



T. C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***LAUROCERASUS OFFCINALIS*'DEN SENTEZLENEN
FLORESANS ÖZELLİKLİ AZOT KATKILI KARBON
NOKTALARININ ANTIOKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL VE
SİTOTOKSİK ETKİLERİ İLE İN VİVO KONFOKAL
MİKROSKOPLA İNCELENMESİ**

DAMLA ERGİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ORDU 2024

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

DAMLA ERGİN

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

LAUROCERASUS OFFICINALIS'DEN SENTEZLENEN FLORESANS ÖZELLİKLİ AZOT KATKILI KARBON NOKTALARININ ANTİOKSİDAN, ANTİMİKROBİYAL VE SİTOTOKSİK ETKİLERİ İLE İN VİVO KONFOKAL MİKROSKOPLA İNCELENMESİ

DAMLA ERGİN

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ, 77 SAYFA

(TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Yeşim ÖZKAN DAĞLIOĞLU)

Karbon noktalar iyi biyoyoumluluk, toksik olmama, yüksek mekanik/termal özellikler ve nispeten işlevselleştirme kolaylığı gibi ayrıcalıklı özelliklere sahiptir. Biyolojik materyallerden kolay ve tek basamaklı sentezleri, toksik kimyasallara ve yoğun enerji gerektiren geleneksel yaklaşımlara göre giderek daha fazla ilgi görmektedir. Amacımız, hücre görüntüleme kullanmak üzere düşük toksisite ve yüksek antioksidan ve antimikrobiyal etkiye sahip N katkılı karbon noktalarının *Laurocerasus officinalis* yaprak özütünden hidrotermal yöntemle sentezlenmesidir. Yine, sentezlenen bu karbon noktalarının akciğer kanser hücrelerinde (A549), sitotoksitesisi ve konfokal mikroskop ile görüntülenmesi amaçlanmıştır. Karbon noktalarının A549 hücrelerindeki sitotoksitesisi WST-8 analizi ile ölçüldü. Antioksidan aktivitesi DPPH ile antimikrobiyal aktivitesi ise disk difüzyon yöntemi ile belirlendi.

Analizler sonucunda, sentez karbon noktaları A549 hücrelerinde sitotoksitesisini (antikanserojen aktivitesi) sadece yüksek konsantrasyonlarda (250-500 ug/mL) gösterdiği, düşük konsantrasyonlarda ise hücre canlılığını artırdığı kaydedilmiştir. Yine, karbon noktaları antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri ile yüksek konsantrasyonlarda (200 ug/mL ve üstü) antioksidan aktiviteleri göstermiştir.

Ayrıca, karbon noktalarının DAPI boyaması ile hücre çekirdeğine girdiği kanıtlanmıştır. Bu çalışmalar sonucu sentezlediğimiz karbon noktalarının antikanser, antimikrobiyal ve antioksidan özelliğe sahip olması ve hücre çekirdeğine ulaşması onları özellikle kanser hücrelerini görüntüleme ve kanser tedavisinde kullanma potansiyeli sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal, Karbon Dot, *Laurocerasus Officinalis*, Sitotoksitesite, Yeşil Sentez.

ABSTRACT

ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC EFFECTS WITH IN VIVO CONFOCAL MICROSCOPY INVESTIGATION OF FLUORESCENT FEATURED AZOT DOPED CARBON DOTS SYNTHESIZED FROM *LAUROCERASUS OFFICINALIS*

DAMLA ERGİN

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED
SCIENCES

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

MASTER THESIS, 77 PAGES

(SUPERVISOR: Assoc. Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN DAĞLIOĞLU)

Carbon dots have distinctive properties such as good biocompatibility, non-toxicity, high mechanical/thermal properties and relative ease of functionalization. Their easy, one-step synthesis from biological materials is attracting increasing attention compared to toxic chemicals and energy-intensive traditional approaches. Our aim is to synthesize N-doped carbon dots with low toxicity and high antioxidant and antimicrobial effects from *L. officinalis* leaf extract by hydrothermal method for use in cell imaging. Again, it is aimed to evaluate the cytotoxicity of these synthesized carbon dots in lung cancer cells (A549) and to visualize them with a confocal microscope. The cytotoxicity of carbon dots in A549 cells was measured by WST-8 analysis. Antioxidant activity was determined by DPPH and antimicrobial activity was determined by disk diffusion method.

As a result of the analyses, it was noted that synthesis carbon dots showed cytotoxicity (anticarcinogenic activity) in A549 cells only at high concentrations (250-500 ug/mL), while they increased cell viability at low concentrations. Again, carbon dots showed antibacterial and antifungal activities and antioxidant activities at high concentrations (200 ug/mL and above).

Additionally, carbon dots have been proven to enter the cell nucleus by DAPI staining. The fact that the carbon dots we synthesized as a result of these studies have strong anticancer, antimicrobial and antioxidant properties and reach the cell nucleus has provided them with the potential to be used especially in imaging cancer cells and in cancer treatment.

Keywords: Antimicrobial, Carbon Dot, Cytotoxicity, Green Synthesis, *Laurocerasus Officinalis*.

TEŞEKKÜR

Tez konunun belirlenmesi, çalıőmanın yűrűtűlmesi desteklenmesi, teővik edilmesi, rehberlięi ve uzmanlıęı ile akademik kariyerimdeki bu önemli dnűm noktasını baőarıyla tamamlamama yardımcı olan ve tezimin yazımı esnasında sűreci gerçekleőtirmem için akademik olarak yn gösteren baőtta danıőman hocam Sayın Doç. Dr. Yeőim ÖZKAN DAęLIOęLU'na, yűksek lisans eęitimim boyunca beni destekleyen tez çalıőmalarım ve araőtırmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen aileme sonsuz teőekkűrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİL LİSTESİ	VII
ÇİZELGE LİSTESİ	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ	1
1.1 Karbon Noktalarının (CD'lerin) Genel Özellikleri.....	7
1.2 CD'lerin Kullanım Alanları.....	9
1.3 CD'lerin Sentez Yöntemleri.....	11
1.4 CD'lerin Sitotoksitesi.....	15
1.4.1 Suda Çözünür Tetrazolyum Testi (WST).....	15
1.5 Floresan Görüntüleme.....	16
1.5.1 Konfokal Mikroskopi (CLSM).....	17
1.6 <i>Laurocerasus officinalis</i> Bitkisi.....	18
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	21
2.1 CD'lerin Biyolojik Materyallerden Sentezlenmesi ile Yapılan Çalışmalar.....	21
2.2 CD'lerin Sitotoksite Çalışmaları.....	22
2.3 CD'lerin Antimikrobiyal Çalışmaları.....	24
2.4 <i>Laurocerasus Officinalis</i> ile Yapılan Çalışmalar.....	24
2.5 Tezin Amacı.....	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM	27
3.1 Kullanılan Cihaz, Malzeme ve Kimyasal Maddeler.....	27
3.1.1 Kullanılan Cihazlar.....	27
3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	28
3.2 Bitki Materyali.....	28
3.2.1 <i>Laurocerasus Officinalis</i> Yapraklarından Özüt Eldesi.....	29
3.3. Azot Katkılı Karbon Noktalarının (N-CD) Sentezi.....	29
3.3.1 N-CD'lerin Karakterizasyonu.....	30
3.3.1.1 Ultraviyole-Görünür Spektroskopi (UV-VIS) Analizi.....	30
3.3.1.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) Analizi.....	30
3.3.1.3 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi.....	31
3.4 LO özütü ve LO/N-CD'lerin Antimikrobiyal Aktivite Tayini.....	31
3.4.1 Disk Difüzyon Yöntemi.....	32
3.4.2 DPPH Radikalı Giderme Aktivitesi Tayini.....	32
3.5 A549 Hücrelerinde LO/N-CD'lerin Sitotoksite Testi.....	33
3.5.1 Hücrelerin Ekimi ve Çoğaltılması.....	34
3.5.2 Hücrelerin Kaldırılması.....	35
3.5.3 Hücrelerin Sayılması.....	35
3.5.4 Hücrelerin Dağıtılması.....	35
3.5.5 LO/N-CD'lerin Hazırlanması.....	36
3.5.6 Ekstraksiyon ile Sitotoksite Çalışmasının Başlatılması.....	36
3.5.7 Hücre Canlılığı Analizi (WST-8) Uygulanması.....	36

3.5.8 Hücre Canlılığı Analizi (WST-8) Analizi	37
3.6 A549 Hücrelerinde LO/N-CD'lerin Alımı	37
3.6.1 Konfokal Analizi İçin Hücrelerin Lamele Alınışı	37
3.6.2 Konfokal İnceleme İçin Boyama Protokolü Ve Görüntüleme	37
3.7 İstatistiksel Analizler	38
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	39
4.1 LO/N-CD'lerin Karakterizasyon	39
4.1.1 LO/N-CD'lerin Morfolojisi	39
4.1.2 LO/N-CD'lerin Optik Özellikleri	40
4.1.3 FTIR Spektroskopisi	41
4.2 LO/N-CD'ler ile Yapılan Biyolojik Çalışmalar	42
4.2.1 LO Özütü ve LO/N-CD'lerin Antimikrobiyal Aktivite Tespiti	42
4.2.1.1 Disk Difüzyon	42
4.2.1.2 LO Özütü ve LO/N-CD'lerin Antioksidan Aktivite Analizi	43
4.2.2 LO/N-CD'lerin Sitotoksikite Tespiti	44
4.2.3 Konfokal Mikroskopî Yöntemi ile LO/N-CD'lerin A549 Hücre İçindeki Yerlerinin Belirlenmesi	46
4.3 Tartışma	49
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	62
6. KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 3.1 <i>L. Officinalis</i> Yaprığı A) Kuru B) Özüt	29
Şekil 3.2 Besiyerlerinin Hazırlanması	32
Şekil 3.3 Kültürdeki A549 Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri	34
Şekil 3.4 Etüv Görüntüsü.....	34
Şekil 3.5 Konfokal Mikroskop.....	38
Şekil 4.1 Hidrotermal Yöntemle Sentezlenen LO/N-CD'lerin TEM Görüntüleri.....	39
Şekil 4.2 Hidrotermal Yöntemle Sentezlenen LO/N-CD'lerin UV-Vis Görünür Spektrumu	40
Şekil 4.3 <i>L. Officinalis</i> Yaprak Özütü ve Bundan Sentezlenen N-CD'lerin FTIR Spektrumu	42
Şekil 4.4 LO/N-CD, LO Özütü ve H ₂ O'nun Antimikrobiyal Aktiviteleri.....	43
Şekil 4.5 <i>Laurocerasus Officinalis</i> Özütü Ve LO/N-CD'lerin DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Değerleri	44
Şekil 4.6 LO/N-CD'lerin A549 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkileri.....	45
Şekil 4.7 LO/N-CD Uygulanmış Kuyucukların WST-8 Uygulaması Sonrası Görünümü.....	46
Şekil 4.8 A549 Hücrelerinin LO/N-CD ile Muamelesi Sonrasındaki Floresans Mikroskop Görüntüsü	47
Şekil 4.9 461 nm lazer kullanılarak 48 saat boyunca 143,8917 µg/mL ile inkübe edilen A549 canlı hücrelerinin eş odaklı görüntüleri.....	48

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Kullanılan Cihazların Adı ve Marka/Model Listesi	27
Çizelge 3.2 Kullanılan Kimyasalların Adı ve Üretici Bilgileri.....	28
Çizelge 4.1 Mikroorganizmaların İnhibisyon Zon Çapları.....	43
Çizelge 4.2 LO/N-CD'lerin 24 Saatlik Çalışma Sonrası Absorbans Değerleri (ABS), Ortalama Yüzde Canlılıkları (ORT) ve Canlılık Değerlerinin Yüzde Standart Sapması	45

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

A549	:	Adenokarsinom Epitel Hücre Dizisi
ALT	:	Alanin Amino Transferaz
ANOVA	:	Varyans Analizi
AST	:	Aspartat Amino Transferaz
BHT	:	Bütillenmiş hidroksitolüen
BT (CT)	:	Bilgisayarlı Tomografi
BUN	:	Kan Hücre Nitrojeni
CD	:	Karbon Dot
CLSM	:	Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu
CQD	:	Karbon Kuantum Dot
Cr	:	Kreatin
DAPI	:	4',6-Diamidino-2- Phenylindole, Dihydrochloride
DCFH-DA	:	2', 7' Diklorohidroflorescein Diasetat
DPPH	:	1, 1-difenil-2,2-pikrilhidrazil
FBS	:	Fetal Bovin Serum
FTIR	:	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
HepG2	:	Karaciğer Hücre Hattı
HT-29	:	Kolon Kanseri Hücre Hattı
LC50	:	Medyan Ölümcül Konsantrasyon
LC-MS/MS	:	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
LDH	:	Laktat Dehidrojenaz
LO	:	<i>Laurocerasus Officinalis</i>
LO/N-CD	:	<i>L. Officinalis</i> ' den Sentezlenen N Katkılı Cd
MCF-29, MDA-MB231	:	Meme Kanseri Hücre Hattı
MRI	:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTS	:	(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Il)-5-(3-Karboksimetoksifenil)-2-(4-Sülfifenil)-2H-Tetrazolyum)
MTT	:	[3-(4,5-Dimetiltiazolil-2)-2,5 Difeniltetrazolyum Bromür]
NA	:	Nutrient Agar
N-CDs	:	Amin Dope Olmuş Karbon Dot
PET	:	Pozitron Emisyon Tomografisi
PBS	:	Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate-Buffered Saline)
PMS	:	Fenazin Metosülfatın
PMT	:	Fotoçoğaltıcı Tüp
TEM	:	Geçirimli Elektron Mikroskobu
UV-VİS	:	Ultraviyole Görünür Spektrofotometri
WST	:	2-(4-Iodofenil)-3-(4-Nitrofenil)-5-(2,4-Disülfifenil)-2H-Tetrazolyum /Suda Çözünür Tetrazolyum Tuzlar
WST-1	:	(2- (4-Iyodofenil) -3- (4-Nitrofenil) -5- (2,4-Disülfifenil) -2 H Tetrazolyum Monosodyum Tuzu)
WST-8	:	(2-(2-Metoksi-4-Nitrofenil)-3-(4-Nitrofenil)-5-(2,4-Disülfifenil) -2H-Tetrazolyum)

1. GİRİŞ

Günümüzde bilimin en heyecan verici ve hızla büyüyen alanı olan ulaşım, gıda, tıp, elektronik ve kozmetik gibi hayatın çeşitli alanlarında uygulamalar bulan nanoteknoloji yer almaktadır. Yeni ve benzersiz özelliklere sahip malzeme ve cihazlar üretmek için nesnelere nanometre ölçeğinde kontrolünü içeren bir teknikler grubu olarak tanımlanabilir (Malik, 2023).

Nanomalzemelerin olağandışı özellikleri, küçük boyutlarından kaynaklanmaktadır. Nanometrik ölçekteki malzemelerin daha yüksek yüzey/hacim oranı ve geniş spesifik yüzey alanı, bu özelliklerinin, makroskobik nesnelere olduğu gibi fazın derinliklerinde değil, öncelikle dış katmanlarında bulunan atomlar ve etkileşimler tarafından belirlendiğini gösterir. Bu durumda, kimyasal bağların sayısı azalır, böylece kovalent bağlar nanoyapının işleyişi üzerinde daha büyük bir etkiye sahip olur (Bhushan, 2017).

Yeni tip karbon bazlı nanomalzemelerin üretimi, özelliklerinin araştırılması ve daha sonra işlevselleştirilmesi nanoteknoloji ve malzeme mühendisliğinin ana görevleridir. Karbon nanopartikülleri (NP'ler) kompozit malzemelerde nano dolgu maddeleri olarak yaygın şekilde kullanılır (Krystyan ve ark., 2021; Krystyan ve ark., 2022; Khachatryan, 2023). Temel özellikleri arasında çok iyi elektriksel ve termal iletkenlik, elektrokimyasal ve termal stabilite ve mekanik dayanım yer alır (Wu ve ark., 2022). Son bilimsel raporlar aynı zamanda osteosit ve nöron gibi hücrelerle yüksek biyouyumluluklarının yanı sıra antimikrobiyal aktivitelerini de ortaya koyarak biyomedikal bilimde kullanımlarını önemli ölçüde artırmıştır (Abd ve ark., 2023; Ganguly ve Margel, 2023).

