamamen baskılanmasına neden olduğu, apoptoz proteini salgılayan BAX geninin ekspresyonunu ise nispi bir düşüşle çok değiştirmedeği belirlenmiştir.

- Sonuç olarak tüm bulgular göz önüne alındığında uygulanan nano materyallerin antiproliferatif etkinlik bakımından nöroblastom hücre hattında daha etkin sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.
- Diğer hücre hatlarında daha etkin sonuçlar görülebilmesi adına, ileriki çalışmalarda biyokonjuge sistemlerin salım profillerinin optimize edilmesi, bu doğrultuda aktif bir tetikleyici unsurla çalışılması önerilmektedir.
- Uygulanan hücre canlılık verilerinin geliştirilebilmesi adına, hücre canlılığı kaydını eş zamanlı olarak tespit edebilecek bir sistemle çalışmanın ileriye taşınması önerilmektedir.
- Farklı hücre hatları ve ileri testlerle eldeki materyallerin daha ayrıntılı ve kapsamlı araştırılmasının devamı önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Boyle P, Levin B, International Agency for Research on C. *World cancer report 2008*. Baskı. Lyon, IARC Press, 2008.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60: 277-300.
3. Liu SQ, Wiradharma N, Gao SJ, Tong YW, Yang YY. Bio-functional micelles self-assembled from a folate-conjugated block copolymer for targeted intracellular delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 2007, 28: 1423-1433.
4. Park EK, Kim SY, Lee SB, Lee YM. Folate-conjugated methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *J Control Release*, 2005, 109: 158-168.
5. Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today*, 2003, 8: 1112-1120.
6. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine*, 2007, 3: 20-31.
7. Pal D, Nayak A. Nanotechnology for targeted delivery in cancer therapeutics. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2010, 1: 1-7.
8. Sumer B, Gao J. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine (Lond)* 3:137-140. *Nanomedicine (London, England)*, 2008, 3: 137-140.
9. Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro endocrinology letters*, 2001, 22: 45-47.
10. Ravindra T, Lakshmi NK, Ahuja YR. Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. *Indian journal of medical sciences*, 2006, 60: 523-535.

11. Stevens RG, Brainard GC, Blask DE, Lockley SW, Motta ME. Breast cancer and circadian disruption from electric lighting in the modern world. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64: 207-218.
12. Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2016, 56: 361-383.
13. Kępczyński M, Ehrenberg B. Interaction of Dicarboxylic Metalloporphyrins with Liposomes. The Effect of pH on Membrane Binding Revisited¶. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 76: 486-492.
14. Ramos AP, Pavani C, Iamamoto Y, Zaniquelli ME. Porphyrin-phospholipid interaction and ring metallation depending on the phospholipid polar head type. *J Colloid Interface Sci*, 2010, 350: 148-154.
15. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, Dicker DJ, Chimed-Orchir O, Dandona R, Dandona L, Fleming T, Forouzanfar MH, Hancock J, Hay RJ, Hunter-Merrill R, Huynh C, Hosgood HD, Johnson CO, Jonas JB, Khubchandani J, Kumar GA, Kutz M, Lan Q, Larson HJ, Liang X, Lim SS, Lopez AD, MacIntyre MF, Marczak L, Marquez N, Mokdad AH, Pinho C, Pourmalek F, Salomon JA, Sanabria JR, Sandar L, Sartorius B, Schwartz SM, Shackelford KA, Shibuya K, Stanaway J, Steiner C, Sun J, Takahashi K, Vollset SE, Vos T, Wagner JA, Wang H, Westerman R, Zeeb H, Zoeckler L, Abd-Allah F, Ahmed MB, Alabed S, Alam NK, Aldhahri SF, Alem G, Alemayohu MA, Ali R, Al-Raddadi R, Amare A, Amoako Y, Artaman A, Asayesh H, Atnafu N, Awasthi A, Saleem HB, Barac A, Bedi N, Bensenor I, Berhane A, Bernabé E, Betsu B, Binagwaho A, Boneya D, Campos-Nonato I, Castañeda-Orjuela C, Catalá-López F, Chiang P, Chibueze C, Chittheer A, Choi JY, Cowie B, Damtew S, das Neves J,

