



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİLİKA NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ, FONKSİYONLANDIRILMASI VE İNSAN PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

İrem Mukaddes DURMUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Temmuz-2020
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

İrem Mukaddes DURMUŞ tarafından hazırlanan "Silika Nanopartiküllerin Sentezi, Fonksiyonlandırılması ve İnsan Prostat Kanseri Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi" adlı tez çalışması 27/07/2020 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**İmza**
Başkan Prof. Dr. Mustafa YILMAZ	……..
Danışman Doç. Dr. Serdar KARAKURT	……..
Üye Dr. Öğr. Üyesi Deniz SEZLEV BİLECEN	……..

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Sait GEZGİN
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından 19201089 nolu proje ile desteklenmiştir.

Dr. Öğr. Gör. İlyas DEVECİ bu tez çalışmasının ikinci danışmanıdır.

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİLİKA NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ, FONKSİYONLANDIRILMASI VE İNSAN PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

İrem Mukaddes DURMUŞ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Serdar KARAKURT

2020, 152 Sayfa

Jüri
Doç. Dr. Serdar KARAKURT
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Dr.Öğr.Üyesi Deniz SEZLEV BİLECEN

Nanoteknoloji, nano boyuttan türeyen bir teknoloji olup maddeleri atomik boyutu ile kontrol etmek amacı ile kullanılmaktadır. Nanoonkolojideki ilerlemeler, hedeflenen ilaç dağıtımında önemli yenilikler getirmiştir. Prostat kanseri (PCa) erkeklerde ikinci en yüksek morbidite ve mortalite oranına sahiptir. Günümüzde, geleneksel yöntemlere ek olarak nano boyutlu ilaç verme sistemleri ile prostat kanseri (PCa) tedavisi yapılabilmektedir. Silika nanopartiküller (SiNP'ler) birçok kanser türü üzerinde toksik etkiler göstermektedir. Bu tez çalışmasının amacı kimyasal yöntemler ile SiNP'leri sentezlenmesi ve bunların NH_2, SH ve Cl ile fonksiyonlaştırılması ve akabinde elde edilen bu bileşiklerin prostat, akciğer, karaciğer, kolon, rahim ağzı ve böbrek kanser hücreleri ve sağlıklı insan epitel hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin belirlenmesi ve etki değerliliğine göre spesifik kanser türü üzerine antiproliferatif mekanizmasının moleküler düzeyde aydınlatılmasıdır.

Stöber yöntemine göre SiNP'ler TEOS kullanılarak sentezlendi ve yüzey modifikasyonu APTES, CPTES ve McPTES olarak adlandırılan silan birleştirme maddeleri ile gerçekleştirildi. Nanopartiküllerin karakterizasyonu TEM, DLS, BET ve FTIR analizleri ile gerçekleştirildi. SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin sitotoksik özellikleri altı(6) farklı kanser hücresi ve insan sağlıklı epitel hücresine karşı araştırıldı. 96-kuyucuklu plakalar içinde büyütülen hücreler, 0-250 µg/mL konsantrasyon aralığında değişen SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri ile muamele edildi. Her bir bileşiğin sitotoksik etkisi ayrı ayrı incelendiğinde çalışılan insan kanser hücreleri arasında en yüksek sitotoksik etki insan prostat kanser hücresi olan metastatik özellikteki PC-3 hücreleri üzerinde belirlenmiş olup moleküler çalışmalar bu hücreler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücre ölüm mekanizmasının aydınlatılması amacıyla öncelikle hücre apoptoz çalışmaları yapılmış olup erken/geç apoptoz ve nekroz oranları, Annexin V-APC ve 7-AAD boyaları kullanılarak NovoCyte Flow sitometre sistemi ile belirlenmiştir. SiNP ve fonksiyonlaştırılmış formlarının PC-3 hücrelerinin DNA yapısındaki etkileşimleri comet (DNA kırılması) deneyi ile belirlenmiştir. Hem apoptoz oluşumunda hem de PCa gelişminde önemli role sahip olan anahtar genlerin ve bu genler tarafından eksprese edilen proteinlerin (BCL-2, BAX, Nf-κB, P53, SMAD4, KRAS ve BRAF) seviyelerinde meydana gelen değişimler sırasıyla qRT-PCR ve Western-Blot yöntemiyle belirlenmiştir.

Nanopartikül konsantrasyonuna karşı hücre canlılığı grafiğininden elde edilen sigmoidal eğrinin analizi sonucunda sentezlenen SiNP, SiNP-SH, SiNP-NH_2 ve SiNP-Cl bileşiklerinin PCa hücre hattı olan PC-3 hücreleri üzerindeki IC_{50} değerleri sırasıyla 75.91 µg/mL, 72.89 µg/mL, 55.46 µg/mL ve 54.09 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu bileşiklerin, insan sağlıklı epitel hücre hattı olan PNT1A hücrelerinde ise çok yüksek konsantrayonlarda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (>250 µg/mL). Hücre içi floresans biyogörüntüleme çalışmaları sonucunda SiNP'lerin ve fonksiyonlaştırılmış formlarının yüksek oranda sitoplazmada lokalize oldukları görülmüştür. SiNP'ler, PC-3 hücrelerini kontrol hücresine göre 2.83 kat, SiNP-NH_2-4.61 kat, SiNP-SH-7.88 kat ve SiNP-Cl-6.76 kat daha fazla erken apoptoza sürüklemiştir.

SiNP'lerin ve fonksiyonlaştırılmış formlarının PCa hücrelerinin metastatik özelliklerini önemli ölçüde ($p<0.001$) inhibe ettiği saptanmıştır. Ayrıca koloni oluşturma çalışmaları sonucunda SiNP ve fonksiyonlaştırılmış formlarının PC-3 hücrelerinin koloni oluşturma oranını %75 azalttığı ($p<0.001$) belirlenmiştir. SiNP ve fonksiyonlaştırılmış formlarının PC-3 hücrelerinde BCL-2, BAX, Nf-κB, TP53(p53), SMAD-4, KRAS, BRAF, CASPASE-3, CASPASE-9, CASPASE-12 mRNA ve protein ekspresyonlarını aşağı ve/veya yukarı yönde modifiye ettiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak; tez projesi kapsamında SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri başarılı bir şekilde sentezlenmiş olup karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu nanopartiküllerin çeşitli insan kanser hücrelerine karşı seçici olarak etki gösterdikleri saptanmış olup en fazla etkiyi ise insan prostat kanseri hücrelerine karşı göstermiştir. Apoptoz, mRNA ve protein ekspresyonları çalışmaları sonucunda bu nanopartiküllerin PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik etilerinin moleküler mekanizması da belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda özellikle SiNP-NH_2 ve SiNP-SH nanopartiküllerinin insan prostat kanseri tedavisinde alternatif ve yeni bir tedavi yönteminde kullanılabilecek bir ilaç adayı olma potansiyellerinin olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Biyo-görüntüleme, Fonksiyonelleştirme, Karakterizasyon, Metastaz, Prostat Kanseri, Protein/Gen Ekspresyonu, Silika Nanopartikül, Sitotoksisite

ABSTRACT

MS THESIS

SYNTHESIS AND FUNCTIONALIZATION OF SILICA NANOPARTICLES, AND INVESTIGATION OF THEIR CYTOTOXIC EFFECTS ON HUMAN PROSTATE CANCER CELLS

Irem Mukaddes DURMUS

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE
OF SELCUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN ADVANCED MATERIALS AND NANOTECHNOLOGY

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Serdar KARAKURT

2020, 152 Pages

Jury
Assoc. Prof. Dr. Serdar KARAKURT
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Asts. Prof. Dr. Deniz SEZLEV BİLECEN

Nanotechnology is a technology derived from nano size and it is used to control the substances with their atomic size. Advances in nanooncology have brought important innovations in targeted drug delivery. Prostate cancer (PCa) has the second highest morbidity and mortality rate in men. Today, in addition to traditional methods, prostate cancer (PCa) can be treated with nano-sized drug delivery systems. Silica nanoparticles (SiNPs) show toxic effects on many types of cancer. The aim of this thesis study is to synthesize SiNPs by chemical methods and functionalize them with NH_2, SH and Cl, and then to determine the cytotoxic effects of these compounds on prostate, lung, liver, colon, cervical and kidney cancer cells and healthy human epithelial cells, and it is the illumination of the antiproliferative mechanism on the specific cancer type at the molecular level according to its efficacy.

According to the Stöber Method, SiNPs were synthesized using TEOS and surface modification was carried out with silane coupling agents called APTES, CPTES and McPTES. Characterization of nanoparticles was performed by TEM, DLS, BET and FTIR analysis. The cytotoxic properties of SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH and SiNP-Cl nanoparticles were investigated against six(6) different cancer cells and human healthy epithelial cells. Cells grown in 96-well plates were treated with SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH and SiNP-Cl nanoparticles varying in the concentration range of 0-250 µg/mL. The highest cytotoxic effect among the human cancer cells studied when the cytotoxic effect of each compound was examined separately, is determined on metastatic properties of PC-3 cells, the human prostate cancer cell, and molecular studies were performed on these cells. In order to clarify the mechanism of cell death, primarily cell apoptosis studies were performed, and early/late apoptosis and necrosis rates were determined with the NovoCyte Flow cytometer system using Annexin V-APC and 7-AAD dyes. The interactions of SiNP and its functionalized forms in the DNA structure of PC-3 cells were determined by the Comet Assay. Changes in the levels of key genes that have an important role in both apoptose formation and PCA development and those proteins that are explanted by these genes (BCL-2, BAX, NF-κB, p53, SMAD4, KRAS and BRAF) are determined by qRT-PCR and Western-Blot, respectively.

Analysis of the sigmoidal curve from cell viability plot against nanoparticle concentration calculated the IC_{50} values of the compounds SiNP, SiNP-SH, SiNP-NH_2 and SiNP-Cl respectively on the cells of PC-3 as 75.91 µg/mL, 72.89 µg/mL, 55.46 µg/mL and 54.09 µg/mL. These compounds were found to have cytotoxic effects at very high concentrations in PNT1A cells, which are human healthy epithelial cell lines (>250 µg/mL). As a result of intracellular fluorescence bioimaging studies, it was observed that SiNPs and their functional forms were highly localized in the cytoplasm. SiNPs dragged PC-3 cells 2.83-fold, SiNP-NH_2-4.61 fold, SiNP-SH-7.88 fold and SiNP-Cl-6.76 fold more early apoptosis than the control cell.

It was found that SiNP's and the functional forms have significantly ($p<0.001$) invanced the metastatic properties of the PCA cells. It has also been determined that, as a result of colonization, SiNP and the functional forms reduce the rate of colonial formation of the cells PC-3 by 75% ($p<0.001$). It has been determined that SiNP and its functional forms have modified BCL-2, BAX, NF-κB, TP53 (p53), SMAD-4, KRAS, BRAF, CASPASE-3, CASPASE-9, CASPASE-12 mRNA and protein expressions in a down and/or up direction in PC-3 cells.

As a result, SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH and SiNP-Cl nanoparticles were successfully synthesized and characterized as part of the thesis project. These nanoparticles have been found to have a selective effect on various human cancer cells, and the greatest effect has been against human prostate cancer cells. As a result of the studies of apoptosis, mRNA and protein expressions, the molecular mechanism of the cytotoxic effects of these nanoparticles on PC-3 cells was also determined. According to the data obtained, it is seen that especially SiNP-NH_2 and SiNP-SH nanoparticles have the potential to be an alternative drug candidate that can be used in an alternative and new treatment method in the treatment of human prostate cancer.

Keywords: Apoptosis, Bio-imaging, Functionalization, Characterization, Metastasis, Prostate Cancer, Protein/Gene Expression, Silica Nanoparticles, Cytotoxicity

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin sonuna gelmiş bulunuyorum. Akademik olarak daha çok bilgiyi öğrenmek, kullanmak ve insanlığa faydalı olmak için önümde aşmam gereken daha pek çok engel olduğunun farkında olarak;

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile kendime bir rol model oluşturduğum, yanında çalışmaktan onur duyduğum, karşılaştığım her sorunda beni sakinleştirip çözüme odaklı yaklaşımının yanında güler yüzünü benden esirgemediği için ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu sonsuz hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam, sayın Doç. Dr. Serdar KARAKURT'a,

Tezimin kimyasal kısmı üzerinde bana yardım eden, benden bilgilerini ve tecrübelerini hiçbir zaman eksik etmeyen, başarısız olacağımı hissettiğim çoğu zaman beni cesaretlendirip elimden tutan, kıymetli zamanını bana ayırıp gösterdiği sonsuz hoşgörü ve sabrından dolayı değerli ikinci danışman hocam, sayın Dr. Öğr. Gör. İlyas DEVECİ'ye,

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım, her koşulda benimle olan ve zamanlarını ayırıp bana desteklerini hissettiren laboratuvar arkadaşlarım Hatice Gül BATUR, Süreyya ERTÜRK ve Sümeyye ÇINAR'a,

Tanıştığım ilk günden beri varlığını eksik etmeyen, beni cesaretlendiren ve bana güç veren Tugay GEZER'e,

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, beni her zaman şefkatle kucaklayan, maddi ve manevi desteklerini benden eksik etmeyen sonsuz sevgi ve saygı duyduğum canım babam Saffet DURMUŞ'a, canım annem Hatice DURMUŞ'a, canım kardeşim Hüseyin Talha DURMUŞ'a ve desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim ailemin geri kalanına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İrem Mukaddes DURMUŞ
KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

TEZ BİLDİRİMİ iii
ÖZET iv
ABSTRACT vi
ÖNSÖZ viii
SİMGELER VE KISALTMALAR xi
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 4
2.1. Kanser Hakkında Genel Bilgiler 4
2.2. Prostat Kanseri Hakkında Genel Bilgiler 8
2.2.1. Prostat 8
2.2.2. Prostat Kanseri 8
2.2.3. Prostat Kanseri Tedavisi 15
2.3. Nanoteknoloji Kavramı ve Nanoteknoloji Tabanlı Terapötik Yöntemler 17
2.4. Nanopartiküller 21
2.4.1. Silika Nanopartiküller 22
2.4.2. Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri 23
2.4.3. Silika Nanopartikül Sentezi 25
2.5. Nanopartiküllerin Kanser Tedavisindeki Rolü 26
3. MATERYAL VE YÖNTEM 28
3.1. Kimyasallar 28
3.2. Cihazlar 29
3.3. Sentez Çalışmaları 30
3.3.1. SiNP'lerin Hazırlanması 30
3.3.2. SiNP'lerin Fonksiyonlandırılması 30
3.3.3. SiNP ve Fonksiyonlarının Karakterizasyonu 34
3.4. *In Vitro* Sitotoksisite Çalışmaları 35
3.4.1. Hücre Kültürü 35
3.4.2. Sitotoksisite Deneyleri 35
3.4.3. Apoptoz Çalışmaları 36
3.4.4. Hücre Görüntüleme Çalışmaları 37
3.4.5. Yara İyileştirme Deneyi 38
3.4.6. Koloni Oluşturma Deneyi 38
3.4.7. DNA Kırılması Deneyi 40
3.4.8. Protein Ekspresyon Çalışmaları 41

3.4.9. Gen Ekspresyonu Çalışmaları 47
3.5. İstatiksel Analiz 52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 53
4.1. SiNP ve Fonksiyonlarının Karakterizasyon Sonuçları 53
4.2. SiNP ve Fonksiyonlarının Farklı Kanser Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri 62
4.3. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresi Üzerine Sitotoksik Etkileri 64
4.4. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresi Üzerine Apoptotik Etkileri 69
4.5. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresinde Hücre Görüntülemesi 75
4.6. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresinde Metastatik Etkileri 76
4.7. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresinde Koloni Oluşumu Üzerine Etkileri 82
4.8. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresinde DNA Kırılması Üzerine Etkileri 88
4.9. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresinde Protein Ekspresyonu Üzerine Etkileri 89
4.9.1. SiNP ve Fonksiyonlarının BAX Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi 89
4.9.2. SiNP ve Fonksiyonlarının BCL-2 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi 91
4.9.3. SiNP ve Fonksiyonlarının Nf-κB Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi 92
4.9.4. SiNP ve Fonksiyonlarının P53 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi 93
4.9.5. SiNP ve Fonksiyonlarının KRAS Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi 94
4.9.6. SiNP ve Fonksiyonlarının SMAD Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi 95
4.10. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresinde Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri 97
4.10.1. Agaroz Jel Elektroforezi ile RNA Moleküllerinin Kalite Kontrolü 98
4.10.2. SiNP ve Fonksiyonlarının BRAF Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 99
4.10.3. SiNP ve Fonksiyonlarının KRAS Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 102
4.10.4. SiNP ve Fonksiyonlarının TP53 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 105
4.10.5. SiNP ve Fonksiyonlarının SMAD Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 108
4.10.6. SiNP ve Fonksiyonlarının BAX Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 111
4.10.7. SiNP ve Fonksiyonlarının CASPASE 3 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 114
4.10.8. SiNP ve Fonksiyonlarının CASPASE 9 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 117
4.10.9. SiNP ve Fonksiyonlarının CASPASE 12 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 120
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 124
KAYNAKLAR 129
ÖZGEÇMİŞ 138

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g:	Gram
M:	Molarite
mA:	Miliamper
mg:	Miligram
mL:	Mililitre
mM:	Milimolar
mm:	Milimetre
mV:	Milivolt
N:	Normalite
nm:	Nanometre
V:	Volt
°C:	Santigrat Derece
µg:	Mikrogram
µL:	Mikrolitre
µm:	Mikrometre

Kısaltmalar

APTES:	3-Aminopropil-trietoksisilan
ATCC:	American Type Culture Collection
BSA:	Sığır Serum Albümini
CPTES:	Kloropropiltrietoksisilan
dH_2O:	Distile Su
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
Et-Br:	Etidyum Bromür

Et-OH: Etanol

FBS: Fetal sığır serumu

IC_{50}: Toplam Hücre Sayısının Yarısını İnhibe Eden İlaç/Madde Konsantrasyonu

McPTES: 3-Merkaptopropiltrietoksisilan

PBS: Fosfat Tamponu

PCa: Prostat Kanseri

PFA: Paraformaldehit

PVDF: Polivinilidin Florür

SDB: Sample Dilution Buffer

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SDS-PAJE: SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez

SiNP: Silika Nanopartikül

SiNP-Cl: Klor Grubu İle Fonksiyonelleştirilmiş Silika Nanopartikül

SiNP-NH_2: Amin Grubu İle Fonksiyonelleştirilmiş Silika Nanopartikül

SiNP-SH: Tiyol Grubu İle Fonksiyonelleştirilmiş Silika Nanopartikül

TBST: Tween 20 İçeren Tris Tamponu

TEMED: Tetrametiletilendiamin

TEOS: Tetraetilortosilikat

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, nano boyutu temel alan bir teknoloji olup atomların ve moleküllerin en küçük birimlerini ifade etmek ve maddeyi atomik boyutu ile kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır. Atom üzerine atom koyup yeni maddeler oluşturmayı ve mevcut olan maddelerin de moleküler yapısını değiştirerek yeni maddeler oluşturma çalışmalarını içermektedir. Nanoteknoloji çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Fizik, kimya, biyoloji gibi temel bilimlerin yanı sıra tıp, bilgisayar, malzeme bilimi, elektronik gibi alanlarda da kullanılmaktadır. Her geçen gün gelişmekte olan bir teknolojidir ve bu yönde kullanım alanı artmaktadır.

Nanoteknoloji alanının en geniş uygulamasına sahip olan nanopartiküller, boyutu 100 nm'den daha küçük olan parçacıklar olarak tanımlanmaktadır. Oldukça küçük olan bu parçacıklar aynı malzemelerin büyük parçacıkları ile kıyaslandığında boyuta bağlı olarak daha üstün ve yeni özellikler göstermektedir (Rahman ve ark., 2007; McNamara ve Tofail, 2017). Nano parçacıklar gösterdiği bu özellikler sayesinde çeşitli alanlardaki uygulanabilirliği doğrultusunda çok fazla dikkat çekmektedir. Nanopartiküller geniş çeşitlilikteki biyolojik ve biyokimyasal uygulamalarda aktif olarak kullanılmaktadır (Dykman ve Khlebtsov, 2012). Nanopartiküller diğer moleküllerle kıyaslandıklarında çok daha geniş bir reaktif yüzey alanına sahip olup bu nedenle birçok makro/mikro molekülle etkileşim halinde bulunabilirler ve bundan dolayı da diğer moleküller ile karşılaştırıldıklarında çok daha fazla etkiye sahip oldukları görülmektedir. Cerrahi, protez malzeme tasarımı, ilaç taşınımı, hastalıkların teşhis ve tedavisi, hücre görüntülemesi gibi var olan uygulama alanları giderek artmaktadır (Abou El-Nour ve ark., 2010; Tsai ve ark., 2010). Nanopartiküllerin yüzey alanları çapları ile ilişkili olup kullanılan nanopartikülün büyüklüğüne bağlı olarak da farklı etki göstermesi beklenmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde birçok nanopartikülün çeşitli insan kanser hücreleri üzerine etkileri araştırılmış ve bunların belirli konsantrasyonlarda karaciğer, meme, kolon ve akciğer kanseri gibi birçok kanser üzerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Dong ve ark., 2019). Ancak dikkate alınması gereken en önemli konulardan biri de bu nanopartiküllerin büyüklüklerinin ve yüzey işlevselliklerinin sitotoksik olmalarının yanında hücre üzerindeki moleküler seviyede gösterdikleri etkileridir.

Günümüzde hücre görüntülemesi, hedefli ilaç salınımı, teranostik ve immünoterapi gibi biyolojik uygulamalar için çeşitli inorganik nanopartiküller kullanılmaktadır (Khan ve ark., 2018). Silika nanopartiküller, işlevsel çok yönlülüğüne sahip üstün özellikleri

nedeniyle araştırmacılar arasında sürekli ilgiye yol açan inorganik nanopartiküller olarak tanımlanmıştır (Kumar ve ark., 2019). Silika nanopartiküller kolayca sentezlenebilmesi, pek çok farklı şekilde fonksiyonlandırılabilmesi, biyouyumlu olması, farklı koşullarda stabilite sağlaması ve birçok alanda pratik bir şekilde uygulanabilir olması nedeniyle tercih edilmektedir (Rao ve ark., 2005; Guo ve ark., 2008; Feifel ve Lisdat, 2011). Farklı büyüklükteki nanopartiküllerin hücre içerisine alınmaları da farklılık göstermekte olup altın nanopartiküller ile yapılan çalışmalar partikül büyüklüğü arttıkça nanopartiküllerin hücre içine daha zor geçtikleri gösterilmiştir (Hostetler ve ark., 1998a). Dolayısıyla nanopartiküllerin etki mekanizmaları incelenirken partikül büyüklüklerini göz önünde bulundururken yüzey işlevselliği hakkında da çalışılması gerekmektedir. Literatürde, kitosan ince film tabanlı silika nanopartiküller hedef tümör hücresine daha etkili bir şekilde bağlanarak silika nanopartiküllerin toksik etkisini arttırmıştır (Chen ve ark., 2019), silika tabanlı organik-inorganik hibrid nanopartiküller saf silika nanopartiküllerin büyük partikül boyutları, düzensiz morfolojilerine karşılık ayarlanabilir partikül boyutu ve düzenli bir morfoloji sağlayarak hedef tümör hücresine etkisini kolaylaştırmıştır (Ilhan-Ayisigi ve Yesil-Celiktas, 2018). Floresan boya ile (ICG, indosiyanin yeşili) aktive edilmiş silika nanopartiküllerin hücre içinde görüntülemesi yapılarak hedef hücreye etki ettiği nokta daha net açıklama bulmuştur (Shindo ve ark., 2018).

Mevcut tedavi seçeneklerinin sınırlı olması ve olası yan etkilerinin varlığı nedeniyle tedavisi için yeni ve alternatif bir yaklaşım arayan hastalıklar arasında kanser başı çekmektedir. Nanoteknoloji tabanlı tedaviler bu kapsamda çeşitli kanser türleri için umut ışığı olmaktadır. Tanım gereği kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz büyüme sonucu yayılması yoluyla gerçekleşen bir hastalıktır ve bu kontrolsüz büyüme ve yayılım kontrol altına alınamazsa ölümle sonuçlanabilir. Yanlış beslenme alışkanlıkları, tütün ve alkol bağımlılığı, artan çevre kirliliği, radyoaktif maddeler, obezite, stres, yaş, genetik faktörler ve sedanter yaşam tarzı kanserin morbidite ve mortalite oranlarında artışa neden olur (Heng ve ark., 2010; Aktipis ve Nesse, 2013; Estape, 2018). Prostat kanseri ise erkeklerde en sık görülen kanser türlerindendir. Son yıllarda, prostat kanserinin biyolojisi ve tedavisi ile ilgili çalışmaların da gösterdiği gibi prostat bezi ile sınırlı tümörler cerrahi ve radyasyon tedavisine yanıt verirken, metastatik prostat tümörlerinde uygulanan tedavilerle istenen sonuçlar elde edilemez (Schulz ve Hoffmann, 2009; Singh ve ark., 2018). Prostat kanseri tedavisinde kullanılan nano boyutta modifiye edilmiş metotlar çoğu zaman nanopartiküllerin yüzeyini, reseptörleri ile prostat kanseri hücrelerinin

yüzeyine spesifik olarak bağlanabilen ligandlarla modifiye ederek aktif taşıma yolu ile tümör hücrelerine iletebilen yöntemleri içermektedir.

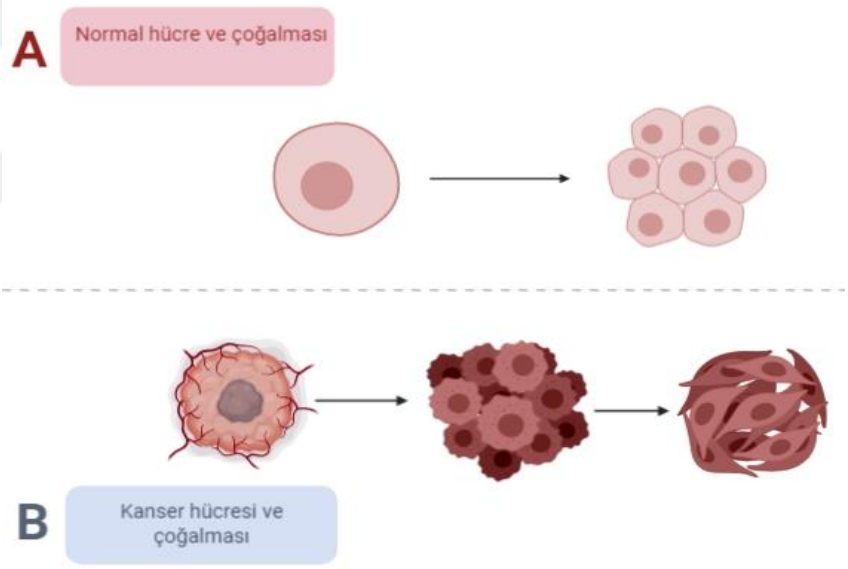
Literatürde yer alan *in vitro* çalışmalar incelendiğinde silika nanopartiküllerin prostat kanseri hücresi üzerinde moleküler seviyedeki etkilerinin yeterince açık olmamasından dolayı bu tez kapsamında <15 nm boyutlarındaki silika nanopartiküller Stöber yöntemini (Stöber W, 1968) esas alarak sentezlenmiş ve farklı yüzey işlevselliklerinin farklı olası toksik etkileri adına yorum yapılabilmesi için amin ($-NH_2$), tiyol (-SH) ve klor (-Cl) grupları ile fonksiyonlandırılmıştır. Silika nanopartiküller, amin grubu ile fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküller, tiyol grubu ile fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküller ve klor grubu ile fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküllerin androjen reseptöründen bağımsız olarak çoğalabilen, agresif metastatik PC-3 prostat kanseri hücresi üzerinde antiproliferatif ve sitotoksik etkileri moleküler seviyede incelenmiştir. Böylelikle prostat kanseri tedavisinde alternatif bir yaklaşım geliştirilmeye çalışılmış olup hücre ölüm mekanizmasının da aydınlatılması ile moleküler seviyede ne gibi değişimlere yol açtığı belirlenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser Hakkında Genel Bilgiler

Yunanlı hekim Hipokrat tarafından yapılan tanımlamaya göre kanser ifadesi "Crab" kelimesinden türemiştir ve yengeç anlamına gelir.

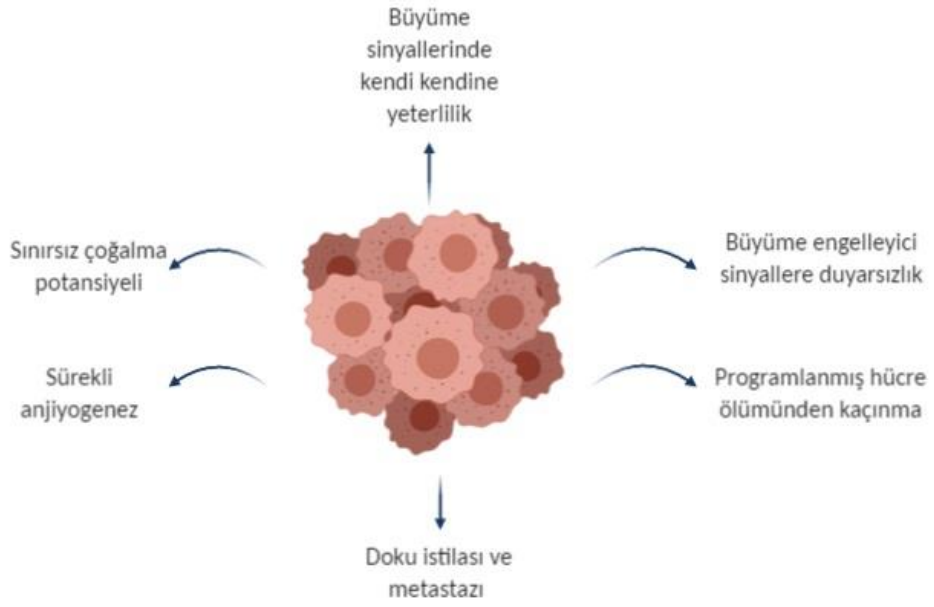
Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz büyümeyle arttığı ve çoğu zaman diğer dokulara yayıldığı çok aşamalı bir süreçtir. Tümör hücreleri normalden farklı bir şekilde proliferasyon sergiler ve normal hücrelerden farklı bir popülasyon içerir (Bordon, 2018). Hücre, normal şartlarda herhangi bir hücresel bozukluğu algıladığında kendini öldürerek apoptoz mekanizmasını indükler. Fakat tümör hücreleri apoptoz mekanizmasını bloke ederek apoptoz yolağında rol alan sinyallere yanıt vermez. Bu nedenle tümör hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğalır ve vücudun homeostazisini etkiler (Witsch ve ark., 2010).



Şekil 2-1 Normal hücre ve kanser hücresi proliferasyonu

Yüzün üzerinde farklı kanser türü vardır, bu türler kökenlerine veya hücre tipine bağlı olarak sınıflandırılır ve bu nedenle her kanserin moleküler mekanizması birbirinden farklı özelliklere sahip olabilir. Her kanser türüne ait farklı karakteristik özellikler olmasına rağmen tüm kanser tipleri için ortak özellikler de mevcuttur (**Şekil 2-2**). Kanserin temel olarak bilinen altı özelliği; büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyüme engelleyici sinyallere duyarsızlık, programlanmış hücre ölümünden (apoptoz)

kaçınma, sınırsız çoğalma potansiyeli, sürekli anjiyogenez, doku istilası ve metastazıdır (Hanahan ve Weinberg, 2000).



Şekil 2-2 Kanserin altı temel özelliği

Proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olarak adlandırılan iki gen sınıfı kanseri tetiklemede önemli bir rol oynar. Bu iki gen grubu, hücre proliferasyonunu ve büyümesini etkileyen çok sayıda protein türünü kodlar (Lodish ve ark., 2000). Normalde protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin aktiviteleri denge halindedir. Büyümenin düzenlemesini kontrol eden proteinler olan protoonkogenlerin, onkogen haline dönüşümü hücre büyümesinin kontrol mekanizmasını bozmakta, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmalarına ve büyümelerine yol açmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012). Tümör baskılayıcı genler ise onkogenlerin aksine, hücre proliferasyonunu bloke eder. Tümör baskılayıcı genler tarafından eksprese edilen proteinler, hücre büyümesini normal seviyelerde tutar ve hücresel çoğalmayı kontrol eder, bu nedenle tümör oluşumunu önlerler. Ancak bu genlerde meydana gelen mutasyonlar hücre bölünmesinin kontrolünü engeller ve hücre kontrolsüz olarak bölünmeye başlar (Sakajiri ve ark., 2001).

Kanser dört evreden oluşur;

1.Evre'de, kanser hücreleri ile sağlıklı hücrelerin birbirlerinden farklı olmaları nedeniyle kanserli hücrelerin tespiti oldukça kolaydır. Kanser hücreleri bölgesel olarak bulunmaktadırlar.

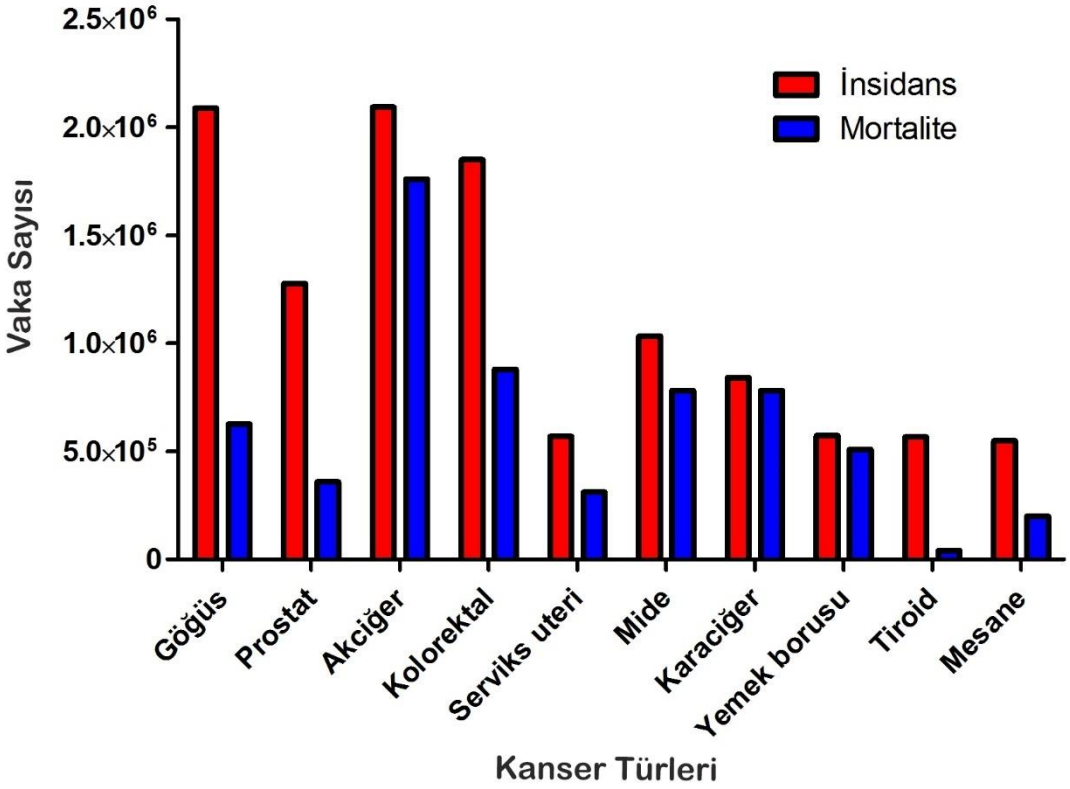
2.Evre'de, tümör büyüklüğünde artma görülür. Kanser hücreleri lenf sistemine ulaşarak dokulara hızlı bir şekilde yayılma eğilimi göstermektedir.

3.Evre'de, tümör bölgesel olmaktan çıkarak diğer doku ve organlara doğru yayılma eğilimindedir.

4.Evre'de, tümörler tüm vücudu sarmak üzeredir.

Kanser oluşumu pek çok farklı etkenlere bağlanabilir. Bu etkenler arasında sigara, tütün, alkol bağımlılığı, yanlış beslenme alışkanlıkları, güneş kaynaklı ultraviole ışınları gibi bazı çevresel faktörler, radyoaktif maddeler, enfeksiyonlar, obezite, stres, genetik faktörler ve sedanter yaşam tarzı yer alır. Tüm bu etkenlere ek olarak yaşın ilerlemesi ile beraber kanser riski de katlanarak artar. Kanserlerin yaklaşık %60'ı 65 yaş ve üstü insanlarda görülürken, kanserlerin neden olduğu ölümlerin yaklaşık %70'i de bu aşamada meydana gelir (Estape, 2018).

Amerikan Kanser Derneği'nin 2019 yılı istatistiklerine göre, yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 1.762.450 yeni kanser vakası ve 606.880 kansere bağlı ölüm gerçekleşeceği tahmin edilmektedir (Siegel ve ark., 2019). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılı istatistiklerine göre ise tüm kanser türlerinin insidans ve mortalite oranları **Şekil 2-3**'de verilmiştir.



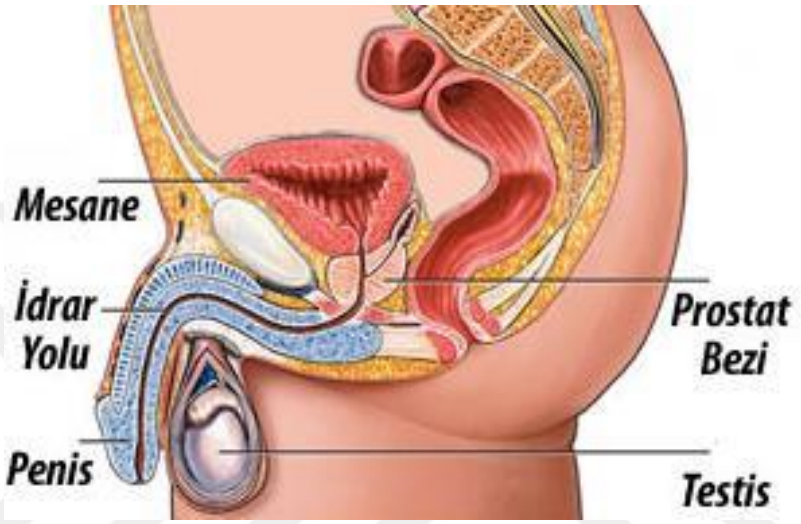
Şekil 2-3 2018 yılında görülen kanserler üzerinde, her iki cinsiyette, her yaşta tahmini insidans ve mortalite oranları (Dünya) (Today, 2020a)

Kanserle ilişkili tüm bu yüksek rakamlar nedeniyle, sürekli artan kanser vakalarının tedavi seçenekleri sadece yeni antikanser ilaçların keşfini ve geliştirilmesini gerektirmekle kalmaz, aynı zamanda mevcut antikanser ilaçların da iyileştirilmesini gerektirir (Gala ve ark., 2020).

2.2. Prostat Kanseri Hakkında Genel Bilgiler

2.2.1. Prostat

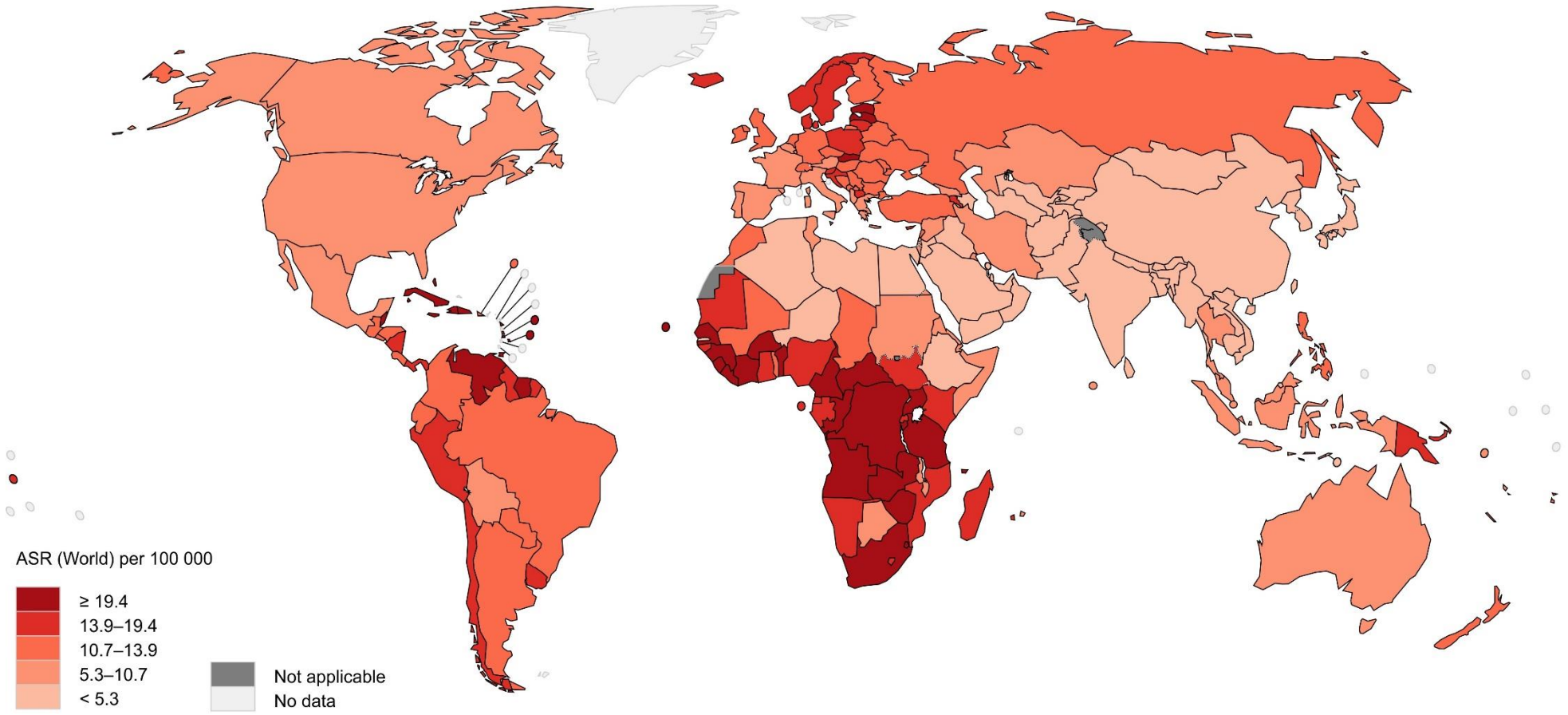
Prostat, mesanenin hemen çıkışında bulunan ve üretrayı çevreleyen erkek üreme sisteminin bir parçasıdır. Erkeklerde prostat, spermi besleyen ve koruyan seminal sıvıyı salgılar ve yaklaşık olarak kestane büyüklüğünde küçük bir bezdir (Wilson, 2014). Prostat salgıları, erkek üreme hücresi sperminin dişi üreme sisteminde hayatta kalmasına izin verir (Lee ve ark., 2011).



Şekil 2-4 Prostat bezi (Gürsoy, 2019)

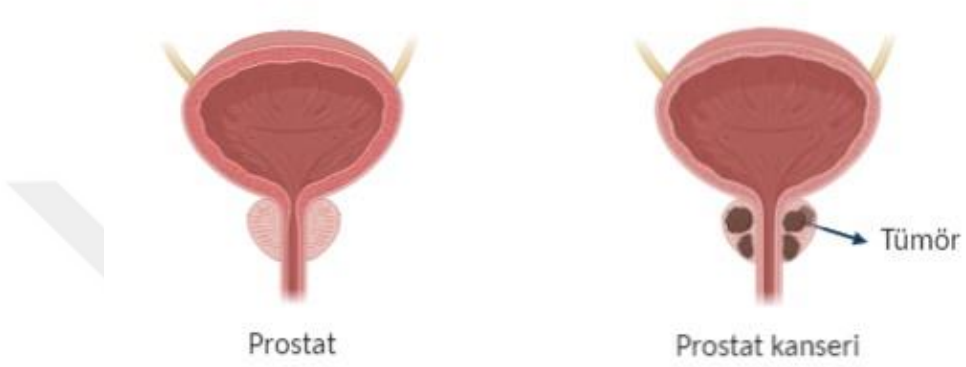
2.2.2. Prostat Kanseri

Prostat kanseri (PCa), dünya çapında, akciğer kanserinden sonra bir milyonun üzerinde yeni vaka ve 2018'de yaklaşık 360.000 ölüme neden olan, erkekler arasında ikinci önde gelen kanser ve beşinci önde gelen ölüm nedenidir (Bray ve ark., 2018). Yaşlı erkek popülasyonunda PCa en sık malignite tanısı almaktadır. Prostat kanseri dışındaki farklı nedenlerden ölen ve ölüm anında 50 yaşın üzerinde olan erkeklerin neredeyse %30'unun otopside PCa kanıtı gösterdiği ve bunun yaşla birlikte önem kazandığı bulunmuştur (Carter ve ark., 2013; Bashir, 2015).


ASR (World) per 100 000
≥ 19.4
13.9–19.4
10.7–13.9
5.3–10.7
< 5.3
Not applicable
No data

Şekil 2-5 Prostat kanseri mortalitesinin tüm yaşlarda ülkelere göre dağılımı (Today, 2020b)

Prostat kanseri risk faktörleri arasında ileri yaş, ailesel yatkınlık, genetik, ırk, diyet, hormonal ve çevresel faktörler yer almaktadır. Prostat kanseri genellikle yavaş büyür ve başlangıçta ciddi zarar veremeyeceği prostat beziyle sınırlı kalır. Ayrıca gizli kalma süresi uzundur ve klinik olarak belirgin olması 10 ila 12 yıl alır (Brooks ve ark., 2001).



Şekil 2-6 Sağlıklı prostat ve prostat kanseri

Prostat kanserleri testosteron bağımlılığına göre iki ayrı grupta sınıflandırılmıştır. Prostat kanseri hücreleri eğer testosteron varlığında büyüyorsa "androjene bağımlı" ya da "androjene duyarlı" olduğu söylenir. Erken evrede olan prostat kanserleri, büyüme ve hayatta kalma için androjenlere bağlıdır. Çok düşük seviyelerde testosteron ile büyüyebilen prostat kanseri hücreleri ise "androjen duyarsız" ya da "androjenden bağımsız" kanserler olarak adlandırılır. Bu durumda, prostat kanseri hücreleri büyümek için testislerden karşılanan testosteron kaynağına gerek duymaz. Kanser, vücutta kalan testosteronun geri kalanıyla büyümeye devam eder. Ayrıca ameliyatla iyileşmeyen prostat kanserleri sonunda androjen duyarsız hale gelir (Huggins ve Hodges, 1972; Feldman ve Feldman, 2001; Konaç ve Sözen, 2014).

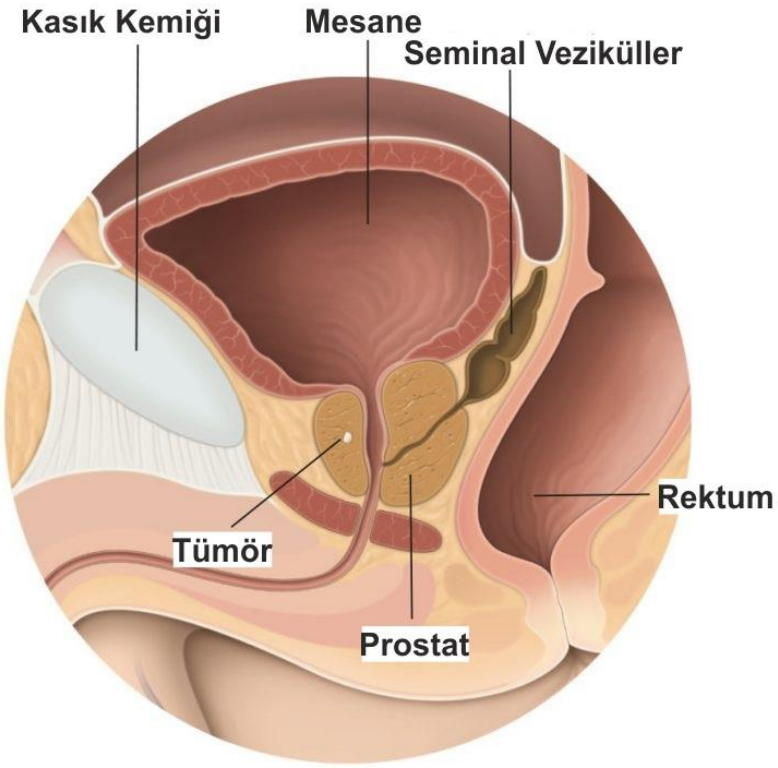
Prostat kanseri 4 evreden oluşur;

1.Evre'de kanser küçüktür ve sadece prostatta lokalizedir (**Şekil 2-7**).

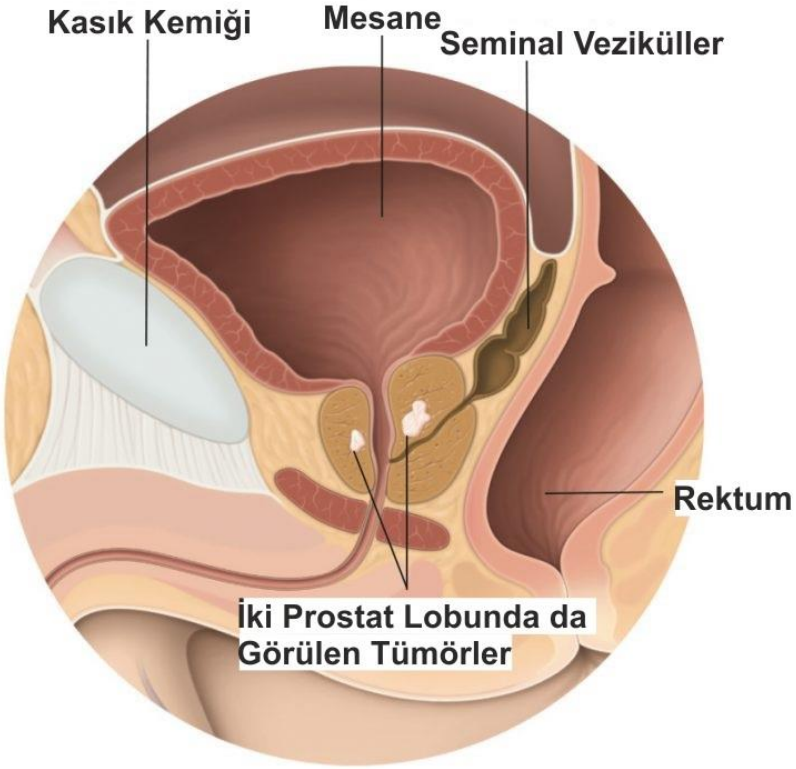
2.Evre'de kanser daha büyüktür ve prostatın her iki lobunda da olabilir, ancak yine de prostat ile sınırlıdır (**Şekil 2-8**).

3.Evre'de kanser, lenf bezleri veya seminal veziküller tarafından kapatmak için prostatın ötesine yayılır (**Şekil 2-9**).