Geçtiğimiz birkaç yılda karbon kuantum noktaları (CQD'ler), yeni bir karbon nanomalzeme sınıfı olarak araştırmacılar arasında özel ilgi kazandı. Düşük toksisite, çok çeşitli fiziksel ve kimyasal sentez yöntemleri ve biyouyumluluk, CD'leri yarı iletken kuantum noktalarının yerine umut verici bir alternatif haline getirmektedir (Yang ve ark., 2019; Tan ve ark., 2023; Pourmadadi ve ark., 2023; Khoshnood ve ark., 2023).

CD'lerin bir başka avantajı, onları elde etmenin son derece basit ve çevre dostu bir yol olmasıdır. Büyük miktarlarda üretilen biyolojik atıklar da dahil olmak üzere

hemen hemen tüm organik malzemelerden sentezlenebilirler (Krystyan ve ark., 2022; Ponduru ve ark., 2023). Benzer şekilde, çeşitli bileşenlerin elde edilme yöntemleri ve oranları da nanokompozitin özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olacaktır. Bu nedenle, istenen özelliklere sahip bir malzeme bulmak için, yalnızca kompoziti oluşturan bireysel bileşenlerin karşılıklı etkisini test etmek değil, aynı zamanda uygun sentetik yolları seçmek de gereklidir (Ezati ve ark., 2022; Shi ve ark., 2022; Kang ve ark., 2023).

CD'ler, keşfedilmelerinden bu yana kimyasal ve mekanik özellikleri, benzersiz optik özellikleri, parlak floresansı, yüksek fotostabilitesi, iyi biyouyumluluğu gibi özellikleri nedeniyle ilgi çeken karbon bazlı nanomateryallerin en son üyeleridir. Kolaylığı ve uygun fiyatlı hazırlama maliyetleriyle birlikte bu özellikler, CD'leri biyolojik görüntüleme, biyoterapi ve gen/ilaç dağıtımını, kanser tanısı ve tedavisi için nanoterapide en umut verici nanomateryaller haline getirir (Nocito ve ark., 2021).

Kanser, hücre döngüsü kontrolünün kaybından kaynaklanan, kontrolsüz çoğalmaya, istilaya, metastaza ve hücrenin normal hücre kontrolünü sürdürmesini engelleyen diğer bazı biyolojik süreçlerin değişmesine yol açan bir grup hastalıktır (Krishnamurthi, 2007).

Hem dış unsurlar (örneğin tütün ve sigara kullanımı, radyasyon, kimyasallar ve bulaşıcı organizmalar gibi) hem de iç unsurlar (kalıtsal değişimler (mutasyonlar), hormonlar, bağışıklık sistemi durumu ve metabolizma kaynaklı mutasyonlar gibi) kansere yol açabilen ajanlar olarak kabul edilir (Das ve ark., 2020).

Kanser, dünya genelinde yüksek insidansı ve mortalitesi olan önemli sağlık sorunlarından biridir. 2017 yılında yaklaşık 9,6 milyon kişinin kanserden öldüğü tahmin edilmekte ve dünya genelinde her altı ölümden birinin kansere bağlı olduğu belirtilmektedir. Bu durum, kanserin kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünya genelinde ikinci önde gelen ölüm nedenlerinden biri olduğunu göstermektedir (Moraga, 2016). Son zamanlarda kanser tedavisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, akciğer, meme ve pankreas gibi agresif tümörler hala hastaların hayatta kalma oranlarını önemli ölçüde düşük tutmaktadır (Bray ve ark., 2018).

Akciğer kanseri gelişmiş ülkelerde kadın ve erkeklerde en sık görülen kanserdir. Aynı zamanda dünya genelinde de kanser ölümlerinin önde gelen

nedenlerindedir. Tüm kanser ölümlerinin %18,4'üne neden olur (Bray ve ark., 2018). Tanı anında hastaların yaklaşık %70'inde hastalık ileri düzeydedir ve akciğer kanseri hastalarının yalnızca %15'i tanıdan 5 yıl sonra hala hayattadır (Siegel ve ark., 2018).

Akciğer kanseri tanısı için çeşitli prosedürler vardır: Fizik muayene, tıbbi öykü ve röntgen, bilgisayarlı tomografi (BT), kemik taraması, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), pozitron emisyon tomografisi (PET) ve kombine PET-CT taramasıdır (Rivera ve ark., 2013). Tüm görüntüleme araçları arasında kombine PET-CT taraması, akciğer tümörlerinin boyutunu ve yerini saptamak, hastalığın doğru evrenmesine ve belirsiz akciğer nodüllerinin belirlenmesine olanak tanıyan standart prosedürdür (Hochegger ve ark., 2015).

Akciğer kanserlerinin erken tanısının yanı sıra bu kanserlerin optimal tedavisi için uygun tedavi stratejisine de ihtiyaç vardır. Akciğer kanserinin tedavisinde radyocerrahi, kemoterapi ve immünoterapi dahil olmak üzere çeşitli terapötik prosedürler yaygın olarak kullanılmaktadır. Akciğer kanseri için en uygun tedavinin seçimi hastanın fonksiyonel değerlendirmesine, evresine ve hastalığın histolojik tipine bağlıdır. Akciğer tümörlerinin çevre dokulara yayılması nedeniyle çıkarılamadığı veya ameliyata gerek olmadığı durumlarda; geleneksel olarak en iyi tedavi seçeneği radyasyon ve kemoterapinin kombinasyonu olmuştur (Kozower ve ark., 2013). Ancak hedefe yönelik tedavi ve immünoterapinin bu yöntemlere yakın zamanda entegre edilmesi, bu tümörlerdeki tedavi paradigmasını değiştirmiştir (Ko ve ark., 2018).

Son Türkiye kanser kayıt raporu Aralık 2021'de yayınlanmış olup 2017 yılı verilerine göre, akciğer kanseri erkeklerde %56,7 oranında en sık görülen kanser tipi olduğu, kadınlarda ise 4'üncü (%11,1) sırada yer aldığını kaydetmiştir (Cangır ve ark., 2022). ABD'de her yıl yaklaşık 1,5 milyon, İngiltere'de ise 300.000 kişiye kanser tanısı konuyor (Altekruse ve ark., 2010).

Kanser tedavisi ve tanısı dünyanın en büyük sorunu olmaya devam ediyor. Aslında doğru ve etkili tedavi için doğru tanı çok önemlidir. Çünkü tüm tümörlerin cerrahi, radyoterapi, kemoterapi gibi spesifik tedavilere ihtiyacı vardır. Ancak bugüne kadar onkologların temel sorunu, kanser tipinin doğru tanımlanmasının yanı sıra minimum toksisite ile maksimum terapötik etki sağlayan doğru farmakolojik dozun belirlenmesidir (Meric-Bernstam ve ark., 2015). Ayrıca, çeşitli kanser türleri için tek

bir tedavi yoktur ve her tedavinin, sıklıkla hastanın yaşam kalitesini etkileyen avantaj ve dezavantajları vardır (Block ve ark., 2015).

Kanserin mevcut tedavi yöntemleri arasında kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi ve cerrahi veya bunların kombinasyonu yer almaktadır. Ancak bu geleneksel tedavi yöntemleri sıklıkla ciddi yan etkilerle ilişkilidir (Krishnamoorthy ve Ashwini, 2011). Üstelik kemoterapiye maruz kalan hastalarda sıklıkla tedaviye bağlı ikinci malignitelere yakalanma riski ortaya çıkar (Kamran ve ark., 2016). Bu bağlamda, biyolojik materyallerden sentezlenen biyoyoumlu nanopartiküller (örneğin, CD'ler gibi) gibi nanoteknolojilere dayanan teşhis yaklaşımları ve kemoterapötik uygulama, kanser araştırmalarında yeni dönem için umut verici olabilir.

Antikanser aktiviteleri açısından değerlendirilen kimyasallar arasında tıbbi bitkilerden elde edilen doğal ürünler, sentetik ilaçlarla karşılaştırıldığında güvenlikleri, etkinlikleri ve daha az yan etkileri nedeniyle en umut verici olanı gibi görünüyor. (Diantini ve ark., 2012; Thillaivanan ve Samraj, 2014).

Tıbbi bitkilerden elde edilen terapötik ilaçların da çeşitli deneysel kanser modellerinde anti-kanser ajanları olarak önemli bir rol oynadığı ve halihazırda mevcut anti-kanser ilaçlarının yaklaşık %60'ının da bitkisel kaynaklardan türetildiği rapor edilmiştir (Kamal ve ark., 2014).

Terpenoidler, fenolik asitler, lignanlar, tanenler, flavonoidler, kinonlar, kumarinler ve alkaloidler gibi birçok doğal bileşiğin önemli antioksidan aktivitelerine sahip olduğu ve kanser tedavisinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Rajandeeep ve ark., 2011). Çeşitli bilimsel araştırmalar, bu antioksidan bileşiklerin aynı zamanda antiinflamatuvar, antitümör, antimutagenik ve antikarsinojenik aktiviteler dahil olmak üzere çok sayıda farmasötik uygulamaya sahip olduğunu bilindiğini ortaya çıkarmıştır (Kabir ve ark., 2013).

Bitkilerden elde edilen bileşiklerin, tümör oluşumunun çeşitli aşamalarını ve ilişkili inflamatuvar süreçleri inhibe etme potansiyeline dair artan sayıda çalışma, bitki ürünlerinin kanserin önlenmesi ve tedavisindeki önemini vurgulamaktadır. Antikanser aktiviteye sahip çeşitli bitki içerikleri, farmakolojik araştırmalardan klinik uygulamalara aktarılmıştır (Man ve ark., 2012; Liu ve ark., 2014).

Kanser tedavisine yönelik pek çok ilaç geliştirilmiş olmasına rağmen bu ilaçların tedavi edici etkileri ve güvenliği konusunda endişeler bulunmaktadır. Çeşitli kanser türlerinde standart tedavi olarak kullanılan kemoterapötik ilaçların en büyük sorunu toksisitedir (Livshits ve ark., 2014). Ancak bitkilerden elde edilen ürünlerin kanser tedavisinde etkili ve güvenli olduğu kanıtlanmıştır. Bu sebeple, kanser ilacı keşifleri, doğal bitkilerden elde edilen bitki kaynaklı ürünlere odaklanmaktadır (Demain ve Vaishnav, 2011). Bu ürünler, hücrel çoğalma, farklılaşma, apoptoz, anjiyogenez ve metastaz gibi çeşitli mekanizmaların modülasyonu yoluyla kanserin başlatılmasına, gelişmesine ve ilerlemesine müdahale ederek anti-kanser ajanları olarak görev yapar. Meyve ve sebzelerin antioksidan içeriği sayesinde, bu gıdaların mide kanseri riskini azaltmada koruyucu etkisi olduğu konusunda geniş bir fikir birliği vardır (Serafini ve ark., 2002; Metere ve Giacomelli, 2017).

Laurocerasus officinalis, Türkiye'de mide ülseri tedavisinde halk ilacı olarak kullanılıyor ve bu nedenle içeriği, onu farklı gastrointestinal problemler için potansiyel bir tedavi adayı haline getiriyor. Bu bitkinin farklı kısımları çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Yaprakları, badem aroması, antispazmodik, narkotik ve sakinleştirici kimyasal olarak kullanılmaktadır. Ayrıca meyveleri ve yaprakları parfümeri ve boya endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Akdeniz ve Gündoğdu, 2007). Ayrıca, iyi bir antioksidan özellik göstermektedir (Liyana-Pathirana ve ark., 2006).

Bitkiler kullanılarak nanometallerin biyosentezine yönelik güncel araştırmalar, nanopartiküllerin hızlı ve toksik olmayan yöntemlerle üretilmesi için yeni bir dönem başlatmıştır. Bitkiler tarafından üretilen metal nanopartiküller, diğer organizmalar tarafından üretilenlere göre daha karardır. Bitkiler (özellikle bitki özleri), metal iyonlarını diğer biyomalzemelerden (mantarlar veya bakteriler) daha hızlı indirgerler. Böylece, nanopartiküllerin biyosentezi için çevre dostu prosesler geliştirilmiş ve bitki veya bitki özleri kullanılarak nanopartikül sentezinin biyolojik yöntemleri çevre dostu alternatifler haline gelmiştir (Singhal ve ark., 2011).

Dünya sağlık örgütüne göre dünya nüfusunun %75'lik büyük bir kısmı hastalıkların tedavisinde bitkisel ve diğer klasik çözümlerden yararlanmaktadır (Yadav ve ark., 2009). Modern ilaç endüstrisinin hastalıklara karşı çeşitli ilaçları geliştirmesinden önce, birçok bitki hastalıkların tedavisinde birincil ilaçlar olarak

kullanılmaktaydı (Arıkan, 1992). Tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin sayısı, antik çağlardan günümüze kadar istikrarlı bir artış sergilemiştir bu da bitkisel tıbbın önemini vurgulamaktadır.

1979 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan bir araştırmaya göre, ticari olarak kullanılan ve farmakopilerde kayıtlı olan bitkisel ilaçların sayısı 1900'ü bulmuştur. Yine WHO'nun 91 ülkenin farmakopilerine ve tıbbi bitkileri üzerine yapılan araştırmalara dayanarak hazırladığı bir çalışmaya göre, tedavi amacı ile kullanılan toplam tıbbi bitki sayısı 20.000'e ulaşmaktadır (Baytop, 1999; Yıldırım, 2006).

19. yüzyılda, bitkilerle tedavi alanında önemli ilerlemeler ve gelişmeler kaydedilmiştir. Bu ilerlemeler, şifalı bitkilerin kültüre edilmesi, toplanması ve kurutulması gibi işlemlerin geliştirilmesini sağlamıştır (Öztürk, 2009). Bu süreçler, bitkilerin anatomik yapılarının belirlenmesinin gerekliliğinin önemini ortaya çıkartmıştır.

Günümüzde, sentetik ilaçlar insanların ve hayvanların tedavisinde kullanılmak üzere yaygın olarak üretilmekte olsa da, son 30-40 yıl içerisinde özellikle gelişmiş ve endüstrileşmiş ülkelerde, bitkisel (doğal) ilaçlara doğru belirgin bir yönelim gözlemlenmektedir (Ünal, 2006).

Hücrelerde meydana gelen kimyasal reaksiyonlar sonucunda serbest radikaller üretilir (Akkuş, 1995). Oksidatif reaksiyonlar ve serbest radikaller çeşitli mekanizmalar sonucunda oluşur. Bu oluşum, demir ve bakır iyonları gibi katalizörlerin varlığına bağlı olarak çeşitli mekanizmalar sonucunda meydana gelir (Nićiforović ve ark., 2010).

Serbest radikaller, kimyasal tepkimelere, DNA'nın zarar görmesine, proteinlerin oksidasyonuna, çeşitli kimyasal bileşiklerin çeşitli redoks reaksiyonlarına ve hücre içinde lipidlerin peroksidasyonuna sebep olmaktadır (Kil ve ark., 2009). Serbest radikallerin insan sağlığına olan olumsuz etkileri son zamanlarda daha fazla dikkat çekmeye başlamış, bu zararlı moleküllerin neden olduğu hasarların arteroskleroz, diyabet, kanser ve yaşlanma gibi çeşitli sağlık sorunlarının temelinde yattığı düşüncesi öne sürülmüştür (Akkuş, 1995).