Dey S, Dharmaratne S, Dhillon P, Ding E, Driscoll T, Ekwueme D, Endries AY, Farvid M, Farzadfar F, Fernandes J, Fischer F, TT GH, Gebru A, Gopalani S, Hailu A, Horino M, Horita N, Hussein A, Huybrechts I, Inoue M, Islami F, Jakovljevic M, James S, Javanbakht M, Jee SH, Kasaeian A, Kedir MS, Khader YS, Khang YH, Kim D, Leigh J, Linn S, Lunevicius R, El Razek HMA, Malekzadeh R, Malta DC, Marcenes W, Markos D, Melaku YA, Meles KG, Mendoza W, Mengiste DT, Meretoja TJ, Miller TR, Mohammad KA, Mohammadi A, Mohammed S, Moradi-Lakeh M, Nagel G, Nand D, Le Nguyen Q, Nolte S, Ogbo FA, Oladimeji KE, Oren E, Pa M, Park EK, Pereira DM, Plass D, Qorbani M, Radfar A, Rafay A, Rahman M, Rana SM, Søreide K, Satpathy M, Sawhney M, Sepanlou SG, Shaikh MA, She J, Shiue I, Shore HR, Shrive MG, So S, Soneji S, Stathopoulou V, Stroumpoulis K, Sufiyan MB, Sykes BL, Tabarés-Seisdedos R, Tadesse F, Tedla BA, Tessema GA, Thakur JS, Tran BX, Ukwaja KN, Uzochukwu BSC, Vlassov VV, Weiderpass E, Wubshet Terefe M, Yebyo HG, Yimam HH, Yonemoto N, Younis MZ, Yu C, Zaidi Z, Zaki MES, Zenebe ZM, Murray CJL, Naghavi M. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*, 2017, 3: 524-548.

16. Kutluk T KA. *Kanser Konusunda Genel Bilgiler*. Baskı. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, 1994.
17. Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature reviews. Cancer*, 2006, 6: 924-935.
18. Burçin Aygün Çevik EP. Beslenme ve Kanser. *Fırat Tıp Dergisi*, 2017, 22: 001-007.

19. Bahçeci Z. *Moleküler Biyoloji*. Baskı. Kırşehir, Öğrenci Kitabevi Yayınları, 1999.
20. Ozenoglu S, Aydogdu G, Dinçsoy A, Taghidizaj A, Derici K, Yilmaz E, Aras S, Cansaran-Duman D. Evaluation of the impact on different types of human cancer cell of lichen secondary compounds. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 2013, 70: 215-226.
21. Guyton AC, Hall, J. E. *Textbook of Medical Physiology*. 11th Baskı. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006.
22. Herceg Z, Hainaut P. Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Molecular oncology*, 2007, 1: 26-41.
23. Calabresi P, Welch AD. Chemotherapy of neoplastic diseases. *Annu Rev Med*, 1962, 13: 147-202.
24. Korkmaz S. Kersetin ve Berberinin, A549, HeLa, HT-29, MCF-7 ve NIH3T3 Hücre Kültürlerinde Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Eskişehir: 2002.
25. Meyyappan M. Nanotechnology: Challenges and the Way Forward. İçinde: Fisher E, Selin C, Wetmore JM (editörler). *Presenting Futures*, Dordrecht, Springer Netherlands, 2008: 227-239.
26. Yadav P, Singh R. A Short Review On Nanotechnology-The New Trend In The Medical Field. 2012.
27. Jain KK. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Med Princ Pract*, 2008, 17: 89-101.
28. Marcato P, Duran N. New Aspects of Nanopharmaceutical Delivery Systems. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2008, 8: 2216-2229.
29. Torchilin VP. Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58: 1532-1555.

30. Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease. *Pharmaceutical research*, 2006, 23: 1417-1450.
31. Cheki M, Moslehi M, Assadi M. Marvelous applications of quantum dots. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17: 1141-1148.
32. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect*, 2006, 114: 165-172.
33. Kim S, Lim YT, Soltesz EG, De Grand AM, Lee J, Nakayama A, Parker JA, Mihaljevic T, Laurence RG, Dor DM, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 93-97.
34. Kumar V, Toffoli G, Rizzolio F. Fluorescent Carbon Nanoparticles in Medicine for Cancer Therapy. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 4: 1012-1013.
35. Yuan Y, Guo B, Hao L, Liu N, Lin Y, Guo W, Li X, Gu B. Doxorubicin-loaded environmentally friendly carbon dots as a novel drug delivery system for nucleus targeted cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 159: 349-359.
36. Zhou L, Li Z, Liu Z, Ren J, Qu X. Luminescent Carbon Dot-Gated Nanovehicles for pH-Triggered Intracellular Controlled Release and Imaging. *Langmuir*, 2013, 29: 6396-6403.
37. Kulkarni NS, Parvathaneni V, Shukla SK, Barasa L, Perron JC, Yoganathan S, Muth A, Gupta V. Tyrosine kinase inhibitor conjugated quantum dots for non-small cell lung cancer (NSCLC) treatment. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 133: 145-159.
38. Şimşek F VH. Apoptotik ve Otofajik Ölümlerde Hücre İçi Organizasyon. *Yeni Tıp Dergisi*, 2014, 31: 6-11.

39. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol*, 1995, 6: 3-16.
40. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*, 1991, 7: 663-698.
41. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol*, 2007, 78: 217-245.
42. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32: 37-43.
43. Nicotera P, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, 2004, 23: 2757-2765.
44. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 1972, 26: 239-257.
45. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*, 1992, 356: 494-499.
46. Renchan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ (Clinical research ed.)*, 2001, 322: 1536-1538.
47. Ford WC. Biological mechanisms of male infertility. *Lancet*, 2001, 357: 1223-1224.
48. Marti A, Ritter PM, Jäger R, Lazar H, Baltzer A, Schenkel J, Declercq W, Vandenabeele P, Jaggi R. Mouse mammary gland involution is associated with cytochrome c release and caspase activation. *Mech Dev*, 2001, 104: 89-98.
49. Hughes FM, Jr., Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*, 1991, 129: 2415-2422.

50. Kannan K, Jain S. Kannan K, Jain S. Oxidative stress and apoptosis. Pathophysiology. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP*, 2000, 7: 153-163.
51. LeBlanc A, Liu H, Goodyer C, Bergeron C, Hammond J. Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 1999, 274: 23426-23436.
52. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26: 61-66.
53. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26: 390-397.
54. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, de Jong S. Tissue distribution of the death ligand trail and its receptors. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52: 821-831.
55. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 594-604.
56. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal*, 2003, 15: 983-992.
57. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*, 2004, 116: 205-219.
58. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 2007, 87: 99-163.
59. Smaili SS, Hsu YT, Carvalho AC, Rosenstock TR, Sharpe JC, Youle RJ. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J Med Biol Res*, 2003, 36: 183-190.

60. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 217-245.
61. Palmer AM, Greengrass PM, Cavalla D. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News Perspect*, 2000, 13: 378-384.
62. Ross MH. *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. 6th ed. Baskı. Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2011.
63. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin--an emerging mystery. *Biochem Pharmacol*, 1998, 56: 1265-1272.
64. Hilton G. Melatonin and the Pineal Gland. *Journal of Neuroscience Nursing*, 2002, 34.
65. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*, 2005, 9: 11-24.
66. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. *İçinde*: 2011: 1-37.
67. Reiter RJ. The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat*, 1981, 162: 287-313.
68. Yazici C, Kose K. Melatonin: Karanlığın Antioksidan Gücü, Melatonin: The Antioxidant Power Of Darkness. 2020.
69. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med*, 1997, 336: 186-195.
70. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38: 313-316.
71. Maksimovich AA. [Structure and function of the pineal gland in the vertebrates]. *Zh Evol Biokhim Fiziol*, 2002, 38: 3-13.

72. Ozcelik F, Erdem M, Bolu A, Glsn M. An Overview On Melatonin Hormone. *Psikiyatride Guncel Yaklasimlar - Current Approaches in Psychiatry*, 2013, 5: 1.
73. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Simopoulos AP, Maldonado MD, Flores LJ, Terron MP. Melatonin in edible plants (phytomelatonin): Identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. *World Rev Nutr Diet*, 2007, 97: 211-230.
74. Scheer FA, Czeisler CA. Melatonin, sleep, and circadian rhythms. *Sleep Med Rev*, 2005, 9: 5-9.
75. Ferguson SA, Rajaratnam SM, Dawson D. Melatonin agonists and insomnia. *Expert Rev Neurother*, 2010, 10: 305-318.
76. Sener G. Karanligin hormonu: Melatonin. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2010, 3: 112-120.
77. Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle CHV, Peral A. Involvement of melatonin MT3 receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *European Journal of Pharmacology*, 2001, 416: 251-254.
78. Reppert SM. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms*, 1997, 12: 528-531.
79. Dillon DC, Easley SE, Asch BB, Cheney RT, Brydon L, Jockers R, Winston JS, Brooks JS, Hurd T, Asch HL. Differential expression of high-affinity melatonin receptors (MT1) in normal and malignant human breast tissue. *Am J Clin Pathol*, 2002, 118: 451-458.
80. Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama Y, Ogata E. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature*, 1993, 362: 75-79.