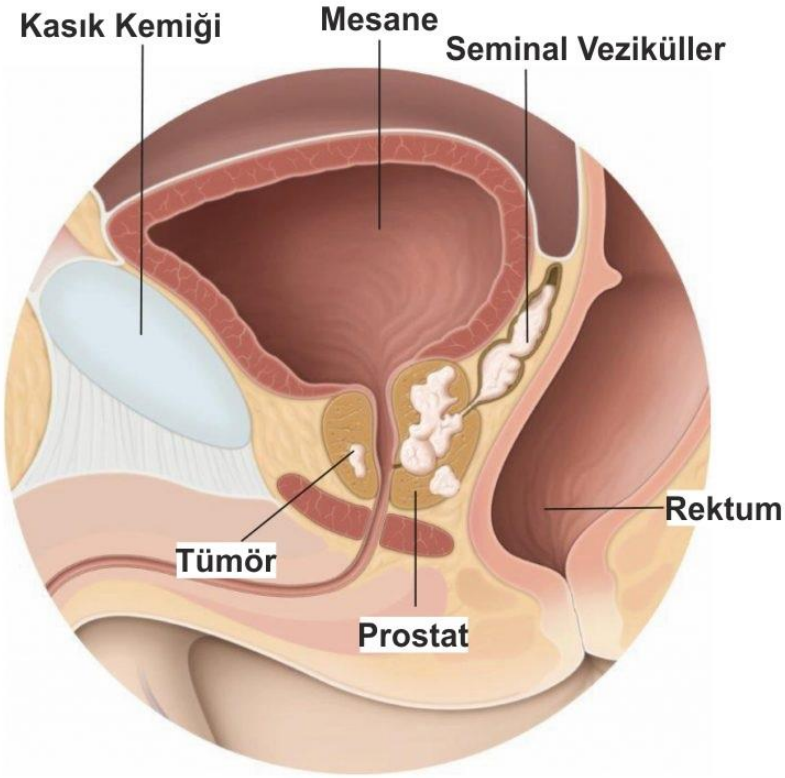
4.Evre'de kanser, kemik gibi diğer organlara yayılmıştır ve metastatik veziküller olarak adlandırılmaktadır (**Şekil 2-10**). (Institute, 2020)



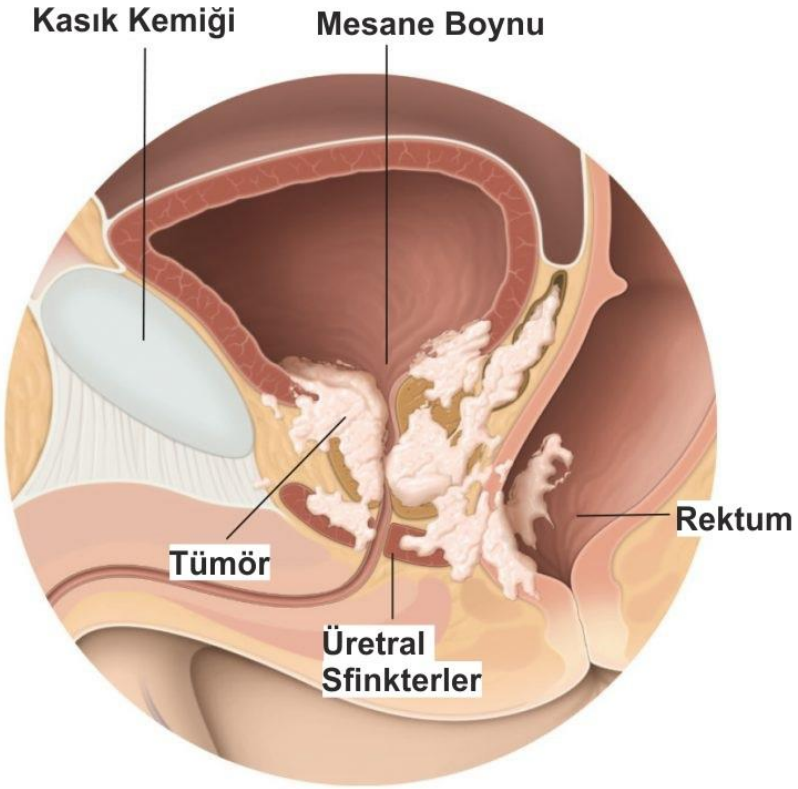
Şekil 2-7 1.evre prostat kanseri (Urology, 2018)



Şekil 2-8 2.evre prostat kanseri (Urology, 2018)

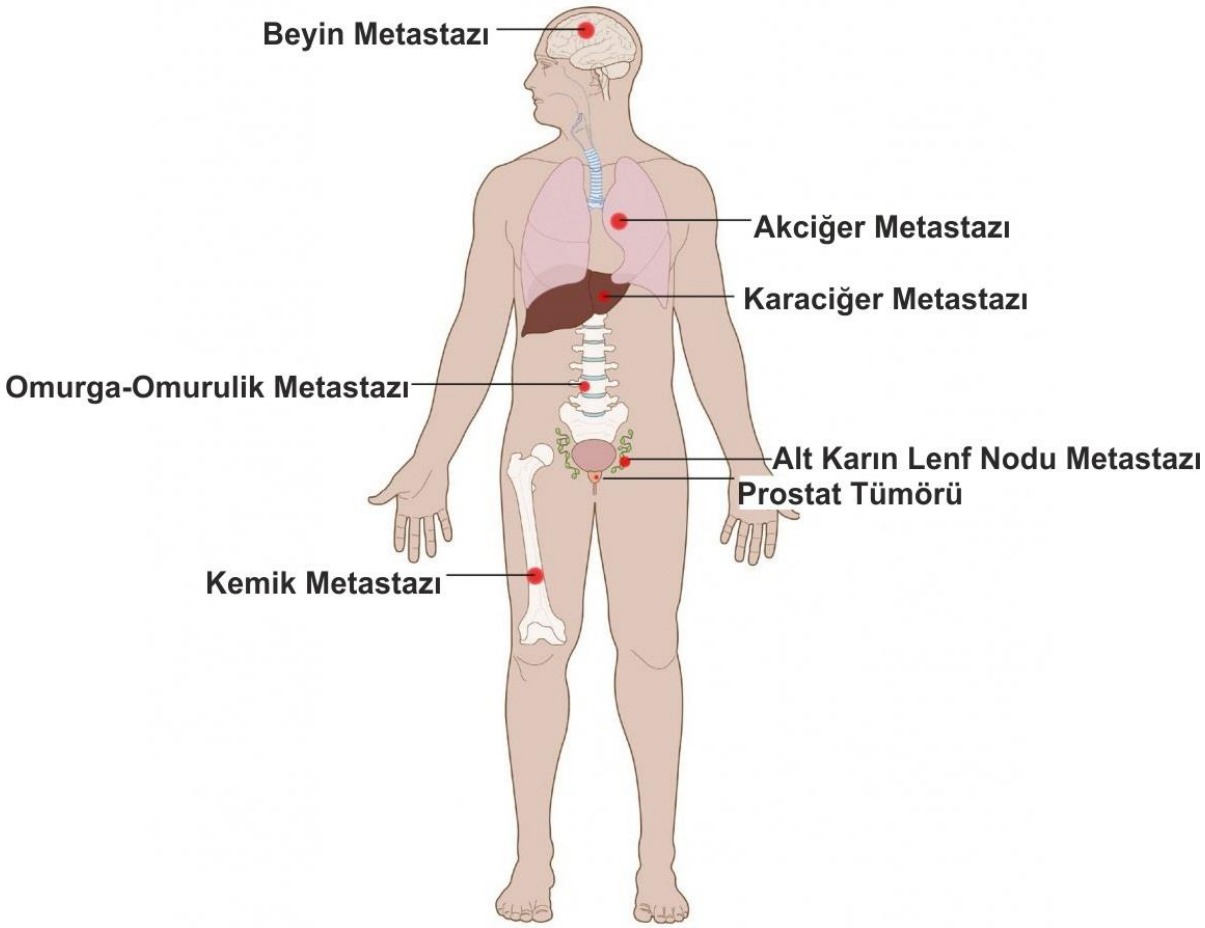


Şekil 2-9 3.evre prostat kanseri (Urology, 2018)



Şekil 2-10 4.evre prostat kanseri (Urology, 2018)

Prostat kanserinin yaptığı farklı metastaz yerleri; beyin, akciğer, karaciğer, omurga-omurilik, alt karın lenf nodu ve kemik olarak **Şekil 2-11**'de gösterilmiştir (Urology, 2018).



Şekil 2-11 Prostat kanserinin metastaz yaptığı bölgeler (Urology, 2018)

2.2.3. Prostat Kanseri Tedavisi

Prostat kanserinin tedavisi, cerrahi (radikal prostatektomi, RP), radyoterapi (RT), hormonal tedavi (HT), neoadjuvan hormonoterapi (NHT) ve androjen çekilme tedavisi (AÇT) yaklaşımları kullanılarak gerçekleştirilir (Heidenreich ve ark., 2008).

Prostat kanseri tedavisi için kullanılacak olan yöntem kanserin hangi evrede olduğuna göre değişiklik göstermektedir. Bu nedenle kanser sürecinin ilerlediği hastalar tedaviye dirençli hale gelmektedir ve tedavi seçenekleri zorlaşmaktadır. İleri seviye prostat kanseri hastalarında antiandrojen maniplasyonu, östrojen tedavisi, Gemsitabin, Doksorubisin ve Paklitaksel gibi kemoterapötik ilaçlar ve Resveratrol, Kurkumin gibi bitkisel tedavilerin kullanımı yaygındır (Batur ve ark., 2015). Ancak kullanılan bu tedavi yöntemlerinin kazanılan ilaç direnci ve buna bağlı olarak kullanılacak dozun yetersizliği

ya da doza bağımlı yan etkiler prostat tedavisi için yeterli olmamakla birlikte çoğu zaman sadece hastanın sağ kalım oranını arttırmaktadır.

Bahsi geçen geleneksel tedavilere ve başarısız uygulamalara ek olarak yeni ilaç tasarımları, yeni tedavi seçenekleri aranmaktadır. Her alanda oldukça başarılı bir şekilde kendini gösteren nanoteknoloji alanı prostat kanseri tedavisinde de günümüzde artarak yerini almaya başlamıştır. Nanoteknolojinin terapi, teşhis ve biyolojik görüntülemede kullanımı Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından "nanotıp" olarak adlandırılmaktadır. Bu terim, spesifik moleküllerin biyouyumlu nano taşıyıcılar tarafından çoğunlukla tümör hücrelerini hedefleyerek terapiye yanıt vermesini ve buna ek olarak daha az yan etkilerle bu tedavinin gerçekleştirilmesini içerir (Moghimi ve ark., 2005).

Prostat kanseri tedavisinde kullanılan nano boyutta modifiye edilmiş metotlar çoğu zaman nanopartiküllerin yüzeyini, reseptörleri ile prostat kanseri hücrelerinin yüzeyine spesifik olarak bağlanabilen ligandlarla modifiye ederek aktif taşıma yolu ile tümör hücrelerine iletebilen yöntemleri içermektedir. B grubu vitaminlerinden olan folik asit, hücre çoğalmasında önemli bir role sahiptir. Folik asit baş ve boyun, göğüs, yumurtalık, rahim ve prostat kanserinin hücre zarları folik asit reseptörlerini eksprese edebilir. Changizi ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada; folik asitle kombine edilen altın nanopartiküller prostat kanseri tedavisinde hedeflemeyi kolaylaştırarak radyasyon tedavisi etkinliğini arttırmıştır ve ek olarak altın nanopartiküllerin floresans özellikleri nedeniyle hücre içindeki görüntülemeleri gerçekleştirilmiştir (Changizi ve ark., 2019).

Ebru ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada Doksataksel yüklü insan serum albumin nanopartikülleri I^{131} ile radyoaktif olarak etiketlenerek hem nükleer görüntülemede hem de prostat kanserinin radyoterapisinde kullanılabilecek uygun bir ajan geliştirilmiştir (Ertugen ve ark., 2020).

Ke Zhang ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada ise *Salvia miltiorrhiza* bitki ekstraktından yeşil sentez yoluyla sentezlenen gümüş nanopartiküllerin prostat kanseri hücresi üzerinde antikarsinojenik etkiler sergilediği ve ek olarak *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumonia* bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkileri kanıtlanmıştır (Zhang ve ark., 2019).

2.3. Nanoteknoloji Kavramı ve Nanoteknoloji Tabanlı Terapötik Yöntemler

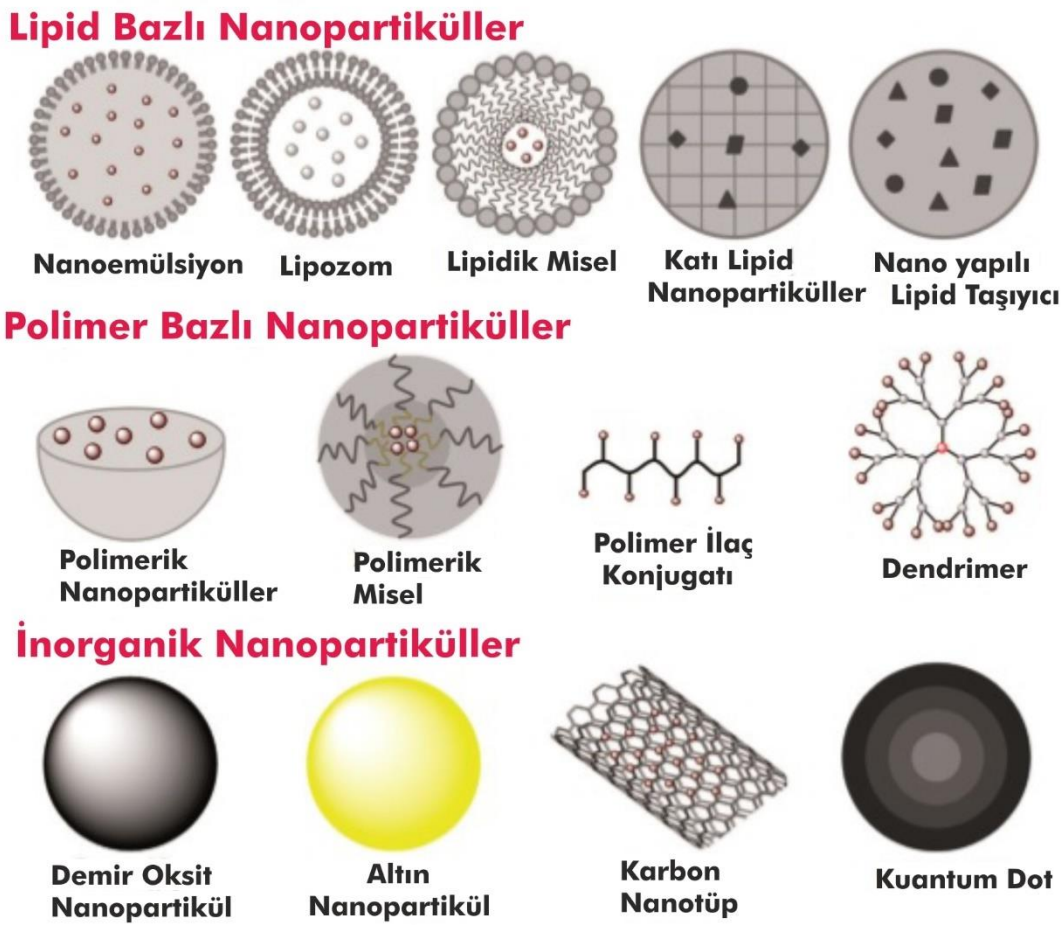
Nanoteknoloji ifadesi ilk kez Richard Phillips Feynman tarafından 1959 yılında ortaya atılmıştır. Nano kelimesi Yunanca "cüce" anlamını taşır ve herhangi bir birimin milyonda biridir.

Bawa (2007) tarafından yapılan tanımlamaya göre nanoteknoloji yapısal olarak kontrollü bir işleme yöntemi ile nanometrik ölçekte elde edilen, en azından bir tür yeni nesil karakteristik özelliklere sahip yapılar ve aygıtların üretimini sağlayan sistemlerdir (Bawa, 2007). Çevre, enerji, tekstil, elektronik, üretim, ziraat, tıp ve biyomedikal gibi alanlarda geniş bir yelpazede kullanılmaktadır.

Tıpta nanoteknoloji, yaşayan sistemlere moleküler seviyelerde müdahale ederek yaşayan organizmalar ile etkileşime geçebilecek boyutlarda araçlar üretilmesi, hastalığın bulunduğu veya yayıldığı bölgelere saldırarak ilaç veren makine tasarımları, çeşitli hastalıkların görüntülenmesi ve teşhis edilmesi, hastaların tedavilerine yönelik gelişmeleri içermektedir (Emerich ve Thanos, 2003; Surendiran ve ark., 2009).

Nanoteknoloji çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisi için güncel yaklaşımlar içermektedir. Bu nedenle kanseri de içinde barındırarak çoğu hastalık için umut vaad etmektedir. Son yıllarda nanoteknoloji, hedeflenen bölgeye spesifik olması ve antikanser ilaçların güvenli ve etkili bir şekilde taşınımını gerçekleştirebilmesinden dolayı, çoğu kanser türünün terapötik etkinliğinde oldukça önemli bir alan haline gelmiştir (Haley ve Frenkel, 2008). Bu nedenle kanserin teşhis ve tedavisinde nanoteknolojinin kullanılması kemoterapi gibi konvansiyonel tedavilere göre çok büyük avantajlar teşkil etmektedir.

Hedeflenmiş ilaç taşınımında kullanılan çeşitli nano-taşıyıcılar **Şekil 2-12**'de gösterilmektedir.



Şekil 2-12 Hedeflenmiş ilaç taşınımında kullanılan çeşitli nano yapılar (Akhter ve ark., 2018)

Nanoteknoloji tabanlı terapötik yöntemler;

- Polimerik nanopartiküller,
- Fotodinamik terapi,
- Polimerik miseller,
- Lipozom bazlı taşıyıcılar,
- Dendrimerler,
- Kuantum noktalar,
- Karbon nanotüpler,
- Nano yapılı lipid taşıyıcıları içermektedir.

Polimerik nanopartiküller; doğal (proteinler, polisakkaritler) ya da sentetik (önceden sentezlenenler, üretim sırasında sentezlenenler) yapıda bulunan polimerler ile hazırlanan, taşınacak maddenin partikül içinde çözdürüldüğü, hapsedildiği veya yüzeye adsorbe edildiği boyutları 10-1000 nm arasında değişen sistemlerdir (Derman S. ve ark., 2013). Doğal polimerler olarak kitosan, aljinat, jelatin ve albumin sayılabilirken, sentetik polimerlere polilaktid, poliakrilat ve polimetakrilat örnek verilebilir. Polimerik nanopartiküllerin üretim teknikleri oldukça basittir, kolaylıkla sterilize edilebilir, parçalanma ürünleri toksik değildir, etkin madde yükleme kapasiteleri yüksektir, etkin maddenin hedef bölgede salınımını sağlarlar.

Fotodinamik terapi; moleküler oksijen ile kullanılan ışığı ve fotosensitizer olarak adlandırılan ışığa duyarlı hale getirici bir kimyasal maddeyi içererek hücre ölümünü ortaya çıkarmak için kullanılan bir fototerapi şeklidir ve son zamanlarda malign kanser büyümesine daha derinden nüfuz edebilen nanopartikülleri geliştirmiştir (Saini ve ark., 2016). Fotodinamik terapi baş, boyun, akciğer, mesane, prostat, göğüs ve kolon kanserlerinde kullanılır. Fotosensitizerler genellikle mitokondri ve lizozomlar dahil olmak üzere hücresel organellerde lokalizedir ve tümör hücreleri için bazı seçiciliğe sahiptir. Fotosensitizörün aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinin üretimine ve doğrudan tümör hücresi ölümüne yol açar (Gollnick ve Brackett, 2010).

Polimerik miseller; bir sıvı içinde amfifilik makromoleküllerin birleşmesiyle kendiliğinden oluşan misellerin nanoboyuttaki sistemleridir. Polimerik miseller istenilen bölgeye hedeflendirmek için uygundurlar, etkin maddenin biyoyararlanımını artırırlar ve olası yan etkileri azaltırlar. Misellerin büyüklüğü, suda çözünmeyen antikanser ilacı vermek için uygun olan 100 nm'ye kadar değişir ve polimerik miseller yüksek taşıma yükü, kan akışında uzun dolaşım süresi ve yüksek ilaç geçirgenliği açısından tercih edilmektedir (Akhter ve ark., 2018).

Lipozom bazlı taşıyıcılar; Lipozomlar hücre membranına benzer ve fosfolipid bir yapıda, çift lipid tabaka (bilayer) halinde olan, toksik olmayan ve biyolojik açıdan inert malzemelerdir (Vural ve Özer, 2015). Lipozomlar, biyolojik membranları bozularak terapötik bir ajan olarak kullanılabilir. Lipozomlar çoğunlukla fosfolipidlerden oluşur ve sahip oldukları hidrofilik ve hidrofobik bölgeler sebebiyle suda ve yağda eriyen molekülleri taşıyabilme özelliğine sahiptir. Lipit bazlı sistemler çeşitli anti-kanser ilaçları

olarak birbirinden farklı hazırlama yöntemleri ile hazırlanabilmektedir. Hazırlanan bu formülasyonlar ilgili ilaçların farmakodinamiğini ve farmakokinetiğini geliştirerek etkili bir taşıma sistemi gerçekleştirebilmektedirler (Wang ve ark., 2008).

Dendrimerler; bir çekirdek, çekirdek etrafında bulunan dallanmalar ve yüzey gruplarından oluşan, küresel yapıda bulunan moleküllerdir. Bu dallar arasına, reaktif olabilen fazla sayıdaki uç grupları sayesinde çeşitli moleküller ilave edilebilir (Bulut ve Akar, 2012). Böylelikle ortalarında iç boşluk bulunduran dendrimerler etkin maddenin korunmasını sağlar ve etkin maddenin kontrollü salınımını gerçekleştirir (Karabulut ve ark., 2015). Dendrimerler özel uygulamalar için sentezlenebilir veya tasarlanabilir. Ayrıca dendrimerler; düzgün şekilleri, yüksek taşıma kapasiteleri, kolay yüzey modifikasyonları, yüksek biyobozunur ve biyouyumluluk özellikleriyle son yıllarda kanser tedavisi için tercih edilmektedir (Akhter ve ark., 2018).

Kuantum noktalar; Yarı kristal nanopartiküller olarak da bilinen kuantum noktalar ayarlanabilir boyutları yardımıyla ışık emisyonuna sahip olması ve yüksek sinyal parlaklıkları ile farklı elektronik ve optik özellikler göstermektedir (Özada, 2016). Kuantum noktalar kolay sentezlenebilir ve düşük toksisitiye sahiptir. Bu nedenle son yıllarda kullanımları oldukça artan kuantum noktaların biyomedikal uygulamaları arasında mikroskopi, akış sitometrisi, fotodinamik terapi, ilaç taşıma, hücre görüntüleme, tümör hedefleme ve tedavisi yer alır (Maiti ve Bhattacharyya, 2013).

Karbon nanotüpler; Grafen düzleminin silindir şeklinde bükülerek uçlarının birleştirilmesi ile oluşur. Karbon nanotüplerin zikzak yapan nanotüp, koltuk tipi nanotüp ve chiral tip nanotüp olmak üzere üç farklı yapısal oluşumu mevcuttur. Ek olarak birkaç sarım üst üste yapılarak çok duvarlı nanotüpler oluşturulabilir ve böylece mukavemet artışı gerçekleşir (Küçükyıldırım ve Eker, 2012). Karbon nanotüpler biyomedikal alanında hücre etiketleme, optik sensörler (Heller ve ark., 2005) ilaç taşıma (Hindumathi ve ark., 2018) gibi alanlarda kullanılmaktadır.

Nano yapılı lipid taşıyıcıları; Biyolojik olarak parçalanabilen ve biyouyumlu katı lipitlerin yüzey etken maddeler ile stabilize edildiği kolloidal sistemlerdir. Nano yapılı lipid taşıyıcıları lipozomlara ve polimerik nanopartiküllere alternatif bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Nano yapılı lipid taşıyıcıları yüksek ilaç yükü kapasitesine sahiptir,

lipofilik ve hidrofilik ilaçların bir arada kullanılmasına olanak sağlar, taşınacak ilacı hedeflendirererek kontrollü salınımını gerçekleştirir ve büyük ölçekli olarak sentezlenebilir (Mehnert ve Mader, 2001; Harde ve ark., 2011).

2.4. Nanopartiküller

100 nm ve altında kalan tozlar olarak tanımlanan nanopartiküller virüsler ve proteinlerle benzer boyuttadır. Nanopartiküller nano boyutun dolayısıyla da nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır. Metal bazlı, polimer bazlı, lipid bazlı ve protein bazlı olarak tasarlanabilen nanopartiküller kullanım amacına göre hazırlanmaktadır.

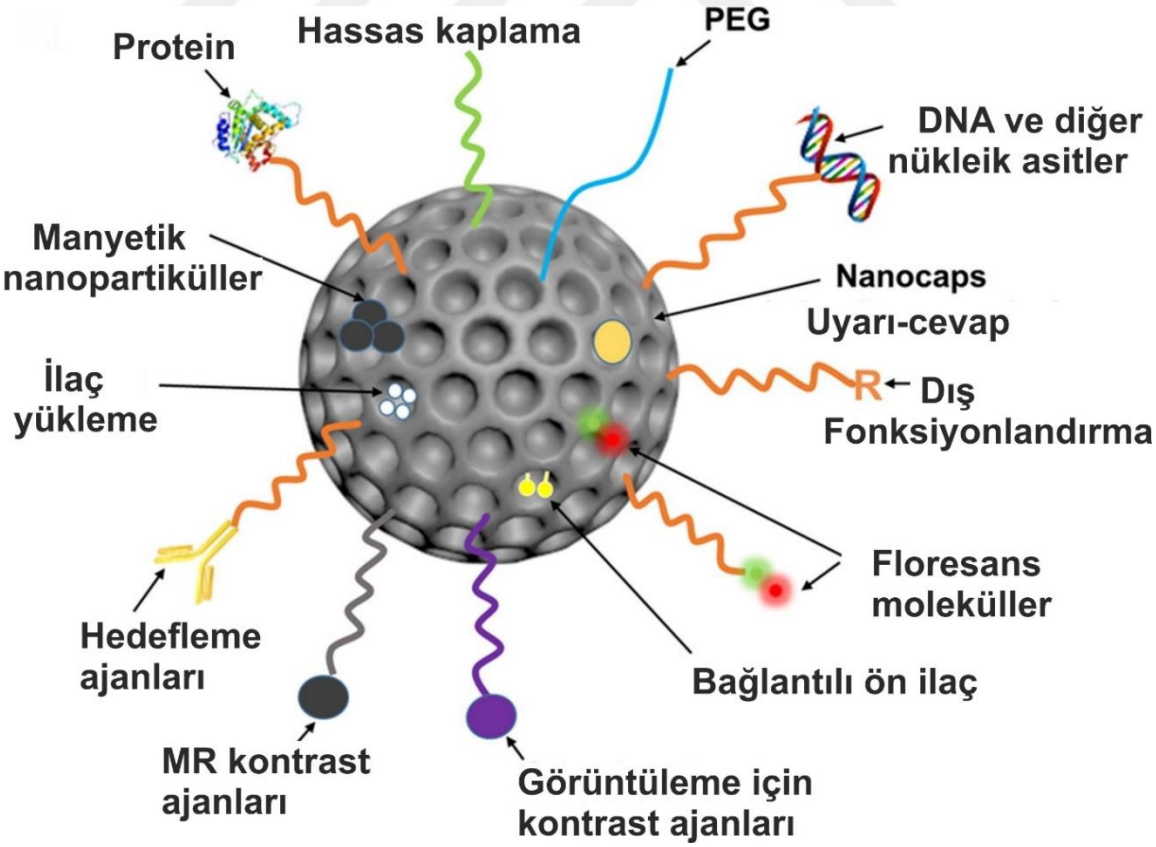
Günümüzde nanopartiküller geniş çeşitlilikteki biyolojik ve biyokimyasal uygulamalarda aktif olarak kullanılmaktadır (Dykman ve Khlebtsov, 2012). Nanopartiküller diğer moleküllerle kıyaslandıklarında çok daha geniş bir reaktif yüzey alanına sahip olup bu nedenle birçok makro/mikro molekülle etkileşim halinde bulunabilirler ve bundan dolayı da diğer moleküller ile karşılaştırıldıklarında çok daha fazla etkiye sahip oldukları görülmektedir. Uygulama alanları (Cerrahi, protez malzeme, doğum kontrol, ilaç taşınımı, herhangi bir hastalığın teşhis ve tedavisi) giderek artmaktadır (Abou El-Nour ve ark., 2010; Tsai ve ark., 2010).

Geleneksel tedavi yöntemleri ile kıyaslandıklarında nanopartiküller ve nanopartikül bazlı ajanlar küçük boyutları, geniş yüzey/hacim oranları, modifiye edilebilirlikleri, uzun süre dolaşım sisteminde kalabilmeleri ve hücre zarından kolaylıkla geçebilmelerinden dolayı terapötik ajan olarak kullanımlarında büyük bir avantaj sağlamaktadırlar. Nanopartiküllerin etkinliklerini belirleyen boyut ve yüzey alanları bu partiküllerin büyüklükleri ile orantılı olup partikül boyutu arttıkça hücre içerisine girişleri de zorlaşacaktır ve bunun yanında nanopartiküllerin modifiye edilebilirliği ile yüzeyleri ne kadar aktifse hücreye o kadar kolay ulaşacaktır (Hostetler ve ark., 1998b). Nanoparçacıkların yüzey alanları çapları ile ilişkili olup kullanılan nanoparçacığın büyüklüğüne bağlı olarak da farklı etki göstermesi beklenmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde birçok nanoparçacığın çeşitli insan kanser hücreleri üzerine etkileri araştırılmış ve bunların belirli konsantrasyonlarda karaciğer, meme, kolon ve akciğer kanseri gibi birçok kanser üzerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Dong ve ark., 2019).

2.4.1. Silika Nanopartiküller

Silika nanopartiküller, ucuz, zararsız, üretilmesi ve işlevselliği kolay olduğu için kullanım açısından geniş bir yelpazeye sahiptir. Silika nanopartiküllerin biyomedikal uygulamalardaki tercih sebepleri ise yüksek biyouyumlulukları, düşük toksisiteleri, kolayca fonksiyonlandırılabilmeleri ve hedefli ilaç taşınımında oldukça başarılı olmalarından kaynaklanmaktadır. Farklı çalışmalar için silika nanopartiküllerin boyutunu, yüzey alanını, gözenek boyutunu ve şekillerini hassas bir biçimde kontrol etmek mümkündür (Yen Yua ve Chang Chen, 2003; Liberman ve ark., 2014).

Silika nanopartiküllerin birçok yüzey modifikasyonu, kimyasal veya ilaç yükü ve bölgeye hedeflemeyi modüle etmek için yüzey kimyasının kontrolü sahip olduğu silanol grupları ile mümkün olmaktadır (Liberman ve ark., 2014). Silika nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan hidroksi grupları organik bileşikler ya da polimerler ile kolaylıkla hazırlanabilir ve silanol gruplar farklı kimyasal yöntemlerle kolaylıkla fonksiyonelleştirilebilmektedir **(Şekil 2-13)**.



Şekil 2-13 Silika nanopartiküllerin nanotıptaki rolü (Chen ve ark., 2018)

Silika nanopartiküllerin düzenli gözenek yapıları ve yüksek miktarda ilaç barındırma kapasitesinden dolayı ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasına odaklanan çok sayıda çalışma bildirilmiştir (Karimi ve ark., 2016). Yanzhuo Zhang ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada Telmisartan gibi zayıf çözünen ilaçlar için oral ilaç dağıtım sistemi olarak küresel yapıdaki silika nanopartiküllerin potansiyel uygulamalarını göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2012). Dr. Xiaoxi Hu ve ark. (2013), sentezledikleri silika nanopartiküllerin yüzeyine 3-glisidiloksi propil trimetoksisilan (GTPMS) bağlayarak pH'a duyarlı hale getirmişlerdir. Daha sonra bu yapının yüzey modifikasyonu kitosan ile gerçekleştirilmiştir. Kitosan ile dekore edilen GTPMS-silika nanopartiküllere anti-kanser bir ilaç olan Doksorubisin yüklenerek meme kanseri hücresi üzerinde akıllı ilaç taşıma sistemi gerçekleştirilmiştir (Hu ve ark., 2014). Zhengfang Tian ve ark. yaptıkları çalışmada (2017) aldehit ile fonksiyonelleştirilmiş dendritik silika nanopartiküllere sığır serum albümini (BSA) yüklenerek protein ilaç taşıma sistemi tasarlanmıştır (Tian ve ark., 2017).

2.4.2. Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri

Nanoteknolojinin çeşitli alanlarda uygulanmasından dolayı nanometre ölçeğinde kontrol sağlamak amacıyla uygun teknikler ve özel üretim yöntemleri geliştirilmektedir. Nanopartiküller için üretim iki ana yöntem izlenerek yapılabilir; "yukarıdan-aşağıya üretim yaklaşımı" ve "aşağıdan-yukarıya üretim yaklaşımı" (**Şekil 2-14**).

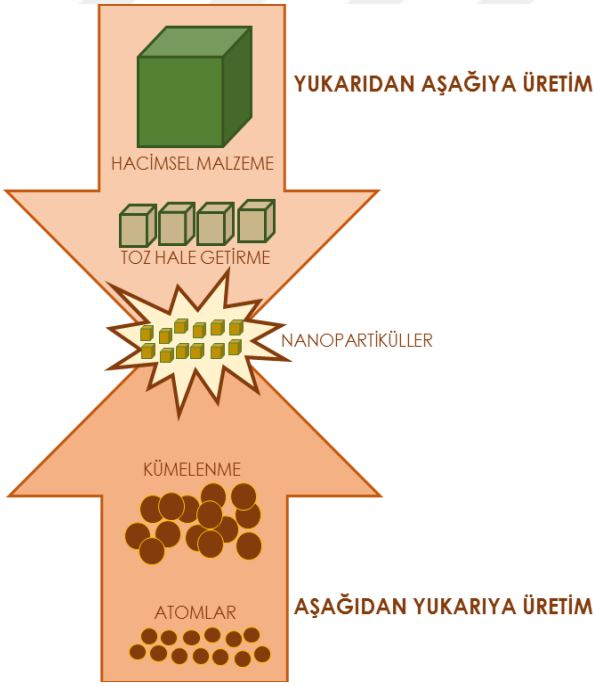
2.4.2.1. Yukarıdan-Aşağıya Üretim Yaklaşımı

Yukarıdan aşağıya üretim tekniklerinde temel olarak kütlesel malzeme ele alınır, ardından şekillendirilip modifiye edilerek istenilen ürüne dönüştürülür. Malzemenin nano boyuta kadar inebilmesi için dışarıdan kimyasal veya mekanik kuvvet uygulanarak enerji verilmesi gerekir. Bu yaklaşımda özel işleme, aşındırma ve yüzey şekillendirme teknikleriyle mikroskobik yapıda bulunan elementlerin boyutları nanometre ölçeğine kadar indirilir (Ateş ve Bahçeci, 2015).

Yukarıdan aşağıya üretim yaklaşımına verilebilecek en güzel örnekler aşındırma, mekanik öğütme, dağlama, litografi ve yüksek enerji yöntemleri olabilir. Bu yöntemlerde basit bir öğütme işlemine göre daha fazla enerji tüketimi gerçekleşir (Gürmen ve Ebin, 2008).

2.4.2.2. Aşağıdan Yukarı Üretim Yaklaşımı

Aşağıdan yukarı üretim tekniklerinde atomik veya moleküler kümeler kimyasal reaksiyonlarla düzenlenerek daha büyük sistemlere dönüştürülür. Aşağıdan yukarı üretim teknikleri temelde kendiliğinden düzenlemenin ilkelerini esas alarak moleküler sistemlerin seçici olarak fiziksel ve ya kimyasal bağ yapmalarından faydalanır. Atomik ve moleküler seviyede bulunan elemanların kümeler, çok moleküllü yapılar ve organik örgüler oluşturmak üzere kontrollü bir şekilde bir arada toplanması sağlanır (Ateş ve Bahçeci, 2015). Kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma, gaz yoğunlaştırma, sprey piroliz, alev sentezi, moleküler hüzme ve sol jel yöntemleri aşağıdan yukarı üretim tekniklerinin en çok kullanılan yöntemleridir (Gürmen ve Ebin, 2008).



Şekil 2-14 Nanopartiküllerin sentezinde kullanılan temel yöntemler

2.4.3. Silika Nanopartikül Sentezi

Silika nanopartikül sentezi için genel olarak ters mikroemülsiyon, alev sentezi ve sol-jel yöntemleri kullanılmaktadır. Mikroemülsiyon sistemlerde oluşan nano boyuttaki su küreleri kullanılan yüzey aktif maddesinin suya oranına göre farklılaşmaktadır. Bu oranın 15'in altında olması ile ters misel oluşurken 15'in üzerinde olduğu durumlarda mikroemülsiyon sistemler oluşur. Ters mikroemülsiyon sisteminde, yüzey aktif maddeler organik bir çözücü içerisinde çözüldüğünde küresel miseller oluşur ve su varlığında kutup başları kendilerini organize ederek ters misel yapısını oluşturur. Silika nanopartiküller sentezlenirken ters misel içeren ortama silikon alkoksitler ve katalizör ilavesi ile sentezlenen nanopartiküller büyütülebilir. Ters mikroemülsiyon yöntemindeki dezavantajlar yüksek maliyetli olması ve son ürünlerde yüzey aktif maddelerinin çıkarılmasında karşılaşılan zorluklardır (Sato ve ark., 1995; Tan ve ark., 2011; Rahman ve Padavettan, 2012).

Silika nanopartiküller ayrıca kimyasal buhar yoğunlaşması (CVC) yöntemi ile de sentezlenebilir. CVC yöntemi gaz fazında bulunan maddenin ısıl parçalanması ile partiküle dönüştürülmesini esas almaktadır. Başlangıç maddesinin gaz fazına geçtiği bölgeye gaz akışı verilerek oluşan buharın bir reaktöre taşınarak bu reaktörde ısıl olarak parçalanması gerçekleştirilir. Parçalanma sonucunda oluşan nanopartiküller kullanılan reaktörün çıkışında yer alan farklı toz toplama yöntemleriyle toplanmaktadır. Tipik bir CVC işleminde silika nanopartikülleri, silikon tetraklorürün hidrojen ve oksijen ile reaksiyona sokulmasıyla üretilir (Vansant ve ark., 1995; Gürmen ve Ebin, 2008). CVC işleminin dezavantajları, nanopartiküllerin parçacık büyüklüğü ve morfolojisinin kontrol edilmesindeki zorluktur (Kickelbick, 2003; Rahman ve Padavettan, 2012).

2.4.3.1. Stöber Yöntemi

Yaklaşık 100 nm ila birkaç µm çapındaki kolloidal kararlılığa sahip silika nanopartiküller çoğunlukla Stöber yöntemine (Stöber W, 1968) dayanan sol-jel işlemi ile kolayca sentezlenmektedir. Stöber yöntemine göre; tetraetilortosilikatın (TEOS), etanol ve amonyak (katalizör görevinde) çözücü karışımı içerisinde gerçekleşen hidroliz ve kondenzasyon tepkimeleri sonucunda silika nanopartiküller sentezlenmektedir. TEOS monomeri, hidroliz tepkimesini tek başına hidrolize olarak gerçekleştirmektedir. Bu hidroliz tepkimesi sonucunda oluşan ara ürün, kondenzasyon tepkimesi ile silika nanopartikülleri oluşturmaktadır (Malkoç, 2011).

$$Si(OR)_4 + H_2O \rightarrow (OR)_3Si(OH)+ROH \quad (2.1)$$

$$(OR)_3Si(OH)+ H_2O \rightarrow SiO_2+ 3\ ROH \quad (2.2)$$

Eşitlik 2-1 Stöber yöntemine göre silika nanopartiküllerinin sentezi

Stöber yöntemi, reaksiyon koşulu kontrol edilebilir ve reaksiyonun yürütülmesi kolay olduğundan dolayı kolloidal kararlı küresel silika nanopartikülleri hazırlamak için en basit ve en etkili yoldur (Wang ve ark., 2010).

2.5. Nanopartiküllerin Kanser Tedavisindeki Rolü

Boyutları oldukça küçük olan nanopartiküller aynı malzemelerin büyük parçacıkları ile kıyaslandığında boyuta bağlı olarak daha üstün ve yeni özellikler göstermektedir. Nanopartiküller gösterdiği bu özellikler onların nanotıpta da daha etkin bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır. Bu kapsamda nanopartiküller antikorlar ile fonksiyonlandırılarak spesifik hücrelere bağlanabilirler, biomarker yoluyla tanıda kullanılabilirler, lipit ve polimer yapıdaki nanopartiküller hedefe vardıklarında dekompose olarak ilacı hücreye verebilirler, kuantum nokta olarak kullanılan nanopartiküller ise çaplarına göre değişik renkte ışık saçarak kompleks tanılarda kullanılabilirler. Nanopartiküllerin kanser alanında kullanımı yarı iletken kuantum noktalar, demir oksit nanopartiküller, altın nanopartiküller gibi nano parçacıklarla sağlanabilir. Kanser tedavisinde kullanılacak en ideal nanopartiküller kanser hücresini saptamalı, tanımalı ve tümör hücresini etkisiz hale getirirken aynı zamanda da sağlıklı hücreye zarar vermemelidir. Nanotaşıyıcı olarak kullanılan nanopartiküller ise ilaç taşıma sistemlerinde biyoaktif moleküllerin toksisitesini azaltarak vücutta yüksek derecede toksik olan antikanser ilaçların dağılımını önlemeli ve ilacı hedeflenen bölgelere ulaştırırken vücudun doğal sistemlerini koruyabilmelidir.

Xin Huang ve ark. (2020) yayınladıkları çalışmada, nanopartikül tabanlı hedeflenmiş ilaç yapılarının kan dolaşımında uzun süre kalmaları, gelişmiş antikanser etkinliği, artmış intratümoral birikimi ve yan etkilerinin azlığı ile osteosarkom tedavisinde de kullanıldığının kanıtıdır. Bu nedenle reseptör aracılı endositoz, osteosarkom için aktif hedeflemeyi arttırdığından çoğunlukla kullanılan bir yöntemdir. Osteosarkom hücreleri yüzeyinde aşırı ekspresyon halinde bulunan proteinler ve moleküller mevcuttur. Buna göre vitaminler, bifosfonatlar, peptitler, antikorlar, aptamerler gibi ligandlar nanopartikül tabanlı hedeflenmiş ilaç yapılarını dekore edebilir. Sonrasında kullanılan bu ligandlar nanopartiküller ve hücreler arasında yüzey

etkileşmesine yol açarak reseptör aracılı endositoz oluştururlar ve bu şekilde nanopartikül tabanlı hedeflenmiş ilaçları sitoplazmaya salarlar (Huang ve ark., 2020).

Dar-Shih Hsieh ve ark. (2011) altın nanopartikülleri epigallokateşin-3-gallat ile fonksiyonlandırarak mesane tümör hücrelerindeki aktivitesini ölçmüşlerdir. Yeşil çayda aktif bir bileşen olan epigallokateşin-3-gallatın, tümör oluşumunu ve gelişimini etkili bir şekilde inhibe ettiği ve altın nanopartiküllerin güvenli bir ilaç taşıma ajanı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle *in vitro* ve *in vivo* deneyler ile altın nanopartikülleri-epigallokateşin-3-gallat bileşiğinin mesane kanseri hücrelerini apoptoza götürerek tümör büyüklüğünü inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Hsieh ve ark., 2011).

Johanna M. Poller ve ark. yaptıkları çalışmada (2017) meme kanserinde kullanılabilecek boyut, zeta potansiyeli ve yüzey kaplaması açısından değişen çeşitli süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin (SPION) çeşitli insan meme kanseri hücre hatları ve endotel hücreleri üzerindeki etkisini belirlemişlerdir. Bunun için SPION'lar dekstran ($SPION^{Dex}$), laurik asit ($SPION^{LA}$) ve insan serum albümini ($SPION^{LA\text{-}HSA}$) ile kaplanmıştır. Sonuç olarak hücresel içe alımın SPION-yüzey kaplaması ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca $SPION^{LA}$'nın, meme kanseri hücreleri üzerinde nispeten toksik olmadığı ve meme kanseri hücrelerini hedeflemek için kolayca işlevselleştirilebildiği, ancak HUVEC olarak adlandırılan insan göbek damarı endotel hücrelerine ve muhtemelen diğer sağlıklı hücrelere zararlı olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, $SPION^{LA}$ tümör hedeflemesinden kaçması durumunda toksiklik riskini oluşturarak klinik kullanımlarını dışlamaktadır. $SPION^{Dex}$ yüksek stabilitesi ve oldukça düşük toksisitesi ile manyetik rezonans görüntüleme için uygun bir aday olarak düşünülebilir. $SPION^{LA\text{-}HSA}$ ise iyi manyetik özelliklere, yüksek stabiliteye ve düşük sitotoksisiteye sahip olmasından dolayı hipertermi ve ilaç yüklemesi üzerine uygundur ve ek olarak manyetik rezonans görüntüleme için kolayca kullanılabilir, böylece teranostik uygulamalar mümkün olur. Özetle, yapılan çalışmada ulaşılan veriler çeşitli meme kanseri ve endotelyal hücreler arasında doza bağlı ve partikül tipine bağlı önemli farklılıklar göstermektedir ve bu sebeple kullanılan bu partikül çeşitlerinin farklı tıbbi uygulamalar için kullanımını göstermektedir (Poller ve ark., 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar

Tetraetil Ortosilikat (TEOS; 131903), Etil Alkol (EtOH; 32205), Amonyak (1054282500), Toluen (244511), 3-Aminopropil-trietoksisilan (APTES; A3648), 3-Merkaptopropiltrietoksisilan (McPTES; 63797), Kloropropiltrietoksisilan (CPTES; 569615), Fosfat tamponlu tuzlu su tableti (PBS; P4417), Tripsin-Etilendiamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA) (59430C), Tetrametiletilendiamin (TEMED; T9281) Sigma Aldrich (ABD)'den satın alınmıştır.

Prostat kanseri hücre hattı PC-3 (CRL-1435™), akciğer kanseri hücre hattı A549 (CCL-185™), böbrek üstü bezi kanseri hücre hattı NCI-H295R (CRL-2128™), rahim ağzı kanseri hücre hattı HELA (CCL-2™), kolon kanseri hücre hattı DLD-1(CCL-221™) Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC®, ABD)'den, prostat epitel hücre hattı PNT1A (95012614) ve karaciğer kanseri hücre hattı HUH-7 (01042712) Sigma Aldrich (ABD)'den satın alınmıştır.

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM; 01-035-1A), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; 01-052-1A), Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM F12; 01-170-1A), Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI-1640; 01-101-1A), Fetal Sığır Serumu (FBS; 04-121-1A), Penisilin-streptomisin (Pen-Strep; 03-031-1B), L-glutamin (03-020-1B) Biological Industries, (Beit-Haemek, İsrail)'den satın alınmıştır.

GAPDH (60004-1-Ig) , BAX (50599-2-Ig), p53 (60283-2-Ig) ve KRAS (67266-1-Ig) antikorları Proteintech (ABD)'den, BCL-2 (ab182858), NF-κB (ab16502) ve SMAD antikorları ise (ab40759) Abcam (ABD)'den satın alınmıştır.

Alamar Mavisi reaktifi İnvitrogen, Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, ABD)'den, QIAzol® (79306), QIAGEN, (Hilden, Almanya)'dan, Syber Green Kit (1-800-424-6723) ve Western ECL Substrat (1705061) Bio-Rad (ABD)'den, Apoptoz kiti BD Pharmingens (San Diego, ABD)'dan satın alınmıştır.

3.2. Cihazlar

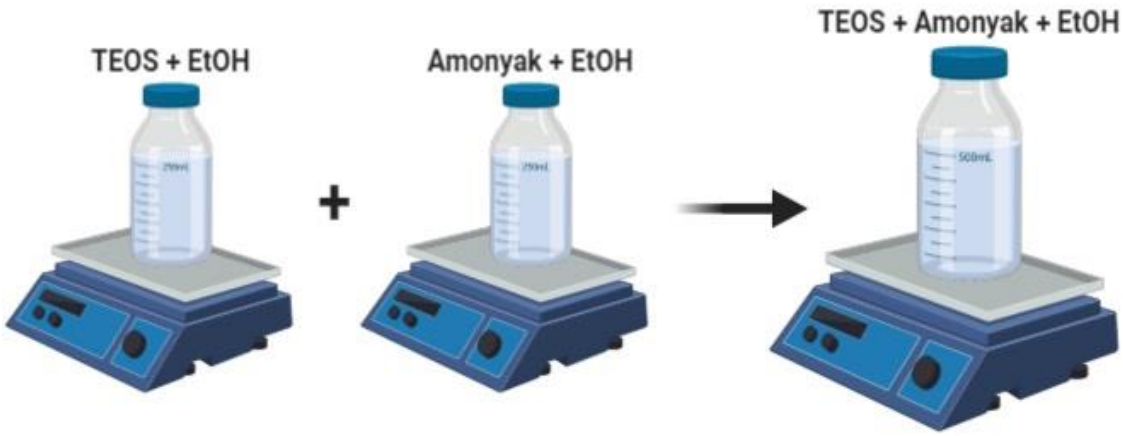
Tablo 3-1 Kullanılan cihazların isimleri ve markaları

CİHAZ	MARKA
Hücre Kültürü Laminar Akım Kabini	Antech
CO_2'li İnkübatör	Binder
96 Kuyucuklu Plaka Okuyucu	Thermo Scientific
İnverted Mikroskop	VWR
Soğutmalı Santrifüj	VWR
Mikrosantrifüj	VWR
Ultrasonik Banyo	VWR
pH Metre	VWR
-80°C Dondurucu	VWR
Floresan Hücre Görüntüleyici	Bio-Rad
Real Time PCR Cihazı	Bio-Rad
Termal Döngüleyici	Bio-Rad
Elektroforez Sistemi	Bio-Rad
Transfer Cihazı	Bio-Rad
Ultra Saf Su Sistemi	MILLIPORE
Hassas Terazi	A&D Company
Vortex	Jeiotech
Orbital Çalkalayıcı	Jeiotech
Kuru Blok Isıtıcı	IKA
Manyetik Karıştırıcı	IKA
Jel Görüntüleme Sistemi	Syngene
Su Banyosu	Nüve
Otoklav	Nüve

3.3. Sentez Çalışmaları

3.3.1. SiNP'lerin Hazırlanması

Silika nanopartiküller, Stöber yöntemine dayanan sol-jel metodu ile elde edilmiştir (Tadanaga ve ark., 2013). Nanometre ölçeğinde silika nanopartiküllerin hazırlanması için, ilk önce uygun miktarda TEOS ve amonyak susuz etanol içinde ayrı ayrı çözülmüştür. Amonyak ve TEOS çözeltileri birbirlerine karıştırılmıştır ve elde edilen çözelti gece boyunca karıştırılmıştır. Hazırlanan nanopartiküller, 1 saat boyunca 14000 x g'de santrifüj kullanılarak sol fazdan ayrılmıştır. Elde edilen nanopartiküller etanol ile yıkanmıştır. Bu amaçla, elde edilen nanopartiküller 30 dakika boyunca ultrasonikleştirme ile etanol içinde dağıtılmıştır ve daha sonra 1 saat 14000 x g'de santrifüjlenmiştir. Dispersiyon ve santrifüjleme döngüsü birkaç kez tekrarlanmıştır. Son olarak, nanopartiküller 12 saat oda sıcaklığında kurutulmuştur.



Şekil 3-1 Silika nanopartiküllerin sentezinin şematik gösterimi

3.3.2. SiNP'lerin Fonksiyonlandırılması

Hazırlanan silika nanopartiküllerinin yüzeyi, 3-Aminopropil-trietoksisilan (APTES), 3-Merkaptopropiltrietoksisilan (McPTES) ve Kloropropiltrietoksisilan (CPTES) gibi silan birleştirme maddeleri kullanılarak modifiye edilmiştir (Feifel ve Lisdat, 2011).

3.3.2.1. SiNP'lerin 3-Aminopropil-trietoksisilan ile Fonksiyonlandırılması

İlk olarak, 1 g taze hazırlanmış silika nanopartiküller, 30 dakika boyunca ultrasonikasyon yoluyla 10 mL Toluen içinde dağıtılmıştır. Daha sonra çözelti, 2 boyunlu reaksiyon şişesine aktarılmıştır. Reaksiyon karışımına 2.5 mL 3-aminopropil-trietoksisilan (APTES) ilave edilmiştir ve reaksiyonun gece boyunca azot gazı altında 110°C'de devamı sağlanmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra 3-aminopropil-trietoksisilan (APTES) ile fonksiyonlandırılmış nanopartiküller, 1 saat boyunca 14000 x g'de santrifüj ile çözeltiden ayrılmıştır. Elde edilen nanopartiküller toluen ile yıkanmıştır. Bu amaçla, elde edilen nanopartiküller 30 dakika boyunca ultrasonikleştirme ile toluen içinde dağıtılmıştır ve daha sonra 1 saat 14000 x g'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin etanol ile yıkaması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, elde edilen nanopartiküller 30 dakika boyunca ultrasonikleştirme ile etanol içinde dağıtılmıştır ve daha sonra 1 saat 14000 x g'de santrifüjlenmiştir. Dispersiyon ve santrifüjleme döngüsü 3 kez tekrarlanmıştır. Son olarak, nanopartiküller 12 saat oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Silika nanopartiküller, 3-aminopropil-trietoksisilan (APTES) kullanılarak fonksiyonlandırılmış olup SiNP-NH_2 olarak adlandırılmıştır.