Canlı organizmaların sahip olduğu antioksidatif koruma sistemi, serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunmada önemli bir rol oynar. Ancak, bazı durumlarda, bu koruma sisteminin yetersiz kaldığı ve serbest radikallerin vücutta birikmesine yol açtığı gözlemlenmiştir.

Antioksidanlar, vücuttaki zararlı serbest radikallerin zincir reaksiyonlarını keserek nötralize eden, böylece hayati bileşenlerimizi hasardan koruyan moleküllerdir. Bu moleküller, süperoksitler, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin neden olduğu zararı, onları temizleyerek veya azaltarak giderir ve böylece koruyucu işlevlerini yerine getirirler (Akkuş, 1995).

Saf bileşiklerin ve bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitesini ölçmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri DPPH yöntemidir (Scherer ve Godoy, 2009).

DPPH yöntemi antioksidan aktivite ölçümünde kullanılan spektrofotometrik yöntemdir (Sharma ve Bhat, 2009). DPPH reaktifinin en zayıf antioksidanlarda da dahil olmak üzere karışımdaki tüm maddelerle etkileşebilmesi ve hem lipofilik, hem de hidrofilik antioksidanlarla reaksiyona girebilmesi bu yöntemi avatajlı kılar (Kedare ve Singh, 2011).

DPPH 'nin absorbansı, ışık, hava oksijeni, rutubet ve pH'ya fazlaca duyarlı olduğundan tekrarlanabilir sonuçların eldesi güçtür (Sharma ve Bhat, 2009). Reaksiyon koşullarındaki bu farklılıkların bir sonucu olarak, askorbik asit ve bütillenmiş hidroksitolüen (BHT) gibi standart antioksidanlar için IC50 değerleri çok değişmektedir.

DPPH'in organik çözücülerle çözünüp sulu sistemlerde çözülmemesi yöntemin dezavantajıdır.

1.1 Karbon Noktalarının (CD'lerin) Genel Özellikleri

Karbon, birçok değişik fiziksel hallerde bulunma özelliğine sahip bir elementtir. Her biri farklı fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerle karakterize edilir. Bu terim, boyutları 10 nm'nin altında olan çeşitli floresans özellikli karbon nanomalzemelerini tanımlamak için kullanılır (Kwon ve ark., 2014).

CD'lerin tüm formlarında ortak olan özellikler, düşük toksisite, iyi tanımlanmış mekanik özellikler, kolay yüzey işlevselleştirmesi, yüksek sıcaklıklarda stabilite, mükemmel elektriksel iletkenlik gibi özelliklerinin yanı sıra antimikrobiyal ve antioksidan aktivitedir (Yan ve ark., 2019; Liu ve ark., 2019). Bununla birlikte, karbon noktalarının çoğu uygulaması, ışık yayma ve absorbe etme özellikleriyle ilişkilidir.

Floresansın kesin mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. CD'nin türüne bağlı olarak kuantum hapsinden, çok sayıda yüzey kusurunun varlığından, yüzey pasifleşmesinden ve belirli heteroatomların varlığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Karbon noktalarının emisyon spektrumları kolayca ayarlanabilir ve böylece floresans görüntüleme için daha geniş olanaklar sağlanır. Emilim davranışı aynı zamanda π -bağlı alanların boyutuna, yüzey gruplarının türüne ve moleküllerin çekirdeklerindeki oksijen ve nitrojen atomlarının içeriğine bağlı olarak da değişir. Ancak tipik olarak 200 ile 400 nm arasındaki radyasyon aralığında güçlü absorpsiyon gösterirler (Cao ve ark., 2011; Sauer ve ark., 2002).

"Karbon nokta" terimi, karbon ve grafen nanotüplerin kombinasyonunu ifade eder. Karbon nanotüpler ise, karbon atomlarının altıgen bir yapıda birleşerek oluşturduğu tüp benzeri yapılar olarak tanımlanır. Karbon nokta, bu iki malzemenin bir araya getirilmesiyle oluşturulan bir nanomalzemedir. Karbon noktalar, son yıllarda optoelektronik (optronik), biyogörüntüleme, algılama ve enerji depolama gibi alanlardaki sahip olduğu olası kullanım alanları nedeniyle yoğun bir şekilde dikkat çekmiştir (Wang ve Li, 2019).

Bu malzeme, çeşitli endüstriyel, elektronik ve enerji alanlarında potansiyel uygulamalara sahiptir. Örneğin, CD'ler hafif ve dayanıklı malzemelerin üretiminde kullanılabilir. Aynı zamanda, elektronik cihazlarda daha verimli ve hızlı elektronik bileşenlerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Enerji depolama ve dönüşüm sistemlerinde de kullanılan CD'ler, yüksek kapasiteye sahip piller veya daha verimli güneş pilleri (fotovoltaik) gibi uygulamalara olanak sağlayabilirler.

CD'ler yüksek fotostabiliteye ve fotoluminesansa sahiptir, yani ışığa maruz kaldıklarında ışık yayabilirler. Bu özellikleri, görüntüleme teknolojilerinde, optoelektronik cihazlarda ve biyolojik etiketleme uygulamalarında potansiyel olarak

kullanılmalarını sağlar. CD'ler ayrıca geniş bir yüzey alanına sahiptir ve bu da onları katalizörler ve sensörler gibi uygulamalarda değerli kılar.

Biyomedikal alanda CD'lerin kullanım potansiyeli büyüktür. CD'ler biyolojik uyumlulukları, düşük toksisite seviyeleri ve hücre içi görüntüleme yetenekleri nedeniyle biyomedikal görüntüleme, hücre etiketleme, ilaç taşıyıcısı ve kanser tedavisi gibi uygulamalarda kullanılmaktadırlar.

CD'lerin sentezi ve karakterizasyonu, nanobilim ve nanoteknoloji alanlarında yoğun olarak araştırılmaktadır. Farklı sentez yöntemleri ve yapılandırma stratejileri kullanılarak çeşitli CD tipleri elde edilebilir. CD'ler genellikle üretim yöntemlerine veya yapısal özelliklerine göre sınıflandırılır. Sentez yöntemlerine bağlı olarak, mikrodalga yöntemi, hidrotermal ve piroliz yöntemi, lazer ablasyonu, kimyasal oksidasyon ve çözelti işleme gibi farklı teknikler kullanılabilir. Yapısal özelliklerine bağlı olarak, farklı CD türleri arasında boyut, yüzey fonksiyonelleştirmesi, emisyon özellikleri, optik özellikler ve kimyasal bileşim gibi farklılıklar olabilir. Örneğin, bazı CD'ler çekirdek-kabuk yapılarına sahip olabilirken, bazıları çeşitli fonksiyonel gruplarla kaplanmış olabilir. Bu yapısal farklılıklar, CD özelliklerini ve uygulamalardaki potansiyellerini etkileyebilir (Barman ve Patra, 2018).

CD'lerin en önemli özelliklerinden biri, ayarlanabilir optik özellikleridir. Boyutlarına, yüzey işlevlerine ve bileşimlerine bağlı olarak görünürden yakın kızılötesi bölgelere kadar değişen güçlü flüoresans emisyonları sergilerler. Bu floresans, kuantum hapsi, yüzey kusurları ve yüzey pasivasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalara bağlanabilir (Liu ve ark., 2018).

CD'ler tipik olarak aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya yaklaşımlar olmak üzere çeşitli yöntemlerle sentezlenir. Aşağıdan yukarıya sentezde atomlar, moleküller kimyasal, fiziksel olarak birleşerek nano malzemeyi oluştururlar. Öte yandan yukarıdan aşağıya sentezde CD üretmek için grafen veya karbon nanotüpler gibi karbon bazlı malzemelerin parçalanmasını daha küçük yapılara ayrılması prensibini içerir.

1.2 CD'lerin Kullanım Alanları

Karbon dot veya C dot olarak da bilinen karbon noktaları (CD), benzersiz özellikler sergileyen karbon bazlı nanomalzemeler sınıfıdır.

Birinci kullanım alanı olarak CD'ler, elektronik ve optoelektronik cihazlar için önemli bir potansiyele sahiptir. Görünürden yakın kızılötesi bölgelere kadar değişen güçlü flüoresan emisyonları, onları ışık yayan diyotlar (LED'ler), organik güneş pilleri ve fotodedektörler gibi uygulamalar için ideal adaylar yapar. CD'ler, bu cihazlarda aktif bileşenler veya ışıldayan katmanlar olarak işlev görerek verimli enerji dönüşümü ve ışık emisyonu sağlar. Yüksek fotoluminesans özellikleri sayesinde, görüntüleme teknolojileri ve optik sensörler için etkin bileşenler olarak kullanılabilirler. CD'ler, düşük maliyetli ve yüksek verimli floresans etiketler olarak da kullanılabilir.

Biyomedikal alanında, CD'ler biyolojik görüntüleme, hücre etiketleme ve ilaç teslimi/dağıtımını gibi uygulamalarda kullanılabilirler.

Nanoteknolojik ilaç taşıyıcıları olarak kullanıldığında, ilaç moleküllerini hedef bölgelere taşıyabilir ve kontrollü salım sağlayarak tedavi sürecini optimize edebilir. Bu, daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. CD'lerin kullanım alanları hızla genişlemekte ve sürekli olarak araştırılmaktadır. Özellikle, sentez yöntemlerindeki ilerlemeler ve yapısal özelliklerin iyileştirilmesiyle birlikte, CD'lerin daha fazla uygulama potansiyeli keşfedilmektedir (Wang ve Zhang, 2014).

İkinci olarak, CD'ler katalizörler ve sensörler alanında önemli bir rol oynar. Yüksek yüzey alanı ve özelleştirilebilir kimyasal özellikleri sayesinde, CD'ler, katalitik reaksiyonlarda etkinliklerini artırabilir ve çeşitli gaz, biyolojik veya kimyasal sensörlerde kullanılabilirler. Özellikle biyosensörlerde, CD'lerin biyolojik molekülleri etkili bir şekilde algılama yetenekleri nedeniyle büyük potansiyel taşıdığı görülmektedir.

Biyogörüntüleme alanında, CD'ler, biyolojik numunelerin floresan etiketlemesi ve görüntülenmesi için değerli araçlar olarak ortaya çıkmıştır. Mükemmel biyoyumlulukları, düşük toksisiteleri ve suda iyi dağılılabirlikleri, hücrelerin, dokuların ve hatta canlı organizmaların güvenli ve verimli bir şekilde görüntülenmesini sağlar. CD'ler, belirli hücreleri veya dokuları hedeflemek için antikolar veya DNA gibi biyomoleküllerle işlevselleştirilebilir ve biyomedikal araştırma ve klinik uygulamalarda kesin görüntüleme ve teşhis sağlar (Lim ve Gao, 2015).

CD'lerin enerji depolama ve dönüşüm sistemlerinde de kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Örneğin, lityum-iyon piller için anot malzemesi olarak kullanıldığında, CD'ler pilin kapasitesini artırabilir ve şarj-deşarj hızını iyileştirebilir. Optik özellikleri sayesinde, güneş hücrelerinin ışığı daha iyi emmelerini sağlayabilir ve enerji dönüşüm verimliliğini artırabilir (Das ve Mandal, 2019).

CD'lerin bir diğer ilgi çekici kullanım alanı ise çevre dostu malzemelerdir. CD'ler, çevresel kirlilik kontrolü ve su arıtma gibi uygulamalarda etkin rol oynayabilir. Özellikle CD'lerin adsorpsiyon yetenekleri ve yüksek yüzey alanı, su arıtma sistemlerinde kirleticilerin giderilmesi için kullanılacak etkili bir malzeme olmalarını sağlar. CD'ler, ağır metaller, organik kirleticiler ve mikroplastikler gibi zararlı maddeleri sudan veya havadan uzaklaştırabilir (Li ve Huang, 2010; Liu ve Liu, 2010).

Tarımsal alanda, CD'lerin bitki besin maddelerinin iletilmesi, bitki büyüme düzenlemesi ve hastalık teşhisinde kullanılabilirler. Gıda endüstrisinde ise gıda güvenliği, taklit ve sahtecilik tespiti gibi konularda analitik araştırmalarda kullanılabilirler. Sıcaklık, pH veya metal iyonları gibi dış uyaranlara karşı yüksek hassasiyetleri, çevresel izleme, gıda güvenliği ve tıbbi teşhis için sensörlerin geliştirilmesine olanak tanır. CD'ler, çeşitli analitleri algılamak ve ölçmek için sensör platformlarına dahil edilebilir, hızlı yanıt, yüksek seçicilik ve düşük algılama limitleri sunar (Jiang ve Cai, 2015).

Akademik araştırma ve endüstriyel çalışmalar, CD'lerin kullanım alanlarının genişletilmesi ve yenilikçi uygulamaların ortaya çıkması için devam etmektedir.

1.3 CD'lerin Sentez Yöntemleri

Karbon noktaların karbon malzemelerden üretilmesinde, yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya olacak şekilde iki farklı sentez metodu uygulanmaktadır (Li ve Kara, 2018).

Yukarıdan aşağıya metodu; büyük malzemeleri daha küçük parçalara ayırma prensibine dayanırken, aşağıdan yukarıya metodu; atom, molekül gibi küçük yapı taşlarını bir araya getirerek daha büyük yapılar oluşturma mantığına dayanır (Rocco ve ark., 2023).

Karbon noktaların sentezinde, yukarıdan aşağıya metodu; lazer ablasyon, ark deşarjı, elektrokimyasal ve kimyasal oksidasyon ile ultrasonik yöntemleri kapsarken; aşağıdan yukarıya metodu; mikrodalga sentezi, termal-plazma bozunması ve hidrotermal yöntem gibi teknikleri içermektedir (Du ve ark., 2021; Wang ve ark., 2019).

Lazer ablasyon yöntemi, organik çözücüler içinde dağıtılmış karbon kaynaklarını yüksek enerjili lazer ışınları ile ışınlayarak karbon kuantum noktaları (CQDs) sentezlemek için kullanılır. Hızlı sentez ve ayarlanabilir floresans özelliklerinin yanı sıra iyi suda çözünürlük avantajı sunar. Ancak bu yöntem ekonomik kaygıları ve karmaşıklığı nedeniyle genellikle tercih edilmemektedir (Wang ve ark., 2019).

Ark deşarj yöntemi, bir tür plazma sentez yöntemidir. Bu yöntemde, yüksek akım ve voltaj altında çalışan bir elektrik arkı kullanılarak gazların iyonize olması sağlanır. İyonize gazlar yüksek sıcaklıkta plazma oluşturur ve bu plazma, reaktör içindeki karbon kaynaklarını ayrıştırarak karbon atomları üretir.

Elektrokimyasal oksidasyon yöntemi, kimyasal bir bileşiğin elektrik akımı kullanılarak oksidasyonunu gerçekleştiren bir yöntemdir.

Kimyasal oksidasyon yöntemi ise, kimyasal reaksiyonlar yoluyla bir bileşiğin oksidasyonunu sağlayan bir yöntemdir.

Elektrokimyasal ve kimyasal oksidasyon yöntemleri, ekonomik oluşları, sentez sonrası kolay modifiye edilebilmeleri, yüksek verimli olmaları, tekrar üretilebilir nitelikleri ve boyut kontrolünün kolaylığı gibi çeşitli üstünlükler sunmaktadır (Liu ve ark., 2013; Çağlayan ve ark., 2022).

Ultrasonik yöntemde, yüksek frekansta titreşen ultrasonik dalgalar sıvı içindeki gaz kabarcıklarının oluşmasına ve kavitasyonun gerçekleşmesine neden olur. Bu kabarcıkların çökmesi sırasında ortaya çıkan yüksek enerjili şok dalgaları ve hidrodinamik kuvvetler, malzeme üzerinde etki ederek onun parçalanmasına ve nano boyutta parçacıkların oluşmasına yol açar.