81. Emet M, Ozcan H, Ozel L, Yayla M, Halici Z, Hacimuftuoglu A. A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. *Eurasian J Med*, 2016, 48: 135-141.
82. Çetin E In *Melatonin ve Bb 2`lkm1k Sistemi*, (editör).^(editörler). 2005.
83. Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang JJ, Xu DP, Li HB. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget*, 2017, 8: 39896-39921.
84. Nooshinfar E, Safaroghli-Azar A, Bashash D, Akbari ME. Melatonin, an inhibitory agent in breast cancer. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, 2017, 24: 42-51.
85. Gonçalves Ndo N, Colombo J, Lopes JR, Gelaleti GB, Moschetta MG, Sonehara NM, Hellmén E, Zanon Cde F, Oliani SM, Zuccari DA. Effect of Melatonin in Epithelial Mesenchymal Transition Markers and Invasive Properties of Breast Cancer Stem Cells of Canine and Human Cell Lines. *PLoS One*, 2016, 11: e0150407.
86. Sohn EJ, Won G, Lee J, Lee S, Kim SH. Upregulation of miRNA3195 and miRNA374b Mediates the Anti-Angiogenic Properties of Melatonin in Hypoxic PC-3 Prostate Cancer Cells. *J Cancer*, 2015, 6: 19-28.
87. Carbajo-Pescador S, García-Palomo A, Martín-Renedo J, Piva M, González-Gallego J, Mauriz JL. Melatonin modulation of intracellular signaling pathways in hepatocarcinoma HepG2 cell line: role of the MT1 receptor. *Journal of pineal research*, 2011, 51: 463-471.
88. Lu J-J, Fu L, Tang Z, Zhang C, Qin L, Wang J, Yu Z, Shi D, Xiao X, Xie F, Huang W, Deng W. Melatonin inhibits AP-2β/hTERT, NF-κB/COX-2 and Akt/ERK and activates caspase/Cyto C signaling to enhance the antitumor activity of berberine in lung cancer cells. *Oncotarget*, 2016, 7: 2985-3001.

89. Lv D, Cui P-L, Yao S-W, Xu Y-Q, Yang Z-X. Melatonin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*, 2012, 24: 310-316.
90. Bułdak RJ, Pilc-Gumuła K, Bułdak Ł, Witkowska D, Kukla M, Polaniak R, Zwirska-Korczala K. Effects of ghrelin, leptin and melatonin on the levels of reactive oxygen species, antioxidant enzyme activity and viability of the HCT 116 human colorectal carcinoma cell line. *Mol Med Rep*, 2015, 12: 2275-2282.
91. García-Navarro A, González-Puga C, Escames G, López LC, López A, López-Cantarero M, Camacho E, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D. Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. *Journal of pineal research*, 2007, 43: 195-205.
92. Osanai K, Kobayashi Y, Otsu M, Izawa T, Sakai K, Iwashita M. Ramelteon, a selective MT1/MT2 receptor agonist, suppresses the proliferation and invasiveness of endometrial cancer cells. *Hum Cell*, 2017, 30: 209-215.
93. León J, Casado J, Carazo Á, Sanjuán L, Maté A, Muñoz de Rueda P, de la Cueva P, Quiles R, Ruíz S, Ruíz-Extremera Á, Salmerón J. Gender-related invasion differences associated with mRNA expression levels of melatonin membrane receptors in colorectal cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 2012, 51: 608-618.
94. Ertugrul MS, Nadaroglu H, Nalci OB, Hacimuftuoglu A, Alayli A. Preparation of CoS nanoparticles-cisplatin bio-conjugates and investigation of their effects on SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Cytotechnology*, 2020.
95. Xue W, Liu Y, Zhang N, Yao Y, Ma P, Wen H, Huang S, Luo Y, Fan H. Effects of core size and PEG coating layer of iron oxide nanoparticles on the distribution and metabolism in mice. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 5719-5731.