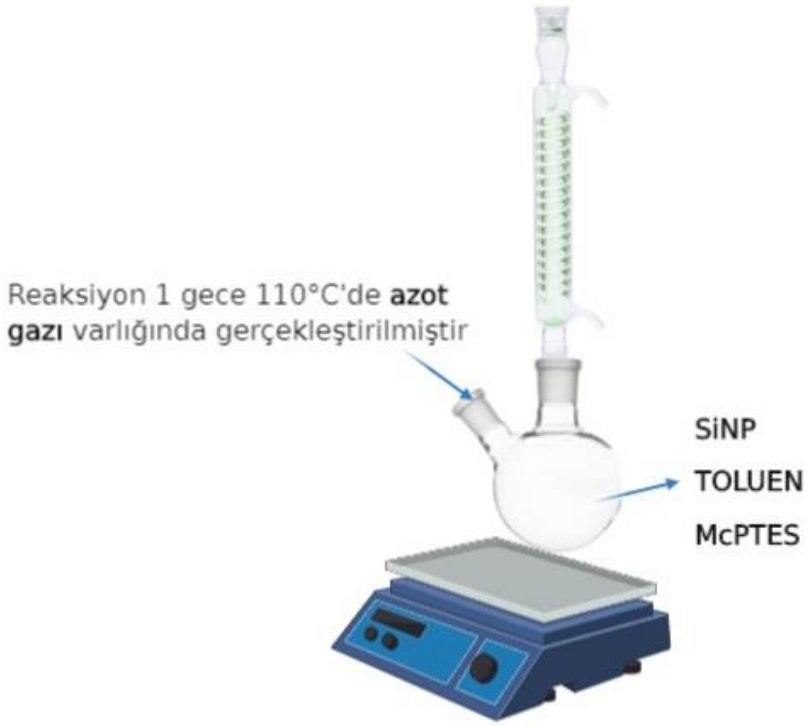


Şekil 3-2 Amin grubu ile fonksiyonlandırılan silika nanopartiküllerin (SiNP-NH_2) sentezinin şematik gösterimi

3.3.2.2. SiNP'lerin 3-Merkaptopropiltrietoksisilan ile Fonksiyonlandırılması

1 g taze hazırlanmış silika nanopartiküller, 30 dakika boyunca ultrasonikasyon yoluyla 10 mL Toluen içinde dağıtılmıştır. Daha sonra çözelti, 2 boyunlu reaksiyon şişesine aktarılmıştır. Reaksiyon karışımına 2.5 mL 3-Merkaptopropiltrietoksisilan (McPTES) ilave edilmiştir ve reaksiyonun gece boyunca azot gazı altında 110°C'de devamı sağlanmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra 3-Merkaptopropiltrietoksisilan (McPTES) ile fonksiyonlandırılmış nanopartiküller, 1 saat boyunca 14000 x g'de santrifüj ile çözeltiden ayrılmıştır. Elde edilen nanopartiküller toluen ile yıkanmıştır. Bu amaçla, elde edilen nanopartiküller 30 dakika boyunca ultrasonikleştirme ile toluen içinde dağıtılmıştır ve daha sonra 1 saat 14000 x g'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin etanol ile yıkaması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, elde edilen nanopartiküller 30 dakika boyunca ultrasonikleştirme ile etanol içinde dağıtılmıştır ve daha sonra 1 saat 14000 x g'de santrifüjlenmiştir. Dispersiyon ve santrifüjleme döngüsü 3 kez tekrarlanmıştır. Son olarak, nanopartiküller 12 saat oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Silika nanopartiküller, 3-Merkaptopropiltrietoksisilan (McPTES) kullanılarak fonksiyonlandırılmış olup SiNP-SH olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3-3 Tiyol grubu ile fonksiyonlandırılan silika nanopartiküllerin (SiNP-SH) sentezinin şematik gösterimi

3.3.2.3. SiNP'lerin Kloropropiltrietoksisilan ile Fonksiyonlandırılması

1 g yeni hazırlanmış silika nanopartiküller, 30 dakika boyunca ultrasonikasyon yoluyla 10 mL Toluen içinde dağıtılmıştır. Daha sonra çözelti, 2 boyunlu reaksiyon şişesine aktarılmıştır. Reaksiyon karışımına 2.5 mL Kloropropiltrietoksisilan (CPTES) ilave edilmiştir ve reaksiyonun gece boyunca azot gazı altında 110°C'de devamı sağlanmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra Kloropropiltrietoksisilan (CPTES) ile fonksiyonlandırılmış nanopartiküller, 1 saat boyunca 14000 x g'de santrifüj ile çözeltiden ayrılmıştır. Elde edilen nanopartiküller toluen ile yıkanmıştır. Bu amaçla, elde edilen nanopartiküller 30 dakika boyunca ultrasonikleştirme ile toluen içinde dağıtılmıştır ve daha sonra 1 saat 14000 x g'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin etanol ile yıkaması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, elde edilen nanopartiküller 30 dakika boyunca ultrasonikleştirme ile etanol içinde dağıtılmıştır ve daha sonra 1 saat 14000 x g'de santrifüjlenmiştir. Dispersiyon ve santrifüjleme döngüsü 3 kez tekrarlanmıştır. Son olarak, nanopartiküller 12 saat oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Silika nanopartiküller, Kloropropiltrietoksisilan (CPTES) kullanılarak fonksiyonlandırılmış olup SiNP-Cl olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3-4 Klor grubu ile fonksiyonlandırılan silika nanopartiküllerin (SiNP-Cl) sentezinin şematik gösterimi

3.3.3. SiNP ve Fonksiyonlarının Karakterizasyonu

3.3.3.1. TEM Analizi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin yüzey morfolojisi, şekli ve boyutu Transmisyon Elektron Mikroskobu (JEOL JEM-2100 (UHR)) kullanılarak incelenmiştir. Aseton çözücü ortamında 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan nanopartiküller analizden önce yarım saat ultrasonik banyoda tutulmuştur.

3.3.3.2. DLS Analizi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyeli (Zetasizer Nano ZS) kullanılarak belirlenmiştir. Etil alkol çözücü ortamında 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan nanopartiküller analizden önce yarım saat ultrasonik banyoda tutulmuştur.

3.3.3.3. BET Analizi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin N2 adsorpsiyon-desorpsiyon izotermi, BET yüzey alanı, ortalama gözenek boyutu ve gözenek boyutu dağılımı sorptometre (Micromeritics TriStar II PLUS) kullanılarak incelenmiştir. 200 mg katı haldeki nanopartiküllerin BET analizi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\mathbf{x\ (nm)} = \frac{\text{Ölçü}\mathbf{len\ değer}\ (\frac{\mathbf{m^2}}{\mathbf{g}})}{\mathbf{4\pi r^2}} \qquad (3.1)$$

Eşitlik 3-1 BET yüzey alanı ölçülen nanopartiküllerin nm cinsinden değerlerini bulmak için kullanılan denklem

3.3.3.4. FTIR Analizi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin yapısını belirlemek için Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FTIR) kullanılmıştır. 2 mg nanopartikül örnekleri 10 mg potasyum bromür (KBr) ile karıştırılarak toz haline getirilmiştir. Spektroskopik potasyum bromür (KBr) yardımı ile birkaç tonluk basınç altında ince şeffaf bir tablet oluşturularak spektrum alınmıştır.

3.4. *In Vitro* Sitotoksisite Çalışmaları

3.4.1. Hücre Kültürü

İnsan prostat kanseri hücre hattı PC-3, prostat epitel hücre hattı PNT1A, karaciğer kanseri hücre hattı HUH-7, böbrek üstü bezi kanseri hücre hattı NCI-H295R, akciğer kanseri hücre hattı A549, rahim ağzı kanseri hücre hattı HELA ve kolon kanseri hücre hattı DLD-1 **Tablo 3.4-1**'de verildiği gibi sırasıyla DMEM, RPMI-1640, DMEM F12, F12K, EMEM büyüme ortamlarında 37°C ve %5 CO_2 içeren inkübatörde (BINDER, ABD) inkübe edilmiştir.

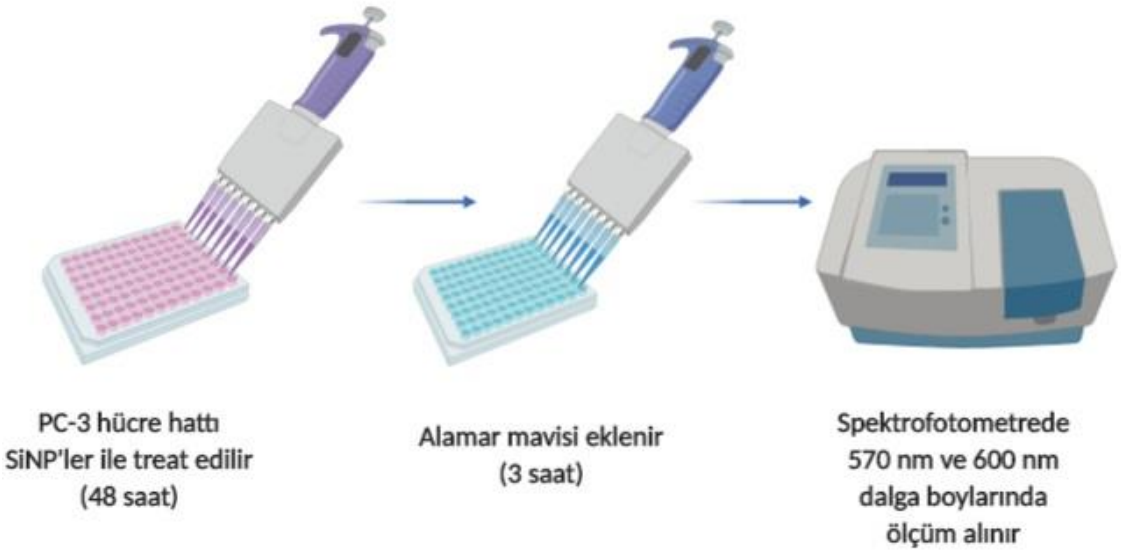
Tablo 3-2 PC-3, PNT1A, HUH-7, NCI-H295R, A549, HELA ve DLD-1 hücreleri için kullanılan büyüme ortamları ve içerikleri

Hücre Hatları	Büyüme Ortamları	Fetal Sığır Serumu (FBS) (v/v)	Penisilin-Streptomisin (v/v)	L-Glutamin
PC-3	DMEM	%10	%1	2 mM
PNT1A	RPMI-1640	%10	%1	2 mM
HUH-7	DMEM	%10	%1	2 mM
NCI-H295R	DMEM F12	%10	%1	2 mM
A549	F12K	%10	%1	2 mM
HELA	EMEM	%10	%1	2 mM
DLD-1	RPMI-1640	%10	%1	2 mM

3.4.2. Sitotoksisite Deneyleri

T-75 büyüme kaplarında büyütülen PC-3, PNT1A, HUH-7, NCI-H295, A549, HELA ve DLD-1 hücreleri, bir kez 10 mM Fosfat Tamponu (PBS) ile yıkandıktan sonra Tripsin-EDTA çözeltisi yardımıyla büyüme kaplarından ayrılmıştır. Tripan Mavisi yöntemiyle canlı hücreler hesaplandıktan sonra (Portillo ve ark., 2010) $1x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekim yapılmıştır. Yaklaşık 24 saatlik bir inkübasyon sonunda yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler 0-250 µg/mL aralığında değişen doz aralığında SiNP, SiNP-Cl, SiNP-NH_2, SiNP-SH ile muamele edilmiştir ve bu deney için iki tekrarlı çalışılmıştır. Nanopartiküllerin ana stok solüsyonları 1 mg/mL olacak şekilde DMEM büyüme ortamında hazırlanmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonunda, Alamar Blue yöntemi (Karakurt, 2016) ile spektrofotometre (Thermo Scientific, Multiskan Go) kullanılarak hücre canlılığı belirlenmiştir. Sonuç olarak tüm hücre hatları

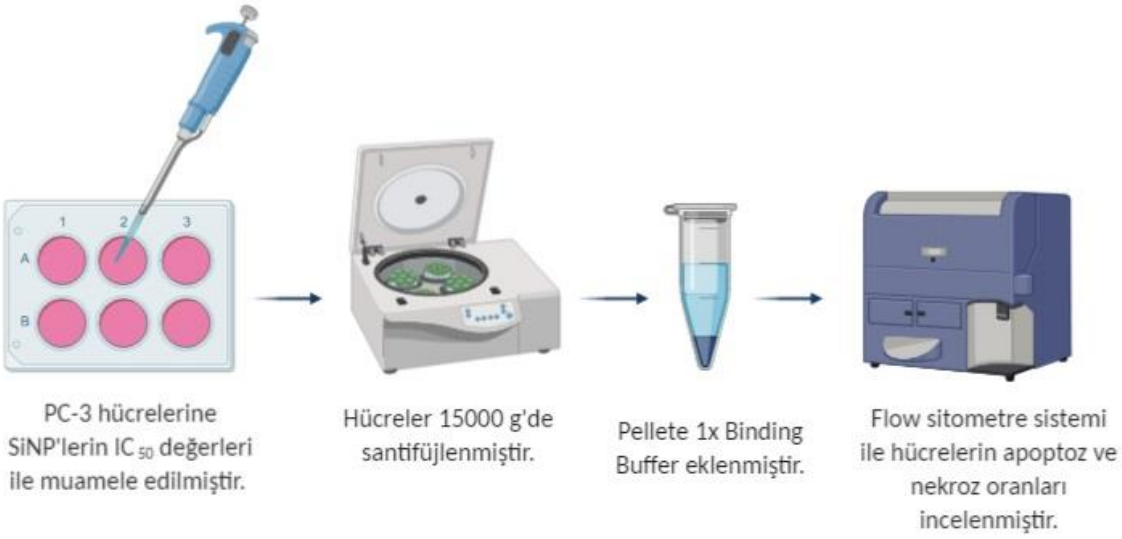
üzerinde değişen IC_{50} değerleri hesaplanmıştır ve böylelikle SiNP, SiNP-Cl, SiNP-NH_2 ve SiNP-SH nanopartiküllerin farklı hücre hatları üzerindeki toksik etkisi bulunmuştur.



Şekil 3-5 En düşük IC_{50} değerine sahip olan PC-3 hücresi üzerindeki sitotoksisite deneyinin şematik gösterimi

3.4.3. Apoptoz Çalışmaları

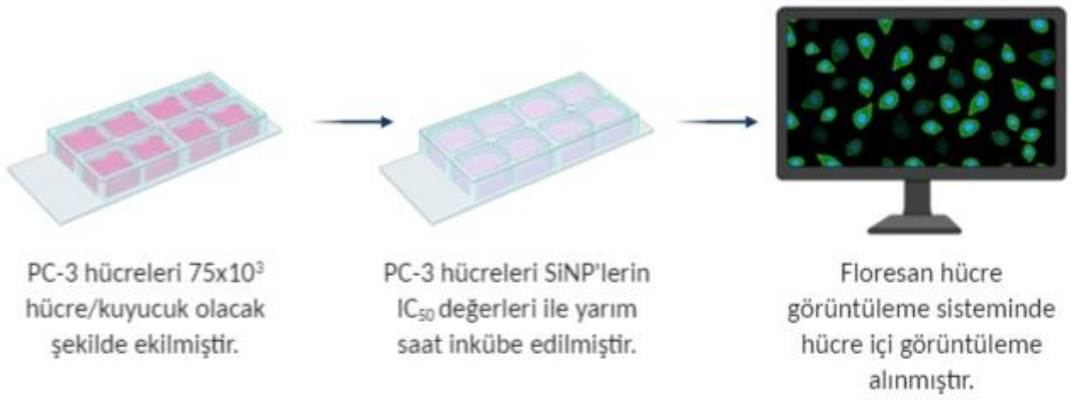
Apoptoz çalışmaları için PC-3 hücreleri $6x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-Cl ve SiNP-SH nanopartiküllerin IC_{50} değerleri ile muamele edilmiştir ve bu deney için iki tekrarlı çalışılmıştır. Hücreler 37°C, %5 CO_2 koşullarında 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 3 kez 10 mM PBS ile yıkanan hücreler Tripsin-EDTA çözeltisi ile plakadan ayrılmıştır. Üzerlerine DMEM büyüme sıvısı eklendikten sonra hücreler 15000 x g'de santrifüjlenmiştir (VWR, Mega Star 1.6R). Pellete 100 µL (1X) Binding Buffer ilave edilip Annexin V Apoptoz Saptama Kiti içinde yer alan Annexin V-APC ve 7-AAD boyaları ile boyanmıştır. Oda sıcaklığında 20 dakika süren inkübasyon sonrası hücrelere tekrar 400 µL (1X) Binding Buffer ilave edilmiştir. Böylelikle NovoCyte Flow Sitometre Sistemi (Acea, Kuzey Amerika) yardımı ile hücrelerin erken/geç apoptoz ve nekroz oranları incelenmiştir (Karakurt ve Adali, 2016).



Şekil 3-6 Apoptoz deneyinin şematik gösterimi

3.4.4. Hücre Görüntüleme Çalışmaları

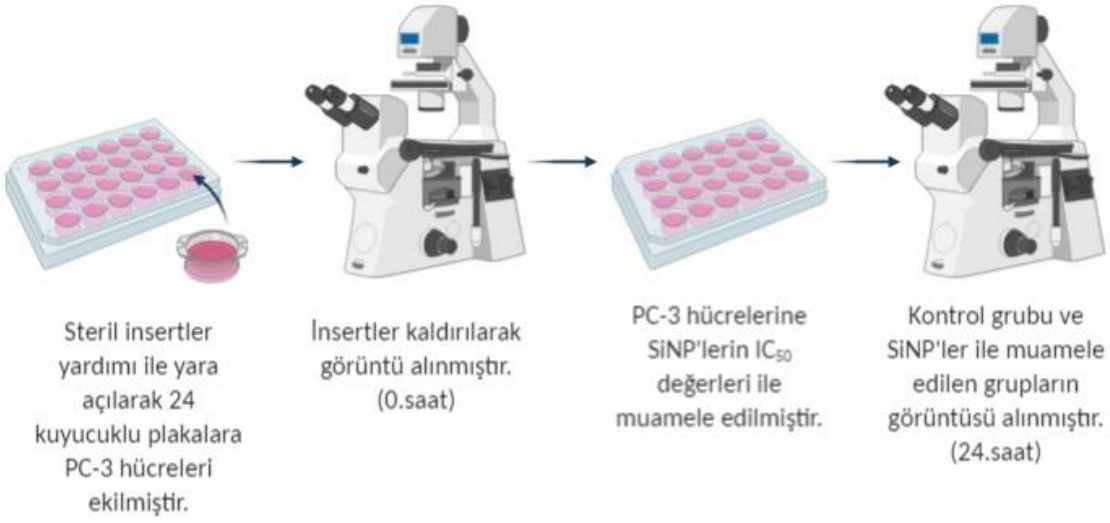
PC-3 hücreleri, görüntüleme için $75x10^3$ hücre/kuyucuk olacak şekilde alt yüzeyi cam olan 8 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler fiksasyon yöntemi ile sabitlenmiştir ve bunun için 10 mL, %4 paraformaldehit (PFA) kullanılmıştır. PFA ile 15 dakikalık bir inkübasyondan sonra, SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-Cl ve SiNP-SH nanopartiküllerin IC_{50} değerleri ile muamele edilen hücreler yarım saat inkübe edilmiştir. Hücre görüntülemesi, floresan hücre görüntüleme sistemi ZOE, Bio-RAD ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3-7 Hücre görüntüleme deneyinin şematik gösterimi

3.4.5. Yara İyileştirme Deneyi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-Cl ve SiNP-SH nanopartiküllerin metastatik özelliklerini belirlemek için steril insertler yardımı ile yaklaşık 0.9 mm kalınlığında bir yara açılarak 24 kuyucuklu plakalara $5x10^5$ hücre/mL olacak şekilde PC-3 hücreleri ekilmiştir. 24 saatlik bir inkübasyondan sonra hücreler mikroskop yardımıyla görüntülenip fotoğraflanmıştır. Daha sonra hücrelere SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-Cl ve SiNP-SH nanopartiküllerin IC_{50} değerleri ile muamele edilmiştir. Hücrelerin tekrar 24 saatlik bir inkübasyonundan sonra hem kontrol grubu hem de SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-Cl ve SiNP-SH nanopartikülleri ile muamele edilen hücreler fotoğraflanmıştır. Yaraya metastaz yapan hücre sayısı Image J yazılımı yardımıyla hesaplanmıştır ve SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-Cl ve SiNP-SH nanopartiküllerin metastatik özellikleri kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.



Şekil 3-8 Yara iyileştirme deneyinin şematik gösterimi

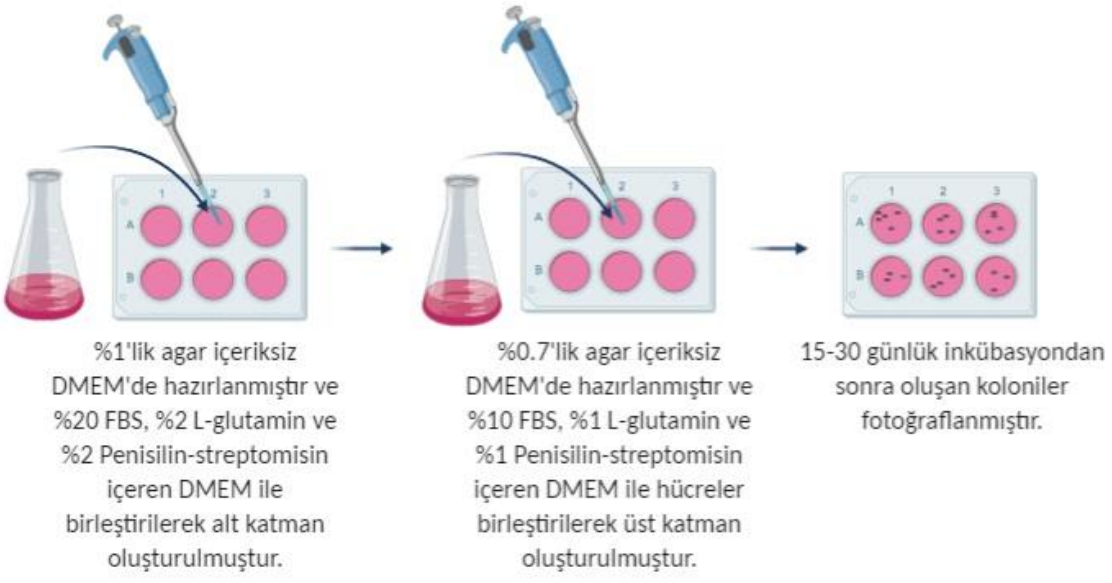
3.4.6. Koloni Oluşturma Deneyi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-Cl ve SiNP-SH nanopartiküllerin PC-3 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkilerini anlamak için öncelikle 24 kuyucuklu plakalara $3x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-Cl ve SiNP-SH nanopartiküllerin IC_{50} değerleri ile muamele edilmiştir. 48 saatlik bir inkübasyondan sonra ilk olarak alt katmandaki agar hazırlanmıştır. Bunun için %20 FBS, %2 L-glutamin ve %2 Penisilin-streptomisin içeren DMEM büyüme sıvısı ile içeriksiz DMEM büyüme sıvısı içinde %1'lik agaroz

çözülmüştür ve hazırlanan her iki karışım birleştirilerek 6 kuyucuklu plakalara 1 mL/kuyucuk olacak şekilde yerleştirilmiştir. Otuz dakika inkübasyon süresi içerisinde agarın donması beklenmiştir.

İnkübasyondan sonra üst katmandaki agar için, içeriksiz DMEM büyüme sıvısı içinde %0.7'lik agaroz çözülmüştür ve %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 Penisilin-streptomisin içeren DMEM büyüme sıvısı hazırlanmıştır. Hazırlanan bu büyüme sıvısı içerisinde $5x10^4$ hücre/5 mL olacak şekilde hücreler hazırlanmıştır. Daha sonra hücreler ve agarlı karışım birleştirilerek 6 kuyucuklu plaka içindeki alt agarın üzerine 1'er mL olacak şekilde eklenmiştir. 5 dakika inkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 1500 µL DMEM büyüme sıvısı eklenmiştir. Hücreler 15 gün boyunca 37°C'de %5 CO_2'de inkübe edilmiştir.

15 günlük inkübasyon sonunda 0.01 w/v Kristal Violet boyası hazırlanmıştır ve hazırlanan boya üst agarın üzerine 0.5 mL olacak şekilde eklenmiştir. Boyayla birlikte doksan dakika inkübasyon yaptırılmıştır. Daha sonra görüntüleme alınmıştır. Koloni sayıları Image J yazılımı ile hesaplanmıştır.



Şekil 3-9 Koloni oluşturma deneyinin şematik gösterimi

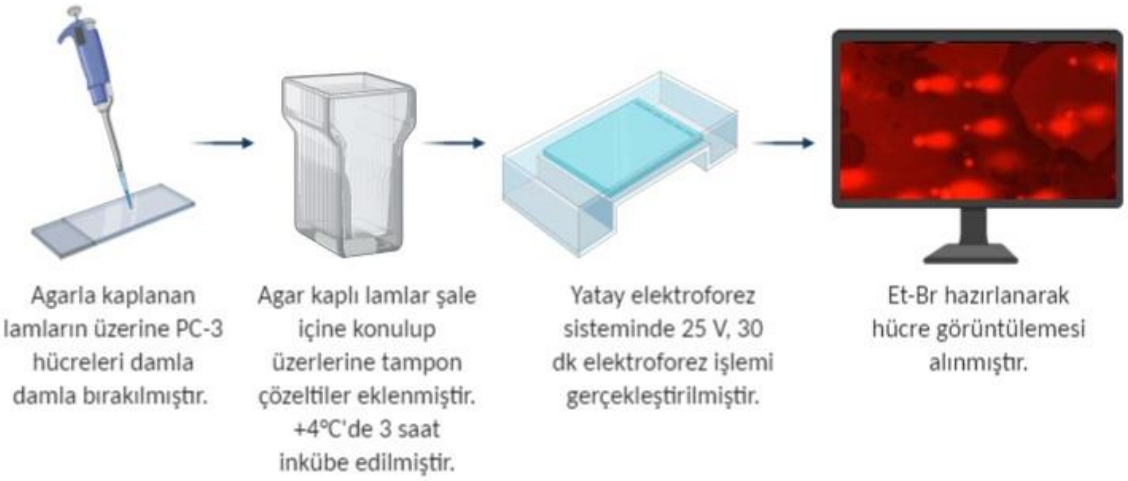
3.4.7. DNA Kırılması Deneyi

Deney gününden önce PC-3 hücreleri $2x10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-Cl ve SiNP-SH nanopartiküllerin IC_{50} değerleri ile muamele edilmiştir ve 48 saat 37°C, %5 CO_2 şartlarında inkübe edilmiştir. %1'lik NMA Agar (Normal Melting Agar) hazırlanmıştır ve lamlar agarla kaplanmıştır. Son olarak deney için kullanılacak olan PBS, Lizis çözeltisi, Running Buffer, dH_2O hazırlanmıştır ve +4°C'de bir gece bekletilmiştir.

Deney günü nötralizasyon tampon çözeltisi ve LMA Agar (Low Melting Agar) hazırlanmıştır. Sonrasında plakalarda yer alan hücreler için öncelikle hücreler plakadan ayrılarak üzerlerine DMEM büyüme sıvısı eklenmiştir ve hücreler Tripan Mavisi yöntemi ile sayılmıştır. Daha sonra hücreler 400 x g'de 5 dk santrifüjlenmiştir ve santrifüj sonrası oluşan pelletteki hücreler PBS ile seyreltilmiştir.

Hücreler hazırlandıktan sonra LMA Agar ile karıştırılmıştır. Tüm bunlar ısıtıcı blok üzerinde gerçekleştirilmiştir (60°C). Bu karışım deney gününden önce hazırlanan agar kaplı lamların üzerine damla damla bırakılıp üzerine temiz ince lamlar kapatılmıştır. Bu haliyle +4°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonuna doğru Lizis çözeltisi + Triton x100 ve DMSO karışımı hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrası agarla kaplı lamlar şalelere yerleştirilmiştir. Üzerine ~ 100 mL bu karışımdan eklenerek +4°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında agar kaplı lamlar yatay elektroforez içine yerleştirilip cihaz running buffer ile doldurulmuştur ve tankın etrafına buz aküleri yerleştirilmiştir. 25 V'da 30 dakika elektroforez işlemi gerçekleşmiştir. Elektroforez işlemi bittikten sonra lamlar tekrar şalelere alınarak içi nötralizasyon tampon çözeltisi ile doldurulup +4°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında lamlar 1 kez +4°C dH_2O'yla yıkanmıştır ve kurumaya bırakılmıştır.

~ 20 dakika sonra kuruyan lamların görüntülenmesi Et-Br boyası hazırlanarak floresan hücre görüntüleme sistemi ZOE, Bio-RAD kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

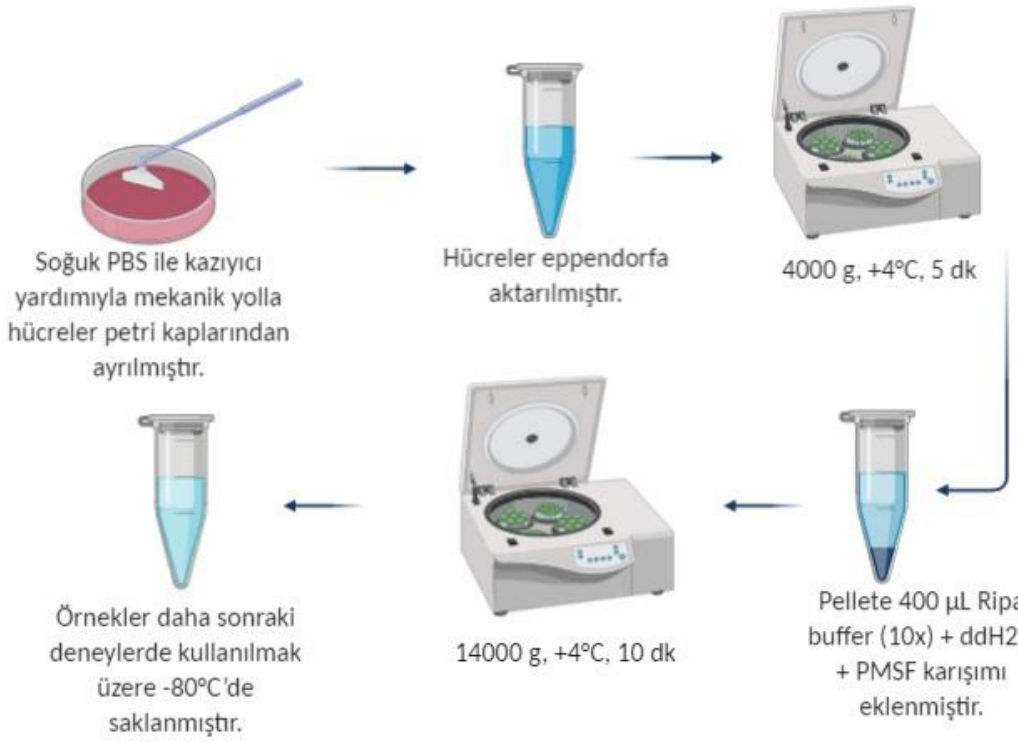


Şekil 3-10 DNA kırılması deneyinin şematik gösterimi

3.4.8. Protein Ekspresyon Çalışmaları

3.4.8.1. Protein İzolasyonu

PC-3 hücreleri petri kaplarına $3x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-Cl ve SiNP-SH nanopartiküllerin IC_{50} değerleri ile muamele edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrasında DMEM büyüme sıvısı ortamdan uzaklaştırılarak soğuk PBS ile yıkanmıştır (x3). Sonrasında 4 mL soğuk PBS ile hücre kazıyıcı yardımıyla mekanik yolla hücreler petri kaplarından ayrılmıştır. Eppendorf tüplere aktarılan hücreler 4000 x g'de +4°C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen pellete 400 µL Ripa buffer (10X) + ddH_2O + PMSF karışımı eklenip pellet dağıtılmıştır. 5 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 14000 x g'de +4°C'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant temiz 1,5 mL'lik eppendorflara aktarılmıştır. Örnekler daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.



Şekil 3-11 Protein izolasyonunun şematik gösterimi

3.4.8.2. Protein Konsantrasyonu Hesaplama

Protein izolasyonu yapılan hücre süspansiyonları -80°C'den alınıp buza gömülmüştür. Elde edilen süspansiyonların protein miktarı BSA Standartı kullanılarak BCA yöntemine göre yapılmıştır (Smith ve ark., 1985).

Protein ölçüm kitinin içerisinde bulunan Reaktif B:A oranı 1:50 olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu reaktif karışımından 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 200 µL olacak şekilde ve daha sonra protein örnekleri her bir kuyucuğa 25'er µL olacak şekilde eklenmiştir. 96 kuyucuklu plaka okuyucuda 37ºC'lik yarım saat inkübasyondan sonra 562 nm dalga boyunda okutularak protein konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre bulunmuştur.

$$\text{Protein Kons.}\,(\mu g/mL) = \left(\frac{\text{Örnek}_{562\ nm} - \text{Blank}_{562nm}}{\text{Eğim}}\right) \text{x Dilüsyon faktörü} \quad (3.2)$$

Eşitlik 3-2 Protein konsantrasyonu hesaplamak için kullanılan denklem

Protein konsantrasyonu hesaplanan proteinler Western-Blot çalışmaları için aşağıdaki formüle göre dH_20 ile seyreltilmiştir. V, 20 µL örneği çözmek için ilave edilecek dH_2O hacmidir.

$$V = \frac{\text{Protein Konsantrasyonu}}{1.333} \text{ x } 20 - 20 \quad (3.3)$$

Eşitlik 3-3 Protein konsantrasyonu belirlenmiş olan proteinlere ilave edilecek dH_2O hacmini hesaplamak için kullanılan denklem

Daha sonra hazırlanan protein ve dH_20 karışımına uygun miktarda 4x SDB eklenerek termal döngüleyicide 95°C'de 5 dakikalık bir inkübasyon yaptırılmıştır. Örnekler Western-Blot çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.4.8.3. Western Blot Çalışmaları

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-Cl ve SiNP-SH nanopartiküllerin PC-3 hücrelerinde apoptoz yolağında rol alan GAPDH, BAX, BCL-2, NF-κb, P53, SMAD ve KRAS proteinlerinin ekspresyonu üzerindeki etkileri Laemli'nin tanımladığı Western Blot tekniğiyle gerçekleştirilmiştir (Laemmli, 1970). Metoda göre dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) yöntemi ile proteinler ayrıştırılmıştır ve her bir protein ekspresyonunun tayini için spesifik antikorlar kullanılmıştır. Öncelikle proteinlerin büyüklüğüne göre dökülecek olan jelin yüzdesi aşağıdaki tabloya göre kararlaştırılmıştır.

Tablo 3-3 SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) yönteminde kullanılacak olan jellerin protein büyüklüğüne göre yüzde oranlarının belirlenmesi

Protein Büyüklüğü (kDa)	Jel Yüzdesi (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8

Jelin yüzde değeri kararlaştırıldıktan sonra ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları **Tablo 3.4-3**'de belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır**.**

Tablo 3-4 SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları

Bileşenler	Ayrıştırıcı Jel			Sıkıştırıcı Jel
Monomer Konsantrasyonu	%7.5	%10	%12	%4
Jel Solüsyonu (mL)	3.75	5	6	0.650
dH_2O (mL)	7.26	6.02	5.02	3.05
Ayrıştırıcı Jel Tamponu (mL)	3.75	3.75	3.75	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu (mL)	-	-	-	1.25
%10 SDS (mL)	0.15	0.15	0.15	0.050
%10 APS (mL)	0.075	0.075	0.075	0.025
TEMED (mL)	0.020	0.020	0.020	0.015

Poliakrilamit slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile Bio-Rad elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle jelin döküleceği camlar üzerlerindeki partiküllerin jeli bozmaması ve proteinlerin düzgün yürüyebilmesi için %70'lik Et-OH'da silinerek peçeteyle kurulanmıştır. Ön ve arka camlar birbirlerine dH_2O ile yapıştırılıp hazırlandıktan sonra jel dökme aparatına yerleştirilmiştir. Düz bir zemin hazırlanarak jel

dökme aparatları stanta yerleştirilmiştir. Hazırlanan ayrıştırıcı jel camlara 4.25 mL olacak şekilde dökülmüştür. Ayrıştırıcı jel döküldükten sonra oluşan dalgalanmaları engellemek için isopropil alkol eklenmiştir ve ~15 dakika jelin donması beklenmiştir. Ayrıştırıcı jel donduktan sonra isopropil alkol boşaltılarak 1,5 mL sıkıştırıcı jel dökülüp hemen taraklar takılmıştır. Sıkıştırıcı jel ~15 dakika donduktan sonra artık proteinler yüklenmeye hazır hale gelmiştir. Camlar jel dökme aparatından çıkartılarak tanklara yerleştirilmiş ve içlerine Elektronik Running Buffer doldurulmuştur. Jellerden taraklar çıkartılıp oluşan kuyucuklar içine belirteç 1 µL, örnekler 15 µL olacak şekilde yüklenmiştir. Önce 15 mA'de ~45 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirilip proteinler ayrıştırıcı jele ulaşıp sıkışınca cihaz 25 mA'e çıkartılıp ~ 45 dakika daha elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

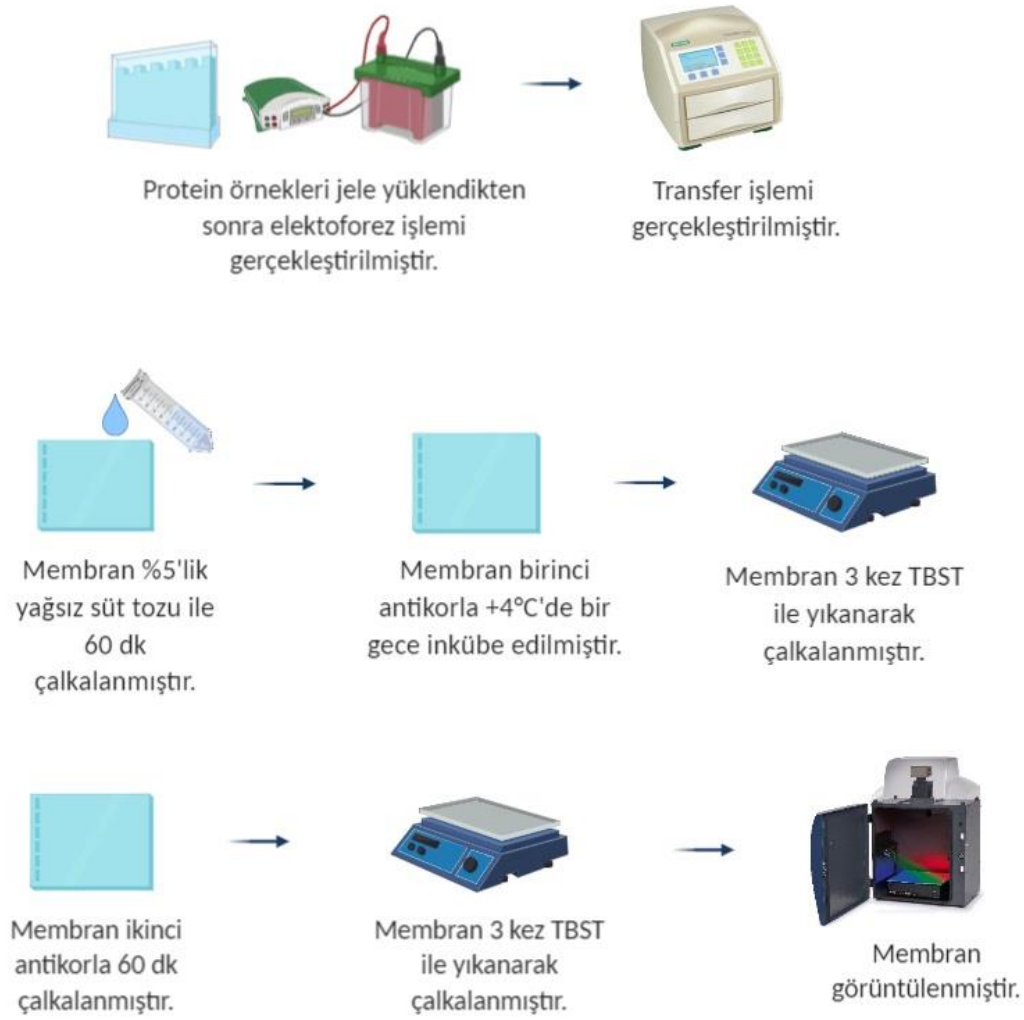
Transfer işlemi için öncelikle jel tanktan çıkartılmış ve transfer işlemine hazırlık için Transfer Buffer'da jelin işe yaramayan kısımları özel kesme aparatı ile kesilerek atılmıştır. Daha sonra PVDF membran jel boyutunda kesilerek 1 dakika metanolde aktifleştirilmiştir. Bio-Rad, Turbo Transfer Cihazı'nın transfer kasetinin anot yüzeyine öncelikle Whatman filtre kağıdı yerleştirilip ufak rulo silindir ile üzerinden geçilerek hava boşluğu kalmayacak şekilde hazırlanmıştır. Üzerine PVDF membran yerleştilip onunda üzerine jel yerleştirilmiştir. Son olarak tekrar Whatman filtre kağıdı yerleştirilip üzerinden ufak rulo silindir ile geçilmiştir. Transfer cihazının katot kapağı kapatılarak transfer işlemi için 25 V, 30 dakikalık uygun transfer programı seçilmiştir.

Transfer işlemi bittikten sonra jel artık PVDF membrana aktarılmıştır. Aktarımdan sonra istenmeyen bağlanmaların önüne geçmek için bloklama yapmak için %5'lik yağsız süt tozu kullanılmıştır. Yağsız süt tozu membranın yüzeyini kaplayacak şekilde eklenerek 1 saat karıştırıcıda çalkalanmıştır.

Membran daha sonra ilgili birincil antikorla +4°C'de bir gece inkübe edilmiştir.

Ertesi gün membran 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra ilgili ikinci antikorla 1 saat karıştırıcıda çalkalanmıştır. Çalkalamadan sonra membran tekrar 3 kez 5'er dakika TBS-T ile yıkanmıştır.

Görüntüleme için membran kuru bir asetat üzerine yerleştirilmiştir. Membranın her yeri ıslanacak şekilde üzerine ECL solüsyonu eklenmiştir ve membran Syngene Görüntüleme Cihaz'ı içine yerleştirilmiştir. Cihazda ilgili yönlendirmeler seçilerek membranın fotoğrafı çekilmiştir.



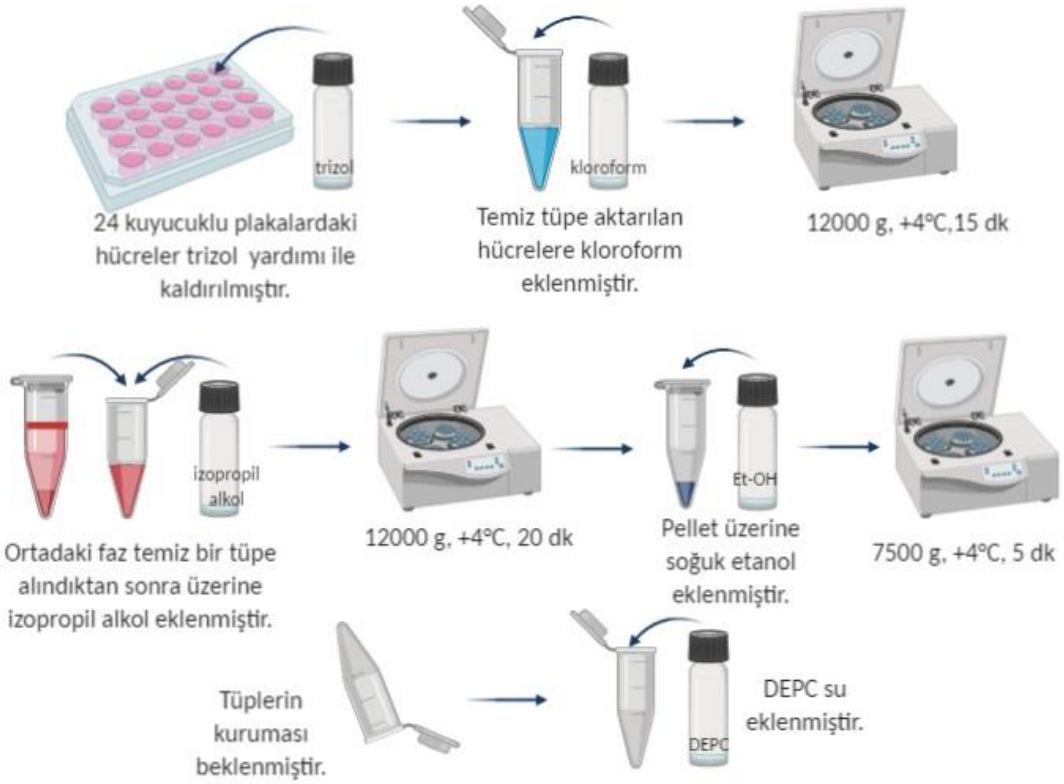
Şekil 3-12 Western Blot çalışmasının şematik gösterimi

3.4.9. Gen Ekspresyonu Çalışmaları

3.4.9.1. Total RNA İzolasyonu

PC-3 hücrelerinden elde edilen örneklerden total RNA, TRIZOL metodu ile izole edilmiştir (Rio ve ark., 2010).

Öncelikle PC-3 hücreleri $3x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekim yapılmıştır. Yaklaşık 24 saat sonunda yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-Cl ve SiNP-SH nanopartiküllerin IC_{50} değerleri ile muamele edilmiştir ve 24 saat 37°C, %5 CO_2 şartlarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 24 kuyucuklu plaka PBS ile yıkanmıştır. Her bir kuyucuğa 0.5 mL Trizol eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Trizolün hücreleri kaldırma özelliğinden yararlanılarak her bir kuyucuğa pipetaj yapılarak hücreler 1.5 mL'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonraki izlenecek adımlar çeker ocakta gerçekleştirilmiştir. Her bir eppendorf tüpüne 120 µL kloroform eklenmiştir ve sertçe sallanarak trizol ile karışması sağlanmıştır. 12000 x g, +4°C'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası tüplerde 3 faz oluşmuştur. En altta DNA, ortada RNA ve en üstte protein olarak sıralanmıştır. Mikro pipet yardımı ile ortadaki faz alınarak RNA'lar temiz birer eppendorf tüpe aktarılmıştır. Eppendorf tüplerin üzerine RNA'nın yoğunlaşarak daha görünür bir hale gelmesi için 250 µL izopropil alkol eklenmiştir ve kibarca karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler 12000 x g, +4°C'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pelletin üzerine 600 µL soğuk Et-OH (%75'lik) eklenmiştir ve kısa süreli üç kez vortekslenerek buza gömülmüştür. Tüpler son kez 7500 x g, +4°C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak tüpler kağıt bir peçete üzerine ters çevrilip 30 dakika oda sıcaklığında kuruması beklenmiştir. Tüpler kuruduktan sonra üzerine 20 µL DNAaz/RNAaz içermeyen su eklenmiştir. Örnekler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırılmıştır.



Şekil 3-13 RNA izolasyonunun şematik gösterimi

3.4.9.2. RNA Konsantrasyonu Hesaplama

-80°C'de saklanan RNA örnekleri bir tur spin attırıldıktan sonra buza gömülmüştür. Nanodrop'a kontrol grubu olarak 1 µL DNAaz/RNAaz içermeyen su ve 1 µL örnekler yüklenmiştir. Böylece elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık oranları belirlenmiştir.

Saflığı 1.8-2.0 arasında olan RNA örnekleri cDNA sentezi için kullanılmıştır. Okunan konsantrasyon değerleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanarak cDNA sentezinde kullanılacak RNA örneklerinin miktarı hesaplanmıştır.

$$\text{RNA Konsantrasyonu } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right) = \frac{1}{\text{Ölçülen değer}} \text{ x } 1000 \qquad (3.4)$$

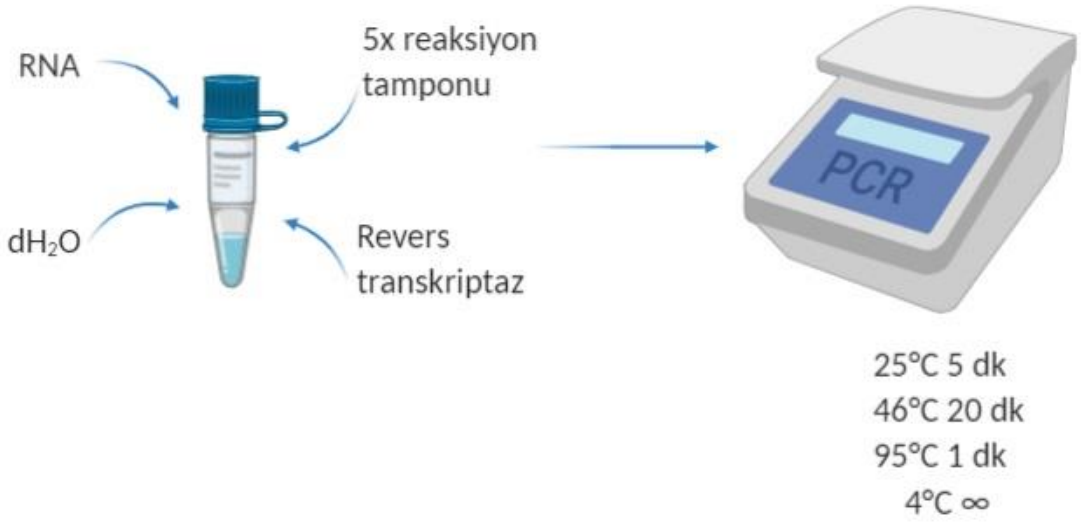
Eşitlik 3-4 cDNA sentezinde kullanılacak olan RNA'ların konsantrasyonlarını hesaplamak için kullanılan denklem

3.4.9.3. RNA Moleküllerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

RNA'nın varlığı ve saflığı, yatay agaroz jel elektroforez ünitesi kullanılarak %1,5'luk agaroz jel üzerinde kontrol edilmiştir. Bunun için öncelikle 0.45 g agaroz tartılarak 30 mL (1x) TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu ile karıştırılmış ve bu karışım mikrodalgada çözülmüştür. Çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 60°C'ye soğutulmuştur. Daha sonra çözeltiye Et-Br boyası ilave edilmiştir. Hazırlanan agaroz jel çözeltisi elektroforez tepsisine dökülmüş ve tarak düzgünce yerleştirilmiştir. Jel polimerizasyonundan sonra, jel tankı (1x) TBE tamponu ile doldurulmuştur. Jel donduktan sonra tarak çıkarılmıştır. 2 µL RNA örneği ve 2 µL yükleme boyası karıştırılarak oluşan kuyucuklara yüklenmiştir. 90 dakika boyunca 90 mV'da elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda jel gözlemlenerek UV ışık altında fotoğrafı çekilmiştir.

3.4.9.4. cDNA sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi iScript™ cDNA Sentez Kiti ile sentezlenmiştir (Bio-RAD, USA). cDNA sentezi için hesaplanan RNA miktarlarına göre toplam hacmi tamamlayacak şekilde (20 µL) dH_2O ve RNA'lar 0.2 mL'lik PCR tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra üzerlerine 4 µL 5X reaksiyon tamponu (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$ ve 50 mM DDT) ve 1 µL Revers Transkriptaz eklenerek son hacim 20 µL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tüm PCR tüplerine 1 tur spin attırıldıktan sonra Termal Döngüleyici'de 25°C 5 dk, 46°C 20 dk, 95°C 1 dk ve 4°C ∞ döngüde sentez tamamlanmıştır. Sentezlenen cDNA'lar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3-14 cDNA sentezinin şematik gösterimi

3.4.9.5. mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi

Kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR (qRT-PCR), mRNA düzeyinde ekspresyonu ölçmek için en hassas ve spesifik yöntemlerden biridir. mRNA düzeyinde ekspresyonlar Kantitatif Real Time PCR Bio-Rad CFX96 cihazı (Bio-Rad, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR' da kullanılacak olan primerler Primer 3 yazılımı kullanılarak dizayn edilmiştir **(Tablo 3.4-4)** ve NCBI blast yazılımı ile gene özgünlüğü kontrol edilmiştir.

Öncelikle cDNA'lar 10x ve gen spesifik primerler 50x dH_2O ile dilue edilmiştir. Reaksiyon 1X Maxima® SYBR Green qPCR Master karışımı ile gerçekleştirilmiştir. SYBR Green, qRT-PCR işleminde ürün amplifikasyonu sırasında çift sarmallı DNA'ya bağlanan bir ajandır. Reaksiyon tüpüne 2 µL cDNA, 7.2 µL RNAaz içermeyen su, 0.4 µL gen spesifik forward primer, 0.4 µL gen spesifik reverse primer ve 10 µL SYBR green qRT-PCR karışımı eklenmiştir.

Daha sonra reaksiyon karışımı PCR işlemi için önce 95ºC' de 30 saniye aktivasyon, 95ºC' de 5 saniye denatürasyon, , 56ºC' de 30 saniye olmak üzere toplam 40 döngü ile işlem sonlandırılmıştır.