Mikrodalga ısıtma, CQDs'ler de dahil olmak üzere çeşitli malzeme sınıflarının sentezi için endüstride ve akademide kullanılan, basit, hızlı ve düşük maliyetli bir

işlemdir. Mikrodalga radyasyonu malzemeye nüfuz eder, hacmi boyunca moleküler/atomik seviyede ısı üretir. Bu yöntem, yeşil sentez yaklaşımlarının tüm alanlarında çok önemli bir araç haline geldi (Singh ve ark., 2019).

Termal bozunma tekniği nano yapıları malzemelerin sentezinde etkili olup, kısa sürede nanopartiküllerin şekil, boyut ve dağılımını kontrol etme imkânı sunar. Bu teknik, yüksek sıcaklıklarda (250-330°C) organik çözücüler içinde yüzey aktif maddeler yardımıyla karbon kaynaklarının çözünmesini içerir (Thangaraj ve ark., 2019).

Nanomalzemelerin sentezinde, yüksek sıcaklık ve düşük sıcaklık plazması olarak sınıflandırılan farklı plazma teknikleri kullanılır. Genel olarak, yüksek sıcaklık plazmasında malzemenin sıcaklığı birkaç bin santigrat dereceye ulaşabilir, bu da onu ısı ve ışık kaynağı olarak değerli kılar. Öte yandan, düşük sıcaklık plazması, elektron sıcaklığının gaz sıcaklığından daha yüksek olduğu özel bir durum sunar.

Düşük sıcaklıklı plazmalar, termal ve termal olmayan çeşitleri ile birlikte, malzemelerin sentezi ve ileri işlenmesi için kritik öneme sahiptir.

Hidrotermal yöntem, basit çalışma şartları ve kolay temin edilebilir özellikleriyle CQDs sentezinde en yaygın kullanılan tekniklerden biri olup, homojen boyut dağılımı ve yüksek kuantum verimine sahip parçacıklar üretir. Bu yöntemde, su veya organik çözücüde çözülen karbon kaynağı teflon kaplı paslanmaz çelik otoklava aktararak belirli basınç ve sıcaklık koşullarında bekletilir. Bu süreçte organik moleküller karbon çekirdeklerini oluşturarak 10 nm'den küçük CQDs'lere dönüşür. Zengin karbon ve azot içerikli biyomoleküllerin hidrotermal koşullar altında CQDs'lerin iç yapılarını hassas bir şekilde kontrol etmek için kullanılabileceği bilinmektedir (Wang ve ark., 2019).

Yüksek basınç altında sulu çözeltiden maddelerin kristalizasyonunu sağlayan bir tekniktir. Kristal büyümesi, besleyici malzeme ve suyun birlikte bulunduğu çelik yapıları basınçlı bir kap olan otoklav içerisinde gerçekleşmektedir. Hidrotermal koşullar altında, elementlerden karmaşık oksitlere, karbonatlardan silikatlara ve germanatlara kadar geniş bir yelpazede çeşitli sınıflara ait bileşikler sentezlenebilmektedir. Hidrotermal metot, üç farklı uygulama tekniğini içermekte olup, bunlar arasında en yaygın kullanılanı sıcaklık farkı yöntemidir.

Aşırı doyum işlemi, hassas sıcaklık kontrolü gerektiren hassas bir süreçtir ve kristal oluşturulacak alanda sıcaklığın düşürülmesi prensibine dayanır. Besleyici madde, farklı sıcaklık bölgeleri oluşturmak için ısıtılan otoklavın alt kısmına çözücü ile birlikte yerleştirilir. Otoklav sıcaklık farklarından iki farklı bölümün oluşmasını sağlar. Bu sıcaklık gradyanı, besleyici maddenin çözünmesini ve daha yoğun olan üst kısımdaki çözeltiliye taşınmasını sağlar. Çözelti alçalırken, karşı akış, çözeltiliyi üst kısma geri taşır, burada aşırı doyum meydana gelir ve kristalizasyon başlar. Bu hassas sıcaklık kontrolü, kristalizasyon sürecini başlatmak ve kontrol etmek için kritik öneme sahiptir.

Sıcaklık düşürme yöntemi, ikinci bir kristalizasyon tekniği olarak, büyütme ve ayrışma bölgeleri arası termal gradyan olmaksızın çalışır. Bu metotta, süperdoymuluk koşulları, otoklavdaki çözeltinin kademeli olarak soğutulmasıyla elde edilir. Ancak, bu yaklaşımın önemli kısıtlamaları mevcuttur. Kristal büyüme kinetiğinin hassas kontrolü ve tohum kristallerin sisteme entegrasyonu oldukça güçtür. Bu teknik zorluklar nedeniyle, sıcaklık düşürme yöntemi uygulamada sınırlı kullanım alanı bulmaktadır.

Yarı kararlı faz yöntemi, hedef kristal fazı ile besleyici materyal arasındaki çözünürlük farkını temel alır. Bu yaklaşımda, büyütme koşullarında termodinamik açıdan metastabil karaktere sahip bileşenler besleyici maddeye dahil edilir. Metastabil fazın çözünürlüğü, kararlı fazını aşar. Böylece kararlı faz, metastabil fazın çözünmesi sonucu oluşan aşırı doymuluk sayesinde kristalleşir. Bu sofistike teknik, genellikle önceki iki yöntemle kombine edilerek uygulanır, böylece kristal büyütme sürecinin verimliliği ve kontrolü artırılır (Byrappa ve Yoshimura, 2001; Roditi, 2007).

Hidrotermal yöntem, düşük reaksiyon sıcaklığı nedeniyle üstün kristal kalitesi sunar. 200 °C'nin altındaki sıcaklık, mükemmel kristal yapısına sahip parçacıkların sentezlenmesini mümkün kılar, bu da hidrotermal yöntemin tercih edilme sebeplerinden biridir (Morita, 2010).

Hidrotermal sentez yöntemi, bilimsel literatürde çeşitli şekillerde tanımlanmaktadır. Bu tanımlamalardan biri, yöntemi doğal jeolojik süreçlere benzer koşullar altında gerçekleşen kristalizasyon veya kimyasal reaksiyonlar olarak nitelendirir. Bu yaklaşım, sulu çözeltilerde, doğadakine yakın şartları simüle ederek

malzeme sentezini gerçekleştirmeyi amaçlar (Laudise, 1970). Bir başka tanımda, hidrotermal sentez, yüksek basınç ve sıcaklık koşulları altında aşırı ısıtılmış çözücülerin kullanıldığı bir yöntem olarak tanımlanır. Bu tanımlama, hidrotermal sentezin yüksek basınç ve sıcaklık koşullarını vurgular (Lobachev, 1973).

Hidrotermal sentez yöntemi genellikle diğer sentez teknikleriyle karşılaştırıldığında daha etkili olsa da, bu kapalı sistem yaklaşımının bir sınırlaması vardır. Reaksiyonların ilerleyişi tamamen kontrol altında olmadığından hidrotermal süreçteki bireysel reaksiyon adımları üzerinde kesin kontrol zordur. (Çevik, 2001; Sun, 2006).

Hidrotermal sentezin avantajları, ergime noktası yakınındaki kararsız substratların kristalleşmesini ve yüksek kaliteli büyük kristallerin sentezlenmesini içerir. Ancak, ekipmanın yüksek maliyeti ve büyüme süreçlerinin izlenememesi dezavantajlar arasındadır.

1.4 CD'lerin Sitotoksitesi

Karbon noktalarının (CD'lerin) sitotoksitesi oldukça ilgi çekmiş ve birçok araştırma grubu tarafından araştırılmıştır. CD'ler genellikle *in vitro* olarak düşük toksisiteye sahiptir (Yang ve ark., 2009).

In vitro sitotoksite, genellikle *in vitro* testler sırasında hücre canlılığı ile karakterize edilir. Hücre canlılığı verilerini elde etmek için sıklıkla kullanılan test yöntemleri MTT, CCK-8 ve WST-1, WST-8'dir (Liu ve ark., 2018; Wang ve ark., 2019; Li ve ark., 2019).

İlk olarak test materyali hücre kültürü ortamına verilir. Canlı hücrelerin sayısı, testin başlangıcında ve belirli bir maruz kalma süresinden (örneğin, 24 saatlik bir kuluçka süresi) sonra ölçülür. Çok sayıda çalışma, CD ilavesi arttıkça hücre canlılığının azaldığını göstermiştir. Bu zamanda hücreden bazı yaygın kimyasallar (laktat dehidrojenaz gibi) salınır (Liu ve ark., 2019; Kuo ve ark., 2020; Ju ve ark., 2020).

1.4.1 Suda Çözünür Tetrazolyum Testi (WST)

Suda Çözünür Tetrazolyum (WST) tuzları, hücre canlılığı analizlerinde kullanılmak üzere tasarlanmış yeni nesil bileşiklerdir. Bu tuzlar, canlı hücrelerdeki mitokondriyal NADH (Nikotinamid adenin dinükleotit) enzimleri tarafından formazan

kristalleri üretmesini sağlar, bu da hücre canlılığının ve metabolik aktivitenin göstergesidir. WST yöntemi, suda çözünür bir formazan ürünü üreten tetrazolyum tuzları prensibine dayanan başka kolorimetrik yöntemdir.

Suda çözünebilir tetrazolyum tuzlarından günümüzde sık kullanılanı 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5 (2,4-disülfofenil)-2H tetrazolyum formundaki WST-1 ve sıklıkla kullanılan bir diğer WST bileşiği ise WST-8 (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5 (2,4-disülfofenil)-2H tetrazolyum)'dur (Präbst ve ark., 2017). WST-1 ve WST-8 bir iyot kalıntısı içerir. MTS veya XTT 'ye kıyasla PMS varlığında daha stabil kalır (Berridge, 1993). WST (Suda Çözünür Tetrazolyum) tahlilleri, üretilen formazan kristallerinin yıkanması veya çözünmesi için herhangi bir ek adım gerektirmez bu sebeple kullanıcı dostu bir yaklaşım sunar. Hazır çözeltiler halinde pazarlanması, tüm protokolün daha hızlı ve verimli hale getirilmesine katkıda bulunur. (Berridge, 1993; WSTs, 2013).

Oluşan formazan kristalleri çözüldükten sonra, geleneksel bir mikropilaya okuyucuda 450 nm absorban değerinde hızlı ve kolay bir şekilde ölçülebilir. WST-1 yönteminde spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldığında absorban değeri doğrudan canlı hücre sayısı ile ilişkilidir. Hücre sayısı arttıkça, formazan tuzu oluşumu da artar, bu da absorban değerinde karşılık gelen bir artışa neden olur. Çoğalan hücreler, çoğalmayan hücrelere göre daha fazla metabolik aktivite gösterdiğinden, bu yöntem yalnızca hücre canlılığını ve sitotoksitesini belirlemekle kalmaz, aynı zamanda hücre aktivasyonunu ve çoğalmasını da belirler. Bu yöntemde ek ajanlar veya hücre yıkama işlemleri kullanılmadan düşük hücre konsantrasyonlarında bile ölçüm yapılmasına olanak tanır. Radyoaktif izotoplar kullanılmadan hücre sayılarını ölçmek ve hücre canlılığını belirlemek için mükemmel çözüm sunarlar. Bu yöntem, çeşitli büyüme faktörleri ve besin bileşenlerine ilişkin hücre çoğalmasının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Protocol Guide, 2022).

1.5 Floresan Görüntüleme

Floresans görüntüleme, hücre materyalinin yüksek kontrastlı görüntülerini sağlayarak biyoteknolojide devrim yaratmıştır. Floresans görüntü elde etme, mikroskobik yapıları tasvir eder. Floresans etiketleme, belirli bir bileşiğin incelenmesine olanak tanır. Floroforlar, hedef tespitini kolaylaştırarak ve sinyali-

gürültü oranını artırarak hem duyarlılığı hem de özgüllüğü geliştirir (Nwaneshiudu ve ark., 2012).

Yaygın olarak kullanılan bir etiketleme probu, seçici bağlanmalarından dolayı antikorlardır. Yüksek çözünürlük ile birlikte istenen maddeyi vurgulayan etiketleme, biyolojik materyalin derinlemesine incelenmesine olanak sağlar.

Floresans görüntüleme, floroforlardan yayılan ışığın odaklanmış bir şekilde toplanmasıyla olağanüstü kontrast elde eder. Bir florofor emilen ışık tarafından uyarılır ve uyarılmadığı zaman daha düşük dalga boyunda ışık yayar. Hem gelen hem de geri dönen ışığın dalga boyu belirli bir aralıktadır. Dalga boyu seçimi için filtreler kullanılarak yalnızca amaçlanan ışığın geçmesi sağlanır. Genellikle bir uyarma ışık kaynağı, kullanımdaki spesifik floroforun emilmesi için uygun bir uyarma filtresinden geçer. Geri dönen ışık, zayıf ve yoğun ışığı ayıran bir emisyon filtresinden geçer.

Mikroskobun çalışma prensibinin temelinde ışığın yönlendirilmesi, odaklanması ve toplanması yer alır. Herhangi bir mikroskopta olduğu gibi objektif, toplayıcı ve yoğunlaştırıcı mercekler de dahil olmak üzere farklı mercekler ışığın düzenlenmesinde işbirliği yapar (Kubitscheck, 2017).

Sayısal açıklık, kapsama ve emisyon için kabul edilen açılarını belirtir ve temel bir lens özelliğidir. Dikroik (iki renkli) aynalar, dalga boylarına bağlı olarak ışığın bir kısmının geçmesine izin verirken diğerlerini yansıtarak ışığı ayırır. Son olarak, fotodetektörler ışığı, olduğu gibi incelenebilecek veya görüntü işlemeyle daha da geliştirilebilecek dijital bir görüntüye dönüştürür.

1.5.1 Konfokal Mikroskopi (CLSM)

Konfokal mikroskopi, geleneksel mikroskopların fiziksel segmentasyon gerektirdiği durumlarda numunenin birkaç mikrometre aşağısında sanal bir düzlem kesitini yeniden oluşturabilir (Nwaneshiudu ve ark., 2012).

Eş odaklı konfigürasyonun gücü, hem aydınlatma hem de geri dönerek yayılan ışığın bilgi toplanması için tek bir uzamsal noktaya odaklanmasıdır. Uyarma ışınının bir mikroskop objektifi aracılığıyla odaklanması, 0,5 µm kadar küçük bir çapa sahip olup hassas bölgesel etkiyi kolaylaştırır. Mikroskobun objektifi aynı zamanda geri dönen yayılan ışığı da daraltır. Kısıtlanmış örnek aydınlatma, odak dışı ışığı azaltır ve dolayısıyla görüntü gürültüsünü azaltır. Geleneksel mikroskobun aksine, geri dönen

ışık görüntülemeyden önce yansıtılır. Dağınık ışık, ışığın kaynağını yansıtmayan bir piksel katkıda bulunarak görüntüyü gizler. Küçük bir iğne deliği açıklığı, algılama için yalnızca doğrusal yörüngeli ışığın geçmesine izin verir. İğne deliğinin arkasında, girişi algılayan ve çoğaltan bir fotoçoğaltıcı tüp (PMT) bulunur.

Görüntü, numunedeki karşılık gelen odak noktasının taranmasıyla o anda bir piksel oluşturur. Odak noktası numunenin seçilen alanı boyunca hareket ettirilir, çerçeve içindeki tüm noktalar taranır ve görüntü piksel piksel oluşturulur. Ayrıca odak noktası derinlemesine değiştirilerek sanal kesitlere ve ardışık 3 boyutlu yeniden yapılanmaya olanak sağlanır.

1.6 *Laurocerasus officinalis* Bitkisi

Gülgiller familyasının bir üyesi olan 6 metreye kadar uzayabilen, çalı benzeri bir görünüme sahip olup, kış aylarında yapraklarını dökmemektedir. Yaprakları sürekli yeşil, parlak, tüysüz, kenarları hafif geri kıvrık ve oval şekillidir. Kısa sapları vardır ve çiçekleri beyaz renklidir. Çiçekler genellikle toplu halde, salkım gibi bir araya gelir ve nadiren sonbaharda açarlar.