96. Price D, Muterspaugh R, Clegg B, Williams A, Stephens A, Guthrie J, Heyl D, Evans HG. IGFBP-3 Blocks Hyaluronan-CD44 Signaling, Leading to Increased Acetylcholinesterase Levels in A549 Cell Media and Apoptosis in a p53-Dependent Manner. *Sci Rep*, 2020, 10: 5083.
97. Rump LV, Asamoah B, Gonzalez-Escalona N. Comparison of commercial RNA extraction kits for preparation of DNA-free total RNA from Salmonella cells. *BMC Res Notes*, 2010, 3: 211.
98. Picard-Meyer E, Peytavin de Garam C, Schereffer JL, Marchal C, Robardet E, Cliquet F. Cross-platform evaluation of commercial real-time SYBR green RT-PCR kits for sensitive and rapid detection of European bat Lyssavirus type 1. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 839518-839518.
99. Prasad KS, Amin T, Katuva S, Kumari M, Selvaraj K. Synthesis of water soluble CdS nanoparticles and study of their DNA damage activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017, 10: S3929-S3935.
100. Srinivasa Goud B, Suresh Y, Annapurna S, Singh AK, Bhikshamaiah G. Green Synthesis and Characterization of Cadmium Sulphide Nanoparticles. *Materials Today: Proceedings*, 2016, 3: 4003-4008.
101. Khaorapapong N, Ontam A, Ogawa M. Very slow formation of copper sulfide and cobalt sulfide nanoparticles in montmorillonite. *Applied Clay Science*, 2011, 51: 182-186.
102. Pawar A, Garje S. Synthesis of Co₉S₈ and CoS nanocrystallites using Co(II) thiosemicarbazone complexes as single-source precursors. *Bulletin of Materials Science*, 2015, 38.

- 103.Dumbrava A, Berger D, Prodan G, Moscalu F, Diacon A. Considerations about the Dependence of PEGylated ZnS Nanoparticles Properties on the Synthesis Method. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 2018, 232: 61-77.
- 104.Spadavecchia J, Movia D, Moore C, Maguire C, Moustauoui H, Casale S, Volkov Y, Prina-Mello A. Targeted polyethylene glycol gold nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer: from synthesis to proof-of-concept in vitro studies. *International Journal of Nanomedicine*, 2016, 11: 791 - 822.
- 105.Ebrahim I. Ramelteon: a new approach to managing insomnia. *Future Neurology*, 2008, 3: 9-18.
- 106.Chauhan A, Ramachandran M, Selvam N. Simple onepot sonochemical synthesis of copper sulphide nanoparticles for solar cell applications. *Arabian Journal of Chemistry*, 2015, 16.
- 107.Taghvaei V, Habibi-Yangjeh A, Behboudnia M. Simple and low temperature preparation and characterization of CdS nanoparticles as a highly efficient photocatalyst in presence of a low-cost ionic liquid. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2010, 7.
- 108.Raju G, Manikandan V, Nalini N, Swaminathan P. *Investigation on effects of polyethylene glycols on cadmium sulfide thin films*. Baskı. 2020.
- 109.Khoza S, Masikane S, Mlowe S, Ezekiel I, Moyo T, Revaprasadu N. Thermolytic synthesis of cobalt and cobalt sulfide nanoparticles using Cobalt(II) N ^ O Schiff base complexes as single molecular precursors. *Turkish Journal Of Chemistry*, 2018, 42: 1224-1237.
- 110.Pawar A, Masikane S, Mlowe S, Garje S, Revaprasadu N. Preparation of CdS Nanoparticles from Thiosemicarbazone Complexes: Morphological Influence of

- Chlorido and Iodido Ligands. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2016, 2016: 366-372.
111. Prasad KA, Joshi J, Joshi M. Growth, structural, spectroscopic, thermal, dielectric and optical study of cobalt sulphide-doped ADP crystals. *Modern Physics Letters B*, 2017, 31: 1750246.
112. Veerananarayanan S, Cheruvathor Poullose A, Mohamed S, Nagaoka Y, Iwai S, Nakagame Y, Kashiwada S, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar S. Synthesis and application of luminescent single CdS quantum dot encapsulated silica nanoparticles directed for precision optical bioimaging. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 7: 3769-3786.
113. Ding K, Zeng J, Jing L, Qiao R, Chunyan L, Mingxia J, Li Z, Gao M. Aqueous Synthesis of PEGylated Copper Sulfide Nanoparticles for Photoacoustic Imaging of Tumors. *Nanoscale*, 2015.
114. Salariya K, Umar A, Kansal SK, Mehta SK. Rapidly synthesized polyethylene glycol coated cadmium sulphide (CdS) nanoparticles as potential scaffold for highly sensitive and selective lethal cyanide ion sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 241: 276-284.
115. Dey P, Das R. Ligand free surface of CdS nanoparticles enhances the energy transfer efficiency on interacting with Eosin Y dye – Helping in the sensing of very low level of chlorpyrifos in water. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 207: 156-163.
116. RamKumar Pandian S, Venkataraman D, Kalishwaralal K, Gurunathan S. Biologically synthesized fluorescent CdS NPs encapsulated by PHB. *Enzyme and microbial technology*, 2011, 48: 319-325.