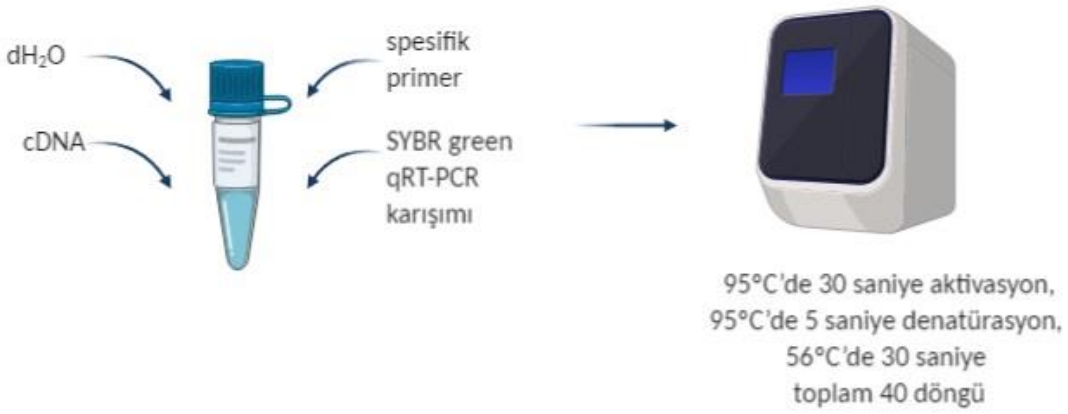
mRNA ekspresyonları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

$$\mathbf{2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{[\Delta Ct\ (deney\ grubu) - \Delta Ct\ (kontrol\ grubu)]}} \quad (3\text{-}5)$$

Eşitlik 3-5 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi

Tablo 3-5 qRT-PCR çalışmasında kullanılan ileri ve geri primerlerin dizileri

Primer	İleri Primer (5'-3')	Geri Primer (5'-3')	Tm (°C)
BAX	CAGCTCTTTAATGCCCGTTC	CTCAGCCCATCTTCTTCCAG	59°C
SMAD-4	CACAGGACAGAAGCCATTGA	ACGCCCAGCTTCTCTGTCTA	55°C
TP53	CACATGACGGAGGTTGTGAG	TAGGGCACCACCACACTATG	55°C
KRAS	TGCAATGAGGGACCAGTACA	TCCTGAGCCTGTTTTGTGTCT	55°C
CASPASE-3	TGTTTGTGTGCTTCTGAGCC	CACGCCATGTCATCATCAAC	56°C
CASPASE-9	CTCACCCTGCCTTATCTTGC	TGTCGTCAATCTGGAAGCTG	58°C
CASPASE-12	ATGGCTGGAAATGGAAACAG	TGGCAGTTACGGTTGTTGAA	55°C
GAPDH	AATCCCATCACCATCTTCCA	TGGACTCCACGACGTACTCA	55°C



Şekil 3-15 qRT-PCR deneyinin şematik gösterimi

3.5. İstatiksel Analiz

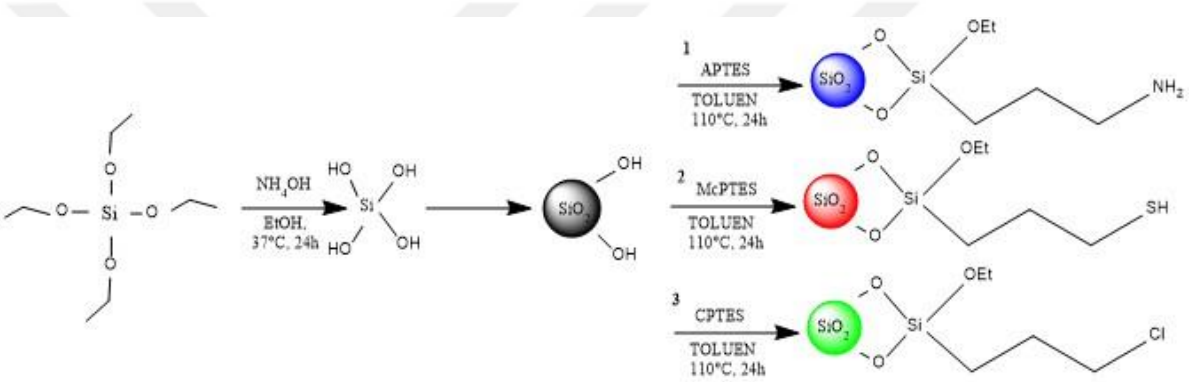
Bu tez kapsamında hesaplamalar, grafikler ve istatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı (GraphPad Software 8.0.2) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bağımsız deney setlerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları (SD), varyans analizi (ANOVA) ve Student t-testi analizi ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık *; $p < 0.05$; **; $p < 0.001$ ve ***; $p < 0.0001$ olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

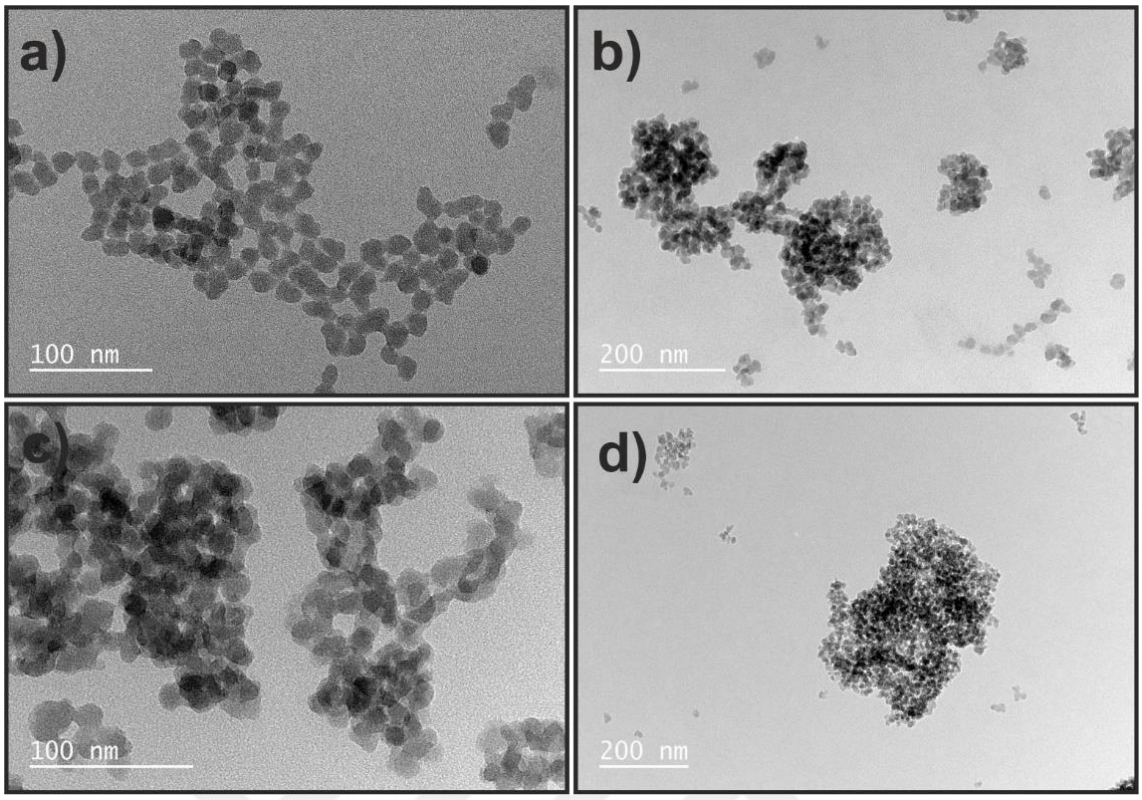
4.1. SiNP ve Fonksiyonlarının Karakterizasyon Sonuçları

Sentezlenen nanopartiküllerin boyutu, şekli ve diğer fiziksel özellikleri, partiküllerin hedeflenen hücreler tarafından hücresel alımı güçlü bir şekilde etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle, nanopartiküllerin yapılan analizlerde karakterizasyon sonuçları birbirleri ile tutarlı olmalıdır.

Şekil 4-1, SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin hazırlanmasının şematik gösterimidir.

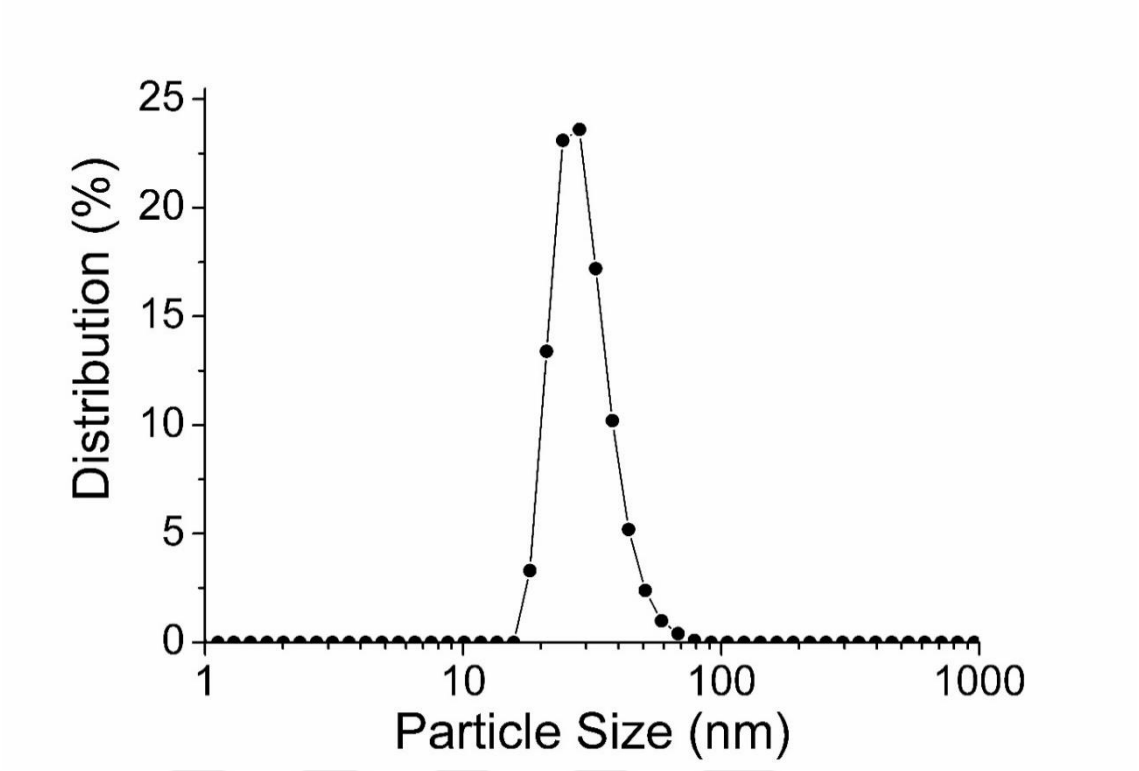


Şekil 4-1 SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin kimyasal yapısı



Şekil 4-2 Silika nanopartiküllere ait TEM görüntüleri a) SiNP, b) SiNP-NH_2, c) SiNP-SH, d) SiNP-Cl için TEM görüntüsü

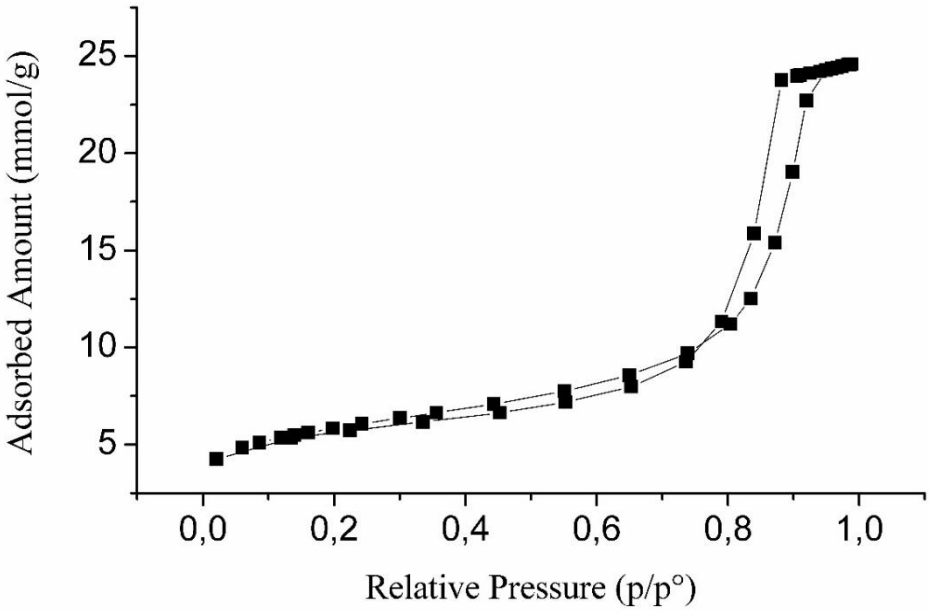
TEM analizi, nanopartiküllerin karakterizasyonu için güçlü ve uygulanabilir bir yöntemdir. **Şekil 4-2** SiNP'lerin ve modifikasyonlarının TEM görüntülerini göstermektedir. Elde edilen nanopartiküllerin boyut dağılımı Image J yazılımı kullanılarak analiz edildi. SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin yarı küresel yapıya ve gözeneksiz dokuya sahip olduğu gözlemlendi. Sentezlenen SiNP'lerin boyutu yaklaşık 10.03 ± 2.4 nm olduğu bulundu (**Şekil 4-2a**). SiNP'lerin fonksiyonelleştirilmiş türevlerinin, modifiye edilmemiş olanlardan biraz daha yüksek ortalama partikül çapına sahip olduğu görüldü. Fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküllerde çapın büyümesi beklenilen bir sonuçtu. SiNP-NH_2 nanopartiküller 11.94 ± 2.8 nm (**Şekil 4-2b**), SiNP-SH nanopartiküller 12.22 ± 2.6 nm (**Şekil 4-2c**) ve SiNP-Cl nanopartiküller 11.20 ± 2.5 nm (**Şekil 4-2d**) çapına sahipti. TEM analizine göre, en küçük boyut SiNP'lere, en büyük boyut ise tiyol grubu ile fonksiyonelleştirilmiş SiNP'lere (SiNP-SH) aitti.



Şekil 4-3 Silika nanopartiküllerin DLS analizi

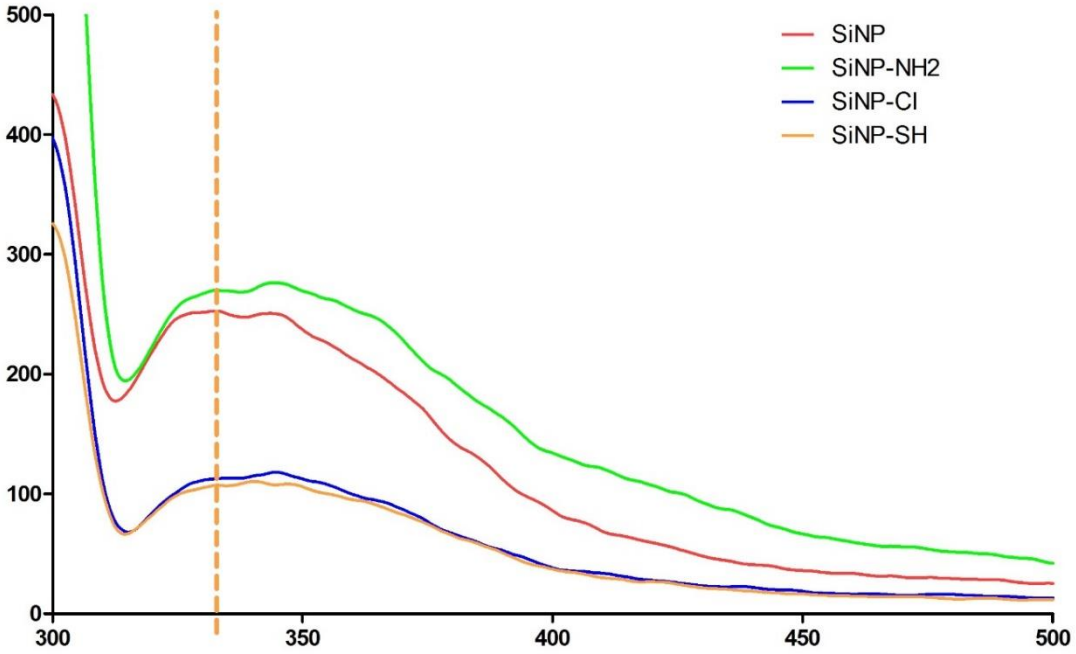
SiNP'lerin boyutunun belirlenmesi için kullanılan bir başka yöntem, Dinamik Işık Saçılımı (DLS) analizidir. DLS analizine göre SiNP'lerin parçacık boyutu dağılımı **Şekil 4-3**'de gösterilmektedir. SiNP'lerin boyutunun 10-100 nm arasında olduğu görüldü. DLS analiz sonuçlarına göre, SiNP'lerin ortalama parçacık boyutu 24.63 ± 6.9 nm olarak belirlendi.

DLS ve TEM arasında SiNP'lerin ortalama partikül boyutunda ufak bir fark olduğu gözlemlendi. Bu farklılaşma, dağıtıcı üzerindeki etki ve agregasyon nedeniyle ortaya çıkabilir. TEM analizinde numuneler kuru partiküller halinde gözlemlenirken, DLS analizinde numuneler çözelti formunda incelenir. DLS analizi sırasında partiküller solvent molekülleri ile çevrelenmiştir ve partikül boyutu bu nedenle daha yüksek çıkabilmektedir.



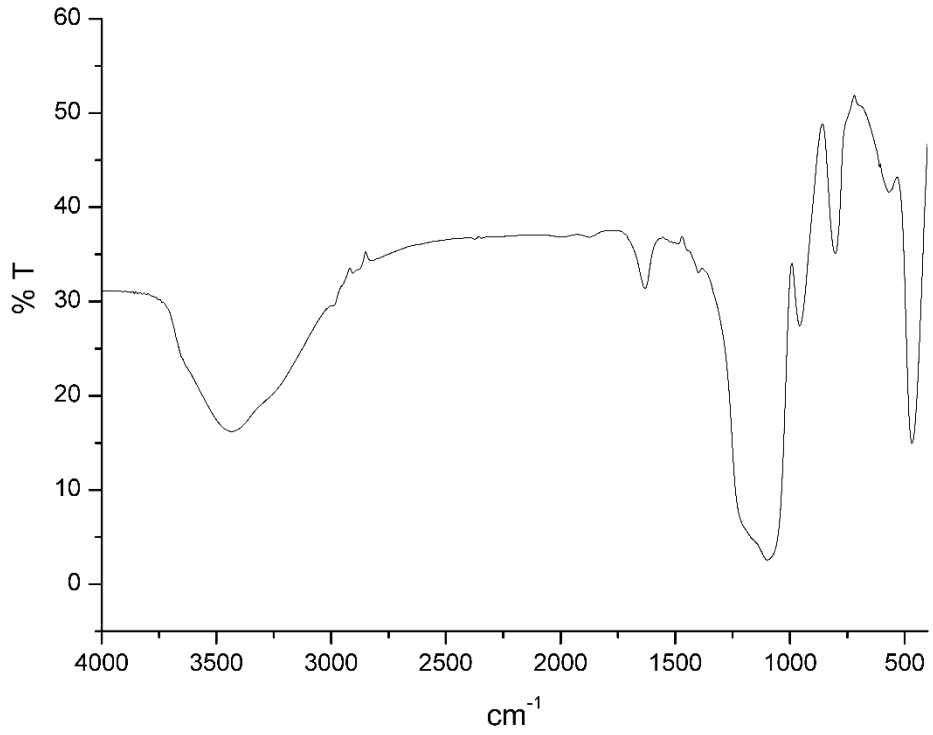
Şekil 4-4 Silika nanopartiküllerin BET analizi

SiNP'lerin N_2 Adsorpsiyon/Desorpsiyon izotermleri **Şekil 4-4**'de gösterilmektedir. IUPAC sınıflandırmasına göre, SiNP'lere ait N_2 Adsorpsiyon/Desorpsiyon izotermi, H3 histerezisi ile Tip II izoterm olarak sınıflandırılabilir (ALOthman, 2012). Bu sonuç, sentezlenen nanopartiküllerin gözeneksiz bir yapıda olduğunu gösterdi ve SiNP'lerin BET yüzey alanı 461.36 ± 4.3 m²/g olarak bulundu.



Şekil 4-5 Silika nanopartiküllerin ve bileşiklerinin UV spektrumları

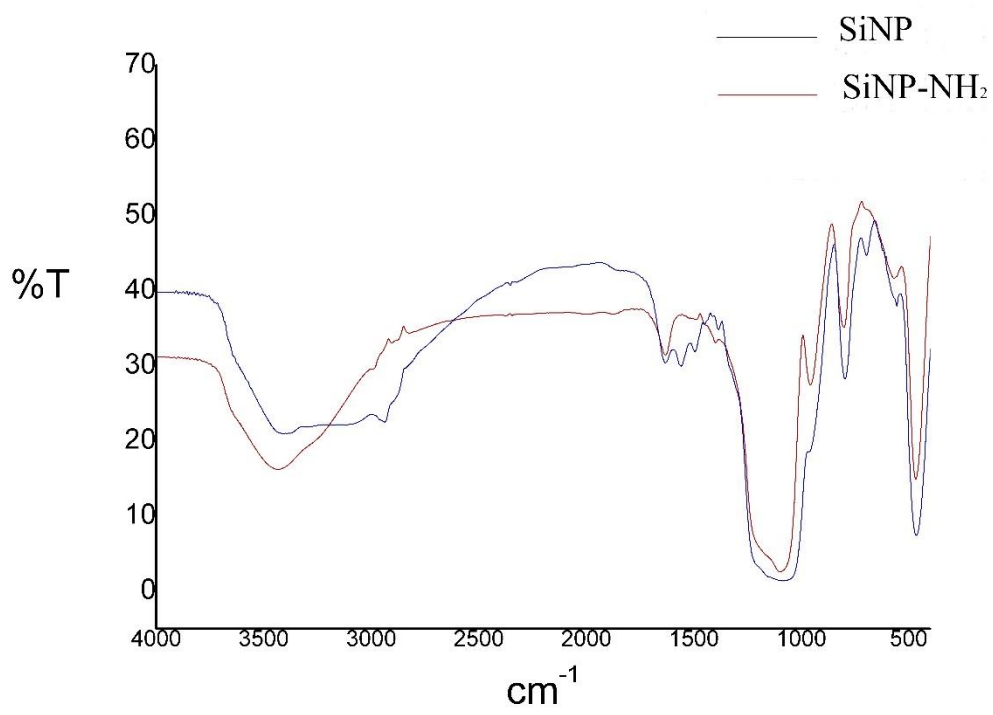
SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin UV-Vis spektrumları, **Şekil 4-5**'de gösterilmektedir. Sentezlenen tüm nanopartiküllerde 310-400 nm arasında yer alan güçlü adsorpsiyon piki gözlemlendi.



Şekil 4-6 Silika nanopartiküllere (SiNP) ait FT-IR spektrumu

Şekil 4-6, 4-7, 4-8, 4-9 4000 cm^{-1} ila 500 cm^{-1} arasında değişen SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin FT-IR spektrumlarını göstermektedir.

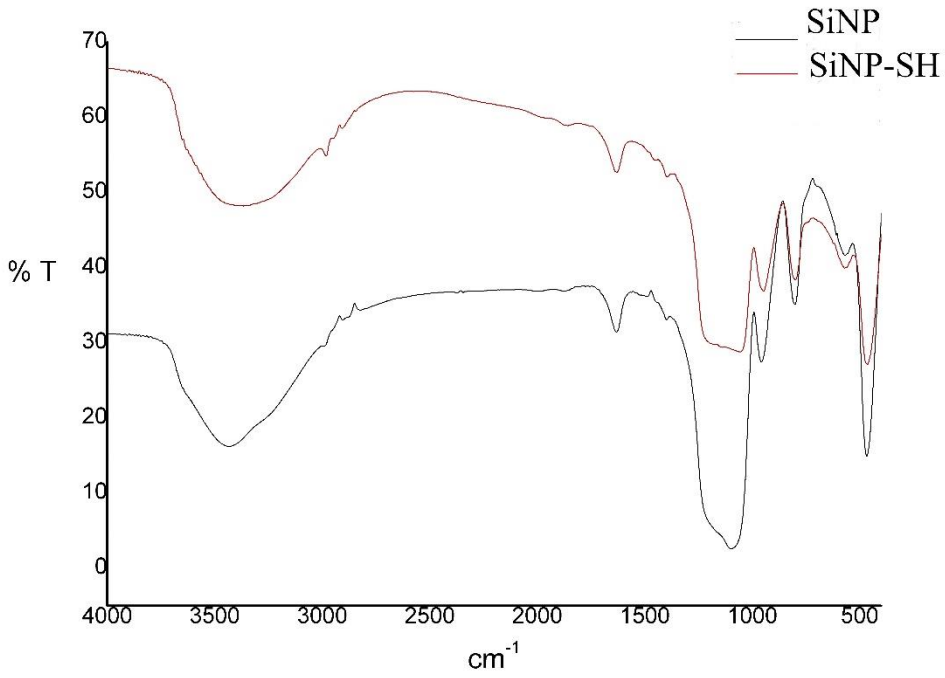
Silika nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu incelendiğinde (**Şekil 4-6)**, spektrumdaki 3400 cm^{-1} ve 1600 cm^{-1}'deki pikler, hidroksil gruplarına ait gerilme titreşimleri oldukları düşünülmektedir. 1100 cm^{-1} ve 800 cm^{-1} civarındaki pikler, sırasıyla Si-O-Si (siloksan) gerilme titreşimlerinden ve OH bükülme titreşimlerinden dolayı ortaya çıkmıştır.



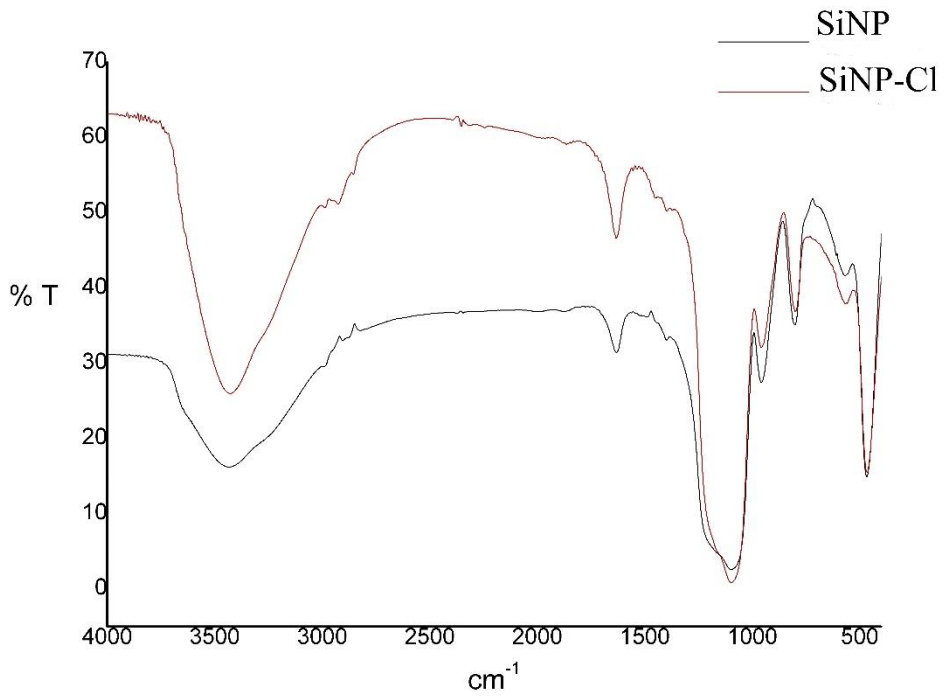
Şekil 4-7 Amin grubu ile fonksiyonelleştirilen silika nanopartiküllere ($SiNP\text{-}NH_2$) ait FT-IR spektrumu

Silika nanopartiküllerinin APTES ile modifikasyonunda sonra ($SiNP\text{-}NH_2$), SiNP'lere göre FT-IR spektrumunda önemli değişiklikler fark edildi. **Şekil 4-7**'de görüldüğü gibi, SiNP'lerin yapısal piklerine ek olarak CH_2 titreşimlerine atfedilen 2924 cm^{-1} ve 2852 cm^{-1}'de pikler gözlemlendi. Ayrıca, amin gruplarından ($-NH_2$) dolayı yaklaşık 1490 cm^{-1} ve 1558 cm^{-1}'de pikler oluştuğu gözlendi.

Sonuç olarak FT-IR spektrumları silika nanopartiküllerin yüzeyinin APTES ile modifikasyonunun başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir.



Şekil 4-8 Tiyol grubu ile fonksiyonelleştirilen silika nanopartiküllere (SiNP-SH) ait FT-IR spektrumu



Şekil 4-9 Klor grubu ile fonksiyonelleştirilen silika nanopartiküllere (SiNP-Cl) ait FT-IR spektrumu

APTES ile modifiye edilmiş silika nanopartiküllerinin aksine, McPTES ve CPTES ile modifiye edilmiş silika nanopartiküllerin FT-IR spektrumları, SiNP'lerle neredeyse aynıydı. Ancak küçükde olsa farklılıklar gözlemlendi. Özellikle, McPTES ve CPTES ile modifiye edilmiş silika nanopartiküller için CH_2 titreşimlerine atfedilen 2924 cm^{-1} ve 2852 cm^{-1}'deki piklerin yoğunluğu görülebilir ve SiNP'den biraz farklıdır (**Şekil 4-8, 4-9**).

Literatürde bildirildiği gibi silika nanopartiküllerinin yüzeyindeki silanol grubu miktarı partiküllerin büyüklüğü ile ters orantılıdır (Rahman ve ark., 2009). Silanol gruplarının miktarı APTES, McPTES ve CPTES'in bağlanması için önemli bir faktördür, çünkü yoğunlaşma reaksiyonu yüzey -OH grubu ve silan birleştirme ajanlarının etoksi grubu arasında gerçekleşmiştir. APTES ile modifiye edilmiş silika nanopartiküller açısından, silika partiküllerinin yüzeyindeki -OH grubu ile $-NH_2$ grupları arasındaki hidrojen bağları, silan birleştirme maddelerinin adsorpsiyonunu ve APTES'in yüzeye yapışmasını arttırabilir.

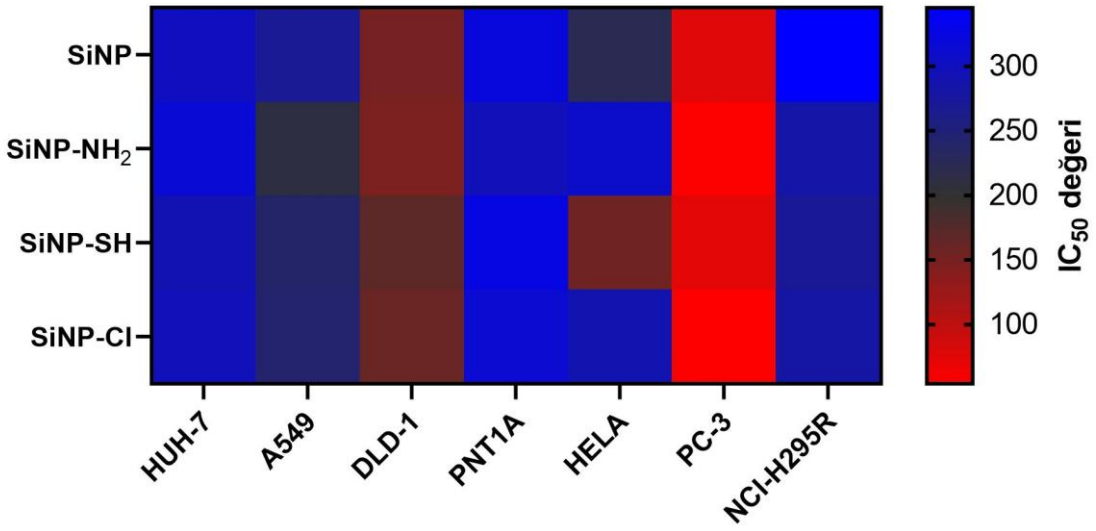
4.2. SiNP ve Fonksiyonlarının Farklı Kanser Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkileri

Hücre çalışmalarının ilk basamağında sentezlenen SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri çeşitli insan kanser hücreleri üzerinde test edilerek kanser hücrelerinin %50'sini öldüren konsantrasyonlar (IC_{50}) hesaplandı. SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri; insan karaciğer kanseri hücre hattı HUH-7, insan böbrek kanseri hücre hattı NCI-H295R, insan akciğer kanseri hücre hattı A549, insan kolon kanseri hücre hattı DLD-1, insan serviks kanseri hücre hattı HELA ve insan prostat kanseri hücre hattı PC-3 olmak üzere 6 (altı) farklı insan kanser hücresi ve insan sağlıklı epitel hücre hattı PNT1A olmak üzere toplamda 7 (yedi) hücre hattında denendi.

Tablo 4-1 SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin değişik kanser hücreleri üzerindeki IC_{50} (µg/mL) değerleri

HÜCRE	SiNP	SiNP-NH_2	SiNP-SH	SiNP-Cl
HUH-7	>250 µg/mL	>250 µg/mL	>250 µg/mL	>250 µg/mL
NCI-H295R	>250 µg/mL	>250 µg/mL	>250 µg/mL	>250 µg/mL
A549	>250 µg/mL	>250 µg/mL	>250 µg/mL	>250 µg/mL
DLD-1	150.9 µg/mL	146.5 µg/mL	168.8 µg/mL	159.6 µg/mL
HELA	>250 µg/mL	>250 µg/mL	155.7 µg/mL	>250 µg/mL
PC-3	**75,91 µg/mL**	**55,46 µg/mL**	**72,89 µg/mL**	**54,09 µg/mL**
PNT1A	>250 µg/mL	>250 µg/mL	>250 µg/mL	>250 µg/mL

Elde edilen veriler sonucunda SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin insan prostat kanseri hücrelerinde yüksek oranda sitotoksik etkiye sahip olduğu bulundu (**Tablo 3.4-5**). SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin akciğer, karaciğer ve böbrek üstü bezi kanseri hücrelerinde sitotoksik etki göstermediği ve ek olarak sağlıklı epitel hücresi üzerinde de toksik etki göstermediği bulundu. Böylece SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri, IC_{50} değeri olarak bulunan konsantrasyon aralıklarında sağlıklı hücrelere zarar vermeden sadece kanserli hücrelere etki gösterdi.



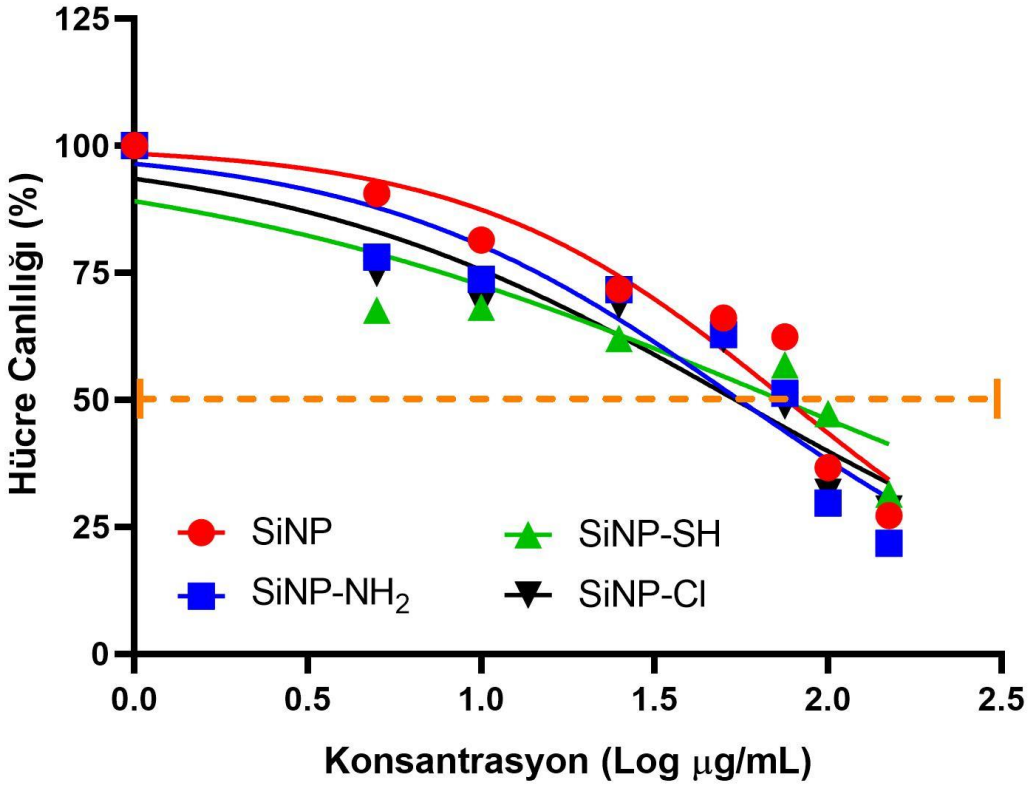
Şekil 4-10 SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin değişik kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri

Sitotoksisite deneyleri sonucunda SiNP'ler ve bileşiklerinin seçici bir sitotoksik etkiye sahip oldukları ve doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulundu.

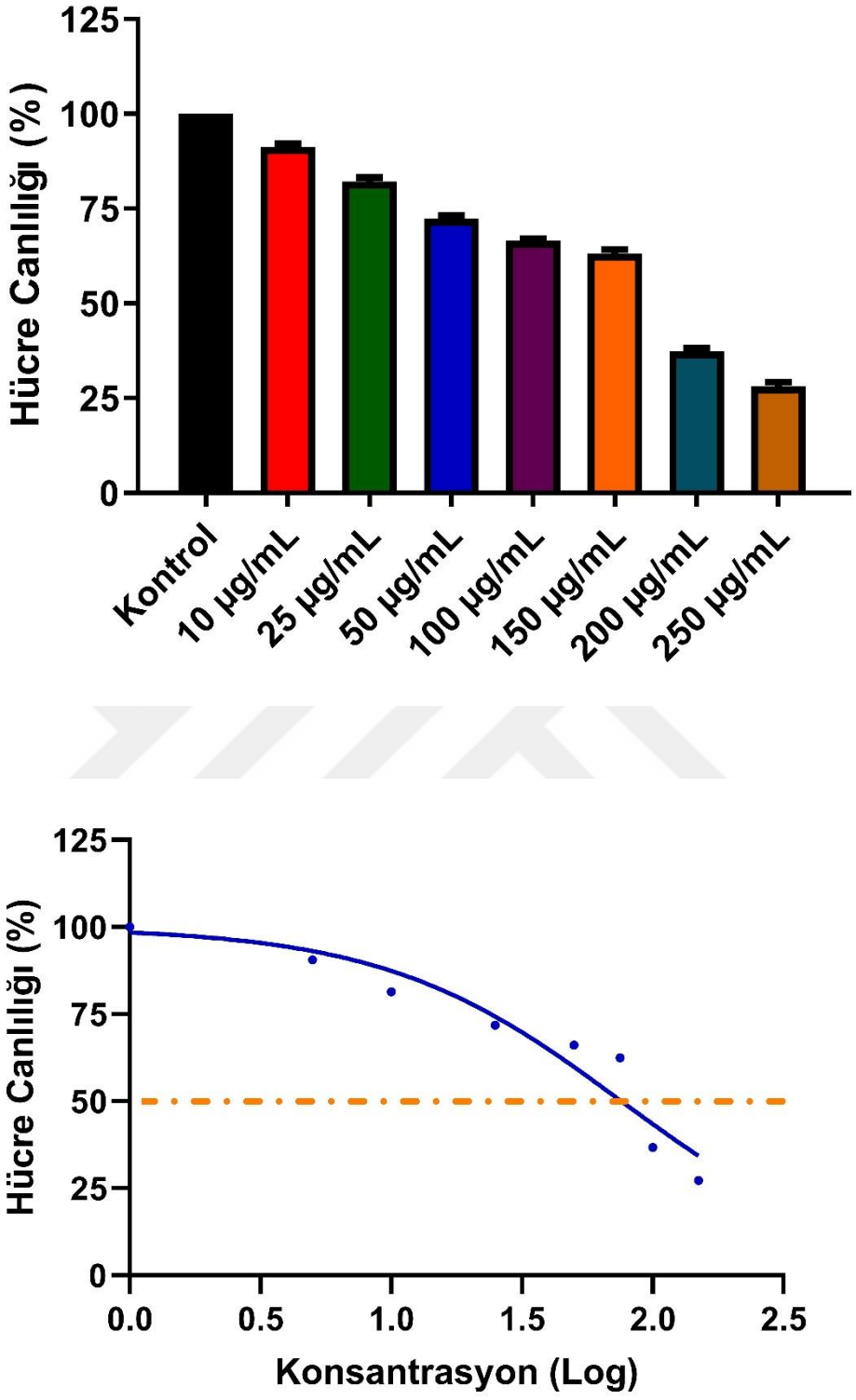
4.3. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresi Üzerine Sitotoksik Etkileri

Sitotoksisite deneyleri sonucunda SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin en yüksek sitotoksik etkiye PC-3 hücreleri üzerinde sahip olduğu bulundu.

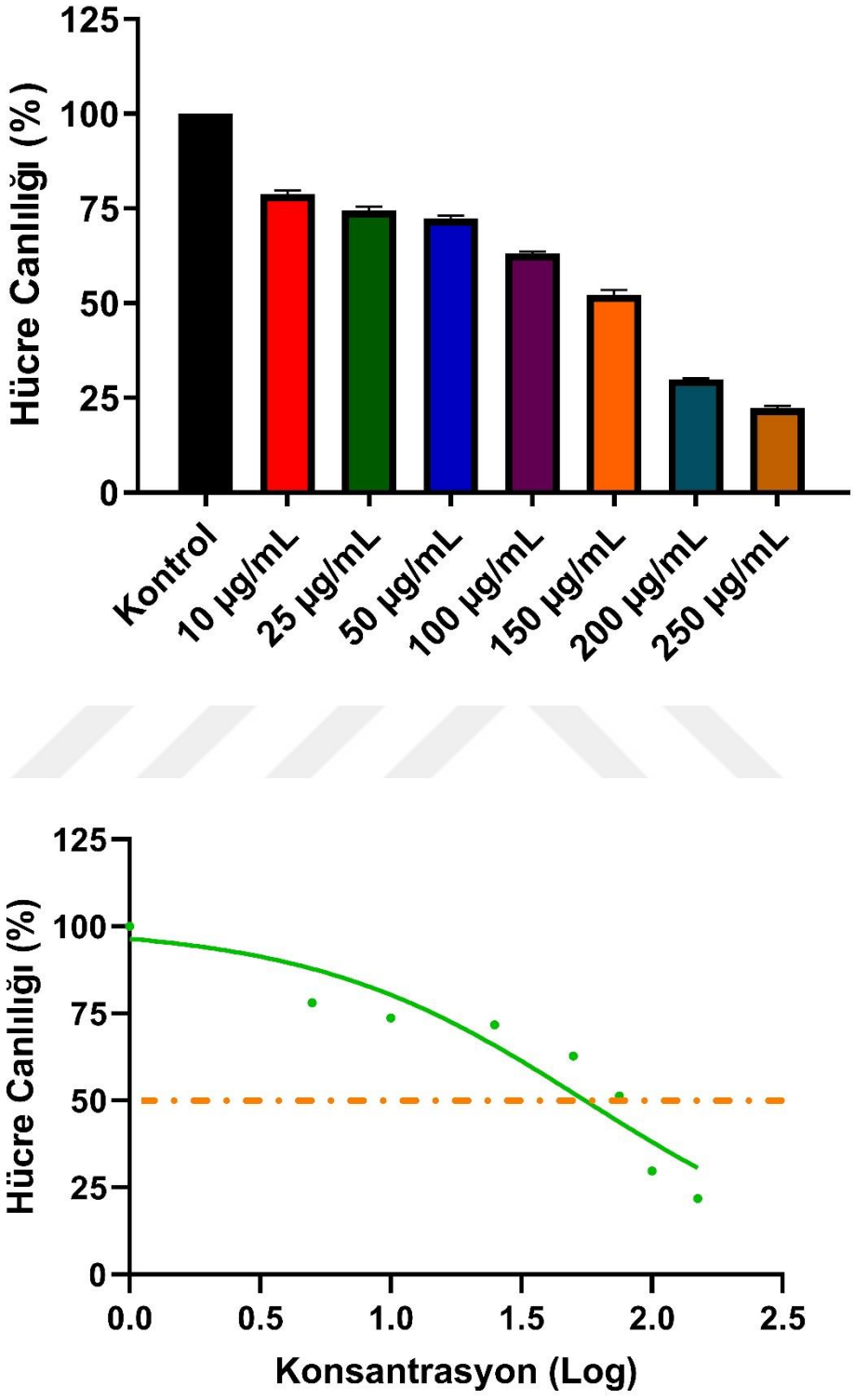
Bileşikler arasında PC-3 hücreleri üzerinde en yüksek toksik etkiye SiNP-Cl (54,09 µg/mL) sahip iken SiNP (75,91 µg/mL**)** ise diğer bileşikler ile kıyaslandığında daha az bir toksik etki gösterdi.



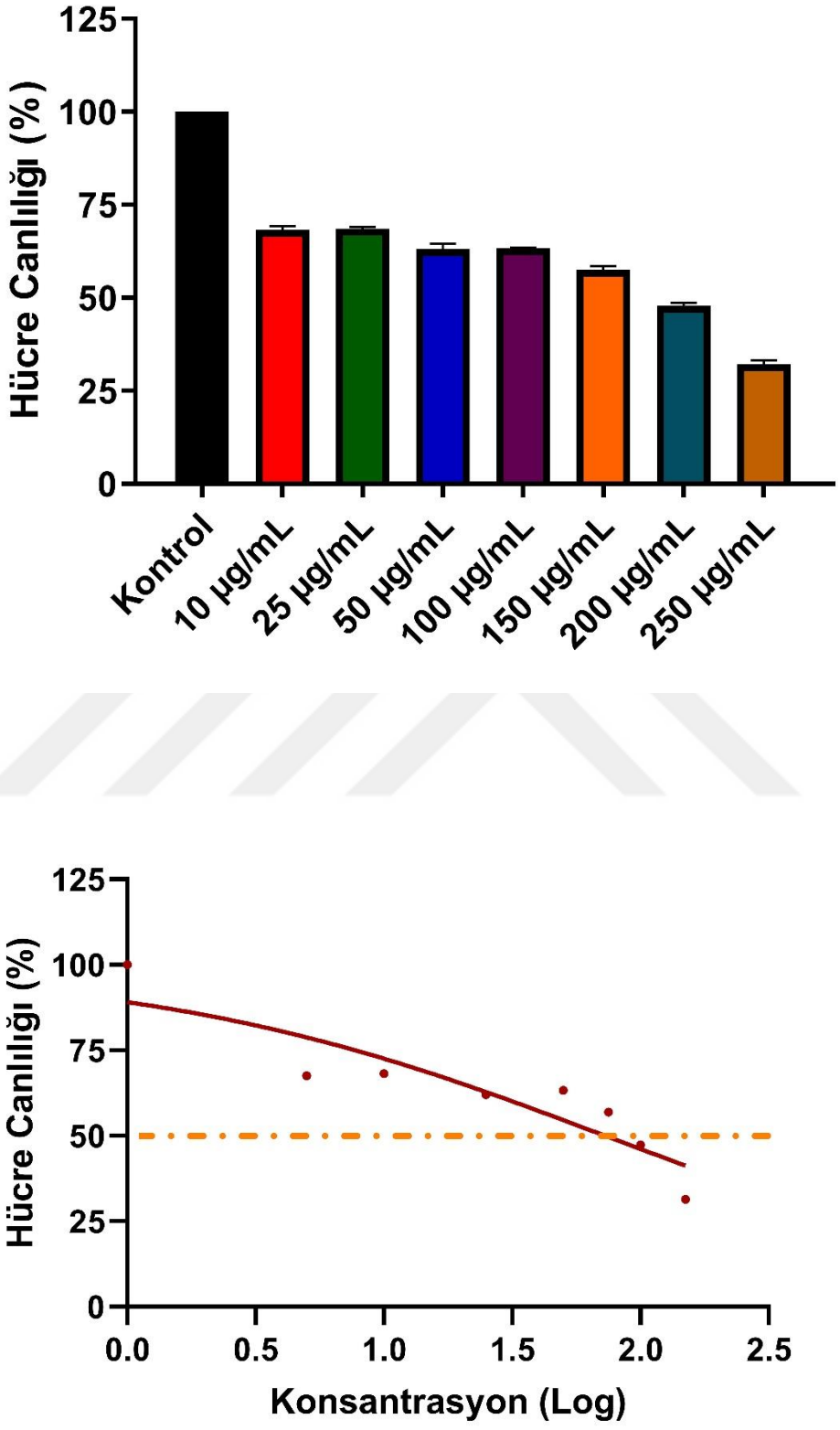
Şekil 4-11 SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin PC-3 hücreleri üzerindeki konsantrasyona bağlı sitotoksik etkileri



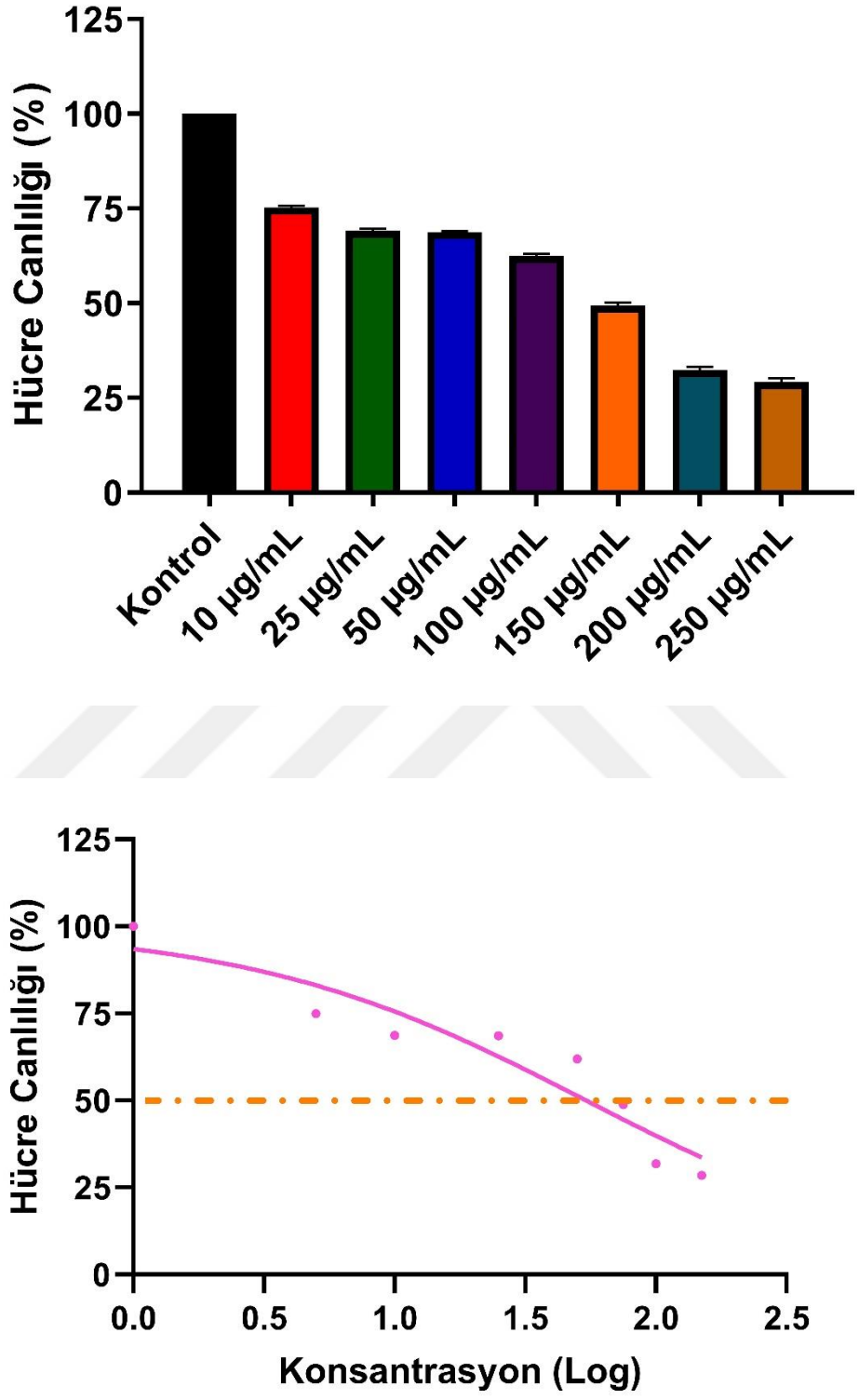
Şekil 4-12 Silika nanopartiküllerin (SiNP) prostat kanseri hücresi proliferasyonu üzerine doza bağımlı sitotoksik etkileri



Şekil 4-13 Amin grubu ile fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküllerin ($SiNP\text{-}NH_2$) prostat kanseri hücresi proliferasyonu üzerine doza bağımlı sitotoksik etkileri



Şekil 4-14 Tiyol grubu ile fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküllerin (SiNP-SH) prostat kanseri hücresi proliferasyonu üzerine doza bağımlı sitotoksik etkileri



Şekil 4-15 Klor grubu ile fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküllerin (SiNP-Cl) prostat kanseri hücresi proliferasyonu üzerine doza bağımlı sitotoksik etkileri

4.4. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresi Üzerine Apoptotik Etkileri

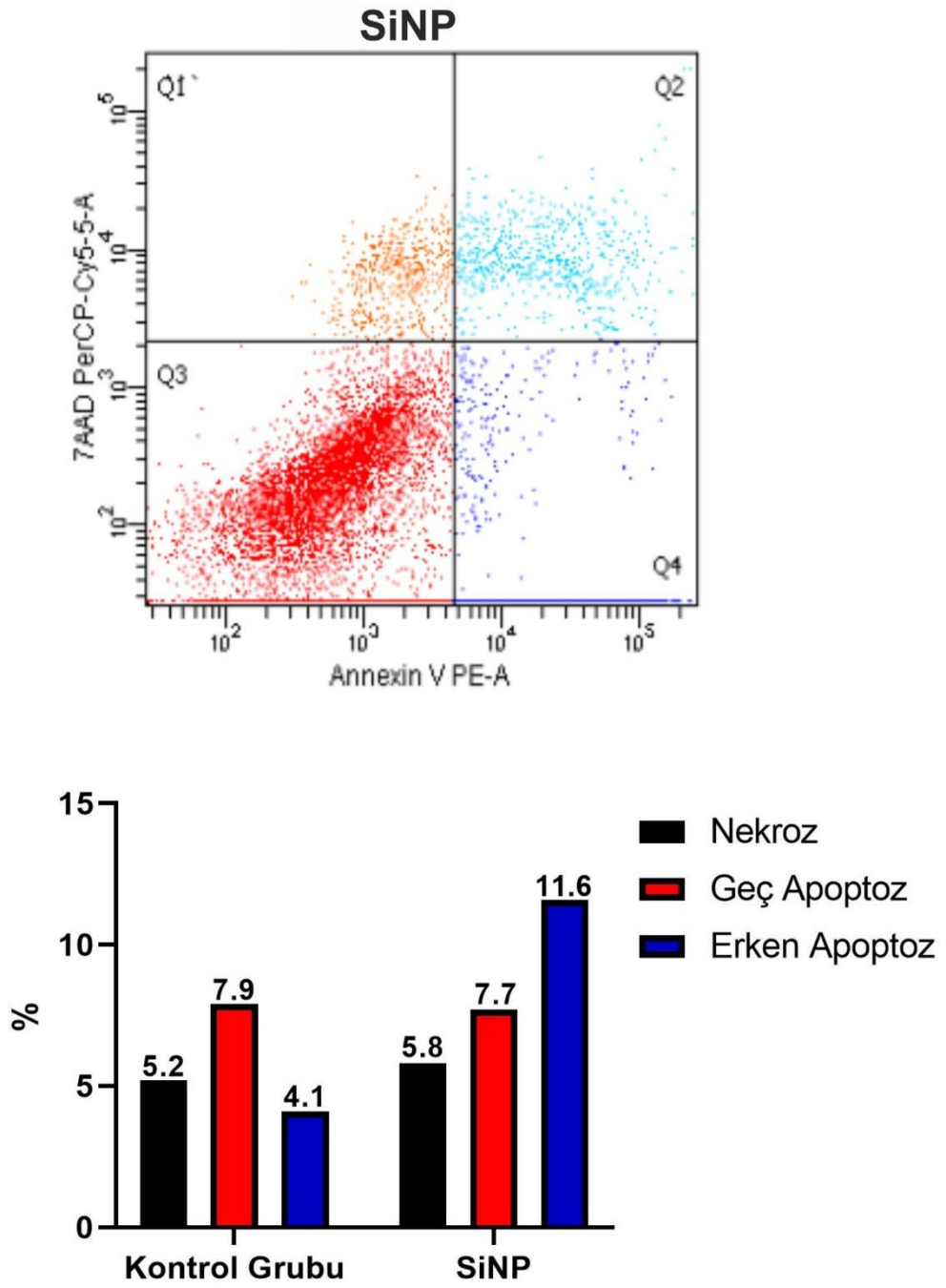
SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri ile muamele edilen insan prostat kanseri hücresi üzerinde apoptoz etkileri akış sitometrisi ile incelendi.