Çalı biçimli bir ağaç olan taflan, yüzyıllardır halk tarafından şifa kaynağı olarak bilinen, kış aylarında da yeşil kalabilen bir bitkidir. Bu yaprak dökmeyen çalı, ormanlık alanlarda doğal olarak yetiştiği ve yeşil yapraklarını yıl boyunca koruduğu için yüzyıllardır halk tarafından tıbbi amaçlı kullanılmaktadır. Gül ailesine ait olan taflanın bilimsel adı *L. officinalis*'tur.

Taflan, ülkemizde farklı yörelerde farklı adlarla anılır ve Karadeniz Bölgesi'nde yaygın bir meyvedir. Laz üzümü, laz kirazı, laz yemişi veya tanal olarak bilinir. Özellikle Ordu'da yetiştiriciliği yaygın durumdadır.

Taflan, yaprakları ve çekirdekleri aşırı tüketildiğinde zehirlenmeye yol açabilecek bir meyvedir. Bununla birlikte, taflanın yaprakları çeşitli faydalar sunar. Yapraklardan hazırlanan çay, geleneksel bir ilaç olarak tüketilirken, meyvenin kendisi de gıda sektöründe koku verici olarak kullanılır. Taflan, likopenin yan ürünleri de dahil olmak üzere antioksidanlar bakımından zengindir, bu da güçlü bir C vitamini kaynağı ve bağışıklık güçlendirici olarak işlev görmesini sağlar.

Karayemiş bitkisinin doğal yayılma alanı Anadolu'da Karadeniz'in doğu bölgeleri, Toroslar, Kuzey ve Doğu Marmara ve Kafkaslardır. Avrupa'nın

güneydoğusu, Balkanlar ve Kuzey İnan başta olmak üzere dünyanın değişik yörelerinde karayemiş formlarına rastlanılmaktadır. Karadeniz Bölgesi'nde; Rize dolaylarında Trabzon çevresinde, Maçka Meryemana Vadisi'nde, Giresun, Sinop (Ayancık), Zonguldak (Devrek), Kastamonu, Bartın ve Bolu çevresindeki yapraklı orman ve orman kıyılarında rastlanır. Marmara Bölgesi'nde; İzmit (Keltepe), Adapazarı dolaylarında, İstanbul çevresinde Belgrat Ormanları'nda ve Alemdağ'da, Bursa Uludağ'da ve Karadeniz kıyısı yakınlarındaki ormanlarda rastlanır. Güney Anadolu'da; Osmaniye'de Gavur Dağları'nda ve lokal olarak da Amanos Dağları'nda yer alır (İslam A., 2005).

Karayemiş, olgunlaşmamış halde buruk bir tada sahip olsa da, olgunlaştıkça aromatik bir lezzet kazanır ve taze tüketime uygun hale gelir. Meyvenin kabuğu düzgün, ince ve parlak bir görünüme sahiptir (İslam A., 2002).

Görünüşü kirazın küçük bir versiyonu gibidir. Olgunlaşmış olarak siyah ve mor renkteki halleri meyve olarak tüketilmek için idealdir. Karayemiş yapraklarından yapılan çay, alternatif tıp araştırmacılarına göre, insülin direncini dengeler ve şeker hastalarına fayda sağlar. Bu çay ayrıca şiddetli öksürüğü keser, boğaz iltihabını azaltır ve virüslere karşı koruma sağlar. Ancak, çekirdekler ve yapraklar toksik bileşikler içerebildiğinden, kurutularak tüketilmeleri önerilir. Karayemiş yapraklarından elde edilen çayın antioksidan içeriği nedeniyle "gençlik iksiri" olarak adlandırılması dikkat çekicidir.

L. officinalis (taflan) yazılı kayıtlara göre ilk kez 1546 yılında Fransız botanikçi Pierre Belon tarafından Trabzon bölgesinden toplanmış ve ilk olarak *Cerasus trapezuntina* (Trabzon Kirazı) olarak tanımlanmıştır. Bitki aynı yıl İstanbul'a oradan İtalya'ya, daha sonra 1574 yılında Clusius tarafından Viyana'ya götürülerek tanıtılmış, oradan da Fransa ve İngiltere'ye gönderilmiştir. Budama yoluyla şekillendirilebilme özelliği, yıl boyu bitki üzerinde kalan koyu yeşil, parlak yaprakları ve hoş kokulu beyaz çiçekleri ile karayemiş, 1600'lü yıllardan itibaren Avrupa'nın her yerinde park ve bahçelerde yetiştirilmeye başlanmıştır.

Taflan için günümüzde mevcut olan yaklaşık 20 farklı kültür varyetesi olup, büyüme biçimi, yaprak boyutları, şekli ve kışa dayanıklılık gibi özelliklerine göre çeşitlilik göstermektedir (Alpınar ve Yazıcıoğlu, 1991).

Karayemiş meyveleri hakkında yapılan çalışmalar toplam fenolik içeriğinin 11,9 ile 54,8 mg/100g arasında değiştiğini ortaya çıkarmaktadır. Diğer meyvelerle karşılaştırıldığında, karayemiş meyvelerinin C vitamini ve toplam karbonhidrat açısından önemli ölçüde daha zengin olduğu bulundu. Ancak, meyveler olgunlaştıkça C vitamini içeriğinin yaklaşık %70 oranında azaldığı gözlemlenmiştir. Bitki kaynaklı yenilebilir ve yenmeyen ürünler genellikle yüksek konsantrasyonda antioksidan fenolik bileşikler içerir. Bu fenoliklerin, kalp hastalığı, belirli kanser türleri ve diğer oksidatif stresle ilişkili durumların riskini artırabilecek zararlı serbest radikalleri engellediği bilinmektedir (Ness ve Powles, 1997).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 CD'lerin Biyolojik Materyallerden Sentezlenmesi ile Yapılan Çalışmalar

Yao ve ark., 2018 yılında, *Panax ginseng* bitkisinde bulunan ana aktif bileşik olan ginsenosidenden türetilen çok işlevli karbon noktaları (CD'ler) geliştirdiler. Bu CD'lerin, Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) üretimini artırarak çeşitli kanser hücrelerini etkili bir şekilde inhibe etmektedir (Yao ve ark., 2018).

Li ve ark., 2014 yılında, zencefil bitkisinin suyundan karbon kuantum noktaları (CD) sentezlediler. Bu CD'ler, herhangi bir ilave ilaç olmadan teşhis ve tedavi amaçlı teranostik uygulamalar için kullanışlı hale getirildi (Li ve ark., 2014).

Biçer ve Bilmişoğlu Biçer, 2020 yılında, kırmızı soğandan karbon kuantum noktaları sentezledi. Karbon kuantum noktalarının yapısı XRD ve FTIR spektrumları ile belirlendi. Karakterizasyonu yapılan karbon kuantum noktalarının fotofiziksel özellikleri üzerine pH ve sıcaklığın etkisini incelemişlerdir. Karbon kuantum noktasının pH değeri ve sıcaklık dayanımı özelliğinin azalması ve uzun zaman aralığında (3 ay) kararlılığını koruduğunu kaydetmişlerdir (Biçer ve Bilmişoğlu Biçer, 2020).

Xiao ve ark., 2019 yılında, buğdaydaki kadmiyum toksisitesinin olumsuz etkilerini azaltmak için karbon noktalarını kullanmışlardır. Çalışmalarında, karbon noktalarının kadmiyumu absorbe ettiği, bitkideki çözünür şeker ve protein içeriğini artırdığı, ve askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), ve peroksidaz (POD) aktivitesini artırarak kadmiyum toksisitesine karşı toleransı yükselttiği keşfetmişlerdir (Xiao ve ark., 2019).

Eken ve ark., 2017 yılında yapılan çalışmada, karayemiş meyve ekstraktının dimetoatla oluşan hepatotoksisite üzerine etkisini incelemişlerdir. Dimetoat karaciğer toksisitesine neden olan bir bileşiktir. Karayemiş meyvesinden elde edilen ekstrakt, bu bileşiğin oluşturduğu hasarı büyük ölçüde iyileştirmiştir (Eken ve ark., 2017).

Güder ve Korkmaz, 2012 yılında karayemiş ve böğürtlen meyvelerinin sulu ve etanollü ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitesi ile DPPH serbest radikali, süperoksit iyon radikali ve hidrojen peroksit süpürücü ve demir iyonları şelatlayıcı aktivitelerini incelenmiştir. Her iki meyvenin de antioksidan aktivitesinin referans

bileşiklerden (BHA, BHT ve α -tokoferol) daha yüksek olduğu görülmüştür (Güder ve Korkmaz, 2017).

Liyana-Pathirana ve ark., (2006) karayemiş meyvesi ve pekmezinin antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Taze ağırlıkları baz alındığında karayemiş pekmezi, karayemiş meyvesine oranla daha yüksek antioksidan aktivitesi göstermektedir. Kuru ağırlık baz alındığında ise karayemiş meyvesinin hidrojen peroksit ve DPPH radikal süpürücü aktivitelerinin pekmezin aktivitesinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Araştırmacılar bu durumun nem içeriğinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Aynı zamanda araştırmacılar karayemiş meyve ve pekmezinin oksidatif stresin neden olduğu dejeneratif hastalıkların iyileşmesinde yararlı etkileri olabileceğini vurgulamışlardır (Liyana-Pathirana ve ark., 2006).

2.2 CD'lerin Sitotoksikite Çalışmaları

Demir ve ark., 2017 yılında yapılan çalışmada dimetil sülfoksit ile ekstrakte edilen karayemiş meyvesinin insandan izole edilmiş prostat, meme, kolon, akciğer, karaciğer ve serviks kanser hücre hatları ve normal fibroblast hücrelerinde sitotoksik etkisini araştırmıştır. Ekstrakt prostat ve meme kanserine karşı antiproliferatif etki göstermez iken kolon ve akciğer kanserlerinde seçici sitotoksikite sergilemiştir (Demir ve ark., 2017).

Başka bir çalışmada, karayemiş meyvesinin antiproliferatif etkisi üzerine yapılan incelemelerde, karayemiş meyvesinin kanser hücrelerine karşı antikanser ajan etkinliği göstermediğini bulgulamıştır. Öte yandan karayemişin kemoterapötik ajanlarla karşı sitotoksikiteyi azaltıcı doğal bir kaynak olarak kullanılabilceğini belirtilmiştir (Aydın ve ark., 2016)

Yang ve ark., 2009 yılında yaptığı çalışmada PEG ile pasifleştirilmiş CD'leri (4-5 nm), öncü olarak karbon kurumu (siyah karbon) kullanarak hazırladı; elde edilen CD'lerin kuantum veriminin, 440 nm uyarda yaklaşık %20 olduğu bulundu. PEG1500N tarafından pasifleştirilen CD'lerin MCF-7 ve HT-29 hücrelerinin fonksiyonları üzerindeki etkisi, MTT ve Tripan mavisi analizleri kullanılarak değerlendirildi. Her iki hücre hattının proliferasyonu, canlılığı ve mortalitesinin sonucu, bu floresan noktaların toksik olmadığını, en azından oligomerik PEG moleküllerininkinden daha fazla olmadığını gösterdi (Yang ve ark., 2009).

Ray ve ark., 2009 yılında karbon kurumunun (siyah karbon) nitrik asit oksidasyonu yoluyla 2-6 nm boyutunda floresans özellikli CD sentezlediler. Bu CD'ler daha fazla işlevselleştirilmeden hücrelere girmiştir. MTT ve Tripan mavisi testleri kullanılarak HepG2 hücreleri üzerinde hücre canlılığı testleri yapmışlardır. 24 saat boyunca < 0,5 mg/mL konsantrasyonda hücre hayatta kalma oranı %90-100 arasında olduğunu, bunun da minimum hücre ölümü olduğunu rapor etmişlerdir (Ray ve ark., 2009).

Portakal suyunun hidrotermal sentez yöntemi ile hazırlanan CD'lerinin doğal sitotoksitesisi, MTT testi ile L929 hücrelerinde değerlendirildi. Sentezlenen CD'ler hücrelere önemli toksisite göstermedi ve yüksek dozda (200 µg mL⁻¹) ve uzun inkübasyon süresinde (72 saat) bile tolere etti (Sahu ve ark., 2012).

CD'lerin farklı kanser hücresi türleri üzerindeki öldürücü etkisini incelemek için, Nurunnabi ve ark. 2013 yılında hazırlanan CD'leri üç kanser hücre hattında (A549, MDA-MB231 ve KB) inkübe etti ve CD'lerin farklı hücrelerdeki toksisitesini karşılaştırdı. Hücre canlılığının yanı sıra, hücre zarı hasarının neden olduğu hücre içi laktat dehidrojenaz salınımını da izlediler. Aynı test koşulları altındaki yanıtlarda belirgin farklılıklar gözlemlendi. İnsan epidermal kanser hücreleriyle karşılaştırıldığında A549 ve MCF-7 hücreleri CD'lere karşı daha duyarlı olduğunu bildirdiler (Nurunnabi ve ark., 2013).

Zhang ve ark., 2014 yılında yaptığı bir çalışmada N katkılı, yüksek derecede floresans özellikli CD'leri (1,3-2,1 nm), kolay ve yüksek çıkışlı bir katı faz yaklaşımıyla ürettiler. Floresans özellikli N katkılı CD'lerin Hela hücrelerine sitotoksitesisini değerlendirmek için MTT analizleri yapıldı. Önemli ölçüde, N katkılı C noktaları, 50-400 µg mL⁻¹'lik geniş bir konsantrasyon aralığında ihmal edilebilir sitotoksitesiteye ve mükemmel biyoyumluluk ve yüksek fotostabilite sahip olduğu kaydedildi (Zhang ve ark., 2014).

Yang ve ark. 2019 yılında A549 hücrelerinde mavi lüminesansa sahip sitrik asit/o-fenilendiamin türevli CD'lerin sitotoksitesisini değerlendirmek için MTT yöntemini kullanmıştır. CD konsantrasyonu biyogörüntüleme için yeterli olan 25 mg mL⁻¹ olduğunda, A549'un hücre canlılığı hala %91,8 idi. İnkübasyon konsantrasyonu 50 mg mL⁻¹'e daha da artırıldığında, A549'un hücre hayatta kalma oranı hafif bir

düşüşle %74,9'a düştü. Bu sonuçlar, sentezlenen CD'lerin biyoyumlu olduğunu ve biyogörüntüleme konsantrasyon aralığında son derece düşük toksisiteye sahip olduğunu gösterdi (Wang ve ark., 2019).

2.3 CD'lerin Antimikrobiyal Çalışmaları

Limon suyundan mikrodalga yöntemiyle karbon noktalarının (CD'ler) sentezi yapılmış ve bu CD'lerin, hidrotermal bazlı diğer yöntemlerle elde edilenlere göre düşük kuantum verimine sahip olduğu ortaya konmuştur. Ancak, sentezlenen CD'lerin biyoteknolojide kullanılan sığır serum albüminin floresans ışımamı sönümlediği ve ayrıca *S. epidermidis*, *C. albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* gibi klinik olarak önemli hastalık etkenleri üzerinde antimikrobiyal etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Mozioglu, 2022).

Bing ve ark., 2016 yılında sırasıyla spermin, kurum ve glikozdan pozitif yüklü, negatif yüklü ve nötr CD'lerin sentezini bildirdi. Pozitif yüklü CD'lerin iyi düzeyde antibakteriyel yetenek sergilediğini, negatif yüklü CD'lerin bakteriyostatik olduğunu, nötr CD'lerin ise *E. coli*'ye karşı pek aktif olmadığını gözlemlediler (Bing ve ark., 2016).