117. Abza T, Dadi D, Hone F, Chebelew T, Tekle G, Abebe E, Ahmed K. Characterization of Cobalt Sulfide Thin Films Synthesized from Acidic Chemical Baths. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2020, 2020: 1-9.
118. Balayeva O, Azizov A, Muradov M, Maharramov A, Eyvazova G. Synthesis and characterization of cobalt sulfide/FNBR nanocomposites by sol-gel method. *Journal of Ovonic Research*, 2016, 12: 267-273.
119. Asadi H, Rostamizadeh K, Salari D, Hamidi M. Preparation of biodegradable nanoparticles of tri-block PLA-PEG-PLA copolymer and determination of factors controlling the particle size using artificial neural network. *Journal of microencapsulation*, 2011, 28: 406-416.
120. Park J, Patel DB, Lee G, Woo S, Chang Y. Highly water-dispersible PEG surface modified ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles useful for target-specific biomedical applications. *Nanotechnology*, 2008, 19: 365603.
121. Singh A, Shirolkar M, Limaye M, Gokhale S, Khan-Malek C, Kulkarni S. A magnetic nano-composite soft polymeric membrane. *Microsystem Technologies*, 2013, 19: 409.
122. Dorset DL. X-ray Diffraction: A Practical Approach. *Microscopy and Microanalysis*, 1998, 4: 513-515.
123. Hoseinpour R, Azizi SN, Shakeri P, Rahmani S. Sensitive Determination of Cetirizine Using CdS Quantum dots as Oxidase Mimic-mediated Chemiluminescence of Sulfite. *International Current Pharmaceutical Journal*, 2016, 5: 59.
124. Joshi J, Kanchan D, Joshi M, Jethva HO, Parikh K. Dielectric Relaxation, Complex Impedance and Modulus Spectroscopic Studies of Mix Phase Rod like Cobalt Sulfide Nanoparticles. *Materials Research Bulletin*, 2017, 93.

- 125.Ma D, Hu B, Wu W, Liu X, Zai J, Shu C, Tadesse Tsega T, Chen L, Qian X, Liu TL. Highly active nanostructured CoS₂/CoS heterojunction electrocatalysts for aqueous polysulfide/iodide redox flow batteries. *Nature Communications*, 2019, 10: 3367.
- 126.Zheng W, Ding R, Yan X, He G. PEG induced tunable morphology and band gap of ZnO. *Materials Letters*, 2017, 201: 85-88.
- 127.Bozok Çetintaş V, Eroğlu Z. Cisplatin direncinde etkili moleküler mekanizmalar. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, 2013, 20: 72-79.
- 128.Song KI, Park JY, Lee S, Lee D, Jang HJ, Kim SN, Ko H, Kim HY, Lee JW, Hwang GS, Kang KS, Yamabe N. Protective effect of tetrahydrocurcumin against cisplatin-induced renal damage: in vitro and in vivo studies. *Planta Med*, 2015, 81: 286-291.
- 129.Surendran D, Geetha CS, Mohanan PV. Amelioration of melatonin on oxidative stress and genotoxic effects induced by cisplatin in vitro. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2012, 22: 631-637.
- 130.Sato A, Itcho N, Ishiguro H, Okamoto D, Kobayashi N, Kawai K, Kasai H, Kurioka D, Uemura H, Kubota Y, Watanabe M. Magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8: 3151-3160.
- 131.Khan S, Ansari AA, Malik A, Chaudhary AA, Syed JB, Khan AA. Preparation, characterizations and in vitro cytotoxic activity of nickel oxide nanoparticles on HT-29 and SW620 colon cancer cell lines. *J Trace Elem Med Biol*, 2019, 52: 12-17.