Prostat kanseri hücre hattı PC-3 üzerinde herhangi bir bileşik ile muamele edilmemiş kontrol grubu %4.1 erken apoptoz, %7.9 geç apoptoz ve %5.2 oranında nekroza uğradığı gözlendi. SiNP ile muamele edilen hücrelerin %11.6 erken apoptoz, %7.7 geç apoptoz ve %5.8 oranında nekroza uğradığı bulundu. Böylelikle SiNP'ler, PC-3 hücrelerini kontrol hücresine göre 2.83-kat daha fazla erken apoptoza uğratarak hücreyi apoptoza sürükledi (**Şekil 4-16**).

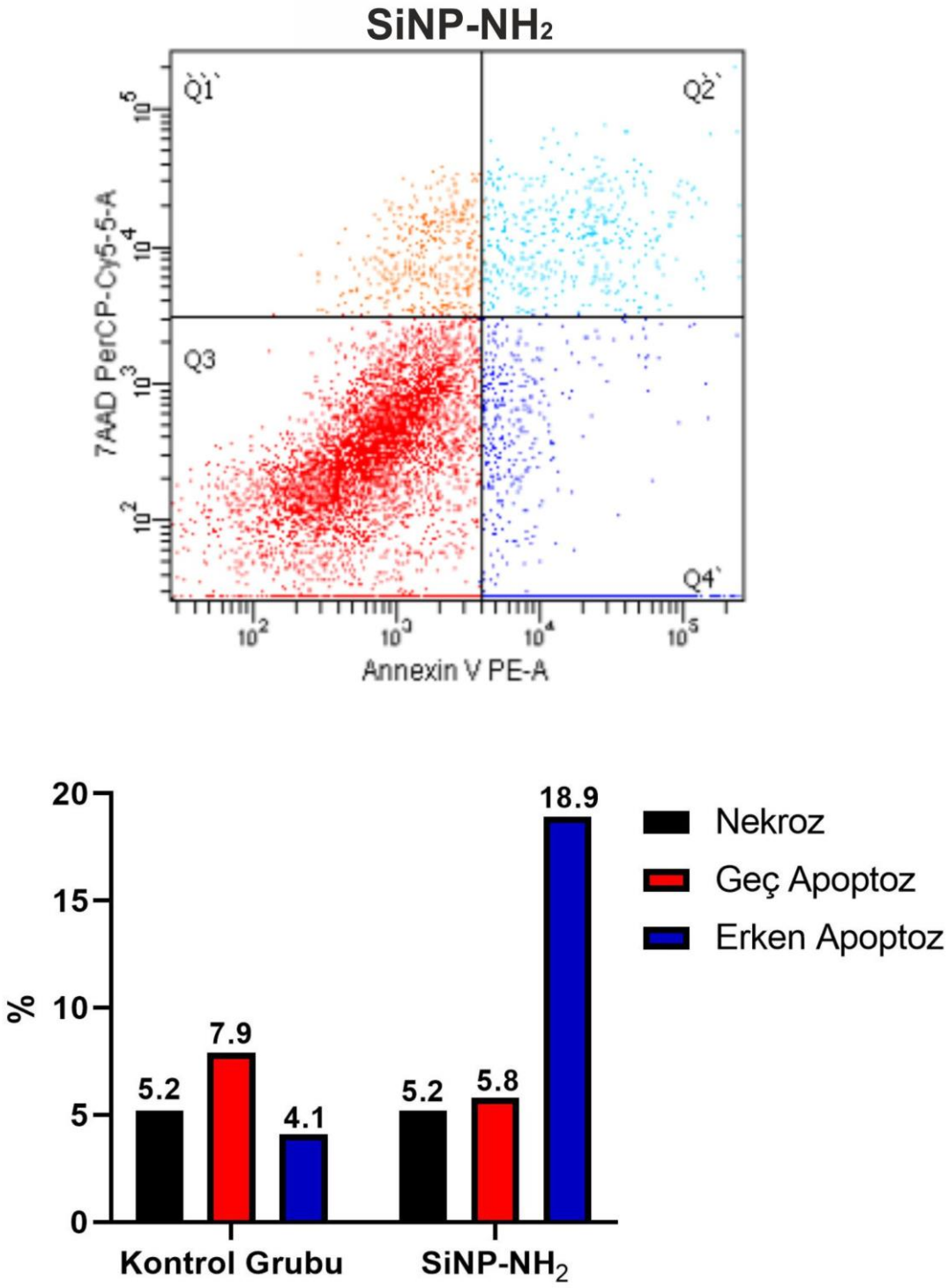
SiNP-NH_2 ile muamele edilen hücrelerin %18.9 erken apoptoz, %5.8 geç apoptoz ve %5.2 oranında nekroza uğradığı bulundu. Böylelikle SiNP-NH_2'nin, PC-3 hücrelerini kontrol hücresine göre 4.61-kat daha fazla erken apoptoza uğrattı (**Şekil 4-17**).

SiNP-Cl ile muamele edilen hücrelerin %27.7 erken apoptoz, %5.1 geç apoptoz ve %4.4 oranında nekroza uğradığı bulundu. Böylelikle SiNP-Cl, PC-3 hücrelerini kontrol hücresine göre 6.76-kat daha fazla erken apoptoza uğrattı (**Şekil 4-18**).

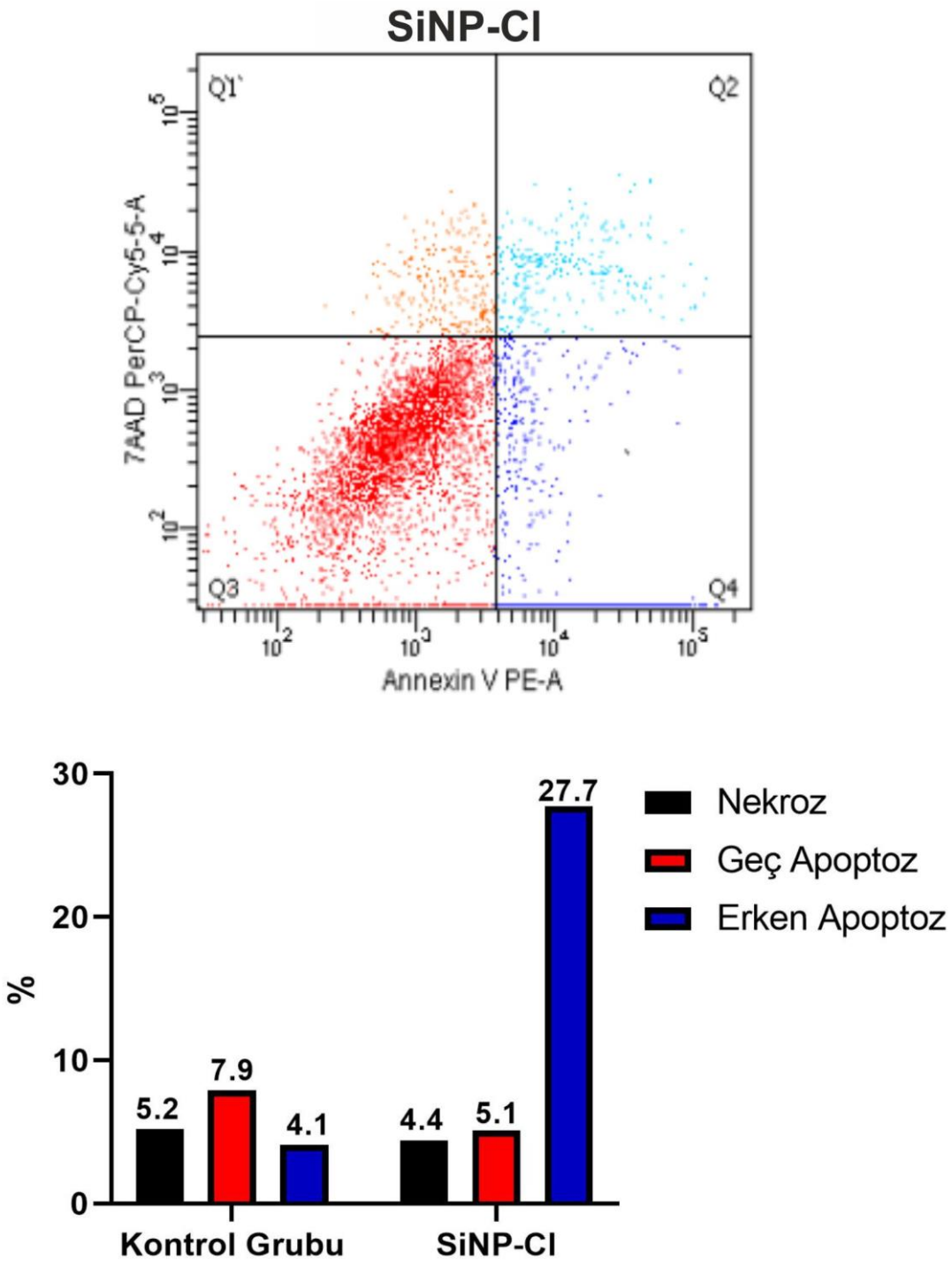
SiNP-SH ile muamele edilen hücrelerin %32.3 erken apoptoz, %7.5 geç apoptoz ve %9.8 oranında nekroza uğradığı bulundu. Böylelikle SiNP-SH'nin, PC-3 hücrelerini kontrol hücresine göre 7.88-kat daha fazla erken apoptoza uğratarak hücreyi apoptoza sürüklediği bulundu (**Şekil 4-19**).



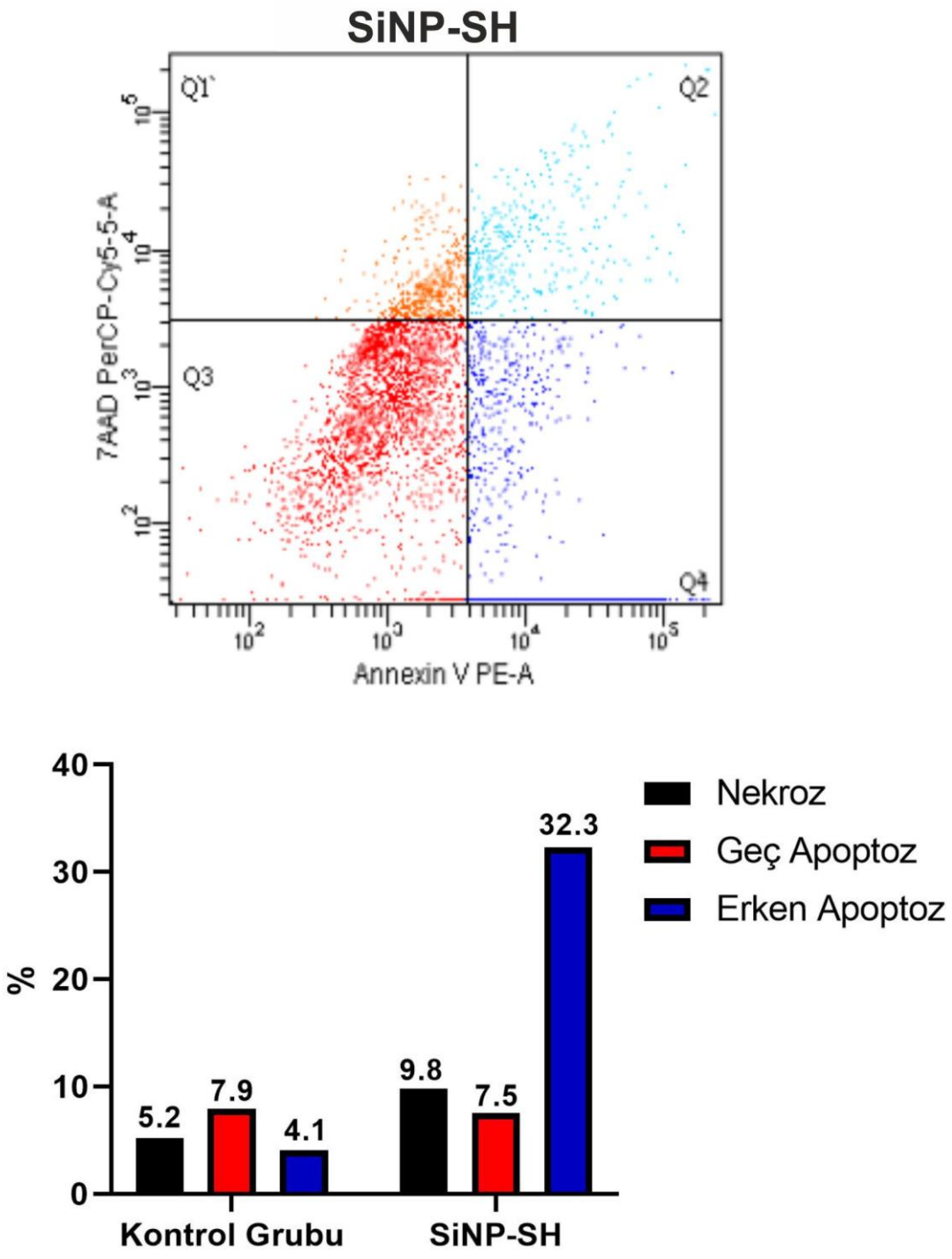
Şekil 4-16 Silika nanopartiküllerin (SiNP) IC_{50} değerinde (75.91 µg/mL) erken/geç apoptotik ve nekrotik etkisi için PC-3 hücrelerinin 48 saat sonunda Annexin V-APC ve 7-AAD ile boyanması



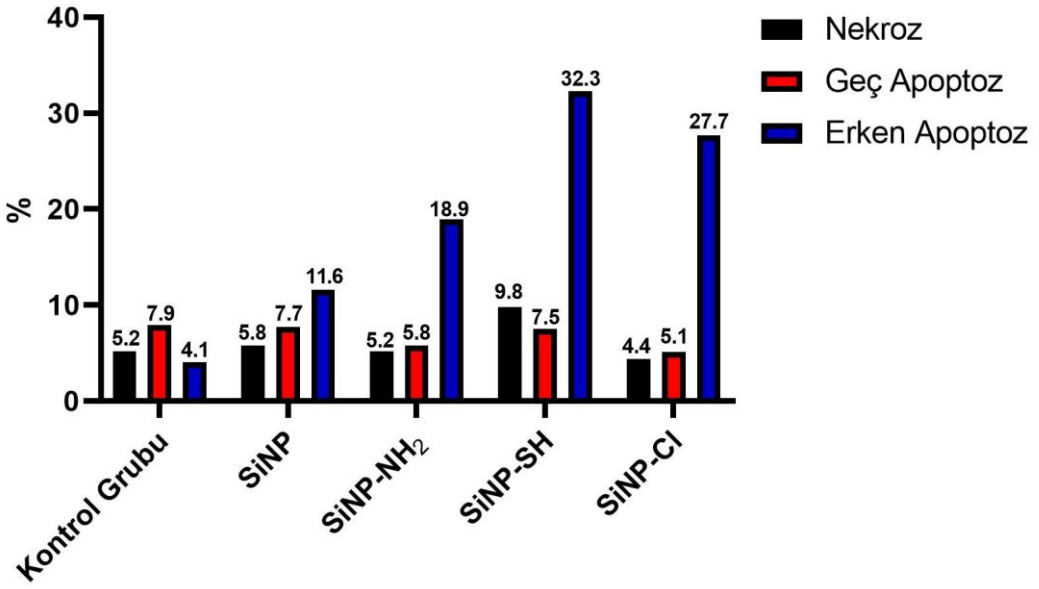
Şekil 4-17 Amin grubu ile fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküllerin ($SiNP\text{-}NH_2$) IC_{50} değerinde (55.46 µg/mL) erken/geç apoptotik ve nekrotik etkisi için PC-3 hücrelerinin 48 saat sonunda Annexin V-APC ve 7-AAD ile boyanması



Şekil 4-18 Klor grubu ile fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküllerin (SiNP-Cl) IC_{50} değerinde (54.09 µg/mL) erken/geç apoptotik ve nekrotik etkisi için PC-3 hücrelerinin 48 saat sonunda Annexin V-APC ve 7-AAD ile boyanması



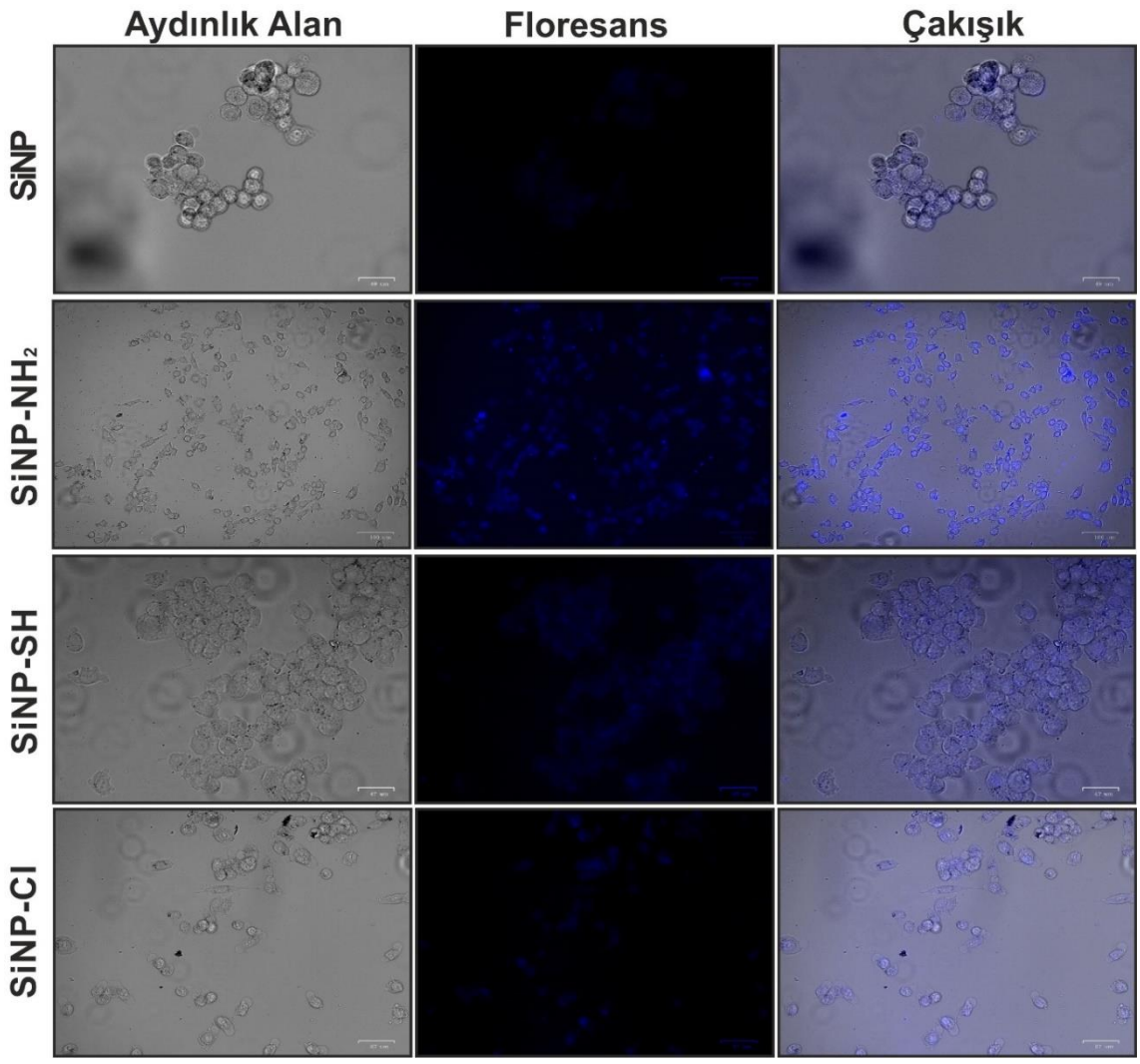
Şekil 4-19 Tiyol grubu ile fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküllerin (SiNP-SH) IC_{50} değerinde (72.89 µg/mL) erken/geç apoptotik ve nekrotik etkisi için PC-3 hücrelerinin 48 saat sonunda Annexin V-APC ve 7-AAD ile boyanması



Şekil 4-20 SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin nekroz, erken apoptoz ve geç apoptoz oranlarının kümülatif grafiği

Sonuç olarak fonksiyonlandırılmamış silika nanopartikül ve fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküller karşılaştırıldığında PC-3 hücrelerini en büyük oranda erken apoptoza götüren bileşik SiNP-SH olmuştur (**Şekil 4-20**).

4.5. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresinde Hücre Görüntülemesi



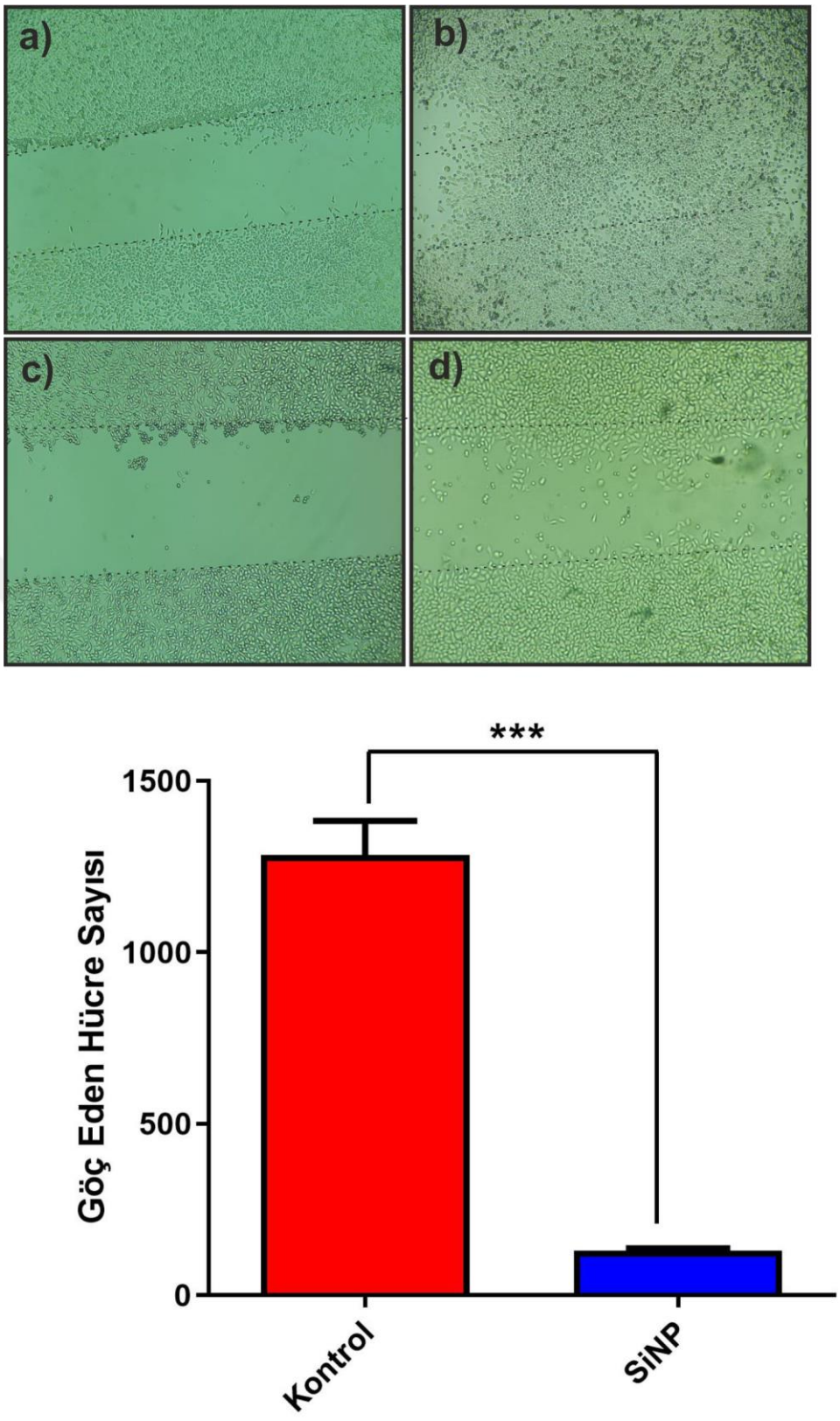
Şekil 4-21 SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin PC-3 hücrelerinde hücre görüntülemesi. Sol panel aydınlık alan görüntüsü, orta panel floresans görüntü ve sağ panel çakışma görüntüsünü temsil etmektedir

Hücre görüntüleme çalışmaları için SiNP (75.91 µg/mL), SiNP-NH_2 (55.46 µg/mL), SiNP-SH (72.89 µg/mL) ve SiNP-Cl (54.09 µg/mL) ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin yarım saatlik inkübasyonundan sonra floresan hücre görüntüleme sistemi ZOE-Bio-RAD ile gerçekleştirildi. Tüm bileşiklerin mavi dalga boyunda floresans bir etkiye sahip olduğu bulundu. Tüm bileşiklerin hücrenin sitoplazmasında yayıldığı ve nükleusta toplandığı gözlemlendi.

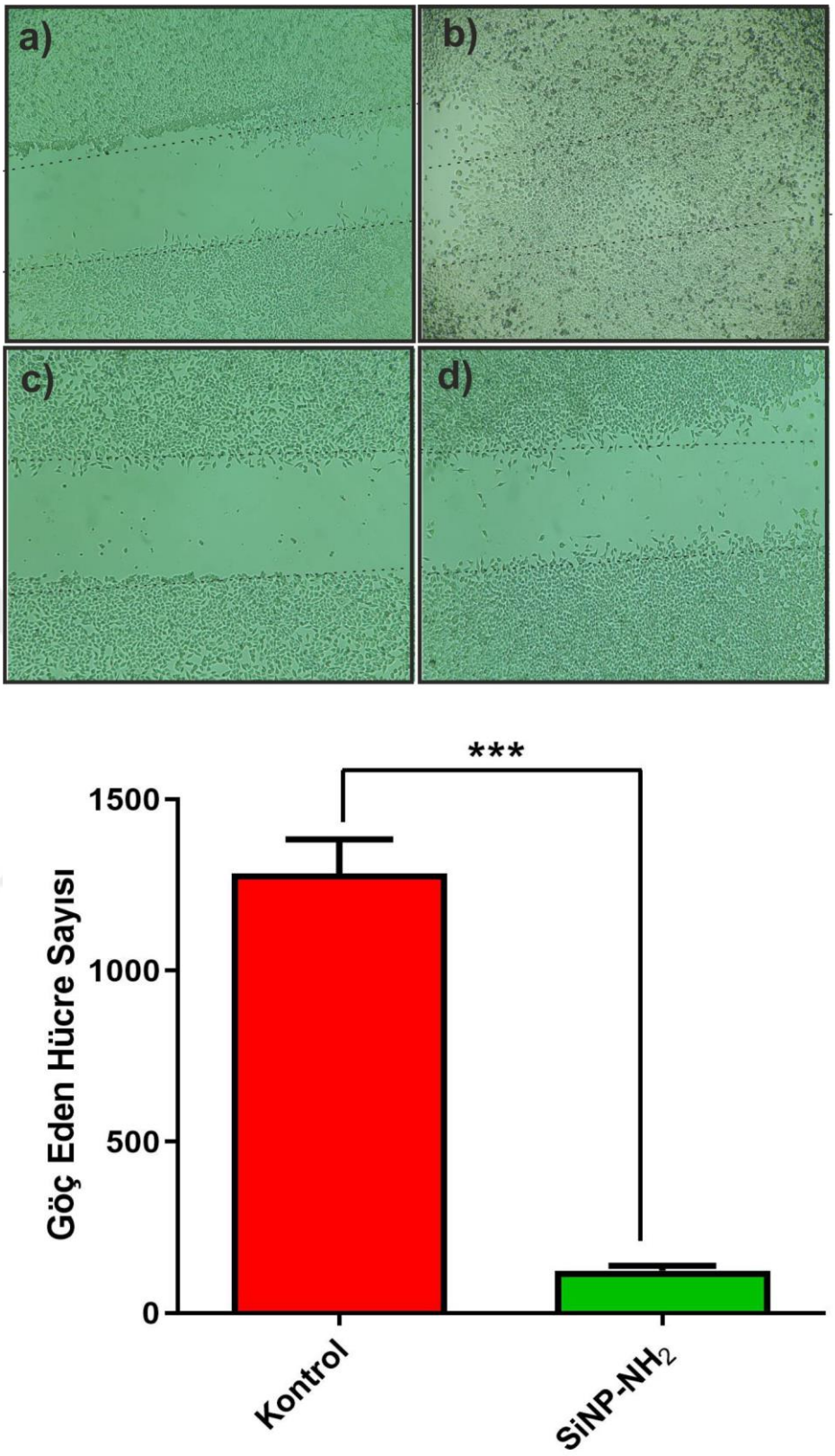
4.6. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresinde Metastatik Etkileri

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin PC-3 hücreleri üzerindeki metastatik etkilerinin incelenmesi amacıyla yara iyileştirmesi deneyi gerçekleştirildi. Bunun için steril insertler yardımı ile 0.9 mm kalınlığında bir yara açılarak PC-3 hücreleri 24 kuyucuklu plakalara ekildi. 24 saatlik bir inkübasyondan sonra insertler kaldırıldı ve hücreler mikroskopta görüntülenerek fotoğraflandı. Alınan ilk görüntülerin ardından hücrelere SiNP (75.91 μg/mL), SiNP-NH_2 (55.46 μg/mL), SiNP-SH (72.89 μg/mL) ve SiNP-Cl (54.09 μg/mL) ile muamele edildi. 24 saat sonra hücreler tekrar fotoğraflandı ve kontrol grubu ile SiNP ve bileşiklerinin oluşturulan yarayı hangi oranda azalttığı karşılaştırıldı.

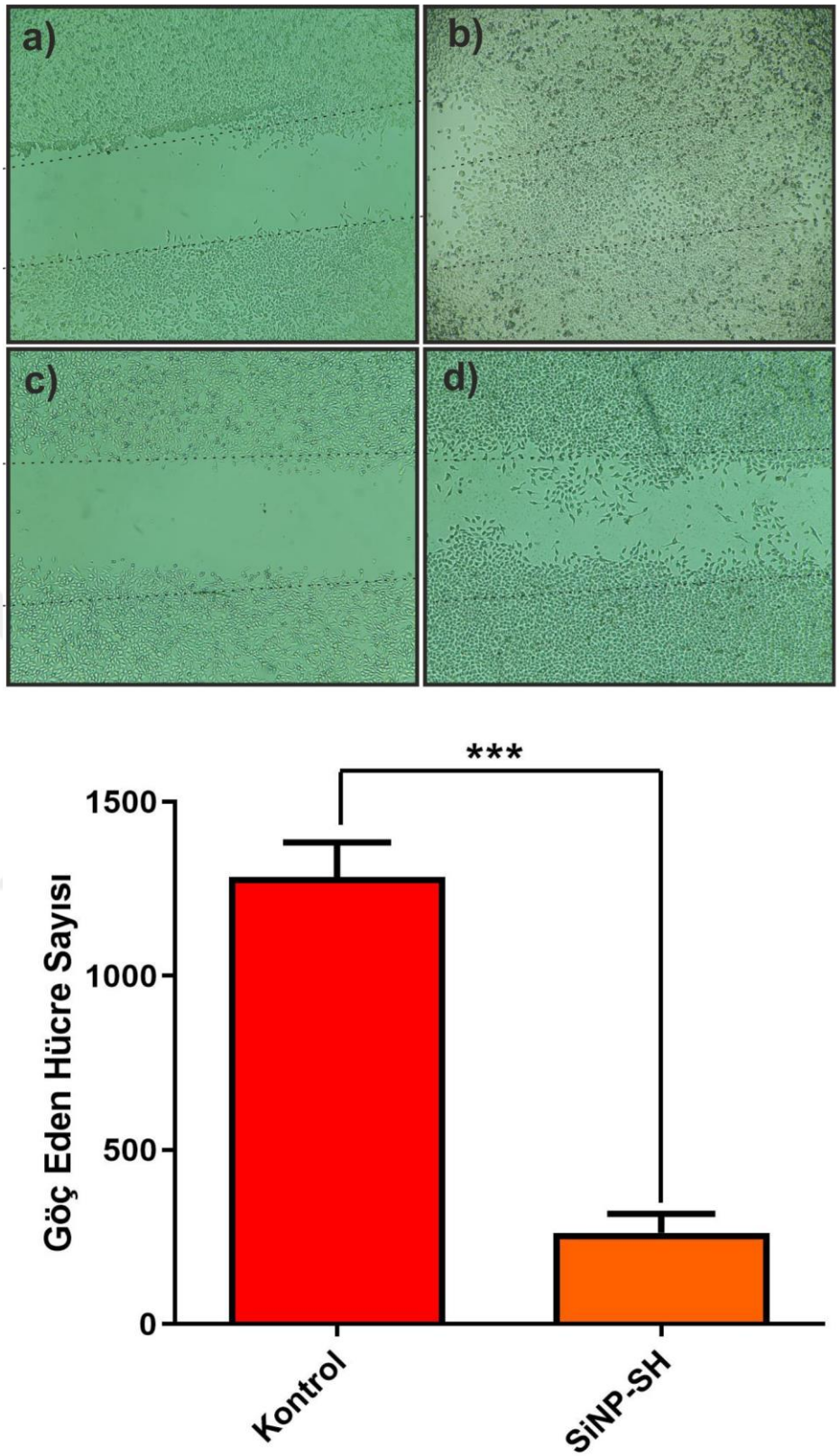
SiNP ve bileşikleri ile muamele edilen hücreler kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında SiNP'ler PC-3 hücrelerinin metastazını %10 (**Şekil 4-22**), SiNP-NH_2 %9.6 (**Şekil 4-23**), SiNP-SH %20.4 (**Şekil 4-24**) ve SiNP-Cl bu oranı %20.5'e (**Şekil 4-25**) kadar düşürdü.



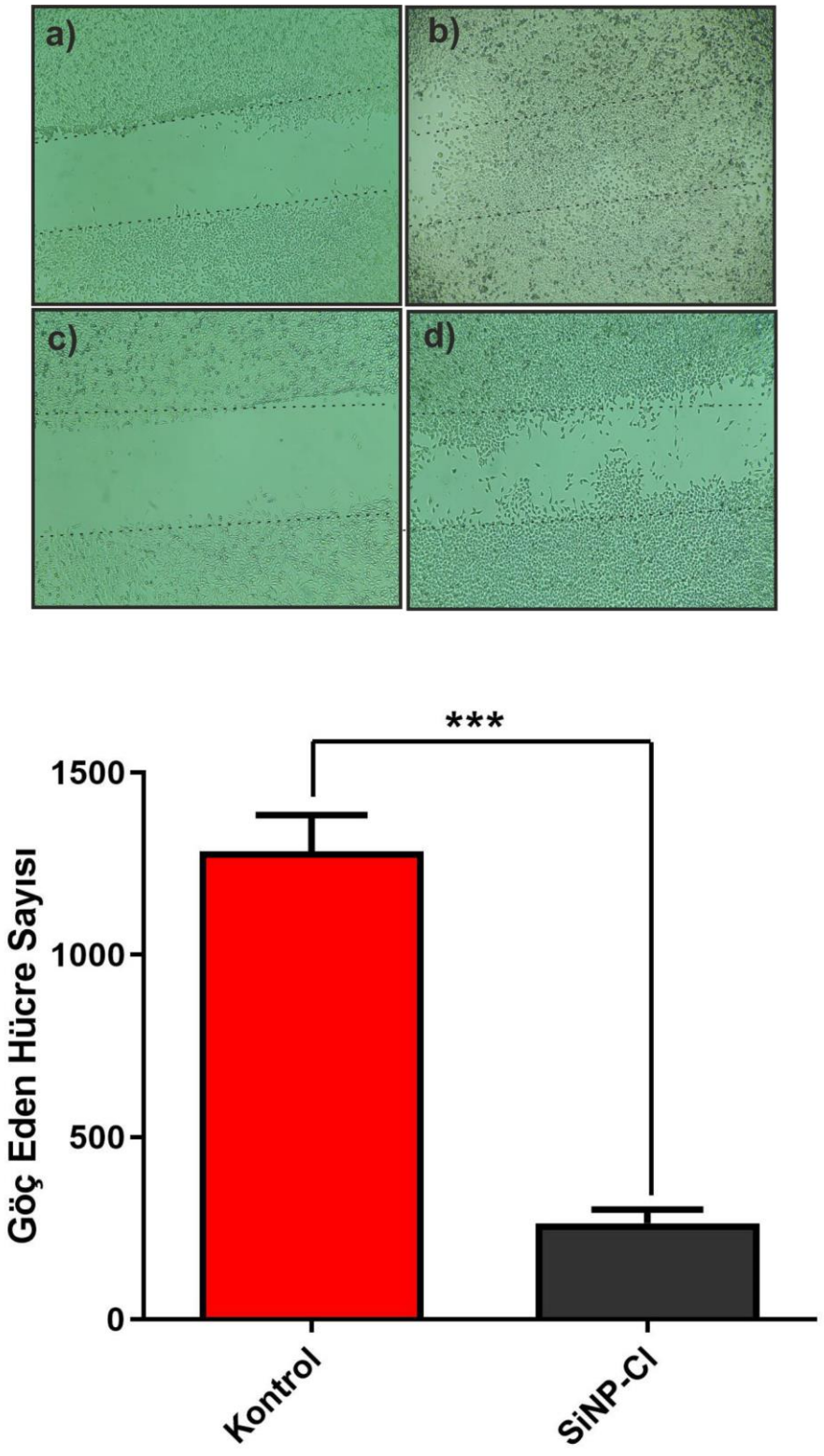
Şekil 4-22 SiNP'nin PC-3 hücrelerinin metatastik özellikleri üzerine etkileri. Sırasıyla kontrol grubunun a(0s)/b(24s) ve SiNP ile ön işleme tabi tutulmuş hücrelerin c(0s)/d(24s) görüntüleri (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$)



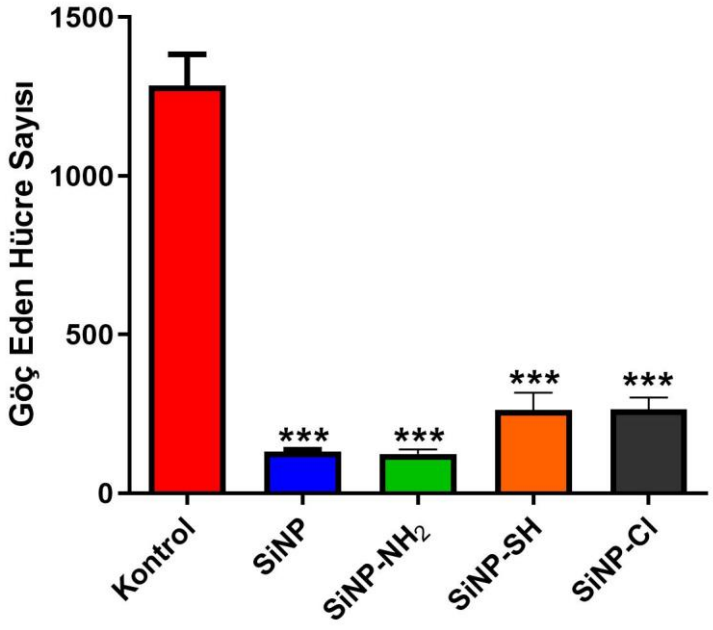
Şekil 4-23 SiNP-NH_2'nin PC-3 hücrelerinin metatastik özellikleri üzerine etkileri. Sırasıyla kontrol grubunun a(0s)/b(24s) ve SiNP-NH_2 ile ön işleme tabi tutulmuş hücrelerin c(0s)/d(24s) görüntüleri (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$)



Şekil 4-24 SiNP-SH'nin PC-3 hücrelerinin metatastik özellikleri üzerine etkileri. Sırasıyla kontrol grubunun a(0s)/b(24s) ve SiNP-SH ile ön işleme tabi tutulmuş hücrelerin c(0s)/d(24s) görüntüleri (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$)



Şekil 4-25 SiNP-Cl'nin PC-3 hücrelerinin metatastik özellikleri üzerine etkileri. Sırasıyla kontrol grubunun a(0s)/b(24s) ve SiNP-Cl ile ön işleme tabi tutulmuş hücrelerin c(0s)/d(24s) görüntüleri (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$)



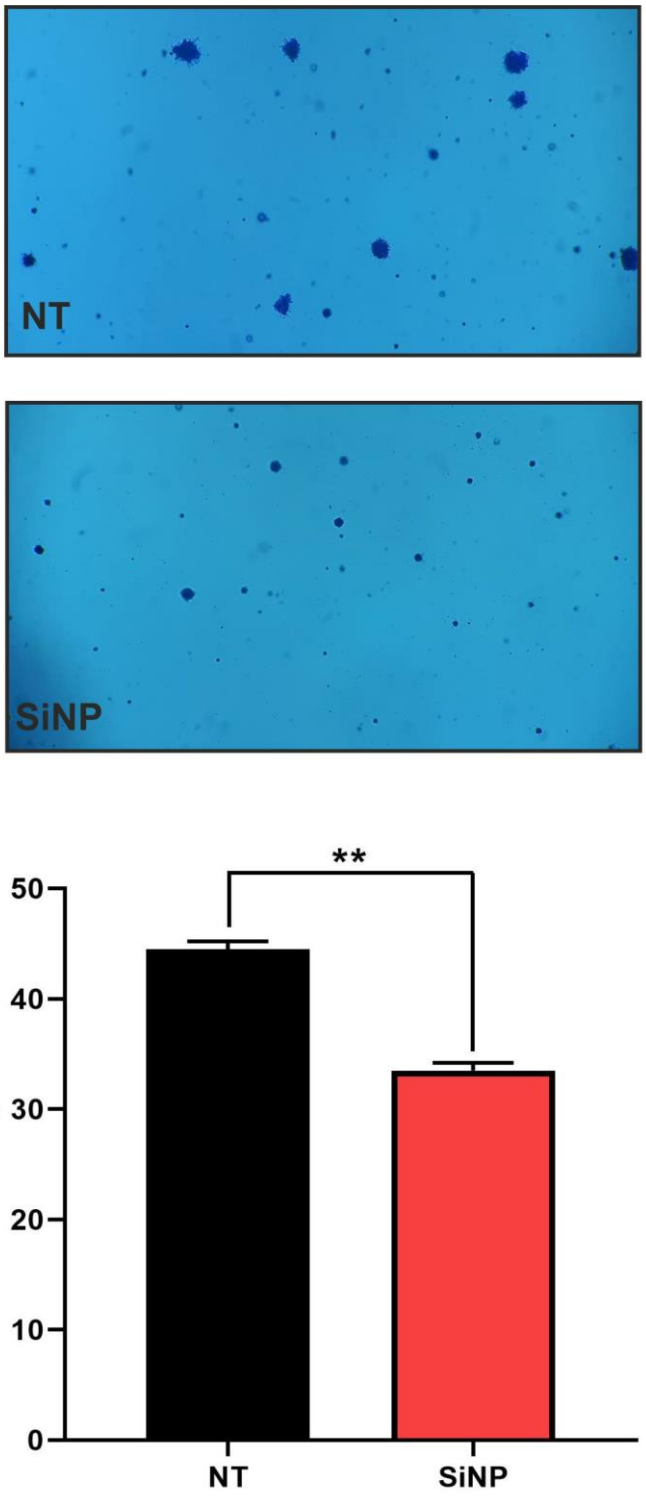
Şekil 4-26 SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin PC-3 hücrelerinin metatastik özellikleri üzerine etkilerinin kümülatif değer grafiği (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$)

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde **Şekil 4-26**'da da gösterildiği gibi PC-3 hücrelerinde en düşük metastatik etki SiNP-NH_2'ye aitken en yüksek metastatik etkiye ise SiNP-Cl'da rastlanmıştır. Ek olarak tüm bileşikler PC-3 hücresi üzerinde güçlü metastatik etkiye sahiptir.

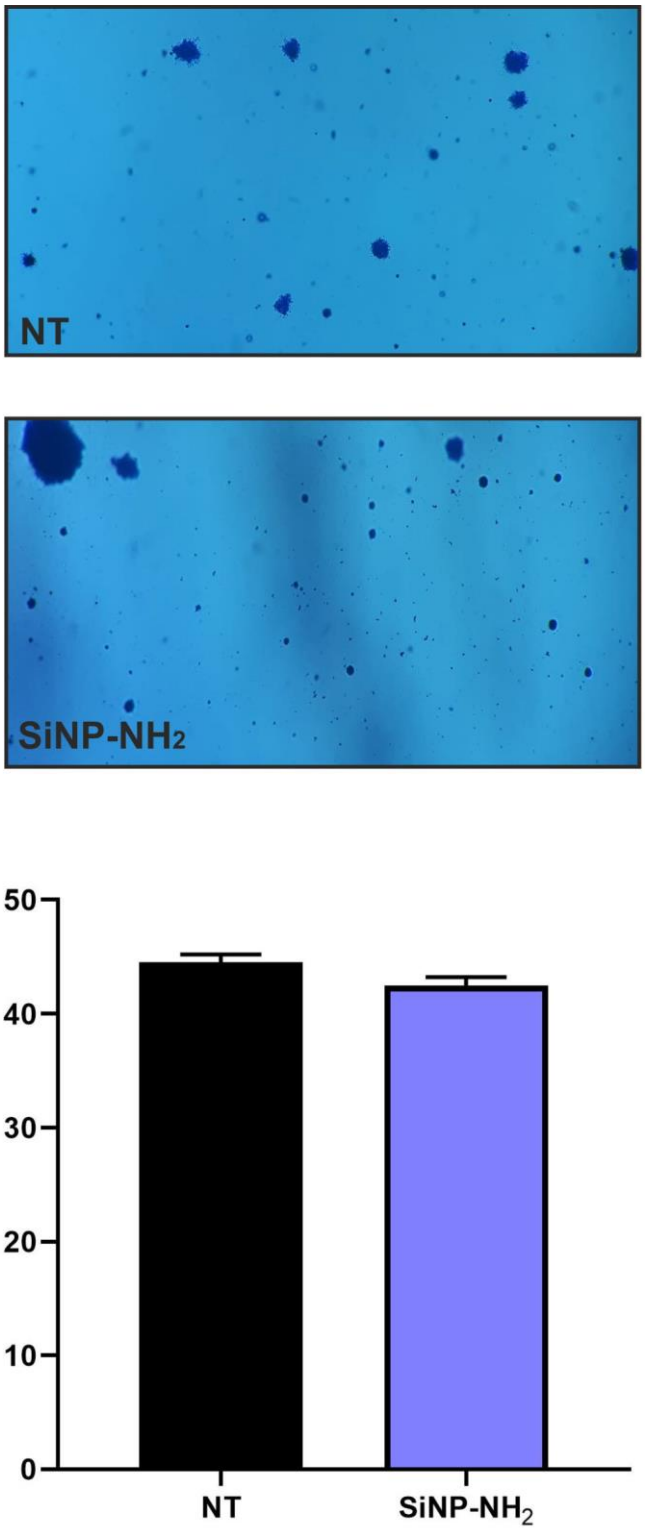
4.7. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresinde Koloni Oluşumu Üzerine Etkileri

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin PC-3 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkilerini anlamak için koloni oluşturma deneyi gerçekleştirildi. %1'lik agaroz içeren alt katmandaki agar hazırlandı ve üzerine %0.7'lik agaroz içeren üst katmandaki agar önceden SiNP (75.91 µg/mL), SiNP-NH_2 (55.46 µg/mL), SiNP-SH (72.89 µg/mL) ve SiNP-Cl (54.09 µg/mL) ile muamele edilen hücrelerle birleştirilerek inkübasyon süreci beklendi. İnkübasyon sonunda hücreler boyanarak görüntüleri alındı (**Şekil 4-27, 4-28, 4-29, 4-30**).

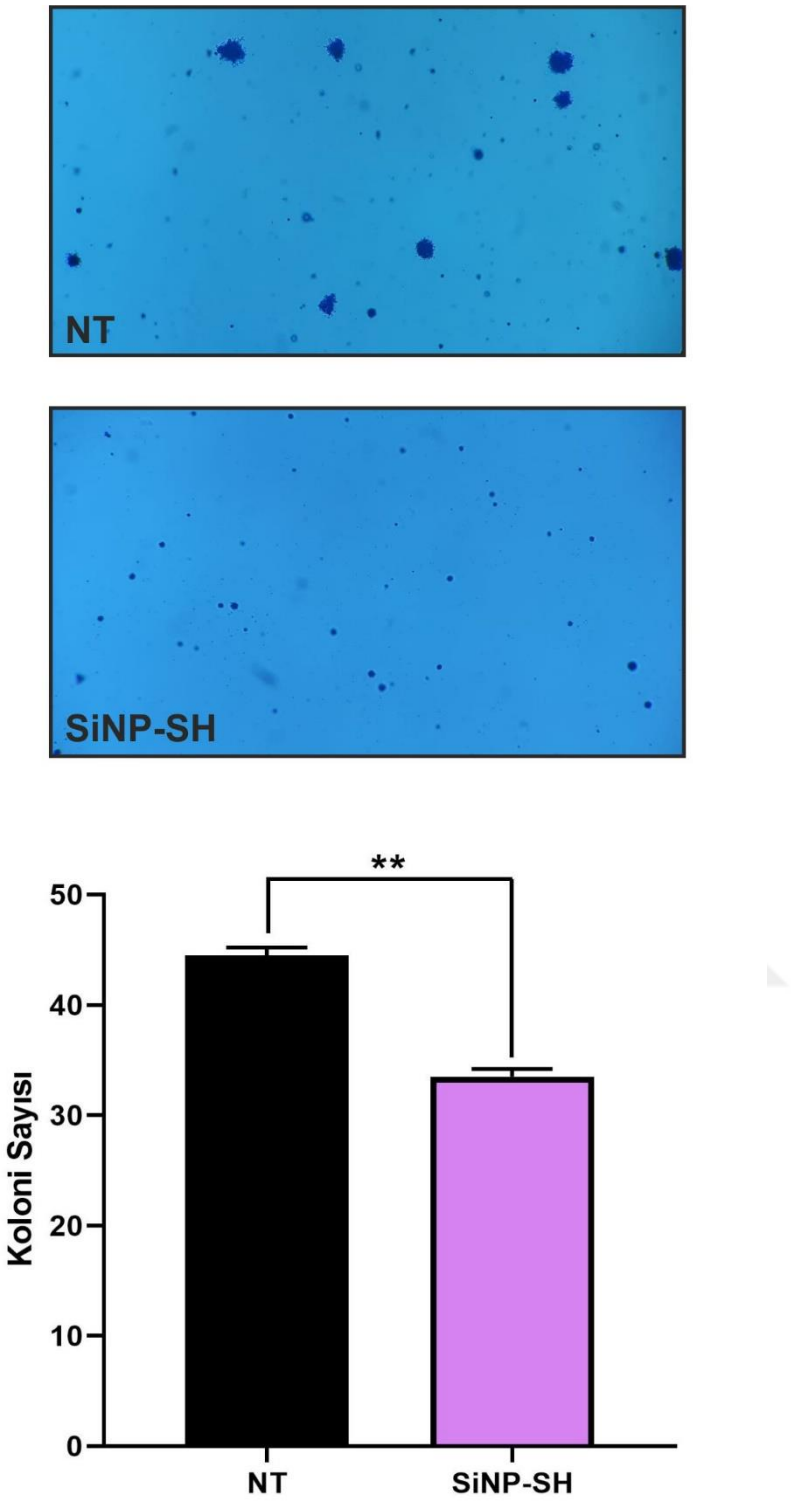
SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri ile muamele edilen PC-3 hücreleri kontrol grubuna göre %0.7'lik agaroz jelde daha az çoğalarak koloni oluşumunu azalttı. SiNP ile muamele edilen hücrelerin koloni oluşturma kapasitesi %75, SiNP-NH_2 ile muamele edilen hücrelerin %95, SiNP-SH ile muamele edilen hücrelerin %73, SiNP-Cl ile muamele edilen hücrelerin %50'ye kadar düştü.