Dou ve ark., 2015 yılında sentez süresi 12 dakika kadar uzun olmasına rağmen, glikoz ve polieterimid (PEI) ve ardından benzil bromit ile kuaternizasyondan hazırlanan çok işlevli CD'ler için üstün bir antibakteriyel aktivite (hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı) bildirdi. Pozitif yüzey yükleri ile kuaternize CD'lerin bakteriyel hücre zarına yapışarak onu parçalayabileceklerini bildirdi (Dou ve ark., 2015).

2.4 *Laurocerasus Officinalis* ile Yapılan Çalışmalar

Gomez ve ark., 1998 yılında taflanın da dahil olduğu *Laurocerasus* türleri üzerinde yaptıkları çalışmada, iki farklı siyanojenik glikozitin varlığını bildirmişlerdir. Bu siyanojenik glikozitlerden biri, hemen hemen tüm siyanojenik bitki kısımlarında bulunan monoglikozit prunasindir. Diğeri ise, *Rosaceae* familyasına özgü olan ve tohumlarda ve yapraklarda bulunan diglikosit amigdalindir ve siyanojenik glikozitler ve bunların hidroliz ürünleri, insanlarda akut zehirlenmeye ve merkezi sinir sistemi sendromlarına neden olabilir (Gomez ve ark., 1998).

Alaşalvar ve ark.,2005 yılında yapılan çalışmada karayemişin içerdiği fenolik bileşiklerin, kanser ve kardiyovasküler rahatsızlıklar dahil olmak üzere çeşitli kronik hastalık riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Alaşalvar ve ark., 2005).

L. officinalis bitkisinin, antikanser aktivite özelliklerinin, kimyasal içeriğini belirlemek amacıyla RT-PCR ile yapılan çalışmalarda bulunmaktadır. Araştırma, *L. officinalis* bitkisinin hem meyve hem de tohum bileşenlerinden ham özütler elde etmek için iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullandı. Bu özütler daha sonra insan rahim ağzı kanserine (HeLa), prostat kanserine (PC-3) ve sıçan beyin tümörü (C6) hücre hatlarına karşı antikanser etkileri açısından değerlendirildi. Ekstraktları daha fazla karakterize etmek için LC-MS/MS kromatografisi kullanıldı. Bu çok yönlü yaklaşım, *Laurocerasus officinalis* bitkisinin potansiyel antikanser özelliklerinin ve kimyasal profilinin kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlamayı ve olası terapötik uygulamalarına dair içgörüler sunmayı amaçladı.

2.5 Tezin Amacı

- Bu tezin amacı, hücre görüntüleme ve tümör hücrelerini yok etme amacıyla toksik olmayan ve çevre dostu karbon noktaların *L. officinalis* yaprak özütü kullanılarak " aşağıdan yukarıya " tek adımlı hidrotermal işlemi ile sentezlenmesidir.
- Sentezlediğimiz floresans özellikli CD'lerin UV-Vis, FT-IR, TEM gibi çeşitli enstrümental analiz teknikleri ile karakterizasyonunun yapılmasıdır.
- Sentezlediğimiz floresans özellikli CD'lerin sitotoksik etkileri insan akciğer adenokarsinomu hücre hattında (A549) kullanılarak WST-8 (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5 (2,4-disülfofenil)-2H tetrazolyum) ile belirlenmesidir.
- Sentezlediğimiz floresans özellikli CD'lerin antimikrobiyal aktivitesi gram negatif, (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), gram pozitif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) ve mantar (*Candida albicans*) mikroorganizmalarına karşı değerlendirilmesidir.
- Sentezlediğimiz floresans özellikli CD'lerin antioksidan aktivitesi DPPH radikal giderme testi ile tayin edilmesidir.
- Sentezlediğimiz floresans özellikli CD'lerin konfokal mikroskobu incelemesi ile hücrelerinin üç boyutlu görüntülenmesi, apoptik morfolojisi, hücre hacmi, membran bütünlüğü gibi hücresel değişiklikleri incelemesidir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihaz, Malzeme ve Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada Ordu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ile Kimya Bölümü araştırma laboratuvarı ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi merkezi araştırma laboratuvarı (ARUM) ile Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezinde (AÜBİBAM) yer alan alet ve cihazlar kullanılmıştır.

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan tüm cihazlar ve ekipmanlar aşağıda (Çizelge 3.1)'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan Cihazların Adı ve Marka/Model Listesi

Cihaz adı	Marka/Model
Azot tankı	ANTECH-Türkiye
Buzdolabı	Arçelik- Türkiye
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik No Frost-Türkiye
Karbondioksitli (CO ₂ 'li) etüv	Panasonic Healthcare Japonya
Laminar kabin (Steril Kabin)	Esco Airstream-Singapur
Ultramikrotom cihazı	Leica-Almanya
Otomatik hücre sayım cihazı	LUNA-II -Kore
Ters (İnverted) Mikroskop	Zeiss Primovert-Almanya
Vorteks	Biocoteİngiltere
Santrifüj	Hermle-Almanya
Elisa okuyucu	ChroMate 4300-Çin
Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	JOEL Marka, JEM-1011 Model
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	Hitachi marka model SU 1510
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR)	Shimadzu Marka IRAFFİNİTY 1S Model
Ultraviyole-Görünür Spektroskopi (UV-VIS)	Shimadzu Marka, UVmini -1240 Model
Konfokal Mikroskop Cihazı	ZEISS LSM 800-Almanya
Distile su cihazı	Elga/Flex4-İngiltere
Floresan mikroskop	ZeissAlmanya
Su banyosu	NB 301-Kore
Otoklav	ALP- 19 Japonya
Freeze-dry	Christ Alpha Plus
Sonikatör	Bandelin, sonorex
Blender	Tefal 400W
Vortex	Fisons
Evaporatör	Heidolph Laborator 4000 efficient
Etüv	Binder BB56
Hassas terazi	Radwad AS\220\C2

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan tüm reaktifler aşağıda (Çizelge 3.2)'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Kullanılan Kimyasalların Adı ve Üretici Bilgileri

Kimyasal madde adı	Üretici bilgisi ve katalog no
Dimetil-Sülfoksit	Sigma Aldrich/67-68-5
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium- High Glucose)	Sigma Aldrich/D5796
Penisilin-Streptomisin	Sigma Aldrich/P4333
2-2-Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH)	Sigma Aldrich
Fetal Bovin serum (FBS)	Sigma Aldrich/TMS-016
RPMI-1640	Sigma Aldrich/R4130
L-Glutamine	Sigma Aldrich/56-85-9
Tripsin-EDTA	Sigma Aldrich/C-41000
Trypan Blue Boyası	Sigma Aldrich/72-57-1
WST-8 Reaktifi	Sigma Aldrich/96992
4',6-Diamidino-2- Phenylindole, Dihydrochloride	Invitrogen/ D1306
Fosfat-Tamponlu Salin	Sigma Aldrich/ P4417
Nutrient Agar	Sigma Aldrich/70148
Etil metan sulfonat (EMS)	Sigma Aldrich/ M0880

3.2 Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan *L. officinalis* (karayemiş, taflan) yaprağı örnekleri Kasım 2022'de Ordu ili Perşembe ilçesindeki *L. officinalis* ağaçlarının olduğu yeşillik alandan toplanmıştır. Toplanan *L. officinalis* yaprakları Ordu Üniversitesi'nde teşhis edildi. Temin edilen örneklerin yaprakları saf suda yıkanıp temizledikten sonra yaprakların yaş haldeki ağırlığı hassas terazi yardımı ile ölçüldü. Yapraklar yaş iken ağırlığı 156 gr geldi. Ardından yapraklar 1 gün oda koşullarında ve gölgede bekletildi. Daha sonra 37 °C'de 5 gün boyunca etüv cihazında bekletilerek kurutuldu. 5. günün sonunda etüvden alınan yapraklar tekrar hassas terazi yardımı ile kuru halde tartıldı. Kuru ağırlık 57,480 gr geldi.

Yaprakların yaş ve kuru haldeki ağırlık farkı hesaplandı ve fark 98,520 gr olarak bulundu. Ardından yapraklar ev tipi blender yardımıyla öğütüldü. Öğütülen yapraklar ekstraksiyon işlemi için hazır hale getirildi.

3.2.1 *Laurocerasus Officinalis* Yapraklarından Özüt Eldesi

L.officinalis yapraklarından özüt (LO) eldesi için Giresun Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı (GRUMLAB) kullanılmıştır. Laboratuvarında Soxhlet ekstraksiyonu ile yapraklardan özüt elde edilmiştir.

Bunun için yapraklar kurutulup toz haline getirildikten sonra bir selüloz kartuşa yerleştirildi ve ardından Soxhlet ekstraktörüne yerleştirildi. Etanol çözücü balon jojeye konuldu. Soxhlet ekstraktörü ve geri soğutucudan oluşan bir sistem kuruldu. Ekstraksiyon işlemi, etanolün kaynama noktasını aşan bir sıcaklıkta ($>78^{\circ}\text{C}$) gerçekleştirildi. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra (minimum 5 döngü), etil alkol, döner buharlaştırıcı kullanılarak çıkarıldı. Son olarak, yaprak ekstraktları bir vakum sistemi kullanılarak tamamen kurutuldu.



Şekil 3.1 *L. Officinalis* Yaprakları A) Kuru B) Özüt

3.3. Azot Katkılı Karbon Noktalarının (N-CD) Sentezi

Toksik olmayan ve çevre dostu N-CD'ler, karbon öncüsü olarak doğal biyomateryal *Laurocerasus officinalis* yaprak özütü kullanılarak "yukarıdan aşağıya" tek adımlı hidrotermal işlemi ile sentezlendi.

100 mL saf distile su içerisine 0,50 g *L. officinalis* yaprak özütü (LO) ilave edildi. Karışım 5 dakika karıştırıldı; daha sonra elde edilen karışım 100 mL teflon astarlı paslanmaz çelik otoklava aktarıldı. Urea ve karbon kaynağı olarak sitrik asit ilave edilerek 200°C 'de 4 saat etüvde ısıtıldı. Kahverengi dispersiyon içindeki süpernatant, bir diyaliz torbasında toplandı ve 2 saat boyunca ultra saf su içerisinde

diyaliz yoluyla saflaştırıldı. Ürün, oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve koyu kahverengi karışım, herhangi bir büyük partikülü çıkarmak için sırasıyla 0.45 um ve 0.22 um filtre membranı ile süzüldü. Son olarak, verimliliği hesaplamak ve daha fazla karakterizasyon için dondurularak kurutulma yöntemiyle CD'lerin tozu elde edildi.

3.3.1 N-CD'lerin Karakterizasyonu

Nanomalzemelerin toksik etkilerini etkileyen faktörler vardır. Bunlar, kullanılan malzemelerin boyutu, yükü, boyut yüzey yapısı, şekli, agregasyon durumu ve konsantrasyonu gibi faktörlerdir. *In vivo* veya *in vitro* tüm nanotoksikolojik çalışmalarda bu özelliklerin belirlenmesi gerekir.

Bu tez çalışmasında *L. officinalis* yaprak özütü (LO) kullanılarak sentezlenen *floresans* özellikli N katkılı karbon noktalarının (LO/N-CD) tüm ayırt edici özellikleri saptamak için Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), UV-Görünür Spektroskopisi analizleri yapıldı.

3.3.1.1 Ultraviyole-Görünür Spektroskopisi (UV-VIS) Analizi

Ultraviyole ve görünür ışık (UV-VIS) spektroskopisi, elektromanyetik spektrumun ultraviyole ve görünür aralıkları boyunca gelen ışığın numune tarafından emilmesi, yayılması ve iletilmesi ile birlikte ışık emilimini ölçmek için kullanılan bir metottur. Ultraviyole ve görünür ışık spektroskopisi (UV-VIS), radyasyon atomik uyarımı indükleyerek moleküllerin düşük enerjili temel durumdan daha yüksek enerjili uyarılmış durumlara geçişine neden olabilir. Bu süreçte, moleküller UV veya görünür ışık altında enerji emerler ve elektronlarının daha yüksek enerji seviyelerine çıkmasına yol açarlar. Bu durum, spektrometrede ölçülen spektral bantların oluşumunu sağlar ve molekülün yapısını ve özelliklerini incelemek için kullanılır.

Bu çalışmada sentezlenen CD'lerin her biri 200-600 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri UV-VIS spektroskopisinde (Shimadzu Marka, UVmini -1240 Model) ölçüldü.

3.3.1.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Fourier dönüşümle kızılötesi spektroskopisi (FTIR), kızılötesi ışığın dipol momente sahip bir malzeme ile etkileşime girdiğinde yapısındaki bağların titreşim hareketinin incelenen numune tarafından absorbe edilmesi prensibine dayanmaktadır.

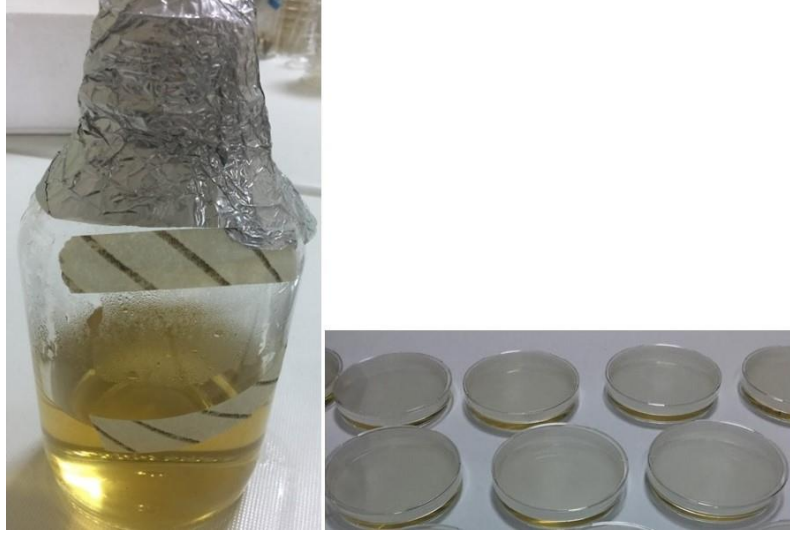
FTIR, kızılötesi ışığın absorpsiyonu nedeniyle kimyasal bağların esneme, bükülme gibi titreşimlerini ölçerek bir molekül veya bileşiğin yapısındaki bağlar hakkında tanımlayıcı bilgiler sağlar. CD'lerin ve bitki özütlerinin ölçümü FTIR analizi (Shimadzu Marka IRAFFINITY 1S Model) ile ortaya kondu. Bunun için CD ve bitki özütleri yaklaşık 2-4 mg numune alınarak karbon-kaplanmış bakır ızgara üzerine damlatıldı ve kuruması için oda sıcaklığında bir süre bekledikten sonra spektrumlar oluşturuldu.

3.3.1.3 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM), ultra ince bir numuneden geçen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibiyle çalışır. Milyon kat büyütme özelliği sayesinde numunenin kristal yapısı ve morfolojisi hakkında bilgi verir. CD'lerin parçacık boyutu 40-100 kV'luk hızlanma gerilimleri altında şekli 50-106x büyütmede 0.2 nm çözünürlük sağlayan analiz enstrümanı (JOEL Marka, JEM-1011 Model) ile görüntülendi. CD'lerin TEM görüntüleri elde etmek için hazırlanan CD solüsyonundan bir damla (8-10 µL) 50 Å kalınlığında ve 3 mm çapındaki numune üzerine yerleştirildi ve bir bakır ızgara muhafaza edildi. Her bir CD'un morfolojik yapıyı, çapı ve boyut dağılımını gösteren görseller TEM cihazından elde edildi.