132. Wongprayoon P, Govitrapong P. Melatonin Protects SH-SY5Y Neuronal Cells Against Methamphetamine-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptotic Cell Death. *Neurotoxicity Research*, 2017, 31: 1-10.
133. Hevia D, Mayo JC, Quiros I, Gomez-Cordoves C, Sainz RM. Monitoring intracellular melatonin levels in human prostate normal and cancer cells by HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397: 1235-1244.
134. Montastruc JL, Galitzky J, Berlan M, Montastruc P. [Mechanism of receptor regulation during repeated administration of drugs]. *Therapie*, 1993, 48: 421-426.
135. McMillan CR, Sharma R, Ottenhof T, Niles LP. Modulation of tyrosine hydroxylase expression by melatonin in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuroscience Letters*, 2007, 419: 202-206.
136. Becker-André M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, André E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem*, 1994, 269: 28531-28534.
137. Sarachana T, Xu M, Wu RC, Hu VW. Sex hormones in autism: androgens and estrogens differentially and reciprocally regulate RORA, a novel candidate gene for autism. *PLoS One*, 2011, 6: e17116.
138. Dal J, Ram P, Yuan L, Spriggs LL, Hill S. Transcriptional repression of ROR alpha activity in human breast cancer cells by melatonin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001, 176: 111-120.
139. Chetsawang B, Putthaprasart C, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P. Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells: involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2. *Journal of pineal research*, 2006, 41: 116-123.

140. Wisessmith W, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P, Chetsawang B. Melatonin reduces induction of Bax, caspase and cell death in methamphetamine-treated human neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells. *Journal of pineal research*, 2009, 46: 433-440.
141. Song J, Kim OY. Melatonin Modulates Neuronal Cell Death Induced by Endoplasmic Reticulum Stress under Insulin Resistance Condition. *Nutrients*, 2017, 9.
142. Calastretti A, Gatti G, Lucini V, Dugnani S, Canti G, Scaglione F, Bevilacqua A. Melatonin Analogue Antiproliferative and Cytotoxic Effects on Human Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 2018, 19.
143. André E, Conquet F, Steinmayr M, Stratton SC, Porciatti V, Becker-André M. Disruption of retinoid-related orphan receptor beta changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. *Embo j*, 1998, 17: 3867-3877.
144. Delerive P, Monté D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, Fruchart JC, Staels B. The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO reports*, 2001, 2: 42-48.
145. Jones HE, Eaton CL, Barrow D, Dutkowski C, Griffiths K. Response of cell growth and retinoic acid receptor expression to retinoic acid in neoplastic and non-neoplastic prostate cell lines. *Prostate*, 1997, 30: 174-182.
146. Cao H, Feng Y, Chen L, Yu C. Lobaplatin Inhibits Prostate Cancer Proliferation and Migration Through Regulation of BCL2 and BAX. *Dose Response*, 2019, 17: 1559325819850981.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Medeni Hali:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
Faks:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	
Lisans:	
Yüksek lisans:	
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	
Almanca:	
Rusça:	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
İlgi Alanları ve Hobiler	

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹

Öğrencinin Adı ve Soyadı	
Öğrencinin Numarası	
Ana Bilim Dalı	Tıbbi Farmakoloji
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	%0	% 15
II. Genel Bilgiler	%5	% 35
III. Materyal ve Metod	%13	% 35
IV. Bulgular	%2	% 15
V. Tartışma	%0	% 20

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
6.12.2021	6.12.2021

¹ Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tez Savunması Jüri Öneri Formu'yla birlikte Ana Bilim Dalı Başkanlığı aracılığıyla ÜBYS üzerinden Enstitüye iletilmelidir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



Bölümü : Dekanlık
Servisi : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/305
Konu : Etik Kurul Kararı

30.05.2019

Sayın:
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Değerlendirilmek üzere Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunduğunuz
“**Melatonin Agonistleri ile Kombine Quantum Dot Sentezi Karakterizasyonu ve Çeşitli**
Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” isimli bilimsel tez
çalışmasına ait Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Eki :
1 Adet Etik Kurul Kararı



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		Melatonin Agonistleri ile Kombine Quantum Dot Sentezi Karakterizasyonu ve Çeşitli Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 04 Karar No: 72	Tarih: 30.05.2019
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin BAP tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	