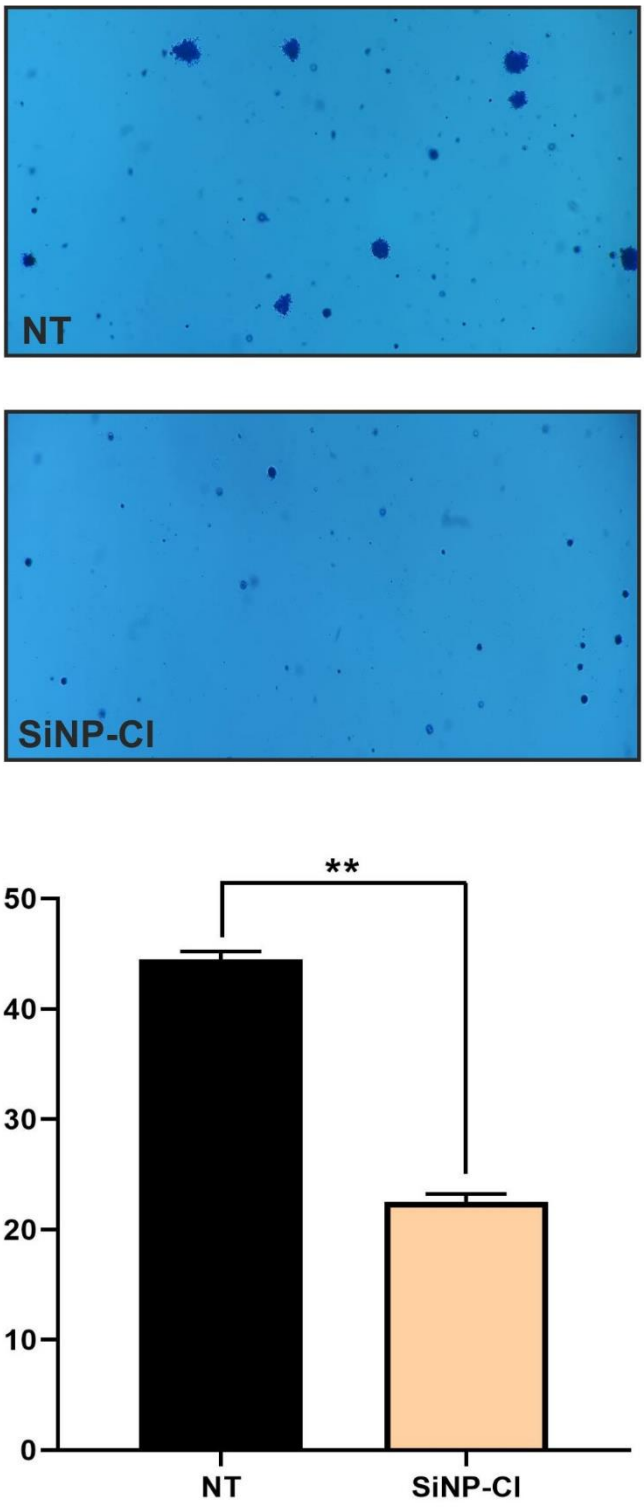
Şekil 4-27 SiNP ile ön işleme tabi tutulmuş hücrelerin yumuşak agar invazyon testinin 15 günlük bir inkübasyon sonucunda elde edilen görüntüsü (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. **; $P<0.001$)



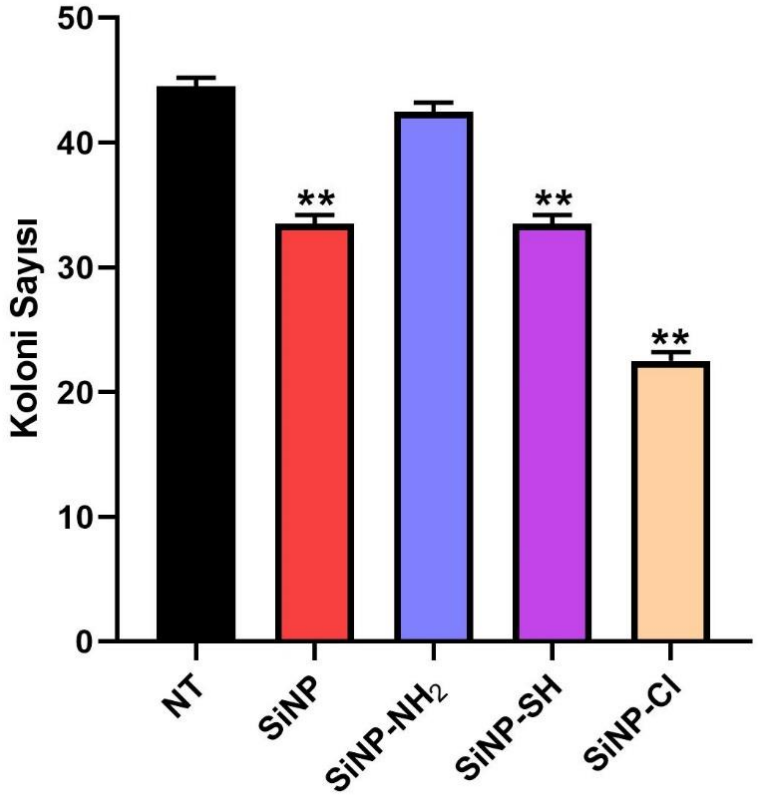
Şekil 4-28 $SiNP\text{-}NH_2$ ile ön işleme tabi tutulmuş hücrelerin yumuşak agar invazyon testinin 15 günlük bir inkübasyon sonucunda elde edilen görüntüsü (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.)



Şekil 4-29 SiNP-SH ile ön işleme tabi tutulmuş hücrelerin yumuşak agar invazyon testinin 15 günlük bir inkübasyon sonucunda elde edilen görüntüsü (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. **; $P<0.001$)



Şekil 4-30 SiNP-Cl ile ön işleme tabi tutulmuş hücrelerin yumuşak agar invazyon testinin 15 günlük bir inkübasyon sonucunda elde edilen görüntüsü (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. **; $P<0.001$)

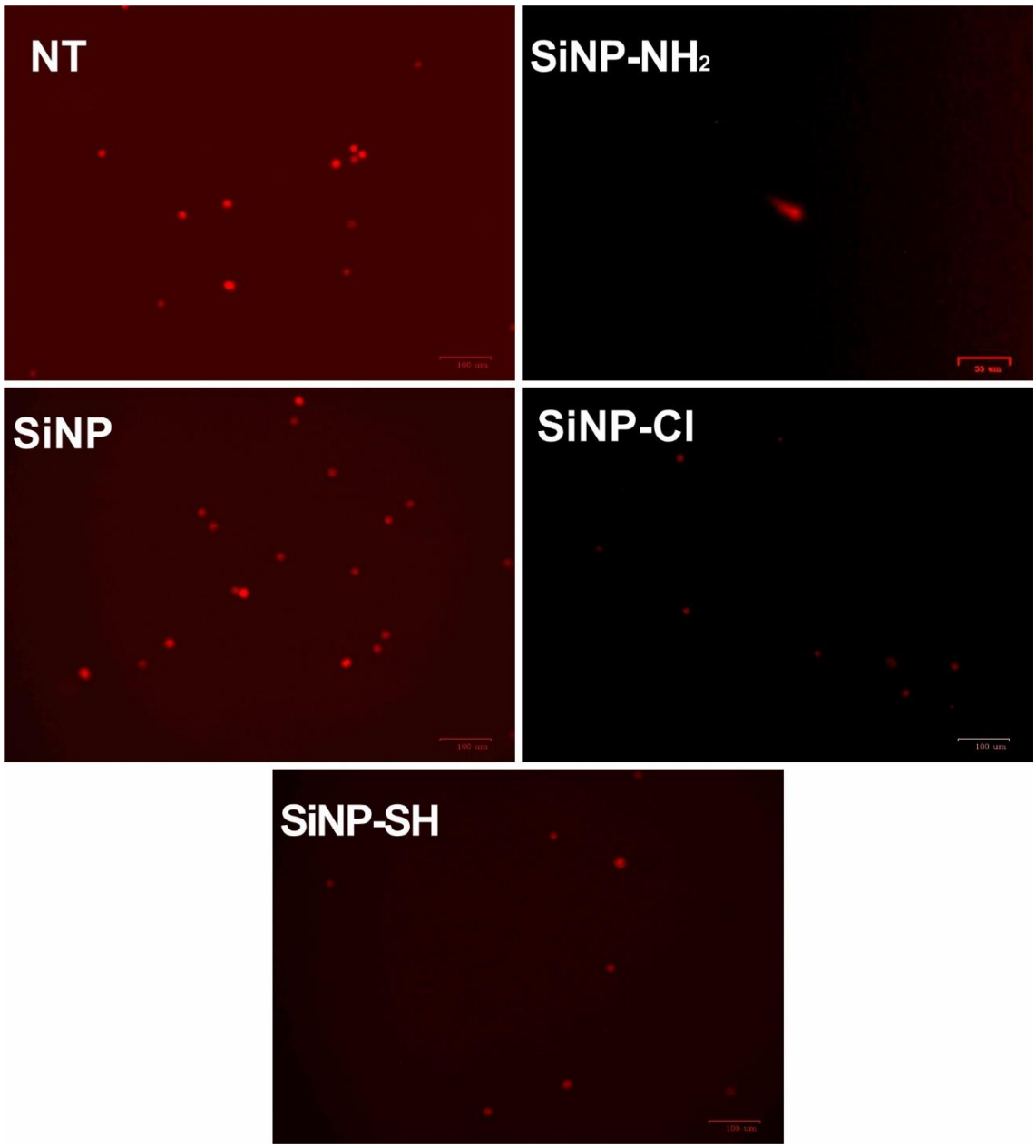


Şekil 4-31 SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri ile ön işleme tabi tutulmuş hücrelerin yumuşak agar invazyon testinin sonuçlarına göre elde edilen koloni sayılarının kümülatif değer grafiği (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. **; $P<0.001$)

Analiz sonuçlarına göre, klor grubu ile fonksiyonelleştirilmiş nanopartikül (SiNP-Cl) diğer nanopartiküllerden daha az koloni oluşturdu (**Şekil 4-31**). Ek olarak tüm bileşikler kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda koloni oluşturarak PC-3 hücreleri üzerinde koloni oluşumunu engelledi.

4.8. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresinde DNA Kırılması Üzerine Etkileri

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin DNA hasarı üzerindeki etkilerini anlamak için DNA kırılması deneyi gerçekleştirildi. Deney sonunda kontrol grubu ile karşılaştırılan, SiNP (75.91 µg/mL), SiNP-SH (72.89 µg/mL) ve SiNP-Cl (54.09 µg/mL) ile muamele edilen hücrelerde herhangi bir DNA hasarına rastlanmazken SiNP-NH_2 (55.46 µg/mL) ile muamele edilen hücrelerde ise DNA hasarı gözlemlendi.

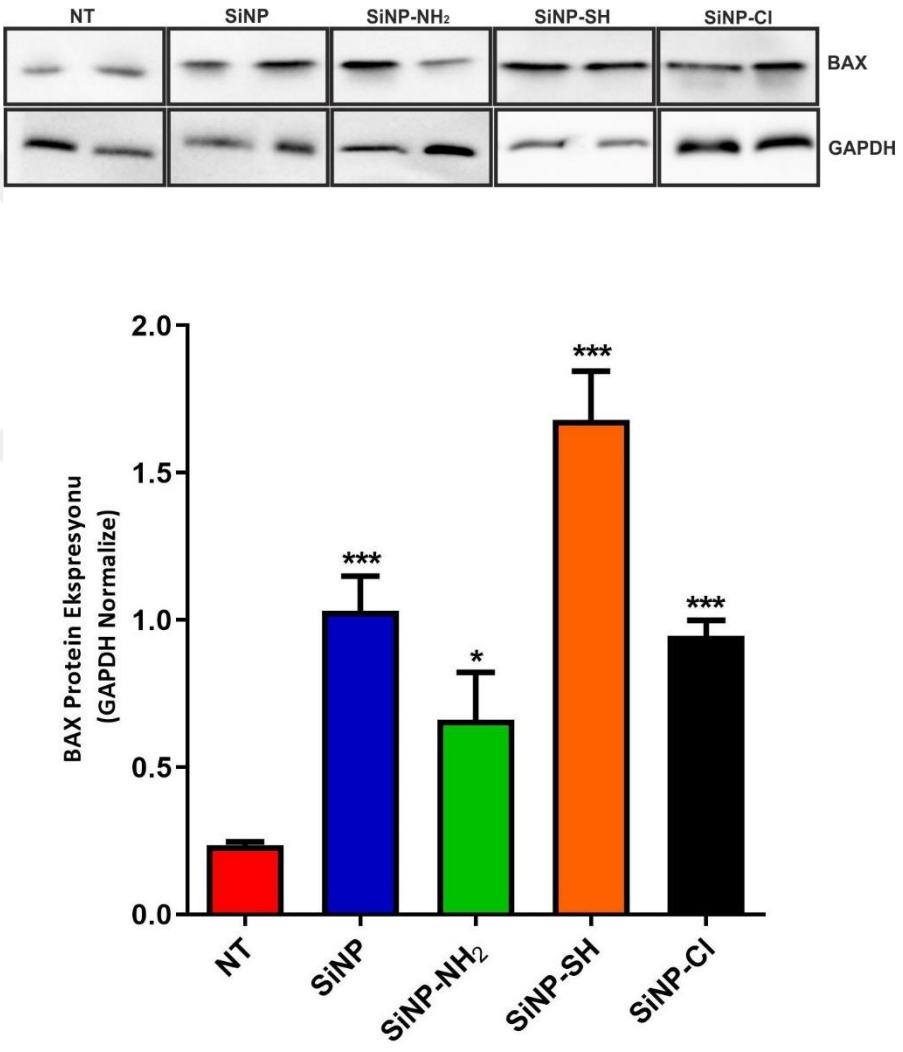


Şekil 4-32 SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri ile muamele edilen hücrelerde DNA kırılması deneyini temsil eden görüntüler

4.9. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresinde Protein Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Apoptoz yolağı ve prostat kanseri yolağında yer alan BAX, BCL-2, Nf-κB, p53, KRAS ve SMAD üzerinde protein seviyelerinin kantitatif ve karşılaştırmalı analizleri Western Blot yöntemi kullanılarak yapıldı. GAPDH referans olarak kullanıldı. PC-3 hücrelerine SiNP (75.91 µg/mL), SiNP-NH_2 (55.46 µg/mL), SiNP-SH (72.89 µg/mL) ve SiNP-Cl (54.09 µg/mL) ile muamele edildi.

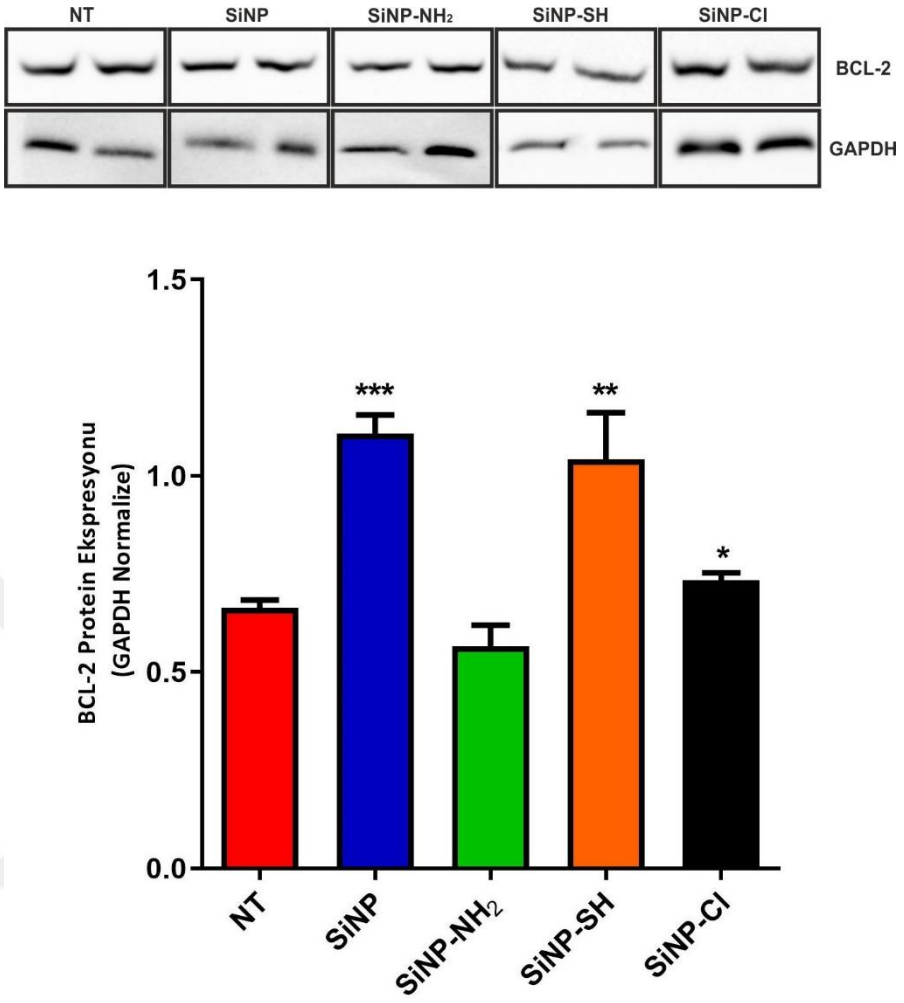
4.9.1. SiNP ve Fonksiyonlarının BAX Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi



Şekil 4-33 Apoptoz yolağında yer alan apoptotik Bax proteininin ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$, *; $P<0.05$)

BAX proteininin immünokimyasal tespiti için Birincil Tavşan Poliklonal Bax Antikoru (1/5000 seyreltme) ve İkincil Keçi Anti-tavşan Antikoru (1/5000 seyreltme) kullanıldı. Bant yoğunlukları, Image J yazılımı kullanılarak analiz edildi. Kontrol grubunun ortalaması alındığında ve daha sonra kontrol grubuna göre diğer bileşikler için ortalama hesaplandığında bağıl protein ifadelerine göre BAX protein ekspresyonunu SiNP-4.39 kat, SiNP-NH_2-2.82 kat, SiNP-SH-7.15 kat ve SiNP-Cl-4.03 kat arttırdı. Sonucunda immünoreaktif protein bantlarının yoğunluğunun analizlerine göre SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl BAX üzerinde önemli ölçüde bir artış gösterdi. Bu verilere ek olarak protein ekspresyonundaki en yüksek artış SiNP-SH bileşiğine aittir.

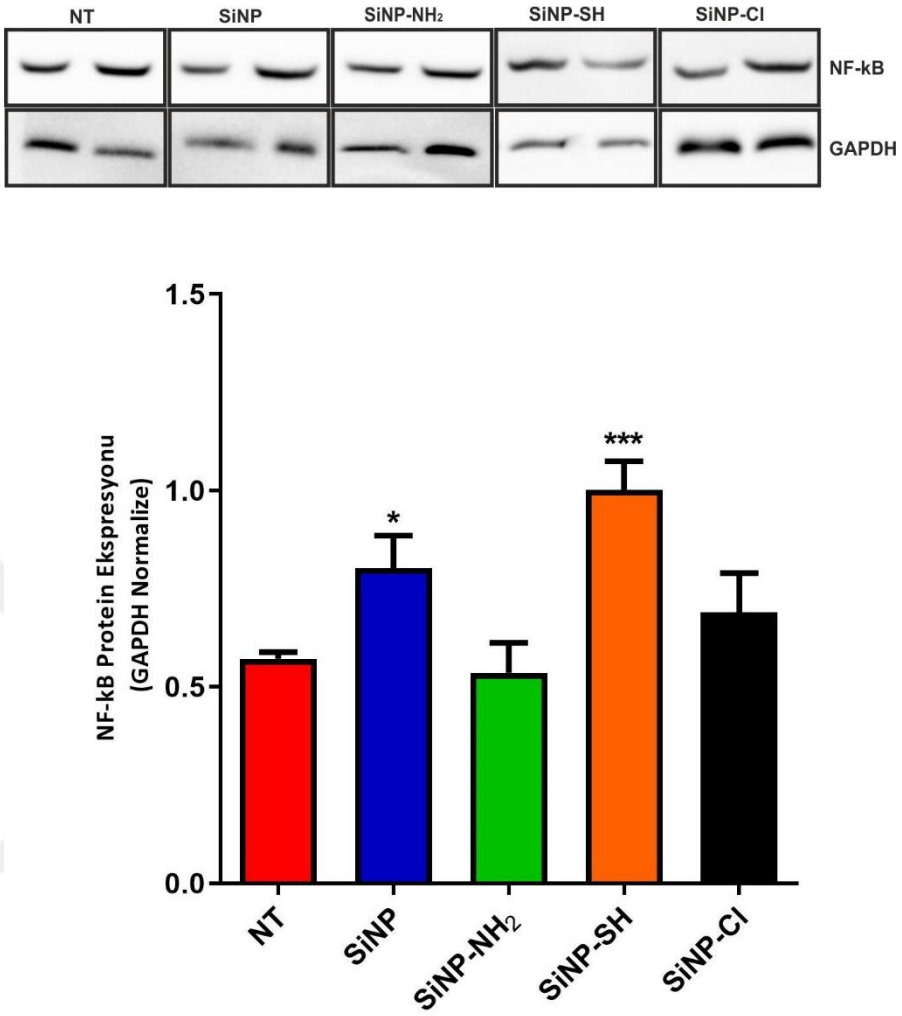
4.9.2. SiNP ve Fonksiyonlarının BCL-2 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi



Şekil 4-34 Bcl-2 proteininin ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir. ***; P<0.0001, **; P <0.001, *; P<0.05)

BCL-2 proteininin immünokimyasal tespiti için Birincil Fare Poliklonal BCL-2 Antikoru (1/500 seyreltme) ve İkincil Keçi Anti-fare Antikoru (1/2000 seyreltme) kullanıldı. Bant yoğunlukları, Image J yazılımı kullanılarak analiz edildi. Kontrol grubunun ortalaması alındığında ve daha sonra kontrol grubuna göre diğer bileşikler için ortalama hesaplandığında bağıl protein ifadelerine göre BCL-2 protein ekspresyonunu SiNP-1.66 kat, SiNP-SH-1.57 kat ve SiNP-Cl-1.10 kat arttırdı ve SiNP-NH_2-0.85 kat azalttı. Sonucunda immünoreaktif protein bantlarının yoğunluğunun analizlerine göre SiNP, SiNP-SH ve SiNP-Cl BCL-2 üzerinde önemli bir artış gösterirken SiNP-NH_2 bileşiğinde bir azalma gözlemlenmiştir.

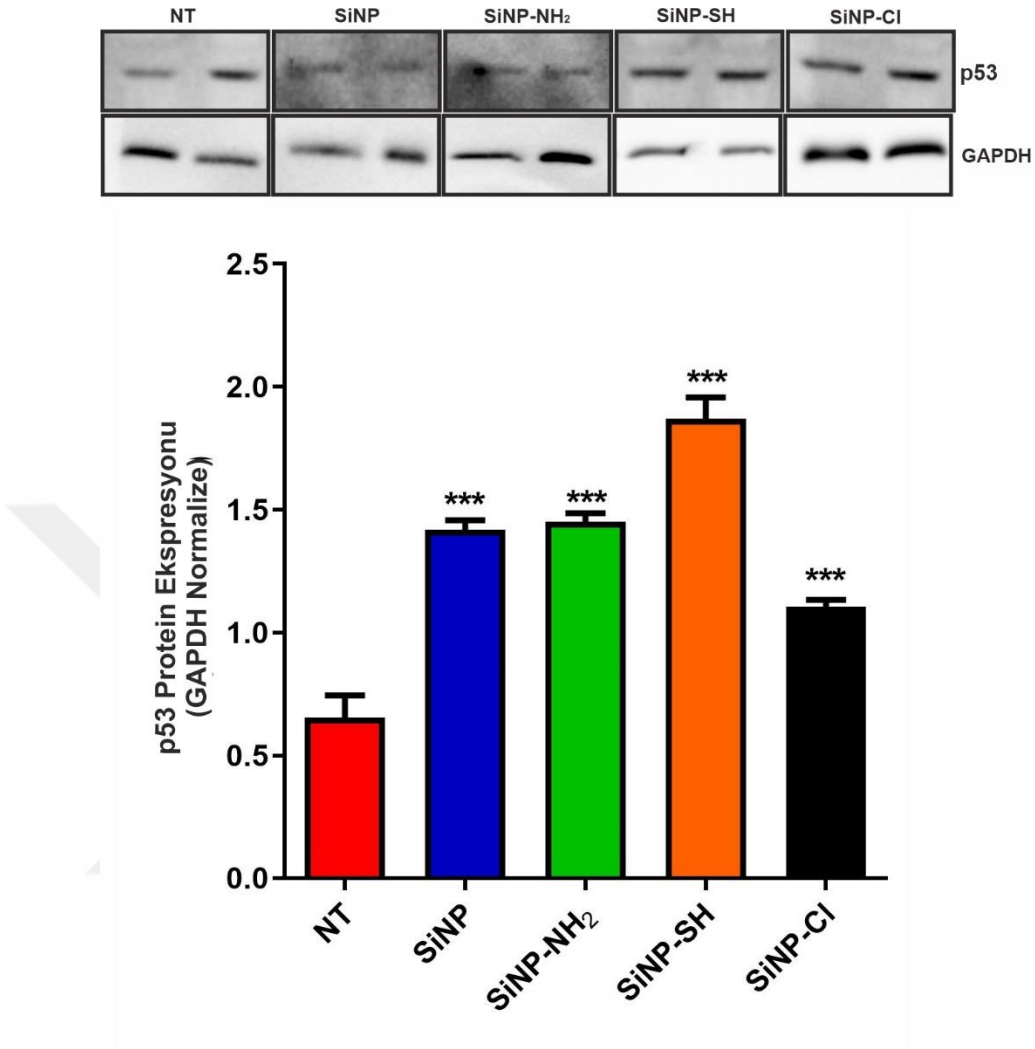
4.9.3. SiNP ve Fonksiyonlarının Nf-κB Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi



Şekil 4-35 Nf-κB proteininin ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$, *; $P<0.05$)

Nf-κB proteininin immünokimyasal tespiti için Birincil Fare Poliklonal Nf-κB Antikoru (1/500 seyreltme) ve İkincil Keçi Anti-fare Antikoru (1/2000 seyreltme) kullanıldı. Bant yoğunlukları, Image J yazılımı kullanılarak analiz edildi. Kontrol grubunun ortalaması alındığında ve daha sonra kontrol grubuna göre diğer bileşikler için ortalama hesaplandığında bağıl protein ifadelerine göre Nf-κB protein ekspresyonunu SiNP-1.40 kat, SiNP-SH-1.75 kat ve SiNP-Cl-1.21 kat arttırdı ve SiNP-NH_2 ise 0.94 kat azalttı. Sonucunda immünoreaktif protein bantlarının yoğunluğunun analizlerine göre SiNP, SiNP-SH ve SiNP-Cl Nf-κB üzerinde önemli bir artış gösterirken SiNP-NH_2 bileşiğinde bir azalma gözlemlenmiştir.

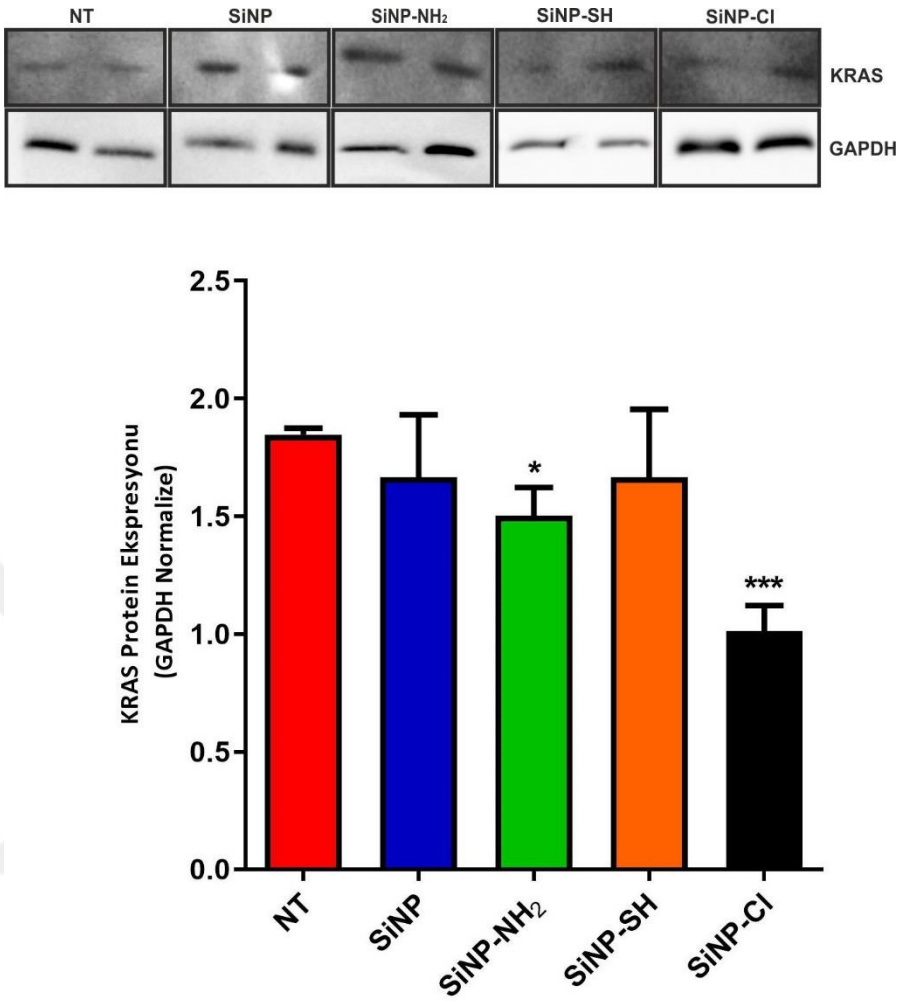
4.9.4. SiNP ve Fonksiyonlarının p53 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi



Şekil 4-36 p53 proteininin ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir. ***; P<0.0001)

p53 proteininin immünokimyasal tespiti için Birincil Tavşan Poliklonal p53 Antikoru (1/2000 seyreltme) ve İkincil Keçi Anti-tavşan Antikoru (1/5000 seyreltme) kullanıldı. Bant yoğunlukları, Image J yazılımı kullanılarak analiz edildi. Kontrol grubunun ortalaması alındığında ve daha sonra kontrol grubuna göre diğer bileşikler için ortalama hesaplandığında bağıl protein ifadelerine göre p53 protein ekspresyonunu SiNP-2.17 kat, SiNP-NH_2-2.22 kat, SiNP-SH-2.86 kat ve SiNP-Cl-1.69 kat arttırdı. Sonucunda immünoreaktif protein bantlarının yoğunluğunun analizlerine göre SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl p53 üzerinde önemli ölçüde bir artış gösterdi. Bu verilere ek olarak protein ekspresyonundaki en yüksek artış SiNP-SH bileşiğine aittir.

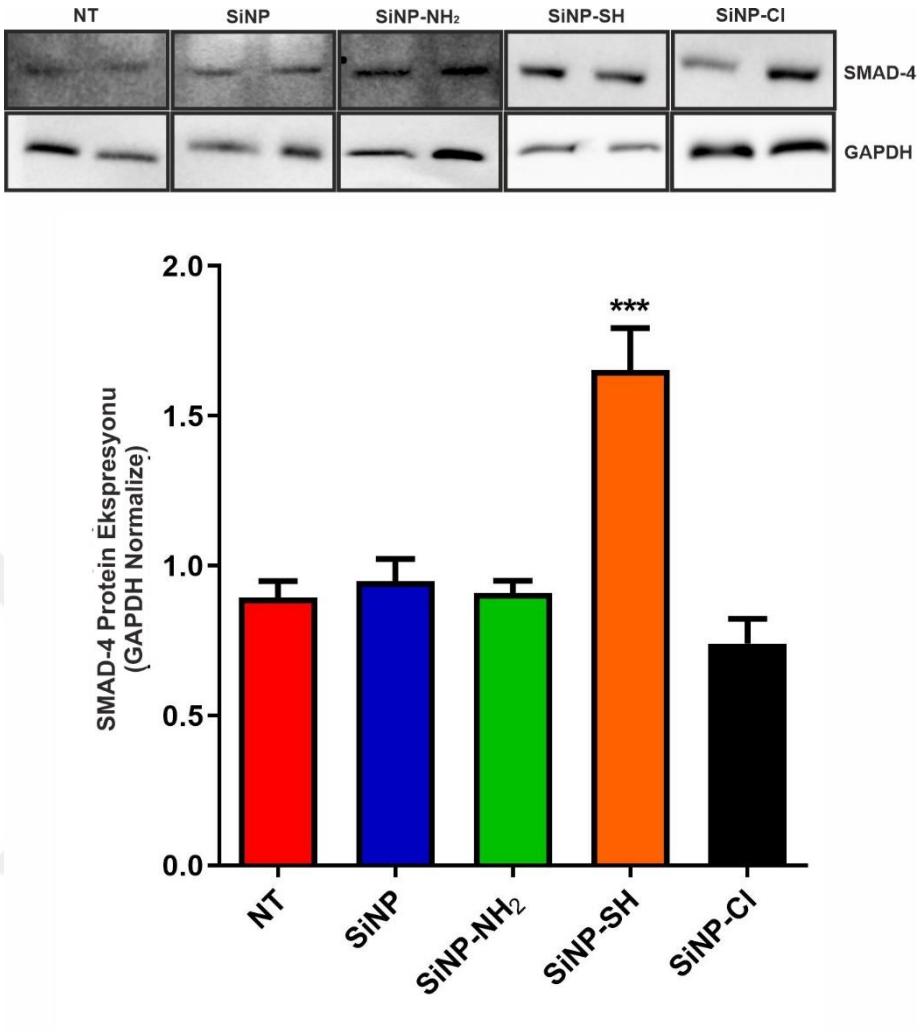
4.9.5. SiNP ve Fonksiyonlarının KRAS Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi



Şekil 4-37 Kras proteininin ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir. ***; P<0.0001, *; P<0.05)

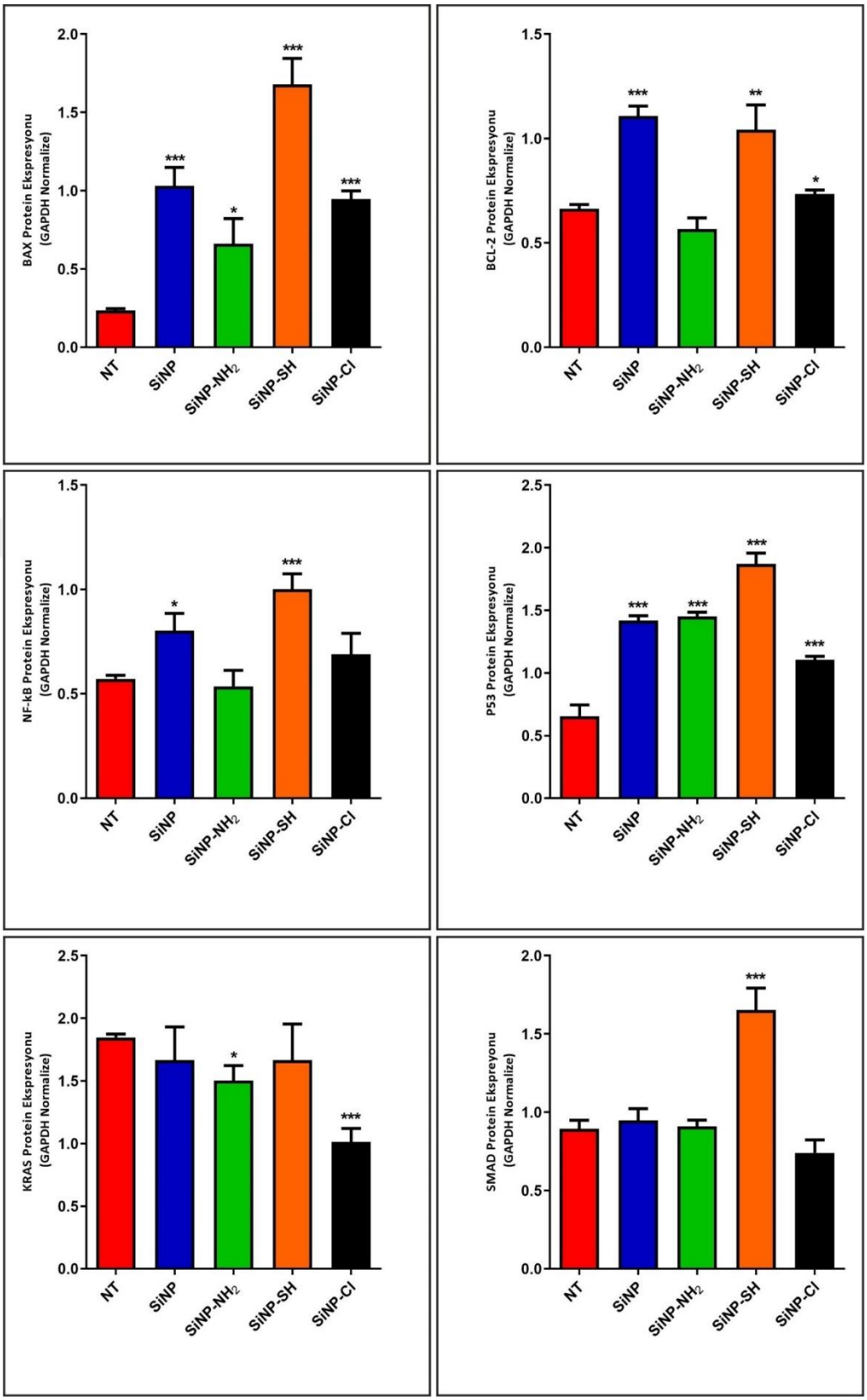
KRAS proteininin immünokimyasal tespiti için Birincil Tavşan Poliklonal Kras Antikoru (1/1000 seyreltme) ve İkincil Keçi Anti-tavşan Antikoru (1/5000 seyreltme) kullanıldı. Bant yoğunlukları, Image J yazılımı kullanılarak analiz edildi. Kontrol grubunun ortalaması alındığında ve daha sonra kontrol grubuna göre diğer bileşikler için ortalama hesaplandığında bağıl protein ifadelerine göre KRAS protein ekspresyonunu SiNP-1.10 kat, SiNP-NH2-1.22 kat, SiNP-SH-1.11 kat ve SiNP-Cl-1.83 kat azalttı. Sonucunda immünoreaktif protein bantlarının yoğunluğunun analizlerine göre SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl KRAS üzerinde önemli ölçüde bir azalma gösterdi.

4.9.6. SiNP ve Fonksiyonlarının SMAD-4 Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisi



Şekil 4-38 Smad-4 proteininin ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$)

SMAD-4 proteininin immünokimyasal tespiti için Birincil Tavşan Poliklonal Smad-4 Antikoru (1/1000 seyreltme) ve İkincil Keçi Anti-tavşan Antikoru (1/5000 seyreltme) kullanıldı. Bant yoğunlukları, Image J yazılımı kullanılarak analiz edildi. Kontrol grubunun ortalaması alındığında ve daha sonra kontrol grubuna göre diğer bileşikler için ortalama hesaplandığında bağıl protein ifadelerine göre SMAD-4 protein ekspresyonunu SiNP-1.06 kat, SiNP-NH_2-1.02 kat ve SiNP-SH-1.85 kat arttırdı ve SiNP-Cl ise 0.83 kat azalttı. Sonucunda immünoreaktif protein bantlarının yoğunluğunun analizlerine göre SiNP, SiNP-NH_2 ve SiNP-SH SMAD-4 üzerinde bir artış gösterirken SiNP-Cl bileşiğinde bir azalma gözlemlenmiştir.



Şekil 4-39 Bax, Bcl-2, Nf-κB, p53, Kras ve Smad-4 proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişimin toplu gösterimi (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$, **; $P<0.001$, *; $P<0.05$)

4.10. SiNP ve Fonksiyonlarının Prostat Kanseri Hücresinde Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

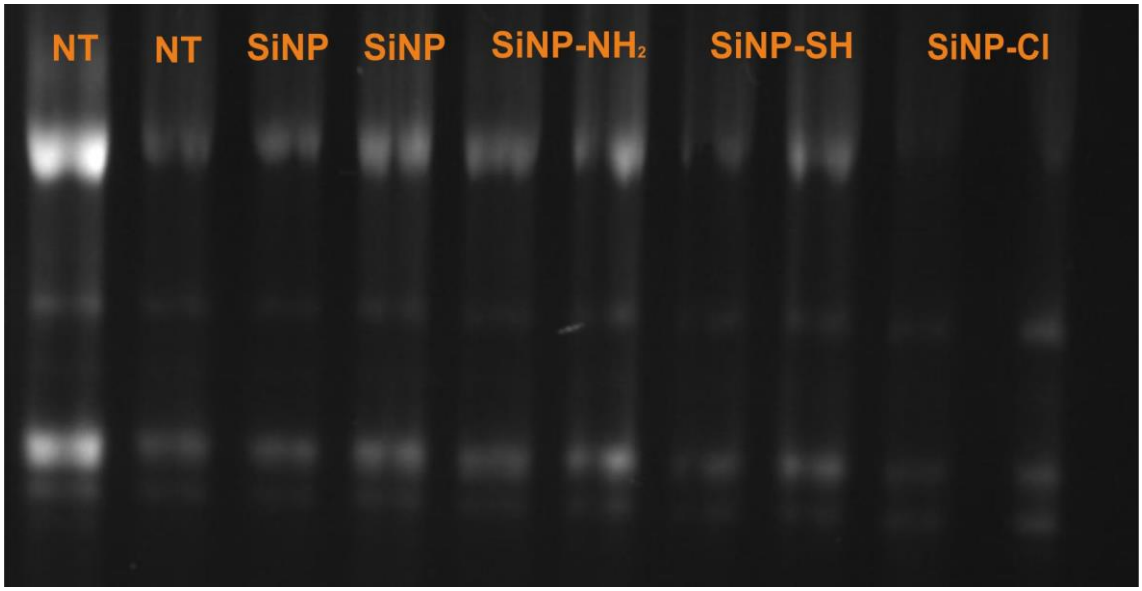
Kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR (qRT-PCR), mRNA düzeyinde ekspresyonu belirlemek için en hassas ve spesifik yöntemlerdendir. Etkin bir qRT-PCR işlemi için amplifikasyonun özgüllüğü ve etkinliği çok önemlidir bu nedenle amplifikasyon işlemi öncesinde ve sonrasında dikkat edilmesi gereken önemli parametreler mevcuttur. İşleme başlamadan önce uygun primer çiftlerinin seçimi oldukça önemlidir. Primer çiftlerinin uzunluğu, dimer ve spesifik olmayan bağlanma içermeyen primer çiftlerinin seçimi qRT-PCR işleminin etkin bir şekilde devamı için uygundur. Seçilen her primer çifti, standart eğriler üreterek amplifikasyon verimleri bakımından değerlendirilir.

Erime eğrisi (melt curve) analizi, qRT-PCR işleminin özgüllüğünü gösterir. Bu nedenle bir erime eğrisi analizinde, aynı sıcaklıkta her numune için tek bir pikin görülmesi beklenir. Oluşan herhangi bir ekstra pik, primer dimerlerinin meydana geldiğini yada reaksiyonda spesifik olmayan amplikonların varlığını ifade eder.

Bu tez kapsamında, her gene özgü spesifik primer çifti için PCR koşulları, qRT-PCR ile istenen uygun erime eğrisini verecek şekilde optimize edildi. BAX, BCL-2, NF-κB, TP53, SMAD-4, KRAS, CASPASE-3, CASPASE-9 ve CASPASE-12 genleri GAPDH referans gen olarak alınarak qRT-PCR işlemi gerçekleştirildi.

4.10.1. Agaroz Jel Elektroforezi ile RNA Moleküllerinin Kalite Kontrolü

Total RNA, Materyal ve Yöntem bölümünde anlatıldığı gibi TRIZOL metodu kullanılarak prostat kanseri hücre hattı olan PC-3 hücrelerinden izole edildi. İzole edilen RNA miktarı ölçüldü ve RNA moleküllerinin nitelikleri, 1.8 ila 2.0 arasında olması gereken OD_{260}/OD_{280} oranı ile NanoDrop kullanılarak kontrol edildi. Daha sonra, 28S ve 18S ribozomal RNA bantları agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi, sağlam ve iyi ayrılmış 28S ve 18S RNA bantları gözlemlendi (**Şekil 4-41**).

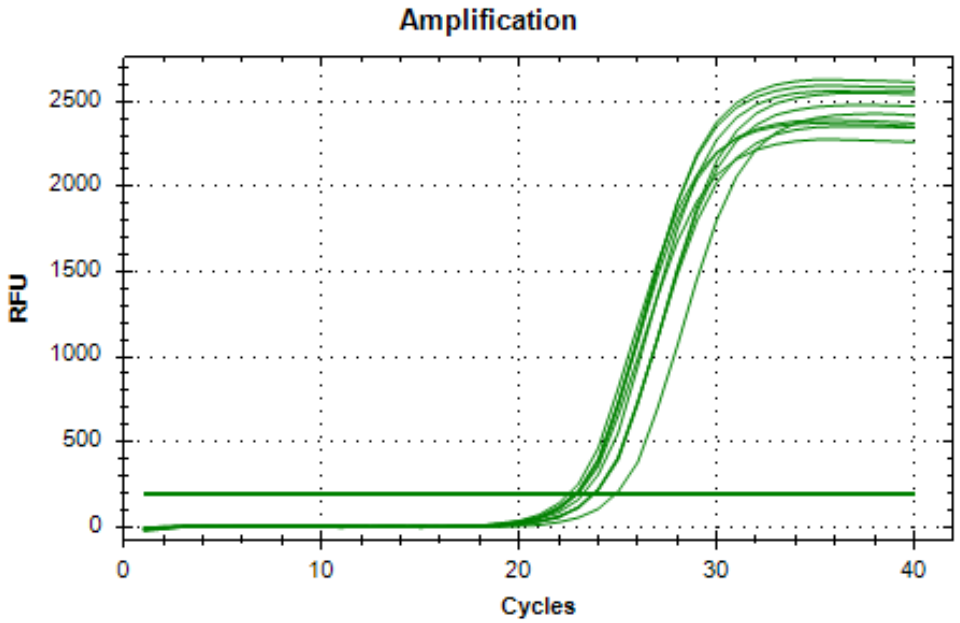


Şekil 4-40 PC-3 hücre hattından izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

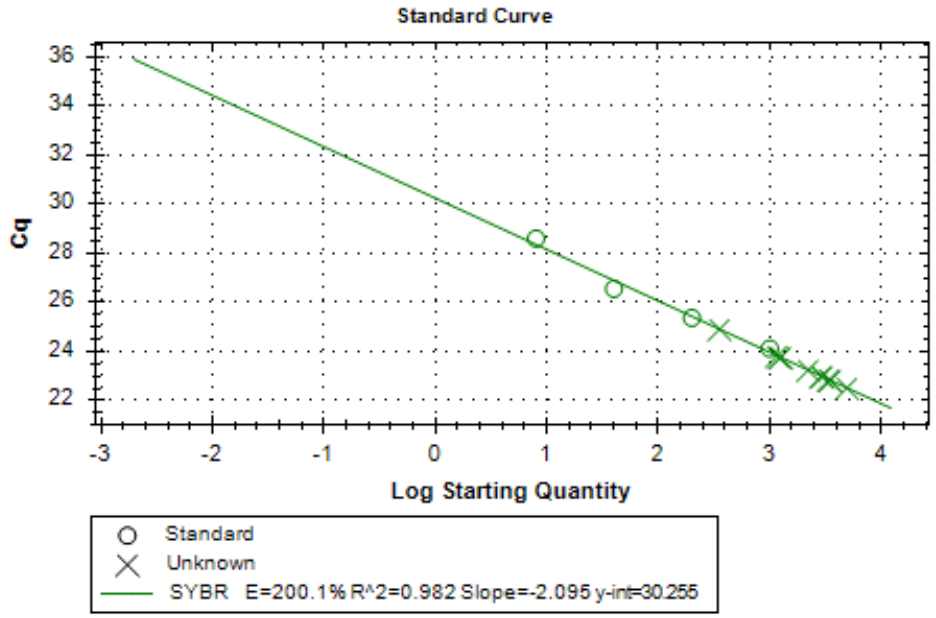
4.10.2. SiNP ve Fonksiyonlarının BRAF Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin IC_{50} değeri ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin BRAF üzerindeki gen ekspresyonları incelendi. Bağıl mRNA ekspresyonu için GAPDH referans gen olarak kullanıldı. BRAF geninin bağıl mRNA ekspresyonu, PC-3 hücre hattının cDNA'sının 1X, 5X, 25X, 125X, 625X ve 3125X dilüsyonlarından standart eğri üretilerek SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri için hesaplandı (**Şekil 4-43**). Amplifikasyon eğrisi grafiği, BRAF geninin döngü sayısına karşı floresans emisyonundaki değişiklikleri göstermektedir (**Şekil 4-42**). Erime eğrisi grafiği, SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin amplifikasyonunu kontrol etmek için yapıldı (**Şekil 4-44**).

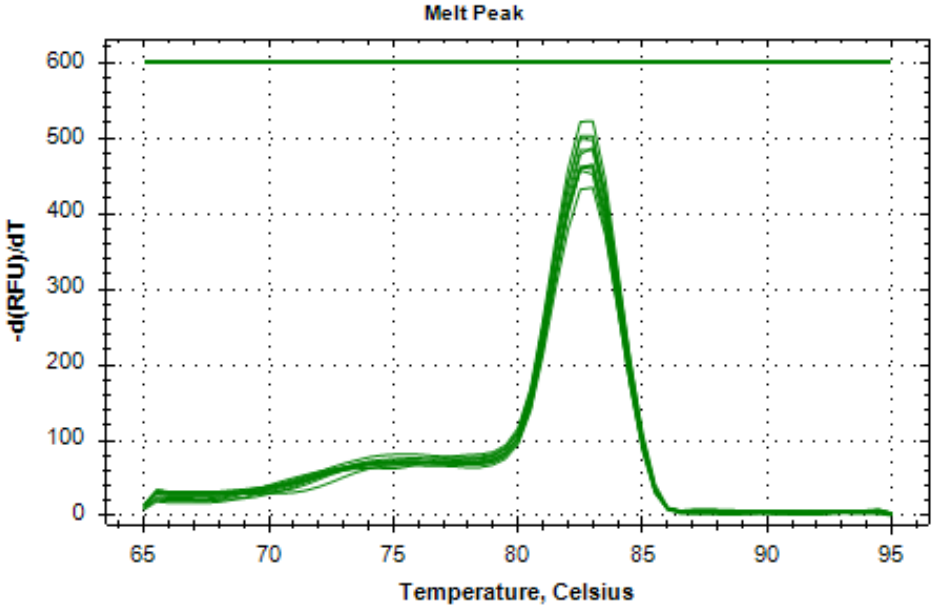
Amplifikasyon sırasında beklenildiği gibi tek bir pik görüldü. Standart eğri için R^2 değeri 0.982 bulundu. SiNP, BRAF gen ekspresyonunu 3.9 kat, SiNP-NH_2-5.3 kat, SiNP-SH-6.7 kat ve SiNP-Cl-1.6 kat arttırdı. Bu durumda sentezlenen silika nanopartiküller ve bileşikleri arasında PC-3 hücreleri üzerinde BRAF gen ekspresyonunu SiNP-SH nanopartikülü en fazla miktarda arttırdı.