3.4 LO özütü ve LO/N-CD'lerin Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Hazırlanan biyojenik LO/N-CD'lerin ve LO özütünün antimikrobiyal aktivitesi gram negatif, (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), gram pozitif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) ve mantar (*Candida albicans*) mikroorganizmalarına karşı değerlendirildi. Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için agar disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde bakterilerden hazırlanan standart süspansiyon ile kaplanmış agar plaklarına, belirli kapasitelerde antimikrobiyal madde içeren diskler yerleştirilir. Diskten gelen antibiyotik, çevredeki agarın içine yayıldıkça, bakteri oluşumunu inhibe eder. Diskler, agar ortamına difüzyon yoluyla oluşan durum olup bakterilerin bu duruma karşı direnç kapasiteleri etkilidir. Bu mekanizma sonucunda, disk etrafında bakterilerin çoğalamadığı belli olan bir inhibisyon alanı oluşur. Oluşan bu inhibisyon zon çapı ölçülerek, her antibiyotik için özel olarak belirlenmiş duyarlılıklardaki sınır değerleriyle karşılaştırılır.



Şekil 3.2 Besiyerlerinin Hazırlanması

3.4.1 Disk Difüzyon Yöntemi

Besiyeri steril bir cam şişeye 11.5 g Nutrient Agar (NA) tartılıp üzerine 500 ml distile su konularak 121 °C’de 30 dk boyunca sterilize edilerek hazırlandı. Otoklavdan alınan besiyeri 45-50°C’ye soğuması beklendikten sonra steril petri kaplarına homojen olacak bir şekilde döküldü. Katılaştıran agar üzerine swap yöntemi ile her bakteri ve mantar türünden 3 tekrerrür olacak şekilde 100 µL mikroorganizma 3 farklı yöne yayma plaka ile ekim yapıldıktan sonra steril boş antibiyotik blank diskleri penset yardımıyla yerleştirildi. Daha sonra LO özütü ve 20µl, 40µl ve 60µl konsantrasyonlarda LO/N-CD’ler ve steril distile su (negatif kontrol) 20 µL alınarak disklerin üzerine eklendi. Zon çaplarının etkilenmemesi için petriler bir süre yerinden oynatılmadı. Ardından petriler organizmanın optimum geliştiği sıcaklıkta (Bakteriler için 37 °C, funguslar için 25 °C) bakteriler için 24 saat, mantarlar için 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonrasında disk etrafındaki inhibisyon çap bölgesi temel alınarak zon çapları kumpas ile ölçüldü.

3.4.2 DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Tayini

Bu yöntem, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikalinin antioksidan madde tarafından tutularak mor renginin açıldıktan sonra spektrofotometrede ölçülmesine dayanır (Blois, 1958). Bunun için *L.officinalis* yaprak özütü bu özütten sentezlenen karbon noktaların (LO/N-CD) antioksidan aktivitesini belirlemek için her birinden 50, 100, 150, 200, 250, 300 ve 350 µL alınıp üzerlerine 4 mL 0,1 mM DPPH çözeltisi de eklendi. Daha sonra, karışımlar iyice vortekslendikten sonra oda

sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 517 nm absorbansta UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu Marka, UVmini-1240 Model) tarafından okundu. DPPH radikal süpürme deneyinde standart olarak BHT kullanıldı.

Numunelerin ve standartların % DPPH renk değişimleri aşağıdaki denklemlerle hesaplandı:

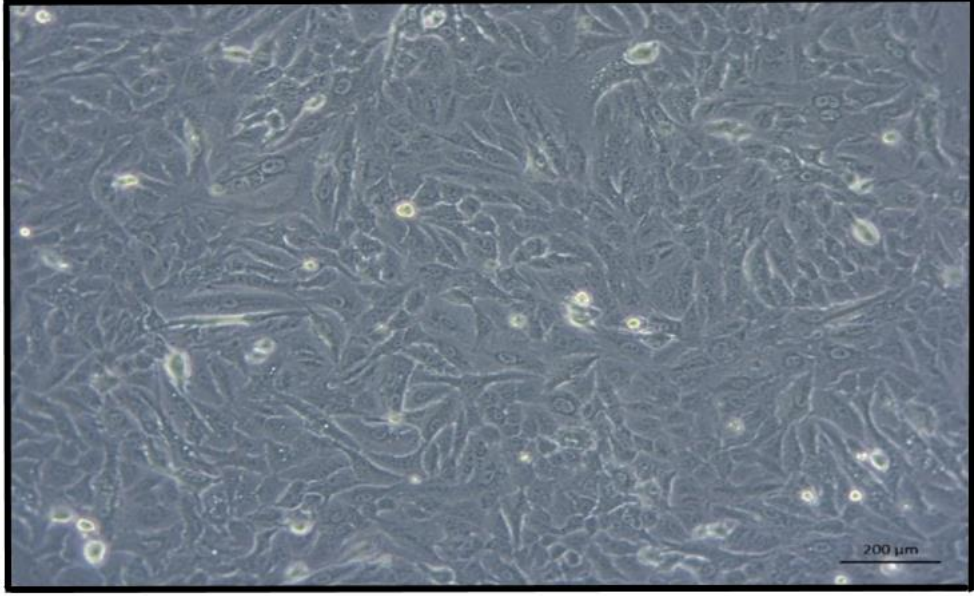
$$\% \text{ DPPH} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Numune}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

Burada kör (blank) kontrol reaksiyonunun absorbansdır (test bileşiği hariç tüm reaktifleri içerir) ve A numunesi, test bileşiğinin absorbansdır.

%50 inhibisyon sağlayan özüt konsantrasyonu (IC50), özüt konsantrasyonuna karşı inhibisyon yüzdesinin grafiğinden hesaplandı. Testler üç kopya halinde gerçekleştirildi.

3.5 A549 Hücrelerinde LO/N-CD'lerin Sitotoksisite Testi

Tez çalışmamızda kullandığımız A549 hücre hattı (ATCC® CCL-185™ akciğer epitelyal karsinoma hücre hattı A549) ATCC (Washington, DC, ABD) hücre bankasından temin edilmiştir. A549 hücrelerinin çoğaltılması ve sürdürülmesi için bu hücreler %1 penisilin-streptomisin + %10 Fetal Bovin serum (FBS) içeren RPMI-1640 besiyerinde kültürlenmiştir (Dağlıoğlu ve Kacı, 2020). Hazırlanan besiyerine ilave edilen A549 hücreleri 37°C derece sıcaklıkta, % 5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin canlılığı, çoğalması ve kontaminasyon durumu inverted mikroskopla gözlendi. Flasklardaki hücre yoğunluğu %80'i geçince hücreler pasaja alındı (Ayla ve ark., 2018).



Şekil 3.3 Kültürdeki A549 Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri (Büyütme Oranı: 40x)

3.5.1 Hücrelerin Ekimi ve Çoğaltılması

Hücreler sıvı azot tankından alındıktan sonra 37°C'deki su banyosunda 2-3 dakika tutularak çözünmesi sağlandı. Çözünen hücreler 5 mL DMEM High Glucose içerisine alınarak 300xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra tüpün alt kısmında toplanan hücrelere dikkat edilerek üstündeki sıvı atıldı.

Hücrelerin pasajlanması için DMEM High Glucose Besiyeri kullanıldı. Tam besiyeri içeriği DMEM + %10 FBS+ %1 L-Glutamine'dir. Hücreler T25 flasklarda 7 mL besiyeri içerisinde, T75 flasklarda 20 mL besiyeri değiştirildi. Sitotoksisite testi için kullanılacak hücreler % 65-75 konfluensiye ulaştığında zeminden kaldırıldı.



Şekil 3.4 Etüv Görüntüsü

3.5.2 Hücrelerin Kaldırılması

Çoğaltılan hücrelerin belirli bir yoğunluğa (konfluensiye) ulaştıklarında zeminden kaldırılmaları gerekmektedir. Bu aşama tripsinizasyon olarak da bilinir. Zeminden kaldırma işleminde aşağıdaki basamaklar sırasıyla uygulandı.

- 1–Çoğalmış hücrelerin üzerindeki besiyeri serolojik pipetle çekilerek atıldı.
- 2–Hücrelerin üzerine soğuk PBS eklendi ve yavaşça çalkalanarak PBS atıldı. (T25 Flask için 2 mL, T75 Flask için 5 mL)
- 3–İkinci basamaktaki işlem tekrarlandı.
- 4–Hücrelerin üzerine Tripsin-EDTA eklendi (Bu miktar genelde T25 Flask için 350-500 mikrolitre, T75 Flask için 750-1000 µL arasındadır).
- 5– Hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 3 dk inkübasyona bırakıldı.
- 6–Süre sonunda mikroskopta kontrol edilerek hücrelerin tamamen yüzer şekilde olması sağlandı. Zemine tutunan hücreler için toplam 5-6 dk inkübasyona devam edildi. İlk 3 dk bekleme sonrası hücreler her dakika başında kontrol edildi.
- 7–Hücreler tamamen zeminden ayrıldıktan sonra kullanılan tripsin miktarının en az 5, en fazla 10 katı kadar besiyeri kullanılarak hücrelerin buldukları flasktan yıkanarak santrifüj tüplerine alındı.
- 8– Hücreler 300xg’de 10 dakika santrifüj edildi.
- 9–Santrifüj sonrası tüpün dibindeki pellet kaldırılmadan yavaşça üstte bulunan sıvı atıldı.
- 10–Kalan hücre üzerine 1 mL besiyeri eklenerek sayım işlemine geçildi.

3.5.3 Hücrelerin Sayılması

Hücreler Tripan mavisi ile boyanarak sayım işlemi yapıldı. Bu amaçla 10 µL Tripan mavisi ile 10 c hücre solusyonu karıştırıldı ve Luna II otomatik sayım cihazında hücrelerin sayımı yapıldı.

3.5.4 Hücrelerin Dağıtılması

Sayım yapıldıktan sonra her kuyucuk başına 1×10^4 hücre gelecek şekilde tam besiyeri ile seyreltme yapıldı ve hücreler her kuyucukta 100 µL tam besiyeri içerisinde kuyulara dağıtıldı. Çalışmanın konsantrasyon sayısından bağımsız olarak pozitif

kontrol (toksikite kontrol), negatif kontrol (canlılık kontrol) kuyularına hücre içeren tam besiyeri eklendi. Dağıtım yapıldıktan sonra hücrelerin zemine tutunması için en az 24 saat beklendi. Süre sonunda yapılan kontrollerde hücrelerin her kuyucukta %70 konfluensiye ulaşmış olması beklendi, ulaşmadıysa bir gün (24 saat) daha inkübasyona devam edildi.

3.5.5 LO/N-CD'lerin Hazırlanması

Öncelikle stok LO/N-CD'lerin konsantrasyonu hesaplandı. Numuneleri dondurarak kurutan bir cihaz olan freeze-dry (Christ Alpha Plus)'da LO/N-CD'ler 24 saat boyunca cihaz da kurutuldu. Örnekler 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Homojen bir şekilde dağılması için bir sonikatör ile 20 dk sonikasyona tabi tutuldu. Bu işlem sonrasında kullanılacak konsantrasyonlar tam besiyeri ile seyreltilerek kullanıldı.

3.5.6 Ekstraksiyon ile Sitotoksikite Çalışmasının Başlatılması

Çalışmamızda sentezlediğimiz LO/N-CD'lerin 500-1,95 µg/konsantrasyon aralıklarında olacak şekilde çözelti konsantrasyonları hazırlandı. Uygun LO/N-CD konsantrasyonları literatür taramaları sonucunda belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla 96 kuyucuklu plaklara hücreler eşit sayıda eklendi, 24 saatlik hücre ölçümleri için pozitif kontrol, negatif kontrol ve kör (blank) deney grupları hazırlanarak aynı koşullarda inkübe edildi.

Belirli konsantrasyonlarda LO/N-CD eklenen hücreler inkübasyona bırakıldı ve sonrasında WST-8 analizi ile hücre canlılığı değerlendirildi. Hücreler konfluensiye ulaştıklarında üzerlerindeki tam besiyeri çekilerek atıldı. Bunun yerine daha önce gerçekleştirilen ekstraksiyonu tam besiyeri ile karıştırarak gerekli konsantrasyonlar hazırlandı ve hücrelerin üzerine pipetlendi. Daha sonrasında analiz edilinceye kadar hücreler 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.

3.5.7 Hücre Canlılığı Analizi (WST-8) Uygulanması

İnkübasyon süresinin bitimine 1 saat kala (yani 24 saat çalışmasında 23. saatte) kuyucuklardaki besiyerinin %10'u kadar (20 µl) WST-8 reaktifi kuyucuklara eklendi ve 90 dakika daha 37°C %5 CO₂ etüvde inkübasyona devam edildi.

3.5.8 Hücre Canlılığı Analizi (WST-8) Analizi

Ortalama 90 dk inkübasyon sonrası örnekler hemen ELISA reader cihazında 450 nm ve 630 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. IC50 değeri, LO/N-CD uygulanmamış kontrol hücrelerine kıyasla, test edilen LO/N-CD konsantrasyonunun absorbansında %50'lik azalma olarak tanımlandı (Sebaugh, 2011; Spiess ve Neumeyer, 2010). Her deney üç kez tekrarlandı ve elde edilen okuma sonuçları kaydedildi. Çıkan sonuçlar formüle edilerek % canlılık tespit edilir.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{(\text{Deney kuyucuğu} - \text{Blank})}{(\text{Negatif Kontrol} - \text{Blank})} * 100$$

3.6 A549 Hücrelerinde LO/N-CD'lerin Alımı

Sentezlenen karbon noktalarının (LO/N-CD) A549 hücrelerine alımı, konfokal mikroskobu kullanılarak 48 saatlik bir süre boyunca incelenmiştir.

3.6.1 Konfokal Analizi İçin Hücrelerin Lamele Alınışı

LO/N-CD'nin IC50 değeri hesaplandıktan sonra hücreler konfokal mikroskopisi ile görüntülenebilmesi için 6 kuyulu plate'ler kullanılmıştır. Her kuyucuğa steril edilmiş lamel eklendi. Hücrelerin ekimi daha önce bahsedildiği gibi 37°C sıcaklıkta, % 5 CO₂ ve nem inkübatörde IC50 konsantrasyonunda LO/N-CD besiyeri verilerek inkübe edildi.

3.6.2 Konfokal İnceleme İçin Boyama Protokolü Ve Görüntüleme

Analizde hücrelerin işaretlenmesi için 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride, Invitrogen, D1306 (DAPI) boyası kullanıldı. A549 hücre lameli oda ısısındaki steril fosfat tamponu (PBS, Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich: P4417) ile iki kez yıkandı. Sonrasında stok solüsyondan PBS içerisinde 300 nM olacak şekilde seyreltilen 300 µL DAPI ile hücrelerin üzeri kaplandı ve etkileşim için 5 dk beklendi. Daha sonra boya kalıntılarının uzaklaştırılması için 3 kez PBS ile yıkama yapılarak lam üzerine ters şekilde lamel yerleştirildi ve inverted tip konfokal mikroskopta (ZEISS LSM 800) görüntüleme yapıldı. Tüm işlemler ışıktan korunarak ve hücreler kurutulmadan gerçekleştirildi. Lamelin farklı bölgelerinden farklı büyütmelemlerde görüntüleme yapıldı ve DAPI boyasının dalga boyuna uygun lazer ile ışığa görüldüğü tespit edildi. Farklı büyütmelemlerde görüntü alınarak hem ışık mikroskobu hem de ışığa gözlenen filtre ile elde edilen görüntüler ayrı ayrı ve üst üste çakıştırılarak görüntüler elde edildi. Görüntüleme için eksitasyon dalga boyu: 358 nm

ve emisyon dalga boyu: 461 nm olacak şekilde uygun lazer ışınları (405 Diode) ve filtre ile 10x (kuru) ve 20x (F type immersion oil, Leica) objektifler kullanılarak görüntüleme ve analiz gerçekleştirildi ve fotoğraflar 20x objektif üzerinden çekildi.