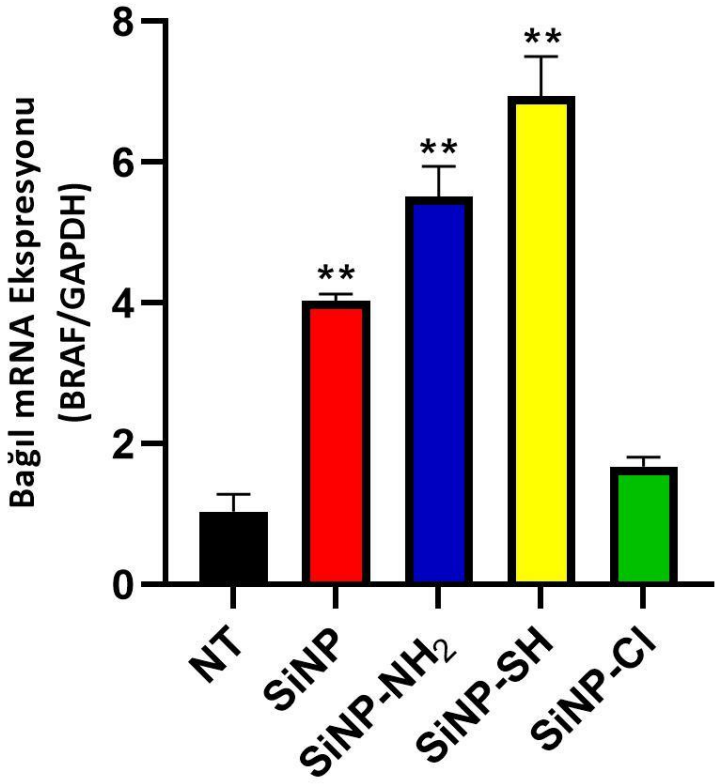
Şekil 4-41 Her reaksiyon döngüsünde floresan emisyonu birikimini gösteren amplifikasyon eğrisi grafiği



Şekil 4-42 PC-3 hücre hattındaki BRAF mRNA miktarlarını hesaplamak için seçilen cDNA'nın seri seyreltmelerinden üretilen standart eğri grafiği



Şekil 4-43 Sıcaklığa karşı floresan emisyon değişikliğini gösteren erime eğrisi grafiği. Tek tepe noktasının varlığı, tek PCR ürünü anlamına gelmektedir

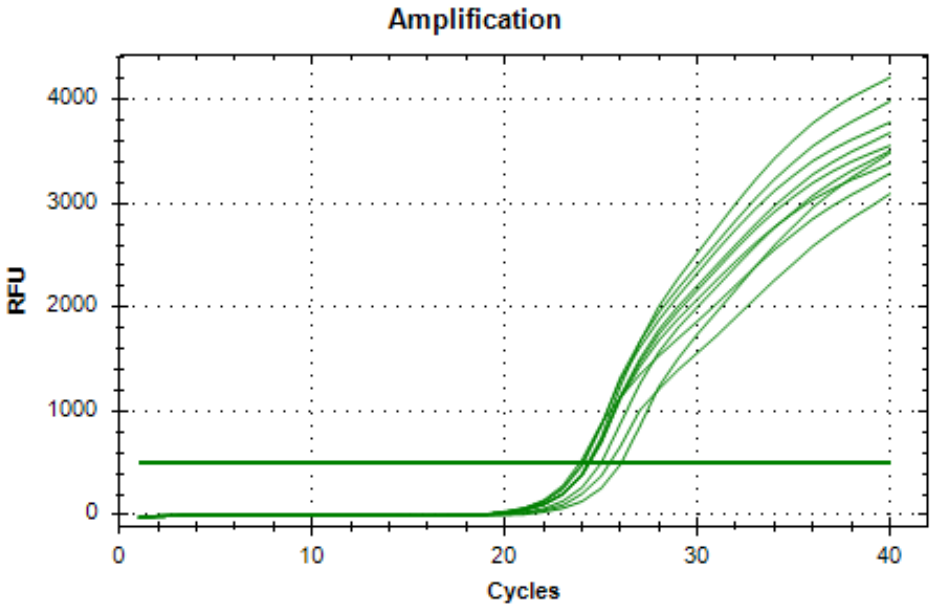


Şekil 4-44 BRAF geni ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. **; $P<0.001$)

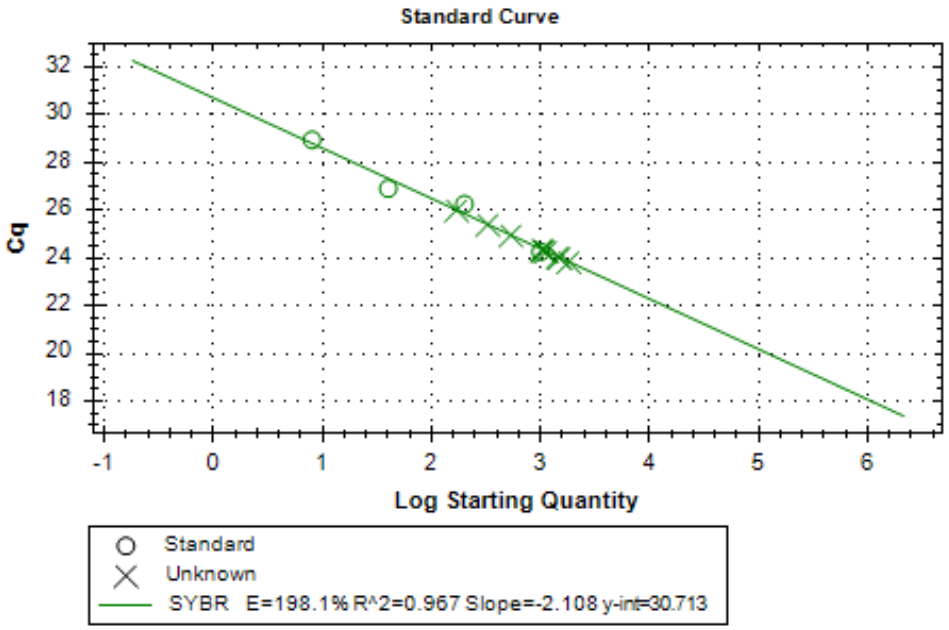
4.10.3. SiNP ve Fonksiyonlarının KRAS Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin IC_{50} değeri ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin KRAS üzerindeki gen ekspresyonları incelendi. Bağıl mRNA ekspresyonu için GAPDH referans gen olarak kullanıldı. KRAS geninin bağıl mRNA ekspresyonu, PC-3 hücre hattının cDNA'sının 1X, 5X, 25X, 125X, 625X ve 3125X dilüsyonlarından standart eğri üretilerek SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri için hesaplandı (**Şekil 4-47**). Amplifikasyon eğrisi grafiği, KRAS geninin döngü sayısına karşı floresans emisyonundaki değişiklikleri göstermektedir (**Şekil 4-46**). Erime eğrisi grafiği, SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin amplifikasyonunu kontrol etmek için yapıldı (**Şekil 4-48**).

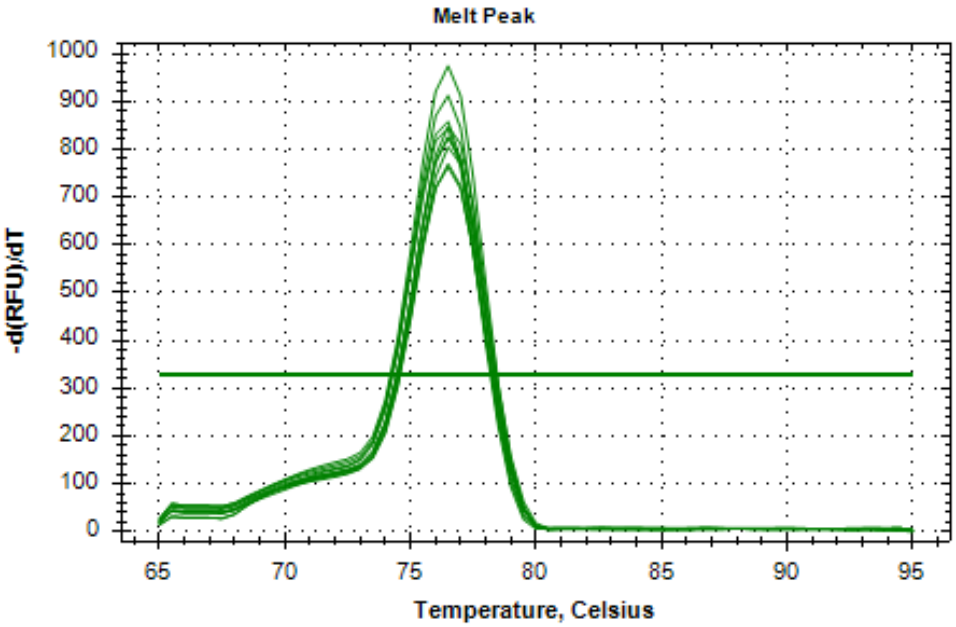
Amplifikasyon sırasında beklenildiği gibi tek bir pik görüldü. Standart eğri için R^2 değeri 0.967 bulundu. SiNP, KRAS gen ekspresyonunu 1 kat, SiNP-NH_2-1.3 kat, SiNP-SH-1.9 kat arttırırken SiNP-Cl ise 0.2 kat azalttı. Klor grubu ile fonksiyonlandırılan silika nanopartikülün (SiNP-Cl) sentezlenen diğer silika nanopartiküllere kıyasla PC-3 hücrelerinde KRAS gen ekspresyonu üzerinde farklı bir etki gösterdiği bulundu.



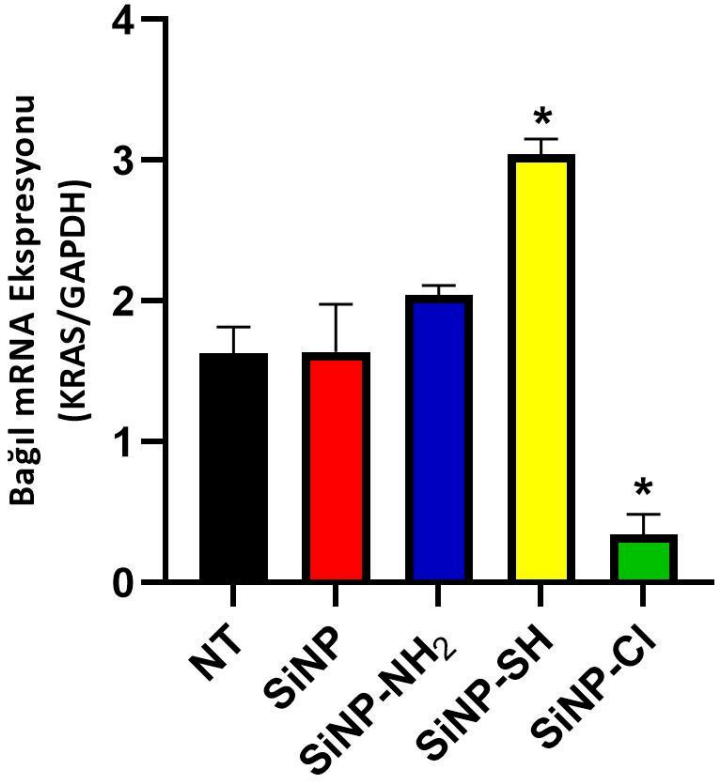
Şekil 4-45 Her reaksiyon döngüsünde floresan emisyonu birikimini gösteren amplifikasyon eğrisi grafiği



Şekil 4-46 PC-3 hücre hattındaki KRAS mRNA miktarlarını hesaplamak için seçilen cDNA'nın seri seyreltmelerinden üretilen standart eğri grafiği



Şekil 4-47 Sıcaklığa karşı floresan emisyon değişikliğini gösteren erime eğrisi grafiği. Tek tepe noktasının varlığı, tek PCR ürünü anlamına gelmektedir

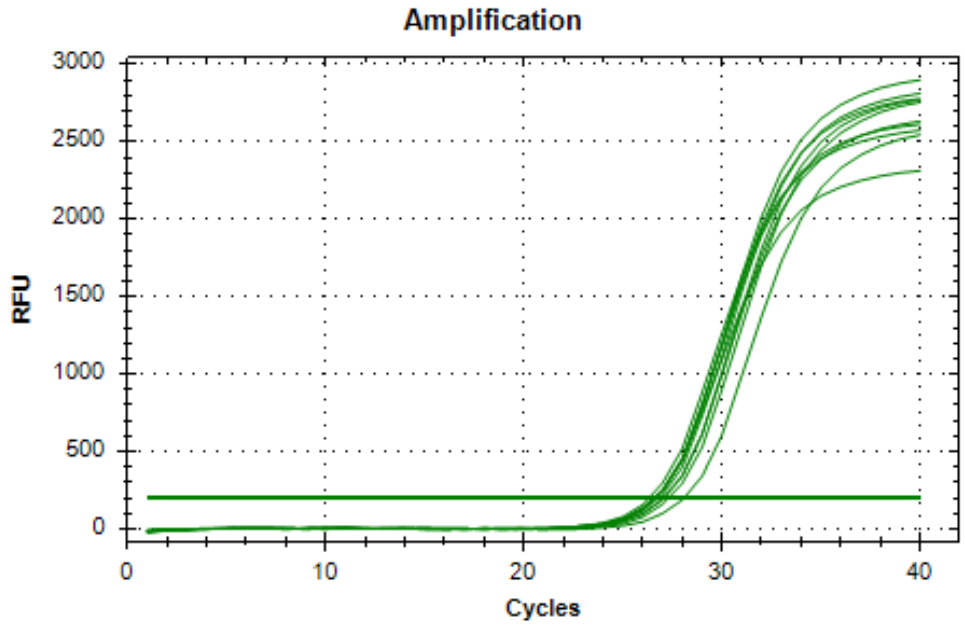


Şekil 4-48 KRAS geni ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. *; $P<0.05$)

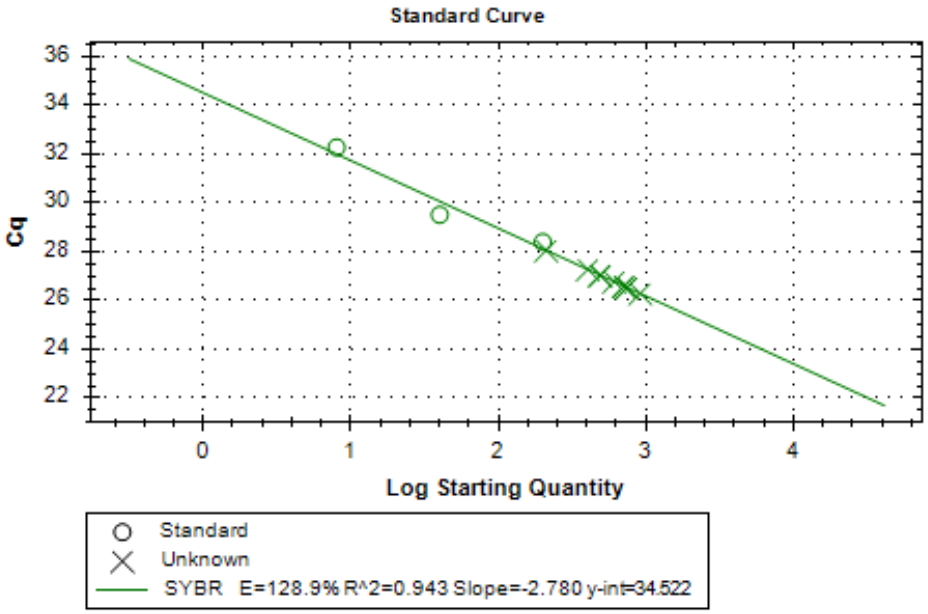
4.10.4. SiNP ve Fonksiyonlarının TP53 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin IC_{50} değeri ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin TP53 üzerindeki gen ekspresyonları incelendi. Bağıl mRNA ekspresyonu için GAPDH referans gen olarak kullanıldı. TP53 geninin bağıl mRNA ekspresyonu, PC-3 hücre hattının cDNA'sının 1X, 5X, 25X, 125X, 625X ve 3125X dilüsyonlarından standart eğri üretilerek SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri için hesaplandı (**Şekil 4-51**). Amplifikasyon eğrisi grafiği, TP53 geninin döngü sayısına karşı floresans emisyonundaki değişiklikleri göstermektedir (**Şekil 4-50**). Erime eğrisi grafiği, SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin amplifikasyonunu kontrol etmek için yapıldı (**Şekil 4-52**).

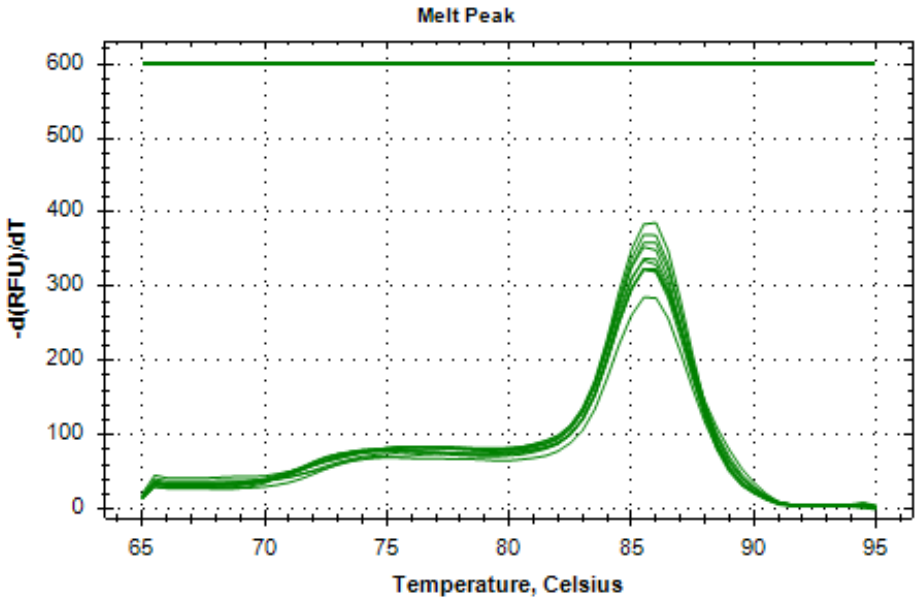
Amplifikasyon sırasında beklenildiği gibi tek bir pik görüldü. Standart eğri için R^2 değeri 0.943 bulundu. SiNP, TP53 gen ekspresyonunu 2.5 kat, SiNP-NH_2-2.6 kat, SiNP-SH-3 kat ve SiNP-Cl-1.3 kat arttırdı. Böylece sentezlenen SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri arasında PC-3 hücreleri üzerinde TP53 gen ekspresyonundaki en yüksek artışı SiNP-SH nanopartikülü gösterdi.



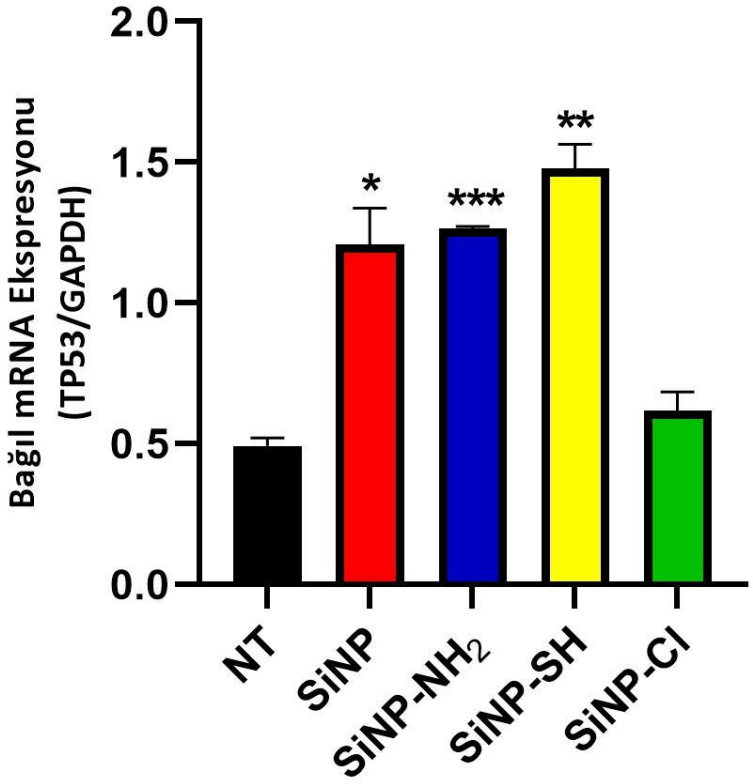
Şekil 4-49 Her reaksiyon döngüsünde floresan emisyonu birikimini gösteren amplifikasyon eğrisi grafiği



Şekil 4-50 PC-3 hücre hattındaki TP53 mRNA miktarlarını hesaplamak için seçilen cDNA'nın seri seyreltmelerinden üretilen standart eğri grafiği



Şekil 4-51 Sıcaklığa karşı floresan emisyon değişikliğini gösteren erime eğrisi grafiği. Tek tepe noktasının varlığı, tek PCR ürünü anlamına gelmektedir

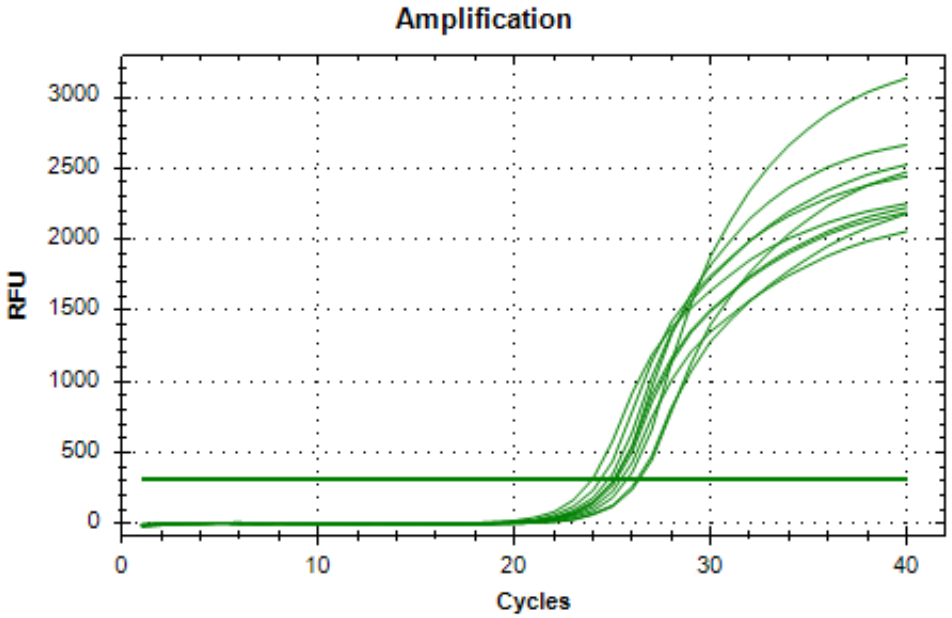


Şekil 4-52 TP53 geni ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. ***; $P<0.0001$, **; $P<0.001$, *; $P<0.05$)

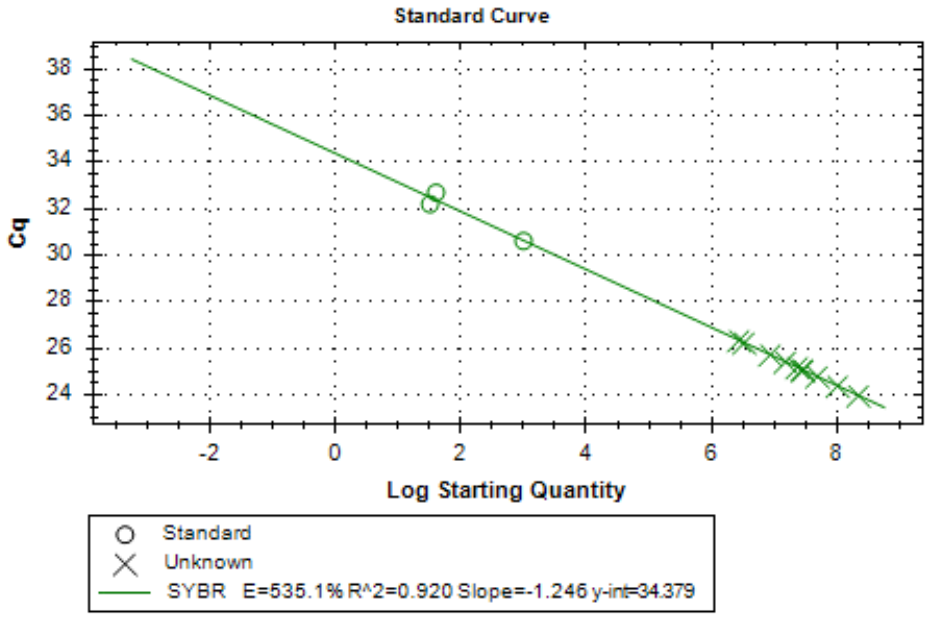
4.10.5. SiNP ve Fonksiyonlarının SMAD-4 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin IC_{50} değeri ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin SMAD-4 üzerindeki gen ekspresyonları incelendi. Bağıl mRNA ekspresyonu için GAPDH referans gen olarak kullanıldı. SMAD-4 geninin bağıl mRNA ekspresyonu, PC-3 hücre hattının cDNA'sının 1X, 5X, 25X, 125X, 625X ve 3125X dilüsyonlarından standart eğri üretilerek SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri için hesaplandı (**Şekil 4-55**). Amplifikasyon eğrisi grafiği, SMAD-4 geninin döngü sayısına karşı floresans emisyonundaki değişiklikleri göstermektedir (**Şekil 4-54**). Erime eğrisi grafiği, SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin amplifikasyonunu kontrol etmek için yapıldı (**Şekil 4-56**).

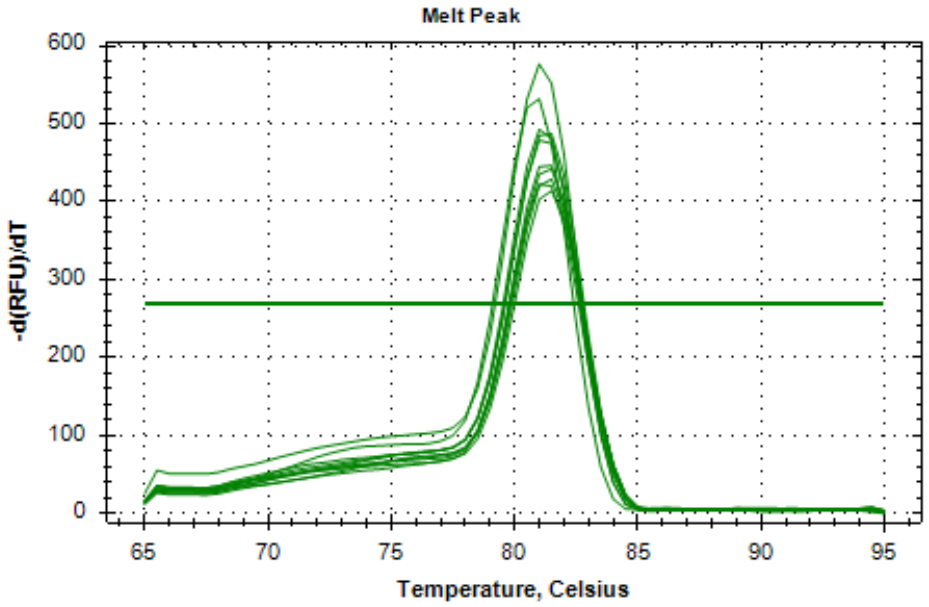
Amplifikasyon sırasında beklenildiği gibi tek bir pik görüldü. Standart eğri için R^2 değeri 0.920 bulundu. SiNP, SMAD-4 gen ekspresyonunu 1.1 kat, SiNP-SH-1.2 kat ve SiNP-Cl-1.3 kat arttırırken SiNP-NH_2 ise 0.4 kat azalttı. Amin grubu ile fonksiyonlandırılan silika nanopartikülün (SiNP-NH_2) sentezlenen diğer silika nanopartiküllere kıyasla PC-3 hücrelerinde SMAD-4 gen ekspresyonu üzerinde farklı bir etki gösterdiği bulundu.



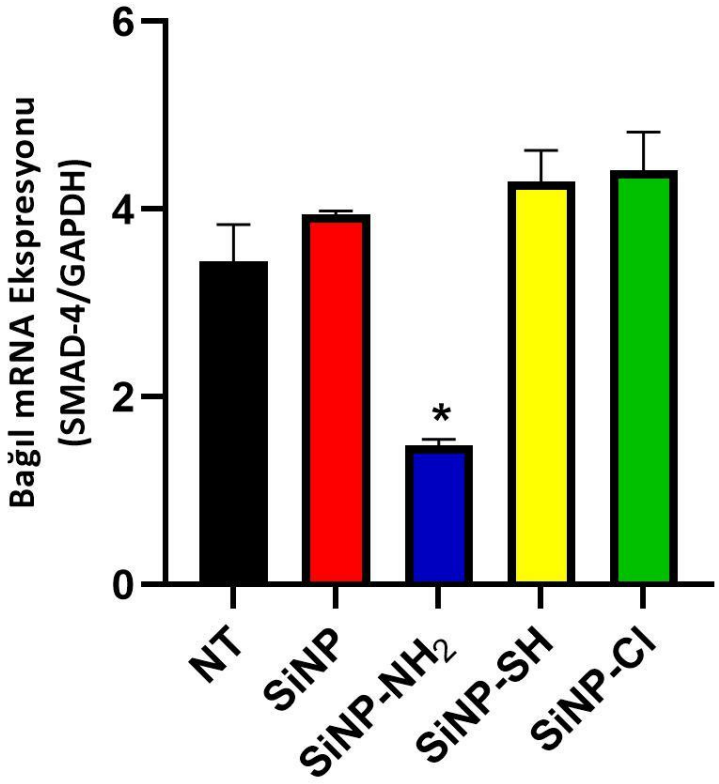
Şekil 4-53 Her reaksiyon döngüsünde floresan emisyonu birikimini gösteren amplifikasyon eğrisi grafiği



Şekil 4-54 PC-3 hücre hattındaki SMAD-4 mRNA miktarlarını hesaplamak için seçilen cDNA'nın seri seyreltmelerinden üretilen standart eğri grafiği



Şekil 4-55 Sıcaklığa karşı floresan emisyon değişikliğini gösteren erime eğrisi grafiği. Tek tepe noktasının varlığı, tek PCR ürünü anlamına gelmektedir

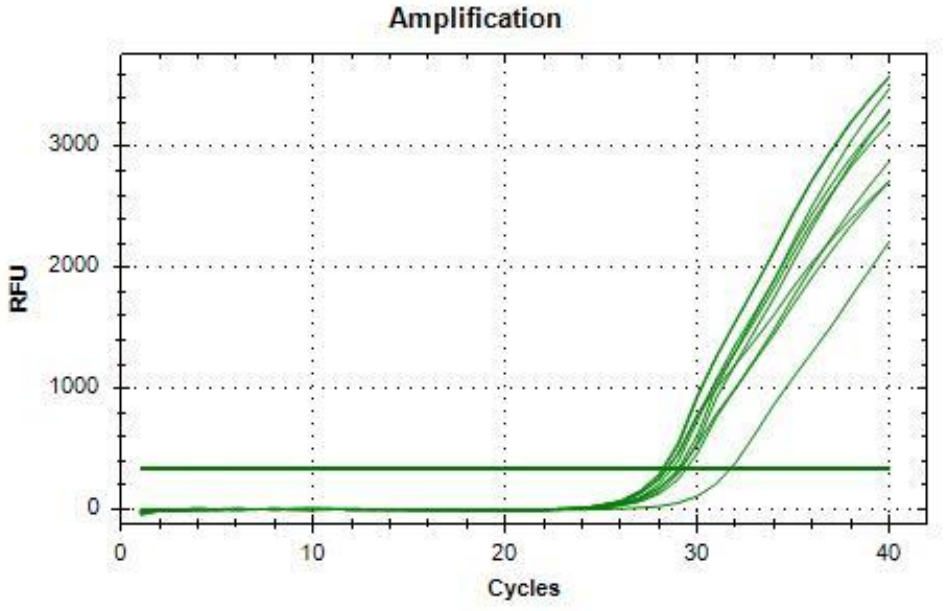


Şekil 4-56 SMAD-4 geni ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. *; $P<0.05$)

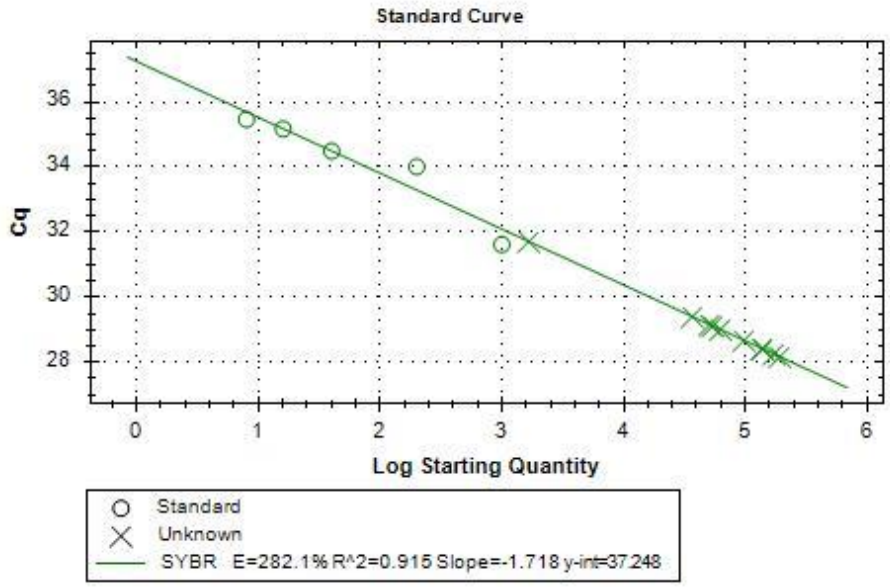
4.10.6. SiNP ve Fonksiyonlarının BAX Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin IC_{50} değeri ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin BAX üzerindeki gen ekspresyonları incelendi. Bağıl mRNA ekspresyonu için GAPDH referans gen olarak kullanıldı. BAX geninin bağıl mRNA ekspresyonu, PC-3 hücre hattının cDNA'sının 1X, 5X, 25X, 125X, 625X ve 3125X dilüsyonlarından standart eğri üretilerek SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri için hesaplandı (**Şekil 4-59**). Amplifikasyon eğrisi grafiği, BAX geninin döngü sayısına karşı floresans emisyonundaki değişiklikleri göstermektedir (**Şekil 4-58**). Erime eğrisi grafiği, SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin amplifikasyonunu kontrol etmek için yapıldı (**Şekil 4-60**).

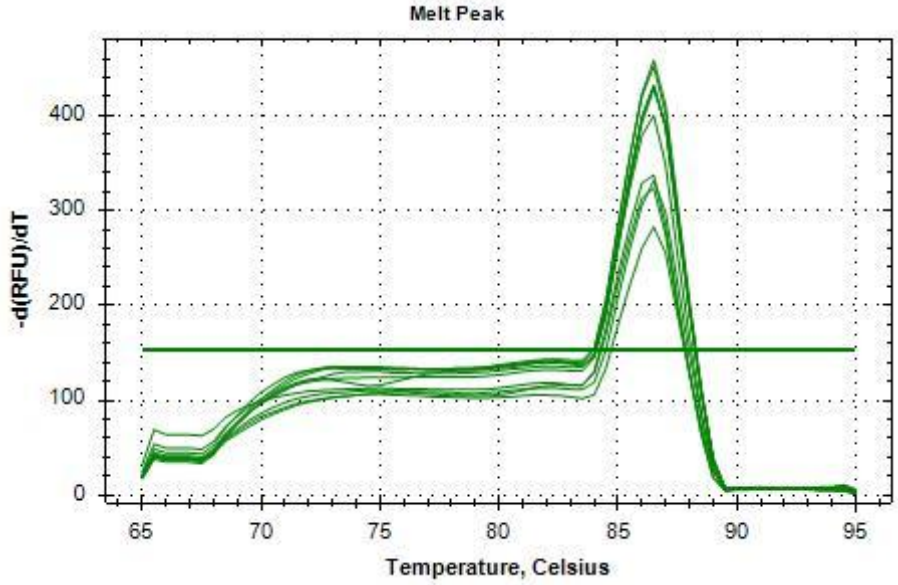
Amplifikasyon sırasında beklenildiği gibi tek bir pik görüldü. Standart eğri için R^2 değeri 0.915 bulundu. SiNP, BAX gen ekspresyonunu 1.3 kat, SiNP-NH_2-2.8 kat, SiNP-SH-1.2 kat ve SiNP-Cl-2.1 kat azalttı. Böylece sentezlenen SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri arasında PC-3 hücreleri üzerinde BAX gen ekspresyonundaki en fazla azalmayı SiNP-NH_2 nanopartikülü gösterdi.



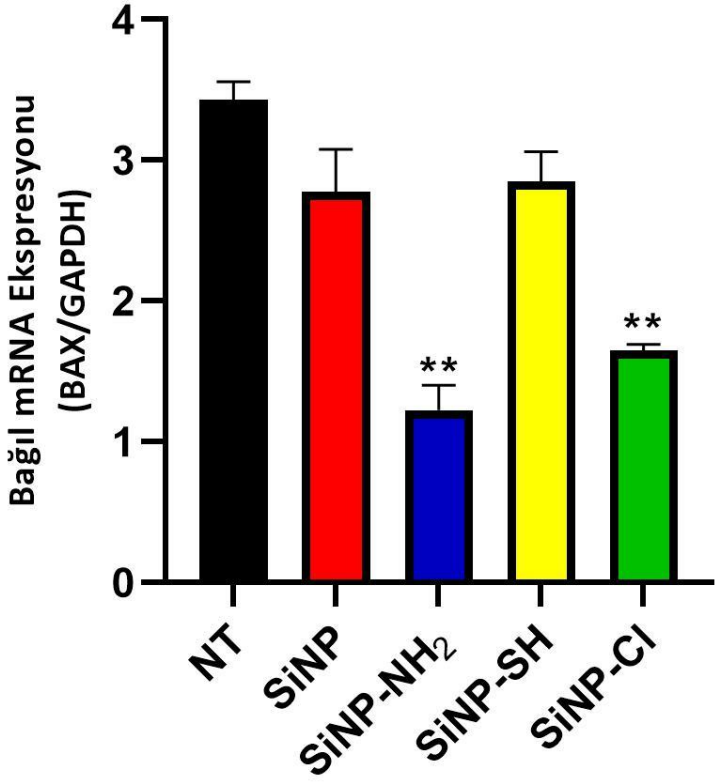
Şekil 4-57 Her reaksiyon döngüsünde floresan emisyonu birikimini gösteren amplifikasyon eğrisi grafiği



Şekil 4-58 PC-3 hücre hattındaki BAX mRNA miktarlarını hesaplamak için seçilen cDNA'nın seri seyreltmelerinden üretilen standart eğri grafiği



Şekil 4-59 Sıcaklığa karşı floresan emisyon değişikliğini gösteren erime eğrisi grafiği. Tek tepe noktasının varlığı, tek PCR ürünü anlamına gelmektedir

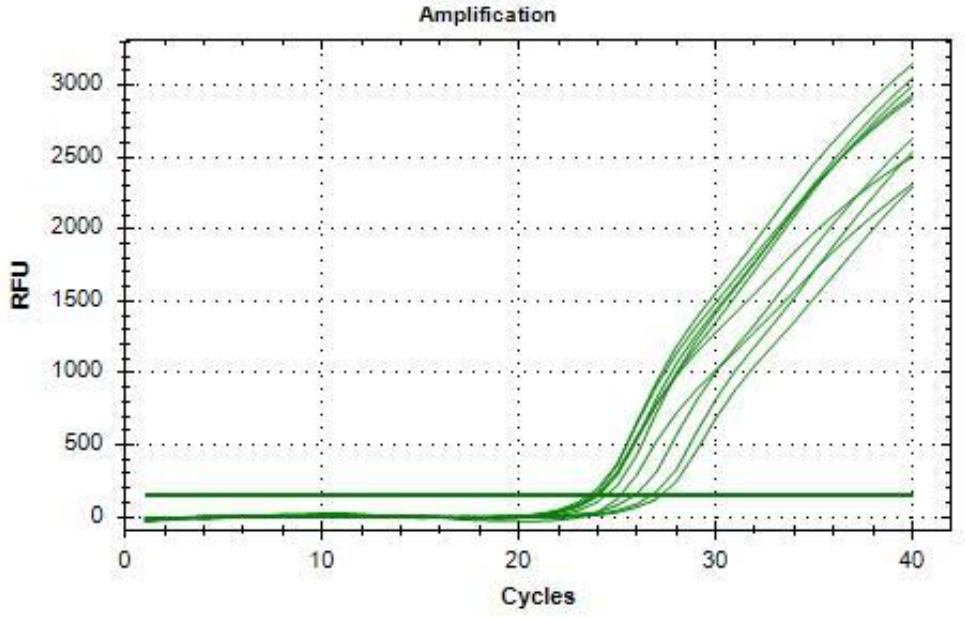


Şekil 4-60 BAX geni ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. **; $P<0.001$)

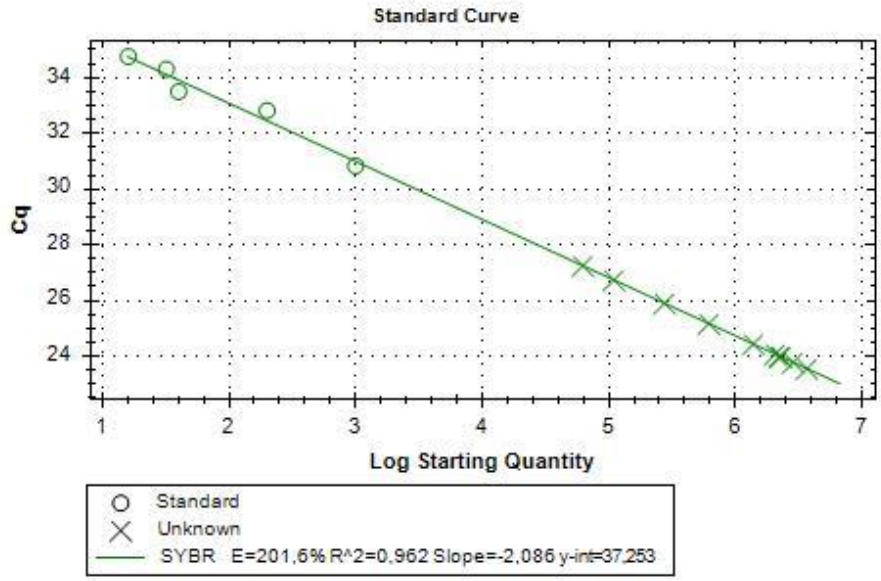
4.10.7. SiNP ve Fonksiyonlarının CASPASE-3 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin IC_{50} değeri ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin CASPASE-3 üzerindeki gen ekspresyonları incelendi. Bağıl mRNA ekspresyonu için GAPDH referans gen olarak kullanıldı. CASPASE-3 geninin bağıl mRNA ekspresyonu, PC-3 hücre hattının cDNA'sının 1X, 5X, 25X, 125X, 625X ve 3125X dilüsyonlarından standart eğri üretilerek SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri için hesaplandı (**Şekil 4-63**). Amplifikasyon eğrisi grafiği, CASPASE-3 geninin döngü sayısına karşı floresans emisyonundaki değişiklikleri göstermektedir (**Şekil 4-62**). Erime eğrisi grafiği, SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin amplifikasyonunu kontrol etmek için yapıldı (**Şekil 4-64**).

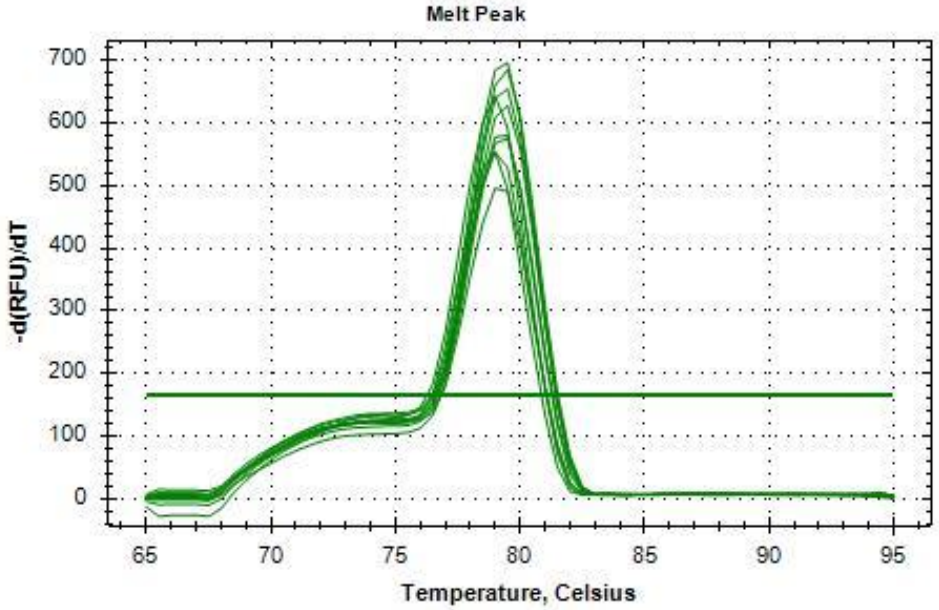
Amplifikasyon sırasında beklenildiği gibi tek bir pik görüldü. Standart eğri için R^2 değeri 0.962 bulundu. SiNP, CASPASE-3 gen ekspresyonunu 1.8 kat, SiNP-NH_2-2.6 kat ve SiNP-SH-3.1 kat arttırırken SiNP-Cl-0.8 kat azalttı. Klor grubu ile fonksiyonlandırılan silika nanopartikülün (SiNP-Cl) sentezlenen diğer silika nanopartiküllere kıyasla PC-3 hücrelerinde CASPASE-3 gen ekspresyonu üzerinde farklı bir etki gösterdiği bulundu.



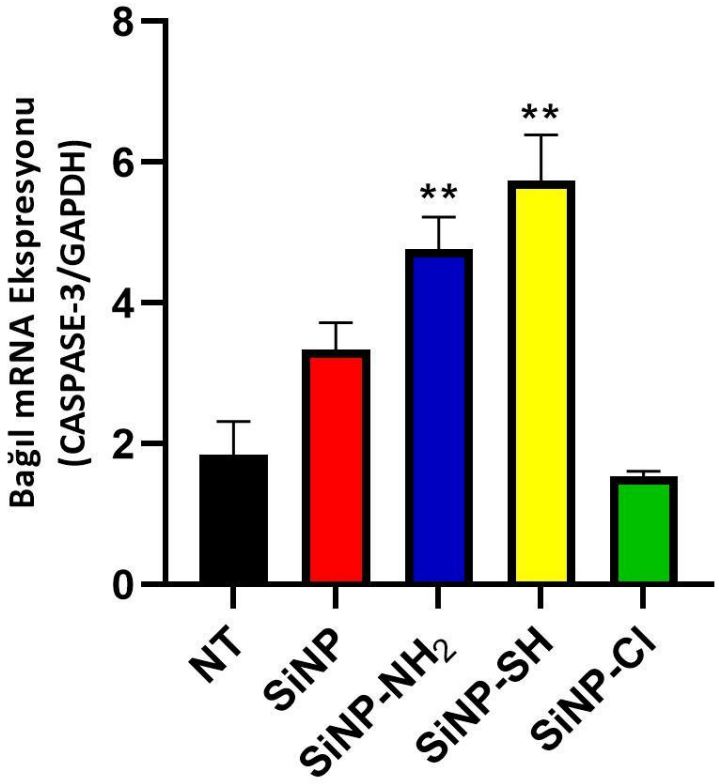
Şekil 4-61 Her reaksiyon döngüsünde floresan emisyonu birikimini gösteren amplifikasyon eğrisi grafiği



Şekil 4-62 PC-3 hücre hattındaki CASPASE-3 mRNA miktarlarını hesaplamak için seçilen cDNA'nın seri seyreltmelerinden üretilen standart eğri grafiği



Şekil 4-63 Sıcaklığa karşı floresan emisyon değişikliğini gösteren erime eğrisi grafiği. Tek tepe noktasının varlığı, tek PCR ürünü anlamına gelmektedir

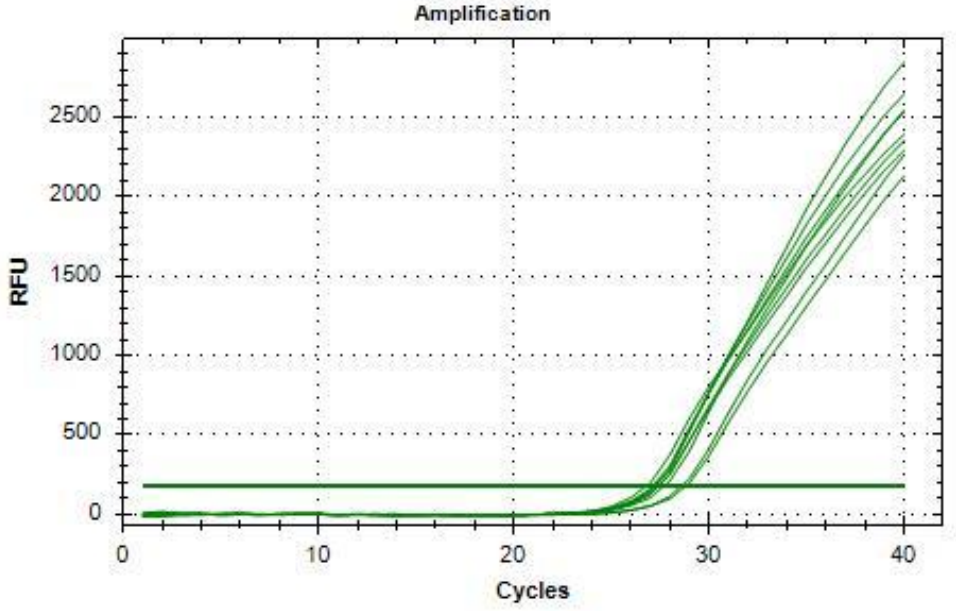


Şekil 4-64 CASPASE-3 geni ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. **; $P<0.001$)

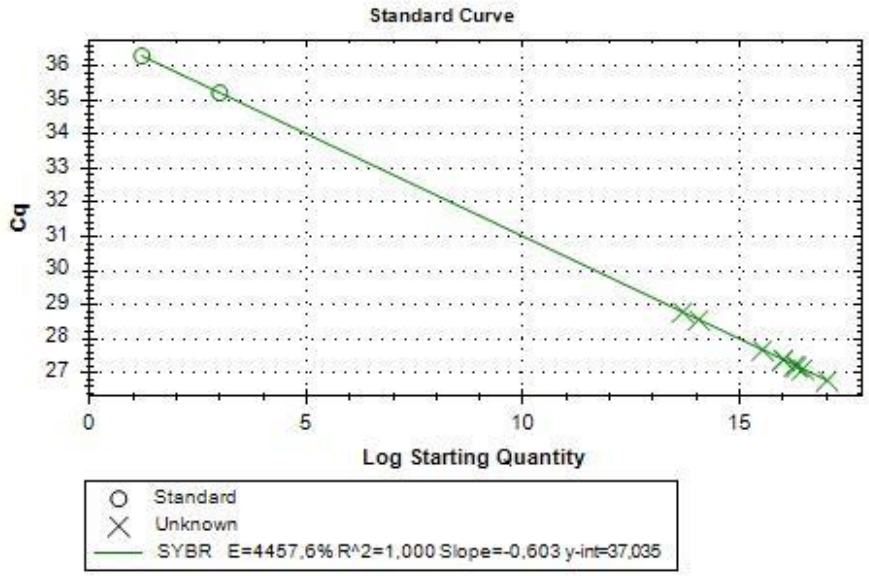
4.10.8. SiNP ve Fonksiyonlarının CASPASE-9 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin IC_{50} değeri ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin CASPASE-9 üzerindeki gen ekspresyonları incelendi. Bağıl mRNA ekspresyonu için GAPDH referans gen olarak kullanıldı. CASPASE-9 geninin bağıl mRNA ekspresyonu, PC-3 hücre hattının cDNA'sının 1X, 5X, 25X, 125X, 625X ve 3125X dilüsyonlarından standart eğri üretilerek SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri için hesaplandı (**Şekil 4-67**). Amplifikasyon eğrisi grafiği, CASPASE-9 geninin döngü sayısına karşı floresans emisyonundaki değişiklikleri göstermektedir (**Şekil 4-66**). Erime eğrisi grafiği, SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin amplifikasyonunu kontrol etmek için yapıldı (**Şekil 4-68**).

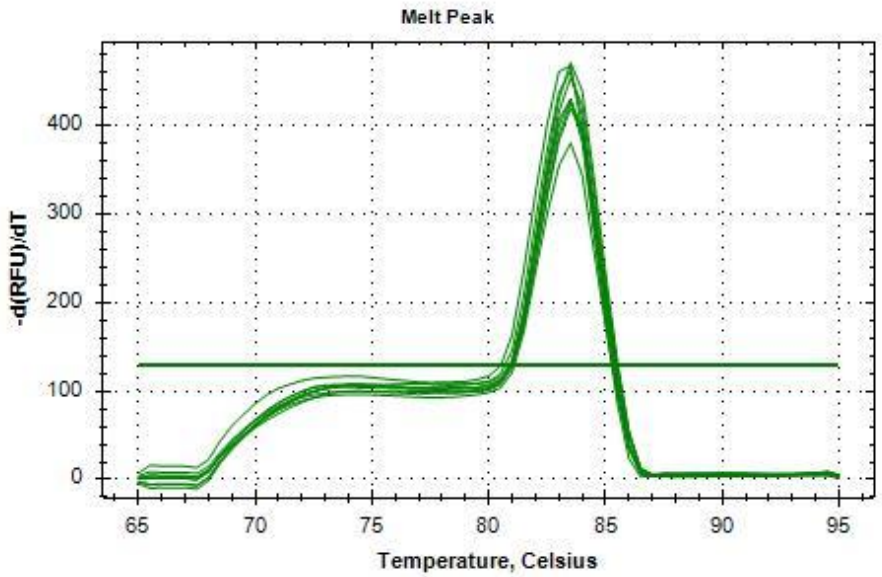
Amplifikasyon sırasında beklenildiği gibi tek bir pik görüldü. Standart eğri için R^2 değeri 1.000 bulundu. SiNP, CASPASE-9 gen ekspresyonunu 2.6 kat, SiNP-NH_2-3.7 kat, SiNP-SH-1.4 kat ve SiNP-Cl-2.3 kat arttırdı. Böylece sentezlenen SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri arasında PC-3 hücreleri üzerinde CASPASE-9 gen ekspresyonundaki en fazla artışı SiNP-NH_2 nanopartikülü gösterdi.



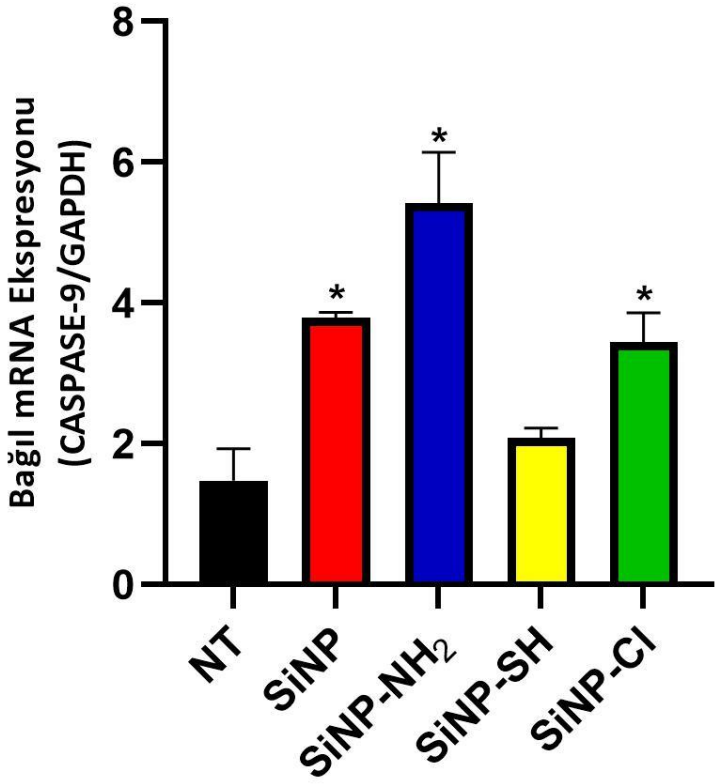
Şekil 4-65 Her reaksiyon döngüsünde floresan emisyonu birikimini gösteren amplifikasyon eğrisi grafiği



Şekil 4-66 PC-3 hücre hattındaki CASPASE-9 mRNA miktarlarını hesaplamak için seçilen cDNA'nın seri seyreltmelerinden üretilen standart eğri grafiği



Şekil 4-67 Sıcaklığa karşı floresan emisyon değişikliğini gösteren erime eğrisi grafiği. Tek tepe noktasının varlığı, tek PCR ürünü anlamına gelmektedir

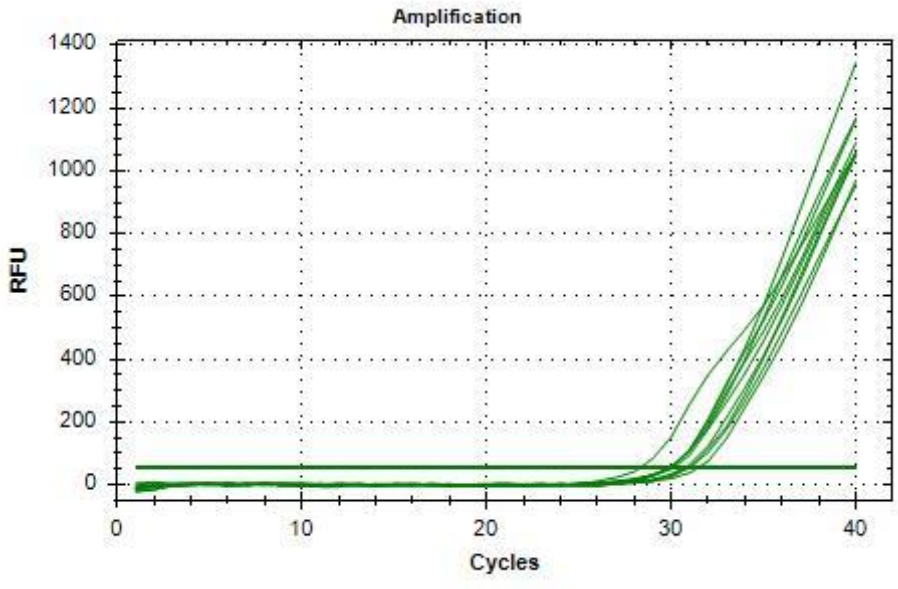


Şekil 4-68 CASPASE-9 geni ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. *; $P<0.05$)

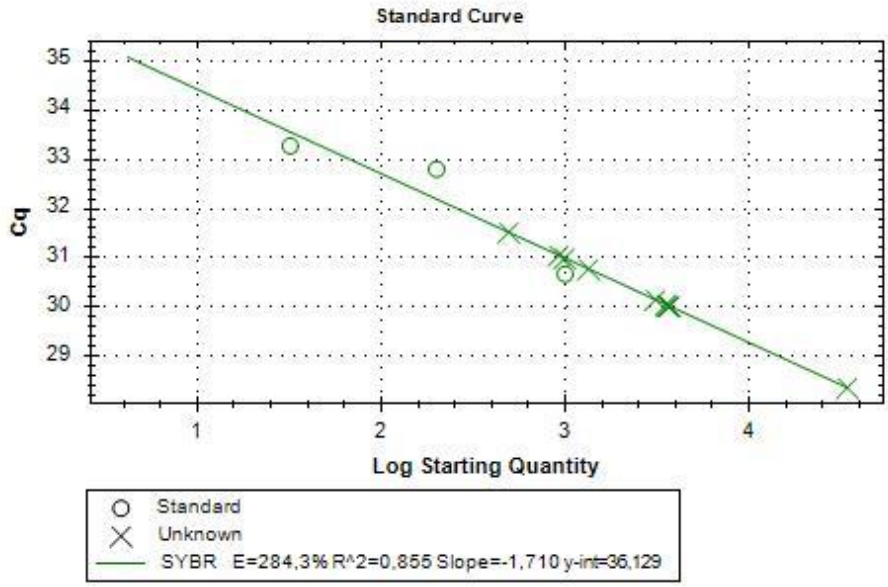
4.10.9. SiNP ve Fonksiyonlarının CASPASE-12 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin IC_{50} değeri ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin CASPASE-12 üzerindeki gen ekspresyonları incelendi. Bağıl mRNA ekspresyonu için GAPDH referans gen olarak kullanıldı. CASPASE-12 geninin bağıl mRNA ekspresyonu, PC-3 hücre hattının cDNA'sının 1X, 5X, 25X, 125X, 625X ve 3125X dilüsyonlarından standart eğri üretilerek SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartikülleri için hesaplandı (**Şekil 4-71**). Amplifikasyon eğrisi grafiği, CASPASE-12 geninin döngü sayısına karşı floresans emisyonundaki değişiklikleri göstermektedir (**Şekil 4-70**). Erime eğrisi grafiği, SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerinin amplifikasyonunu kontrol etmek için yapıldı (**Şekil 4-72).**

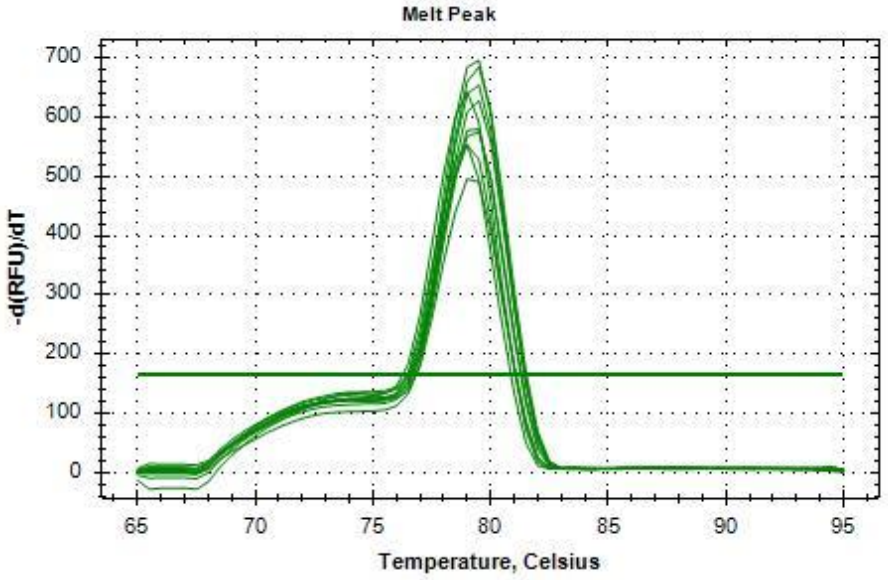
Amplifikasyon sırasında beklenildiği gibi tek bir pik görüldü. Standart eğri için R^2 değeri 0.855 bulundu. SiNP, CASPASE-12 gen ekspresyonunu 1.5 kat, SiNP-NH_2-1.3 kat ve SiNP-Cl-5.4 kat azaltırken SiNP-SH-0.9 kat arttırdı. Tiyol grubu ile fonksiyonlandırılan silika nanopartikülün (SiNP-SH) sentezlenen diğer silika nanopartiküllere kıyasla PC-3 hücrelerinde CASPASE-12 gen ekspresyonu üzerinde farklı bir etki gösterdiği bulundu.



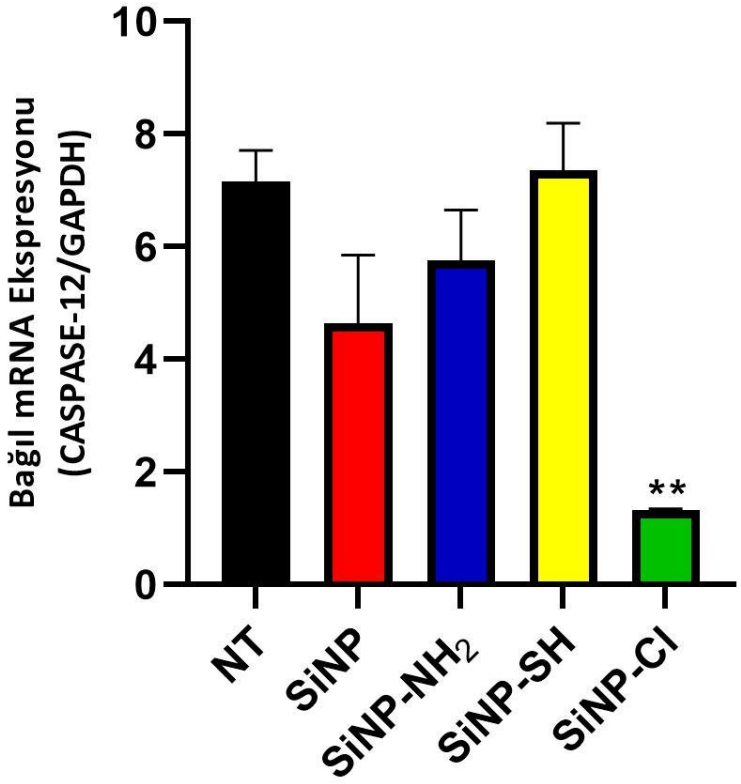
Şekil 4-69 Her reaksiyon döngüsünde floresan emisyonu birikimini gösteren amplifikasyon eğrisi grafiği



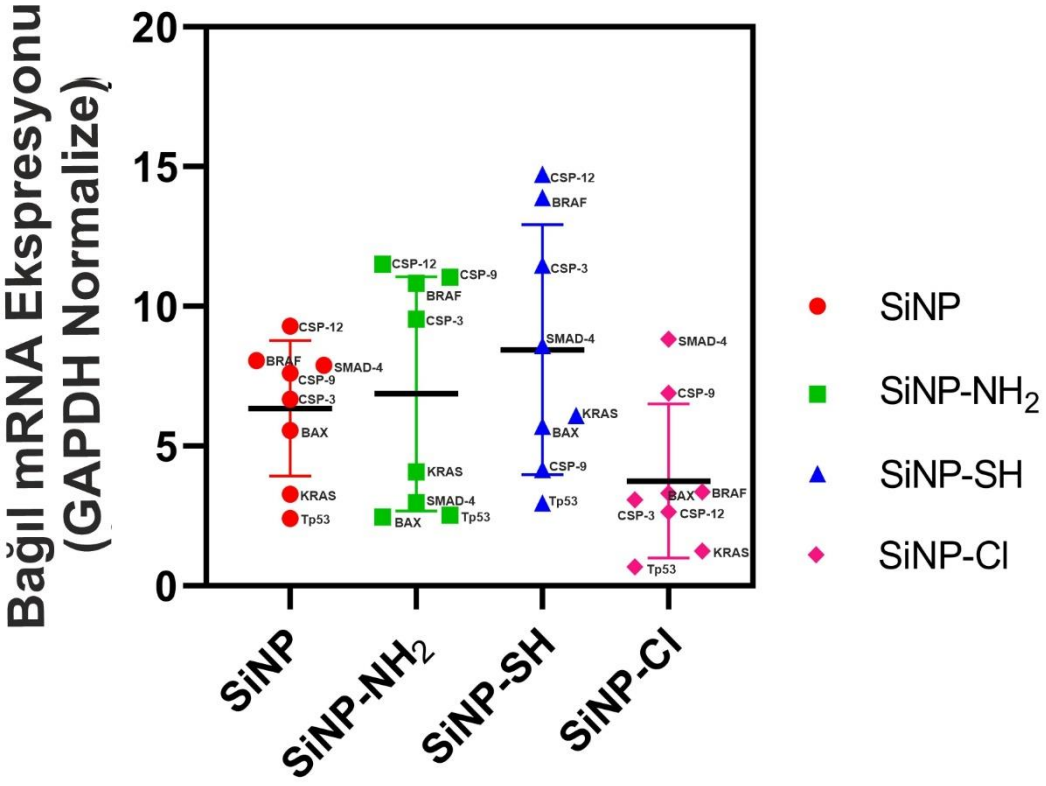
Şekil 4-70 PC-3 hücre hattındaki CASPASE-12 mRNA miktarlarını hesaplamak için seçilen cDNA'nın seri seyreltmelerinden üretilen standart eğri grafiği



Şekil 4-71 Sıcaklığa karşı floresan emisyon değişikliğini gösteren erime eğrisi grafiği. Tek tepe noktasının varlığı, tek PCR ürünü anlamına gelmektedir



Şekil 4-72 CASPASE-12 geni ekspresyonundaki değişim (Grafikler ortalama ± Std.Dev. En az 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir. t-test analizlerine göre $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. **; $P<0.001$)



Şekil 4-73 SiNP ve fonksiyonlarının tüm gen gruplarındaki kümülatif qRT-PCR analizi

Sonuç olarak; BAX, TP53, SMAD-4, KRAS, CASPASE-3, CASPASE-9 ve CASPASE-12 genlerindeki SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl değişimleri kümülatif olarak incelendiğinde tüm genler üzerinde en etkili ve en yaygın etkiyi SiNP-SH nanopartikülü göstermiştir (**Şekil 4-73**).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu tez kapsamında ilk olarak silika nanopartiküller (SiNP) 10.03 ± 2.4 nm boyutlarında Stöber yöntemi ışığında sentezlendi.
- Sentezlenen silika nanopartiküller çeşitli silan birleştirme ajanları kullanılarak fonksiyonlandırıldı. Bunun için 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) yardımıyla silika nanopartiküllerin yapısına amin grubu kazandırıldı ve SiNP-NH_2 olarak adlandırıldı. SiNP-NH_2 nanopartiküller 11.94 ± 2.8 nm boyutlarında sentezlendi.
- 3-merkaptopropiltrietoksisilan (McPTES) yardımıyla silika nanopartiküllerin yapısına tiyol grubu kazandırıldı ve SiNP-SH olarak adlandırıldı. SiNP-SH nanopartiküller 12.22 ± 2.6 nm boyutlarında sentezlendi.
- Son olarak kloropropiltrietoksisilan (CPTES) yardımıyla silika nanopartiküllerin yapısına klor grubu kazandırıldı ve SiNP-Cl olarak adlandırıldı. SiNP-Cl nanopartiküller 11.20 ± 2.5 nm boyutlarında sentezlendi.
- Sentez aşamasında farklı gruplarla modifiye edilen silika nanopartiküllerin boyut dağılımına ve yüzey yüküne etkileri DLS analizi ile incelendi.
- Sentezlenen silika nanopartiküllerin ve modifiye edilmiş hallerinin morfolojik ve yapısal analizinde TEM, FTIR ve BET teknikleri kullanılarak elde edilen nanopartiküllerin beklenen karakteristik özelliklere sahip olduğu gösterildi.
- Sentezlenen nanopartiküllerin altı farklı kanser hücresi ve bir sağlıklı epitel hücredeki sitotoksik etkileri incelendi.
- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin prostat kanseri (PC-3), rahim ağzı kanseri (HeLa) ve kolon kanseri (DLD-1) hücreleri üzerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulundu.
- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin akciğer kanseri (A549), karaciğer kanseri (HUH-7) ve böbrek üstü bezi kanseri (NCI-H295R) üzerinde toksik etki göstermediği bulundu.
- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküller en fazla toksik etkiyi prostat kanseri (PC-3) hücresi üzerinde gösterdi.
- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküller sağlıklı prostat epitel hücresi (PNT1A) üzerinde herhangi bir toksik etki göstermedi.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin PC-3 hücresi üzerinde hücre ölüm mekanizması (apoptoz), yara iyileştirme kabiliyeti, koloni oluşturma potansiyeli ve DNA yapısı üzerindeki etkileri incelendi.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin PC-3 hücresi üzerinde hücre ölüm mekanizmasının (apoptoz) belirlenmesi için akış sitometrisi kullanıldı. Bunun için PC-3 hücreleri nanopartiküllerin IC_{50} değerleri ile muamele edildi. SiNP'ler, PC-3 hücrelerini kontrol hücresine göre 2.83 kat, SiNP-NH_2 nanopartiküller 4.61 kat, SiNP-SH nanopartiküller 7.88 kat ve SiNP-Cl nanopartiküller 6.76 kat daha fazla erken apoptoza uğratarak hücreyi apoptoza sürükledi.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin PC-3 hücreleri üzerindeki metastatik etkilerinin incelenmesi amacıyla yara iyileştirmesi deneyi gerçekleştirildi ve bunun için plakalara 0.9 mm kalınlığında yara açıldı. SiNP'ler, PC-3 hücrelerinin metastazını %10, SiNP-NH_2 nanopartiküller %9.6, SiNP-SH nanopartiküller %20.4 ve SiNP-Cl nanopartiküller bu oranı %20.5'e kadar düşürdü.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin PC-3 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkilerini anlamak için koloni oluşturma deneyi gerçekleştirildi. SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküller ile muamele edilen PC-3 hücreleri kontrol grubuna göre %0.7'lik agaroz jelde daha az çoğalarak koloni oluşumunu azalttı. SiNP ile muamele edilen hücrelerin koloni oluşturma kapasitesi %75, SiNP-NH_2 ile muamele edilen hücrelerin %95, SiNP-SH ile muamele edilen hücrelerin %73, SiNP-Cl ile muamele edilen hücrelerin %50'ye kadar düştü.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin PC-3 hücrelerinde DNA hasarı üzerindeki etkilerini anlamak için DNA kırılması deneyi gerçekleştirildi. SiNP-NH_2 nanopartikülleri PC-3 hücreleri üzerinde DNA hasarı gösterdi.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin PC-3 hücreleri üzerinde protein ekspresyonundaki değişiklikleri anlamak için Western-Blot tekniği kullanıldı. Bunun için apoptoz yolağında yer alan BAX, BCL-2, Nf-κB, p53, KRAS ve SMAD-4 antikorları seçildi.

- Sentezlenen nanopartiküller BAX protein ekspresyonu üzerinde önemli bir artış gösterdi. SiNP, BAX protein ekspresyonunu 4.39 kat, SiNP-NH_2-2.82 kat, SiNP-SH-7.15 kat ve SiNP-Cl-4.03 kat arttırdı.

- Sentezlenen SiNP, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküller BCL-2 protein ekspresyonu üzerinde önemli bir artış gösterirken, SiNP-NH_2 nanopartikülünde azalma gözlemlendi. Sonuç olarak SiNP, BCL-2 protein ekspresyonunu 1.66 kat, SiNP-SH-1.57 kat ve SiNP-Cl-1.10 kat arttırdı ve SiNP-NH_2 ise 0.85 kat azalttı.

- SiNP, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküller Nf-κB protein ekspresyonu üzerinde önemli bir artış gösterirken, SiNP-NH_2 nanopartikülünde azalma gözlemlendi. Nf-κB protein ekspresyonunu SiNP-1.40 kat, SiNP-SH-1.75 kat ve SiNP-Cl-1.21 kat arttırdı ve SiNP-NH_2 ise 0.94 kat azalttı.

- Sentezlenen nanopartiküller p53 protein ekspresyonu üzerinde önemli bir artış gösterdi. SiNP, p53 protein ekspresyonunu 2.17 kat, SiNP-NH_2-2.22 kat, SiNP-SH-2.86 kat ve SiNP-Cl-1.69 kat arttırdı.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküller KRAS protein ekspresyonu üzerinde önemli bir azalma gösterdi. KRAS protein ekspresyonunu SiNP-1.10 kat, SiNP-NH_2-1.22 kat, SiNP-SH-1.11 kat ve SiNP-Cl-1.83 kat azalttı.

- SiNP, SiNP-SH ve SiNP-NH_2 nanopartiküller SMAD-4 protein ekspresyonu üzerinde önemli bir artış gösterirken, SiNP-Cl nanopartikülünde bir azalma gözlemlendi. SMAD-4 protein ekspresyonunu SiNP-1.06 kat, SiNP-NH_2-1.02 kat ve SiNP-SH-1.85 kat arttırdı ve SiNP-Cl ise 0.83 kat azalttı.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin PC-3 hücreleri üzerinde gen ekspresyonundaki değişiklikleri anlamak için qRT-PCR tekniği kullanıldı. Bunun için TP53, BRAF, KRAS, SMAD-4, BAX, CASPASE-3, CASPASE-9 ve CASPASE-12 genleri seçildi.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküller BRAF geni ekspresyonu üzerinde önemli bir artış gösterdi. SiNP, BRAF gen ekspresyonunu 3.9 kat, SiNP-NH_2-5.3 kat, SiNP-SH-6.7 kat ve SiNP-Cl-1.6 kat arttırdı.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH nanopartiküller KRAS geni ekspresyonu üzerinde önemli bir artış gösterirken SiNP-Cl nanopartikülünde bir azalma gözlemlendi. SiNP, KRAS gen ekspresyonunu 1 kat, SiNP-NH_2-1.3 kat, SiNP-SH-1.9 kat arttırırken SiNP-Cl ise 0.2 kat azalttı.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküller TP53 geni ekspresyonu üzerinde önemli bir artış gösterdi. SiNP, TP53 gen ekspresyonunu 2.5 kat, SiNP-NH_2-2.6 kat, SiNP-SH-3 kat ve SiNP-Cl-1.3 kat arttırdı

- SiNP, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküller SMAD-4 geni ekspresyonu üzerinde önemli bir artış gösterirken, SiNP-NH_2 nanopartikülünde bir azalma gözlemlendi. SiNP, SMAD-4 gen ekspresyonunu 1.1 kat, SiNP-SH-1.2 kat ve SiNP-Cl-1.3 kat arttırırken SiNP-NH_2 ise 0.4 kat azalttı.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküller BAX geni ekspresyonu üzerinde önemli bir azalma gösterdi. SiNP, BAX gen ekspresyonunu 1.3 kat, SiNP-NH_2-2.8 kat ,SiNP-SH-1.2 kat ve SiNP-Cl-2.1 kat azalttı.

- SiNP, SiNP-SH ve SiNP-NH_2 nanopartiküller CASPASE-3 geni ekspresyonu üzerinde önemli bir artış gösterirken, SiNP-Cl nanopartikülünde bir azalma gözlemlendi. SiNP, CASPASE-3 gen ekspresyonunu 1.8 kat, SiNP-NH_2-2.6 kat ve SiNP-SH-3.1 kat arttırırken SiNP-Cl-0.8 kat azalttı.

- SiNP, SiNP-NH_2, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküller CASPASE-9 geni ekspresyonu üzerinde önemli bir artış gösterdi. SiNP, CASPASE-9 gen ekspresyonunu 2.6 kat, SiNP-NH_2-3.7 kat, SiNP-SH-1.4 kat ve SiNP-Cl-2.3 kat arttırdı.

- SiNP, SiNP-Cl ve SiNP-NH_2 nanopartiküller CASPASE-12 geni ekspresyonu üzerinde önemli bir azalma gösterirken, SiNP-SH nanopartikülünde bir artış gözlemlendi. SiNP, CASPASE-12 gen ekspresyonunu 1.5 kat, SiNP-NH_2-1.3 kat ve SiNP-Cl-5.4 kat azaltırken SiNP-SH-0.9 kat arttırdı.

- Bulunan tüm sonuçlar göz önüne alındığında, SiNP'ler üzerindeki bazı fonksiyonel grupların varlığı kanser hücreleriyle kolayca etkileşime girdiği söylenebilir. Bu nedenle, fonksiyonlandırılmış SiNP'ler ($SiNP-NH_2$, SiNP-SH, SiNP-Cl) çoğu deney sonucu için SiNP'lerden daha etkili sonuçlar gösterdi.

- SiNP-SH, PC-3 hücreleri üzerinde en yüksek toksik etkiye sahipti ve kanser hücresini diğerlerine kıyasla en yüksek oranda erken apoptoza sürükledi. SiNP-SH'nin PC-3 hücreleri üzerindeki metastatik özellikleri önemli ölçüde daha az iken koloni oluşturma yeteneği bu sonucu desteklemekteydi. İlgili genlerdeki protein ve gen ekspresyon analizlerine bakıldığında, SiNP-SH diğer bileşiklere kıyasla daha fazla ekspresyon gösterdi. Tüm bu sonuçlara göre, tiyol grubu ile fonksiyonlandırılan nanopartikül (SiNP-SH), PC-3 hücreleri üzerinde daha etkili olmayı başardı.

- Sonuç olarak, bu tez, başta sağlık ve sanayi olmak üzere birçok alanda aktif olarak kullanılan SiNP'lerin ve SiNP bazlı ajanların anti-kanserojen etkisini kapsamlı bir şekilde moleküler seviyede aydınlattı.

- SiNP, $SiNP-NH_2$, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin metastatik prostat kanseri hücrelerinde (PC-3) proliferasyonu önemli ölçüde engelledi. Ek olarak, metastatik özelliğinin azaldığı ve önemli miktarda erken apoptoza yol açtığı belirlendi. Bu nedenle ölümcül ve yüksek insidanslı PCa tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlerin yüksek maliyeti ve metastazın mortaliteyi arttırması nedeniyle sonuçların PCa tedavisinde önemini ortaya koydu.

- SiNP, $SiNP-NH_2$, SiNP-SH ve SiNP-Cl nanopartiküllerin düşük maliyeti ve yüksek verimliliği, mevcut tedavilere yeni bir yaklaşım getirerek PCa oluşumunu azaltmak ve PCa'yı tedavi etmek için önemli bir stratejiyi temsil edebilir.

KAYNAKLAR

Abou El-Nour, K. M. M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A. ve Ammar, R. A. A., 2010, Synthesis and applications of silver nanoparticles, *Arabian Journal of Chemistry*, 3 (3), 135-140.

Akhter, M. H., Rizwanullah, M., Ahmad, J., Ahsan, M. J., Mujtaba, M. A. ve Amin, S., 2018, Nanocarriers in advanced drug targeting: setting novel paradigm in cancer therapeutics, *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 46 (5), 873-884.

Aktipis, C. A. ve Nesse, R. M., 2013, Evolutionary foundations for cancer biology, *Evolutionary Applications*, 6 (1), 144-159.

ALOthman, Z. A., 2012, A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials, *materials*, 5, 2874-2902.

Ateş, H. ve Bahçeci, E., 2015, Nano Malzemeler için Üretim Yöntemleri, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 3 (2), 483-499.

Bashir, M. N., 2015, Epidemiology of Prostate Cancer, *Asian Pac J Cancer Prev*, 16 (13), 5137-5141.

Batur, A. F., Kutman, K. G. ve Bolat, M. S., 2015, Prostat Kanseri Tedavisinde 'Nanoteknoloji Uygulamaları', *Üroonkoloji Bülteni*, 14, 150-155.

Bawa, R., 2007, Patents and nanomedicine, *Nanomedicine (Lond)*, 2 (3), 351-374.

Bordon, Y., 2018, Tumour immunology: NK cells bring in the troops, *Nat Rev Immunol*, 18 (3), 151.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. ve Jemal, A., 2018, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin*, 68 (6), 394-424.

Brooks, J. D., Paton, V. G. ve Vidanes, G., 2001, Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10 (9), 949-954.

Bulut, M. O. ve Akar, E., 2012, Dendrimerlerin Önemi Ve Kullanım Alanları, *SDU Journal of the Technical Sciences*, 2, 5-11.

Carter, H. B., Albertsen, P. C., Barry, M. J., Etzioni, R., Freedland, S. J., Greene, K. L., Holmberg, L., Kantoff, P., Konety, B. R., Murad, M. H., Penson, D. F. ve Zietman, A. L., 2013, Early detection of prostate cancer: AUA Guideline, *J Urol*, 190 (2), 419-426.

Changizi, O., Khoei, S., Mahdavian, A., Shirvalilou, S., Mahdavi, S. R. ve Rad, J. K., 2019, Enhanced radiosensitivity of LNCaP prostate cancer cell line by gold-photoactive nanoparticles modified with folic acid, *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 101602.

Chen, C., Yao, W., Sun, W., Guo, T., Lv, H., Wang, X., Ying, H., Wang, Y. ve Wang, P., 2019, A self-targeting and controllable drug delivery system constituting mesoporous silica nanoparticles fabricated with a multi-stimuli responsive chitosan-based thin film layer, *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 1090-1099.

Chen, F., Hableel, G., Zhao, E. R. ve Jokerst, J. V., 2018, Multifunctional nanomedicine with silica: Role of silica in nanoparticles for theranostic, imaging, and drug monitoring, *J Colloid Interface Sci*, 521, 261-279.

Derman S., Kızılbey K. ve Z.M., A., 2013, POLYMERIC NANOPARTICLES *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31, 109-122.

Dong, H., Pang, L., Cong, H., Shen, Y. ve Yu, B., 2019, Application and design of esterase-responsive nanoparticles for cancer therapy, *Drug Deliv*, 26 (1), 416-432.

Dykman, L. ve Khlebtsov, N., 2012, Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives, *Chemical Society Reviews*, 41 (6), 2256-2282.

Emerich, D. F. ve Thanos, C. G., 2003, Nanotechnology and medicine, *Expert Opin Biol Ther*, 3 (4), 655-663.

Ertugen, E., Tuncel, A. ve Yurt, F., 2020, Docetaxel loaded human serum albumin nanoparticles; synthesis, characterization, and potential of nuclear imaging of prostate cancer, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55, 101410.

Estape, T., 2018, Cancer in the elderly: Challenges and barriers, *Psycho-Oncology*, 27, 39-39.

Feifel, S. C. ve Lisdat, F., 2011, Silica nanoparticles for the layer-by-layer assembly of fully electro-active cytochrome c multilayers, *Journal of Nanobiotechnology*, 9.

Feldman, B. J. ve Feldman, D., 2001, The development of androgen-independent prostate cancer, *Nat Rev Cancer*, 1 (1), 34-45.

Gala, U. H., Miller, D. A. ve Williams, R. O., 3rd, 2020, Harnessing the therapeutic potential of anticancer drugs through amorphous solid dispersions, *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1873 (1), 188319.

Gollnick, S. O. ve Brackett, C. M., 2010, Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy, *Immunol Res*, 46 (1-3), 216-226.

Guo, J. J., Lu, X. H., Cheng, Y. C., Li, Y., Xu, G. J. ve Cui, P., 2008, Size-controllable synthesis of monodispersed colloidal silica nanoparticles via hydrolysis of elemental silicon, *Journal of Colloid and Interface Science*, 326 (1), 138-142.

Gürmen, S. ve Ebin, B., 2008, Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri -1, *Metalurji Dergisi*.

Gürsoy, E., 2019, Prostat Problemleri ve Çözümler [online], https://www.bto.org.tr/wp-content/uploads/2019/10/prostat-problemleri-cozumleri-eray-gursoy.pdf [Ziyaret Tarihi: 6.1.2020].

Haley, B. ve Frenkel, E., 2008, Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment, *Urol Oncol*, 26 (1), 57-64.

Hanahan, D. ve Weinberg, R. A., 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100 (1), 57-70.

Harde, H., Das, M. ve Jain, S., 2011, Solid lipid nanoparticles: an oral bioavailability enhancer vehicle, *Expert Opin Drug Deliv*, 8 (11), 1407-1424.

Heidenreich, A., Aus, G., Bolla, M., Joniau, S., Matveev, V. B., Schmid, H. P., Zattoni, F. ve European Association of, U., 2008, EAU guidelines on prostate cancer, *Eur Urol*, 53 (1), 68-80.

Heller, A. D., Baik, S., Eurell, T. E. ve Strano, M. S., 2005, Single-Walled Carbon Nanotube Spectroscopy in Live Cells: Towards Long-Term Labels and Optical Sensors, *Advanced Materials*, 17, 2793–2799.

Heng, H. H. Q., Stevens, J. B., Bremer, S. W., Ye, K. J., Liu, G. ve Ye, C. J., 2010, The Evolutionary Mechanism of Cancer, *Journal of Cellular Biochemistry*, 109 (6), 1072-1084.

Hindumathi, R., Jagannatham, M., Prathap, H. ve Chandra, P. S., 2018, Novel nano-cocoon like structures of polyethylene glycol–multiwalled carbon nanotubes for biomedical applications, *Nano-Structures & Nano-Objects*, 13, 30-35.

Hostetler, M. J., Wingate, J. E., Zhong, C.-J., Harris, J. E., Vachet, R. W., Clark, M. R., Londono, J. D., Green, S. J., Stokes, J. J., Wignall, G. D., Glish, G. L., Porter, M. D., Evans, N. D. ve Murray, R. W., 1998a, Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size, *Langmuir*, 14 (1), 17-30.

Hostetler, M. J., Wingate, J. E., Zhong, C.-J., Harris, J. E., Vachet, R. W., Clark, M. R., Londono, J. D., Green, S. J., Stokes, J. J., Wignall, G. D., Glish, G. L., Porter, M. D., Evans, N. D. ve Murray, R. W., 1998b, Alkanethiolate Gold Cluster Molecules

with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size, *Langmuir*, 14 (1), 17-30.

Hsieh, D. S., Wang, H., Tan, S. W., Huang, Y. H., Tsai, C. Y., Yeh, M. K. ve Wu, C. J., 2011, The treatment of bladder cancer in a mouse model by epigallocatechin-3-gallate-gold nanoparticles, *Biomaterials*, 32 (30), 7633-7640.

Hu, X., Wang, Y. ve Peng, B., 2014, Chitosan-capped mesoporous silica nanoparticles as pH-responsive nanocarriers for controlled drug release, *Chem Asian J*, 9 (1), 319-327.

Huang, X., Wu, W., Yang, W., Qing, X. ve Shao, Z., 2020, Surface engineering of nanoparticles with ligands for targeted delivery to osteosarcoma, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 190, 110891.

Huggins, C. ve Hodges, C. V., 1972, Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate, *CA Cancer J Clin*, 22 (4), 232-240.

Ilhan-Ayisigi, E. ve Yesil-Celiktas, O., 2018, Silica-based organic-inorganic hybrid nanoparticles and nanoconjugates for improved anticancer drug delivery, *Engineering in Life Sciences*, 18 (12), 882-892.

Institute, N. C., 2020, Prostate Cancer- Patient Version [online], USA, https://www.cancer.gov/types/prostate [Ziyaret Tarihi: 4 Ocak 2020].

Karabulut, B., Kerimoğlu, O. ve Uğurlu, T., 2015, Dendrimerler- İlaç Taşıyıcı Sistemler, *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences*, 5, 31-40.

Karakurt, S., 2016, Modulatory effects of rutin on the expression of cytochrome P450s and antioxidant enzymes in human hepatoma cells, *Acta Pharmaceutica*, 66 (4), 491-502.

Karakurt, S. ve Adali, O., 2016, Tannic Acid Inhibits Proliferation, Migration, Invasion of Prostate Cancer and Modulates Drug Metabolizing and Antioxidant Enzymes, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16 (6), 781-789.

Karimi, M., Mirshekari, H., Aliakbari, M., Sahandi-Zangabad, P. ve Hamblin, M. R., 2016, Smart mesoporous silica nanoparticles for controlled-release drug delivery, *Nanotechnology Reviews*, 5 (2), 195-207.

Khan, H. A., Sakharkar, M. K., Nayak, A., Kishore, U. ve Khan, A., 2018, Nanoparticles for biomedical applications: An overview, *Nanobiomaterials: Nanostructured Materials for Biomedical Applications*, 357-384.

Kickelbick, G., 2003, Concepts for the incorporation of inorganic building blocks into organic polymers on a nanoscale, *Progress in Polymer Science*, 28 (1), 83-114.

Konaç, E. ve Sözen, S., 2014, Prostat Kanserinin Tanı ve Tedavisinde Moleküler Biyolojinin Kullanım Alanları, *Üroonkoloji Bülteni*, 13, 228-235.

Kumar, R., Chauhan, A., Jha, S. K. ve Kuanr, B. K., 2019, Encapsulated lanthanum strontium manganese oxide in mesoporous silica shell: Potential for cancer treatment by hyperthermia therapy, *Journal of Alloys and Compounds*, 790, 433-446.

Küçükyıldırım, B. O. ve Eker, A. A., 2012, KARBON NANOTÜPLER, SENTEZLEME YÖNTEMLERİ VE KULLANIM ALANLARI, *Mühendis ve Makina*, 53, 34-44.

Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (5259), 680-685.

Lee, C. H., Akin-Olugbade, O. ve Kirschenbaum, A., 2011, Overview of prostate anatomy, histology, and pathology, *Endocrinol Metab Clin North Am*, 40 (3), 565-575, viii-ix.

Liberman, A., Mendez, N., Trogler, W. C. ve Kummel, A. C., 2014, Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine, *Surface Science Reports*, 69 (2-3), 132-158.

Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25 (4), 402-408.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. ve Darnell, J., 2000, Molecular Cell Biology, 4th edition, *New York: W. H. Freeman*.

Maiti, A. ve Bhattacharyya, S., 2013, Review: Quantum Dots and Application in Medical Science *International Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 3, 37-42.

Malkoç, A., 2011, Polimer Modifiyeli Silika Nanopartiküllerin Enzim İmmobilizasyonunda Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 62-63.

McNamara, K. ve Tofail, S. A. M., 2017, Nanoparticles in biomedical applications, *Advances in Physics-X*, 2 (1), 54-88.

Mehnert, W. ve Mader, K., 2001, Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Adv Drug Deliv Rev*, 47 (2-3), 165-196.

Moghimi, S. M., Hunter, A. C. ve Murray, J. C., 2005, Nanomedicine: current status and future prospects, *FASEB J*, 19 (3), 311-330.

Özada, Ç., 2016, Nükleer Görüntüleme Sistemlerinde Kuantum Noktaların Kullanılması *JOURNAL OF ENGINEER BRAINS*, 1, 6-11.

Poller, J. M., Zaloga, J., Schreiber, E., Unterweger, H., Janko, C., Radon, P., Eberbeck, D., Trahms, L., Alexiou, C. ve Friedrich, R. P., 2017, Selection of potential iron oxide nanoparticles for breast cancer treatment based on in vitro cytotoxicity and cellular uptake, *Int J Nanomedicine*, 12, 3207-3220.

Portillo, L. M., Guzmán, J., Rojas, C., Becerra, A., Avila, J., Jaimes, D., Ospino, B., Gomez, C. ve Madero, J. I., 2010, Viability and functional capacity after thawing of hematopoietic progenitor cells cryopreserved at a cord blood stem cell bank in Colombia, *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 109, 151–154.

Rahman, I. A., Vejayakumaran, P., Sipaut, C. S., Ismail, J., Abu Bakar, M., Adnan, R. ve Chee, C. K., 2007, An optimized sol-gel synthesis of stable primary equivalent silica particles, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 294 (1-3), 102-110.

Rahman, I. A., Vejayakumaran, P., Sipaut, C. S., Ismail, J. ve Chee, C. K., 2009, Size-dependent physicochemical and optical properties of silica nanoparticles, *Materials Chemistry and Physics*, 114 (1), 328-332.

Rahman, I. A. ve Padavettan, V., 2012, Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites *Journal of Nanomaterials*.

Rao, K. S., El-Hami, K., Kodaki, T., Matsushige, K. ve Makino, K., 2005, A novel method for synthesis of silica nanoparticles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 289 (1), 125-131.

Rio, D. C., Ares, M., Jr., Hannon, G. J. ve Nilsen, T. W., 2010, Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent), *Cold Spring Harb Protoc*, 2010 (6), pdb prot5439.

Saini, R., Lee, N. V., Liu, K. Y. ve Poh, C. F., 2016, Prospects in the Application of Photodynamic Therapy in Oral Cancer and Premalignant Lesions, *Cancers (Basel)*, 8 (9).

Sakajiri, S., Kawamata, N., Egashira, M., Mori, K. ve Oshimi, K., 2001, Molecular analysis of tumor suppressor genes, Rb, p53, p16INK4A, p15INK4B and p14ARF in natural killer cell neoplasms, *Jpn J Cancer Res*, 92 (10), 1048-1056.

Sato, H., Hirai, T. ve Komasawa, I., 1995, Mechanism of formation of composite CdS-ZnS ultrafine particles, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 34 (7), 2493-2498.

Schulz, W. A. ve Hoffmann, M. J., 2009, Epigenetic mechanisms in the biology of prostate cancer, *Semin Cancer Biol*, 19 (3), 172-180.

Shindo, Y., Inose, T., Kubota, Y., Oikawa, T., Tokunaga, M., Kamei, T., Gonda, K. ve Kobayashi, Y., 2018, Synthesis on aggregation of colloidal solutions of ICG-active silica nanoparticles and their application in in-vivo fluorescence imaging, *Materials Chemistry and Physics*, 220, 201-207.

Siegel, R. L., Miller, K. D. ve Jemal, A., 2019, Cancer statistics, 2019, *CA Cancer J Clin*, 69 (1), 7-34.

Singh, S. K., Lillard, J. W., Jr. ve Singh, R., 2018, Reversal of drug resistance by planetary ball milled (PBM) nanoparticle loaded with resveratrol and docetaxel in prostate cancer, *Cancer Lett*, 427, 49-62.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. ve Klenk, D. C., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem*, 150 (1), 76-85.

Stöber W, F. A., Bohn E 1968, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *J Colloid Interface Sci*, 26, 62–69.

Surendiran, A., Sandhiya, S., Pradhan, S. C. ve Adithan, C., 2009, Novel applications of nanotechnology in medicine, *Indian J Med Res*, 130 (6), 689-701.

Tadanaga, K., Morita, K., Mori, K. ve Tatsumisago, M., 2013, Synthesis of monodispersed silica nanoparticles with high concentration by the Stober process, *Journal of sol-gel science and technology*, 68 (2), 341-345.

Tan, T. T. Y., Liu, S., Zhang, Y., Han, M. Y. ve Selvan, S. T., 2011, Microemulsion preparative method (Overview), *Comprehensive Nanoscience and Technology*, 5, 399–441.

Tian, Z., Xu, Y. ve Zhu, Y., 2017, Aldehyde-functionalized dendritic mesoporous silica nanoparticles as potential nanocarriers for pH-responsive protein drug delivery, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 71, 452-459.

Today, C., 2020a, Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, both sexes, all ages, https://gco.iarc.fr/today/home [Ziyaret Tarihi: 12 Aralık 2019].

Today, C., 2020b, https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=1&cancer=27&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=1

7&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D, [Ziyaret Tarihi: 4.4.2020].

Tsai, T. H., Thiagarajan, S. ve Chen, S. M., 2010, Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Ionic Liquid and Application for the Detection of Dissolved Oxygen, *Electroanalysis*, 22 (6), 680-687.

Urology, E. A. o., 2018, Patient İnformation, Prostate Cancer, https://patients.uroweb.org/cancers/prostate-cancer/#Stages_of_the_disease) [Ziyaret Tarihi: 4 Ocak 2020].

Vansant, E. F., Van Der Voort, P. ve Vrancken, K. C., 1995, Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface, *Elsevier Science*, 93.

Vural, G. U. ve Özer, A. Y., 2015, Nükleer Tıpta İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Teranostik Kullanımları, *Nükleer Tıp Seminerleri*, 1 (2), 109-119.

Wang, X., Yang, L., Chen, Z. G. ve Shin, D. M., 2008, Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging, *CA Cancer J Clin*, 58 (2), 97-110.

Wang, X. D., Shen, Z. X., Sang, T., Cheng, X. B., Li, M. F., Chen, L. Y. ve Wang, Z. S., 2010, Preparation of spherical silica particles by Stober process with high concentration of tetra-ethyl-orthosilicate, *J Colloid Interface Sci*, 341 (1), 23-29.

Wilson, A. H., 2014, The prostate gland: a review of its anatomy, pathology, and treatment, *JAMA*, 312 (5), 562.

Witsch, E., Sela, M. ve Yarden, Y., 2010, Roles for growth factors in cancer progression, *Physiology (Bethesda)*, 25 (2), 85-101.

Yen Yua, Y. ve Chang Chen, W., 2003, Transparent organic–inorganic hybrid thin films prepared from acrylic polymer and aqueous monodispersed colloidal silica, *Materials Chemistry and Physics*, 82 (2), 388-395.

Yokuş, B. ve Çakır, D. Ü., 2012, Kanser Biyokimyası *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1 (2), 7-18.

Zhang, K., Liu, X., Samuel Ravi, S. O. A., Ramachandran, A., Aziz Ibrahim, I. A., A, M. N. ve Yao, J., 2019, Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) from leaf extract of Salvia miltiorrhiza and its anticancer potential in human prostate cancer LNCaP cell lines, *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 47 (1), 2846-2854.

Zhang, Y., Wang, J., Bai, X., Jiang, T., Zhang, Q. ve Wang, S., 2012, Mesoporous silica nanoparticles for increasing the oral bioavailability and permeation of poorly water soluble drugs, *Mol Pharm*, 9 (3), 505-513.



İREM MUKADDES DURMUŞ

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSİ

iremdurmuss73@gmail.com

EĞİTİM

YÜKSEK LİSANS

- **Üniversite:** Selçuk Üniversitesi, TÜRKİYE
- **Enstitü:** Fen Bilimleri Enstitüsü
- **Bölüm:** Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler
- **Tez Başlığı:** Silika Nanopartiküllerin Sentezi, Fonksiyonlandırılması ve İnsan Prostat Kanseri Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi
- **Mezuniyet Yılı**:-

LİSANS

- **Üniversite:** Afyon Kocatepe Üniversitesi, TÜRKİYE
- **Fakülte:** Mühendislik Fakültesi
- **Bölüm:** Biyomedikal Mühendisliği
- **Tez Başlığı:** Koşu ve Yürüme Analizi İçin Ölçüm Cihazının Gerçekleştirilmesi
- **Mezuniyet Yılı**: 2018

DENEYİM

- Temmuz 2018- Ekim 2018 : Medikal 2000 Tıbbi Cihazlar A.Ş. (**Satış Destek Personeli & Kalite Kontrol Sorumlusu**)
- Temmuz 2017- Ağustos 2017 : İnterlife Medikal Sistemler (**Stajyer Mühendis**)
- Haziran 2016- Temmuz 2016 : Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi (**Stajyer Mühendis**)

PROJELER

	Proje Türü	Görev	Başlık	Yıl
1	Selçuk-BAP	Araştırmacı	7,8-Dihidroksiflavonun İnsan Karaciğer Kanser Hücrelerindeki Etkilerinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi	2019
2	Selçuk-BAP	Araştırmacı	Silika Nanopartiküllerin Sentezi, Fonksiyonlandırılması ve İnsan Prostat Kanseri Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi	2019
3	Selçuk-BAP	Araştırmacı	Kaempferolün İnsan Prostat Kanseri Hücreleri Üzerine Etkilerinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi	2019
4	Selçuk-BAP	Araştırmacı	İnsan Prostat Kanseri Hücrelerinde Şalter Genlerin Regülasyonunun Terapötik Etkilerinin İncelenmesi	2019

POSTER VE SÖZLÜ SUNUMLAR

		Tür	Yıl
1	**DURMUŞ İ.M,** Deveci İ., Karakurt S. Synthesis and Modification of Silica Nanoparticles and Investigation of Their Cytotoxic Properties on Human Cancer Cells, **3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasianbiochem 2020), Ankara, Türkiye.**	Sözlü Bildiri	2020
2	**DURMUŞ İ.M,** Deveci İ., Karakurt S. Cytotoxic and Antimetastatic Effects of Chlorine Decorated Silica Nanoparticles on Prostate Cancer Cells, **3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasianbiochem 2020), Ankara, Türkiye.**	Poster Bildirisi	2020
3	Ertürk S., **DURMUŞ İ.M**., Batur H.G., Çınar S., Karakurt S. Tannic Acid Upregulates mRNA Expression of TNF Receptor Associated Factor in Prostate Cancer, **3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasianbiochem 2020), Ankara, Türkiye.**	Poster Bildirisi	2020
4	Çınar S., Ertürk S., Batur H.G., **DURMUŞ İ.M**., Karakurt S. Expression of Tumour Necrosis Factor was Upregulated by Tannic Acid in Prostate Cancer Cells, **3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasianbiochem 2020), Ankara, Türkiye.**	Poster Bildirisi	2020
5	Batur H.G., **DURMUŞ İ.M**., Ertürk S., Çınar S., Karakurt S. Kaempferol Upregulates mRNA and Protein Expression of p53 and Bax in Prostate Cancer, **3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasianbiochem 2020), Ankara, Türkiye.**	Poster Bildirisi	2020
6	**DURMUŞ İ.M,** Deveci İ., Karakurt S. From Glass to Drug: Silica Nanoparticles Against Prostate Cancer Proliferation, **2. Uluslarası**	Poster Bildirisi	2019

	Katılımlı Avrasya Biyokimyasal Yaklaşımlar & Teknolojiler (2. Ebat) Kongresi, Antalya, Türkiye.		
7	**DURMUŞ İ.M,** Deveci İ., Karakurt S. Investigation of Cytotoxic Effects of Silica Nanoparticles and Thiol Group Functionalized Silica Nanoparticles on Human Prostate Cancer Cells, **2. Uluslarası Katılımlı Avrasya Biyokimyasal Yaklaşımlar & Teknolojiler (2. Ebat) Kongresi, Antalya, Türkiye.**	Sözlü Bildiri	2019
8	Batur H.G., **DURMUŞ İ.M**., Karakurt S. Cytotoxic and Apoptotic Properties of Kaempferol on Human Prostate Cancer Cells, **2. Uluslarası Katılımlı Avrasya Biyokimyasal Yaklaşımlar & Teknolojiler (2. Ebat) Kongresi, Antalya, Türkiye.**	Poster Bildirisi	2019
9	Batur H.G., **DURMUŞ İ.M.**, Akalın H.Ş., Karakurt S. Cytotoxic Effects of Kaempferol in Colon Cancer Cells, **2.Uluslarası Katılımlı Avrasya Biyokimyasal Yaklaşımlar & Teknolojiler (2. Ebat) Kongresi, Antalya, Türkiye.**	Poster Bildirisi	2019
10	**DURMUŞ İ.M.**, Akalın H.Ş., Karakurt S. Vanadyum-5,7 Dihidroksiflavon Kompleksinin Osteosarkom Üzerine Etkileri**, Yaşamın Anahtarı: Periyodik Tablo Kongresi, Konya, Türkiye.**	Poster Bildirisi	2019
11	**DURMUŞ İ.M.**, Batur H.G., Karakurt S. Kuarsetinin Meme Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik Potansiyelleri, **1.Uluslararası ve 24. Ulusal Multidisipliner Klinik Toksikoloji Kongresi, Konya, Türkiye.**	Poster Bildirisi	2019

ÖDÜLLER

	Başlık	**Yıl**
1	Yaşamın Anahtarı: Periyodik Tablo Kongresi Poster Ödülü	2019
2	2. Uluslarası Katılımlı Avrasya Biyokimyasal Yaklaşımlar & Teknolojiler (2. Ebat) Kongresi Poster Ödülü	2019