Şekil 3.5 Konfokal Mikroskop

3.7 İstatistiksel Analizler

Tez çalışmasındaki antimikrobiyal antioksidan sitotoksisite aktivite deneyleri ayrı ayrı üç kez yapıldı. Deneysel sonuçlar ortalama değer \pm SEM (ortalamanın standart hatası) biçiminde ifade edildi. Verilerin istatistiksel anlamlılığını ve ilişkilerini belirlemek için Excel yazılımı tarafından tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve korelasyonlar yapıldı. ANOVA'da $p= 0,05$ kullanıldı, dolayısıyla p değeri 0,05'ten küçükse değerler anlamlı derecede farklı kabul edildi.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

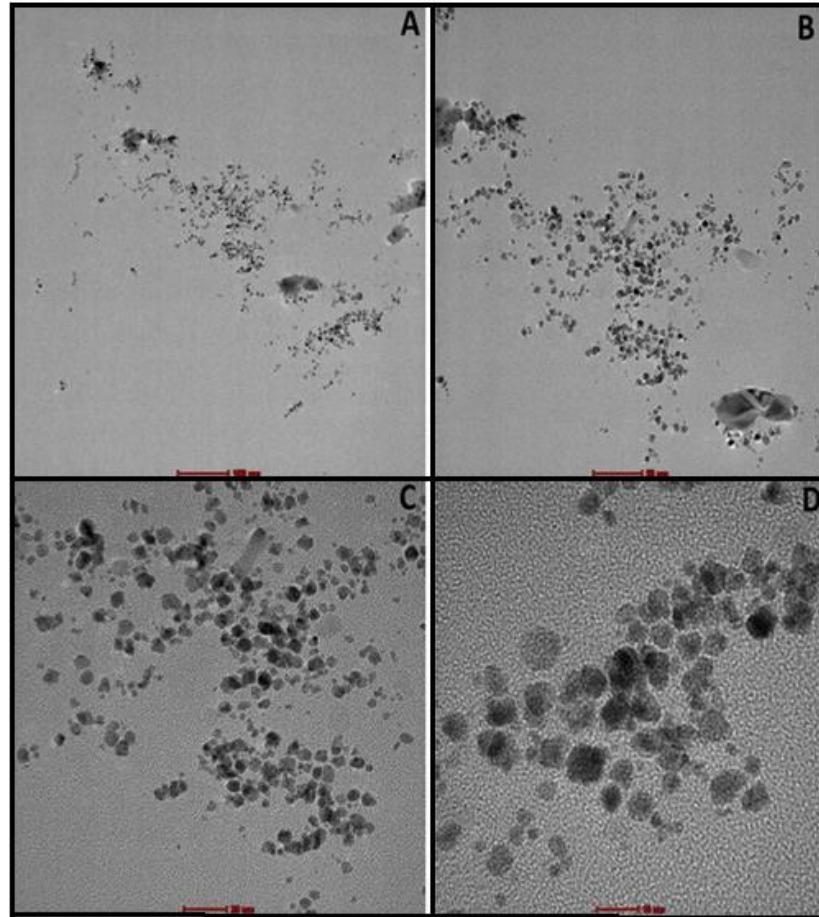
4.1 LO/N-CD'lerin Karakterizasyon

L. officinalis yaprak özütün kullanılarak hidrotermal sentez yöntemiyle sentezlenen azot katkılı karbon noktalarının (LO/N-CD) varlığını doğrulamak için çeşitli karakterizasyon yöntemleri kullandık.

4.1.1 LO/N-CD'lerin Morfolojisi

Hazırlanan LO/N-CD'lerin transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Sentezlenen CD'nin ölçülen boyut dağılımı $3,75 \pm 5,50$ nm'dir.

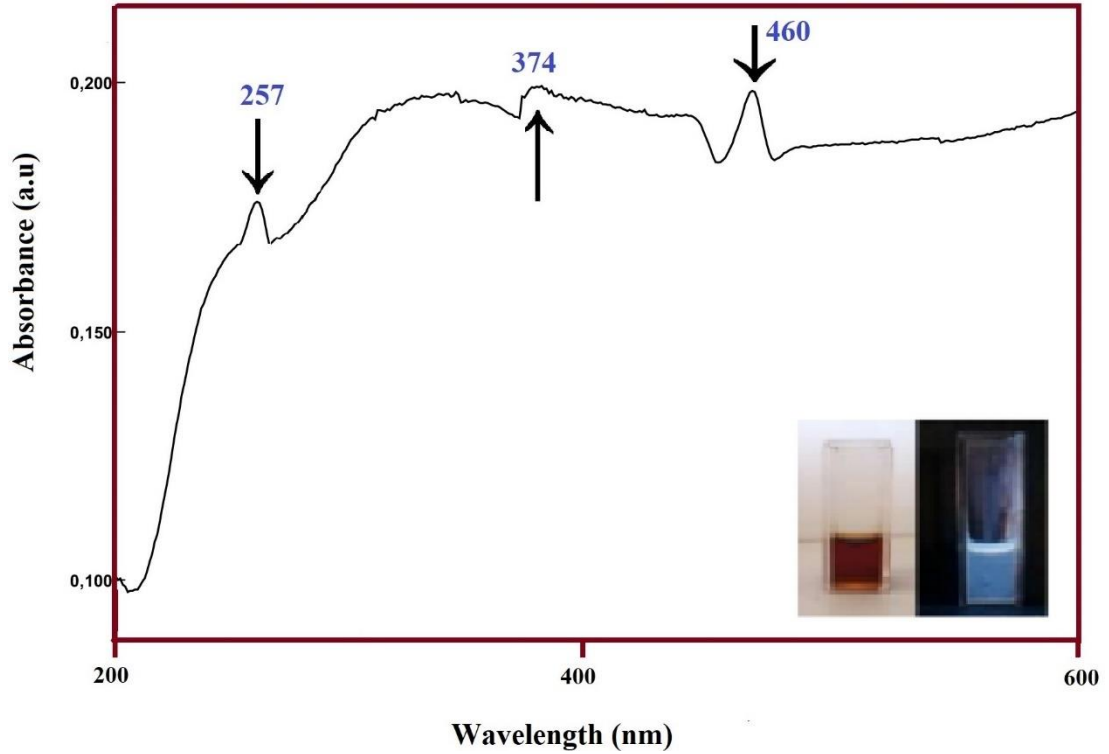
Şekil 4.1 (A ve B) LO/N-CD'lerin uzak mesafeden, (C ve D) yakın mesafeden TEM görüntüsüdür. LO/N-CD'lerin Şekil ortalama boyutu 3-5 nm'dir.



Şekil 4.1 Hidrotermal Yöntemle Sentezlenen LO/N-CD'lerin TEM Görüntüleri A)100 Nm B) 50 Nm C) 20 Nm D) 10 Nm

4.1.2 LO/N-CD'lerin Optik Özellikleri

Hidrotermal sentez yöntemiyle elde edilen LO/N-CD'lerin optik özelliklerini araştırmak için saf su içindeki normalleştirilmiş absorpsiyon spektrumu incelenmiştir. Şekil 4.2'de gösterildiği gibi UV-vis absorpsiyon spektrumunda 257, 374 ve 460 nm değerlerinde 3 pik gözlenmiştir. Spesifik olarak, 257 nm'deki pik, N-CD'lerin karbonize çekirdeğindeki aromatik alanların $\pi-\pi^*$ geçişine atfedilir (Mehta ve ark., 2015). 374 ve 460 nm'de hibritleştirilmiş farklı bantlar O, N atomlarının kenar fonksiyonel grup elektronlarının $n-\pi^*$ geçişine atfedilir (Mohammed ve Omer, 2020). LO/N-CD'ler, 374 nm'de UV-görünür absorpsiyon pikini gösterir ve yüzey durumlarının uyarılmış durum enerjisinin yakalanmasının, güçlü floresansa yol açabileceği düşünülür. 374 nm'deki pik CONH-bağından $n-\pi^*$ geçişine atfedilir. $n-\pi^*$ geçişi $-C=O-$ bağından kaynaklanır ve $-N-H$ bağı bu bandın kırmızıya kaymasına atfedilir. Şekil 4.2'nin iç görüntüsü LO/N-CD'lerin sulu çözeltilerinin reaksiyon öncesi ve sonrası görüntüsüdür. LO/N-CD'ler, şeffaf sarı bir dispersiyon oluşturacak şekilde suda kolayca dağılıbilir. UV ışınımı altında, CD sulu dispersiyonu mavi bir parlaklık yayar (Şekil 4.2 iç görüntü).



Şekil 4.2 Hidrotermal Yöntemle Sentezlenen LO/N-CD'lerin UV-Vis Görünür Spektrumu

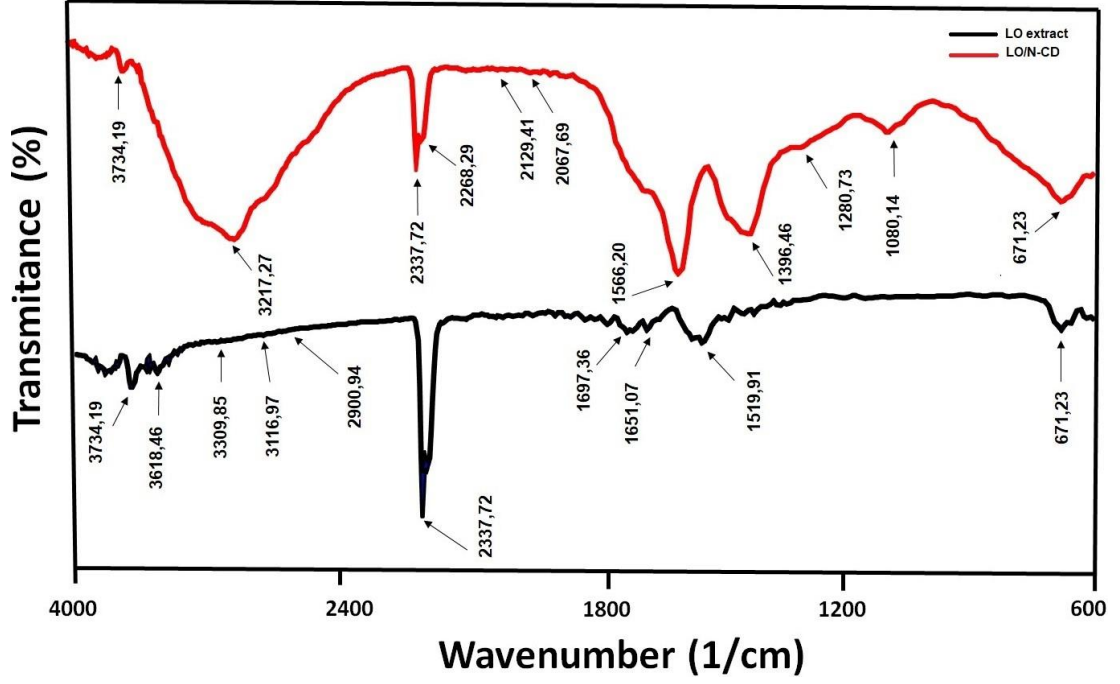
4.1.3 FTIR Spektroskopisi

Sentezlenen LO/N-CD'lerin ve LO özütünün yüzey fonksiyonel gruplarının tanımlanmak için FTIR spektroskopisi ile karakterize edildi. LO özütünün ve bundan elde edilen LO/N-CD'lerin FTIR spektrumu Şekil 4.3'de görülmektedir. FTIR spektrumuna göre LO/N-CD'ler 3734, 3217, 2337, 2266, 2129, 2067, 1566, 1396, 1280, 1080, 671 cm^{-1} ; LO özütü ise 3734, 3618, 3309, 3116, 2900, 2337, 1697, 1651, 1519, 671 cm^{-1} 'de belirgin bantlar vermişlerdir. LO/N-CD'lerin ve LO özütleri için FTIR profilleri 3734, 2337 ve 671 cm^{-1} 'deki bantlar sırasıyla O-H gerilme titreşimlerini, trigliseritlerin oksidasyonunun yan ürünü olabilecek CO_2 birikimini ve C-X gerilme titreşimlerini gösterir. Ancak LO/N-CD'lerin 2337 cm^{-1} 'deki bandı, LO özütünün bandından daha keskindir buda daha fazla oksidasyon olduğunu gösterir.

LO özütünün FTIR spektrumunun, 3309 ve 3116 cm^{-1} 'de alkollü hidroksilin (R-OH) gerilme titreşimi gösterdi. 2900 cm^{-1} 'deki küçük bant C-H gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. PO_4^{3-} gruplarının titreşim bantlarındaki bükülme ise 671 cm^{-1} olarak gözlemlendi. Titreşim bantları incelediğinde 1697 cm^{-1} ve 1651 cm^{-1} 'deki soğurma bandı NH_2 grupları kuvvetli bant göstermiş ve bu pikler sırasıyla ester karbonil (COOR) gruplarının ve karboksilat iyon germe bandının (-COO-) absorpsiyonuna atfedildi. 1519 cm^{-1} 'deki kuvvetli bant proteinlerden gelen amidli N-H gerilmesidir (Coates, 2000). 2900 cm^{-1} civarındaki absorpsiyon bantları alifatik CH_2 gruplarına ait C-H simetrik gerilme titreşimleridir.

LO/N-CD'lerinde gözlenen FTIR spektrumları, 3217 cm^{-1} 'de güçlü bant ortaya çıkardı ve bu, fenollerin ve alkollerin -OH ve N-H'nin simetrik ve asimetric gerilmesine atfedilebilir. 1566 cm^{-1} 'deki güçlü absorpsiyon bandı bant flavonoidlerin aromatik halka uzanımına ait ve - NH_2 ile amid (-C=O) bağlarının varlığını gösterir. Bu gözlem herhangi bir harici nitrojen kaynağı ilavesi olmadan N katkılı karbon noktalarının oluşumunu doğrulamaktadır. 1396 cm^{-1} 'deki karakteristik bant, doymamış alken yapısında (C=C) C-H'nin bükülme titreşimini gösterir. 1280 cm^{-1} 'lik bant, -C-N gerilebilir aromatik aminlerin varlığından kaynaklanmaktadır. 1080 cm^{-1} 'deki dar bant C-O- C'nin varlığı ve 671 cm^{-1} 'deki soğurma bandı C-X gerilme titreşimlerini göstermektedir. 2300-200 cm^{-1} 'de gözlenen zayıf bantlar nitril grubunun (-CN) varlığına bağlanabilir. Bu bulgular, sentezlenen LO/N-CD'lerin sisteme

mükemmel suda çözünürlük ve biyoyumluluk kazandıran hidroksil, karbonil ve amino grupları ile kendiliğinden işlevselleştğini göstermektedir.



Şekil 4.3 *L. Officinalis* Yaprak Özütü ve Bundan Sentezlenen N-CD'lerin FTIR Spektrumu

4.2 LO/N-CD'ler ile Yapılan Biyolojik Çalışmalar

4.2.1 LO Özütü ve LO/N-CD'lerin Antimikrobiyal Aktivite Tespiti

4.2.1.1 Disk Difüzyon

L. Officinalis yaprak özütü ile sentezlenen LO/N-CD'lerin ve LO özütlerinin antimikrobiyal özelliklerini analiz etmek disk difüzyon deneyi yapıldı. Şekil 4.4'te sunulan görsel bakterilerin ve mantar türünün disk difüzyon testinin sonuçları, gözlemlenebilir bir inhibisyon bölgesi gösterdi. Bu, LO/N-CD'lerin ve LO özütünün sahip olduğu antimikrobiyal özelliklerin etkinliğini gösterir. Çizelge 4.1'de test mikroorganizmalarına ait zon çapları verilmiştir. Buna göre gram negatif bakteride (*E.coli*) üreme gram pozitif bakterilerden ve mantar (*C.Albicans*) dan daha fazladır. Yine, LO özütünde üreme farklı konsantrasyonlarda/miktardaki LO/N-CD'lerden daha azdır.



Şekil 4.4 LO/N-CD, LO Özütü ve H₂O'nun Antimikrobiyal Aktiviteleri (A): 20µl LO/N-CD, (B): 40µl LO/N-CD, (C): 60µl LO/N-CD, (D): 20µl LO Özüt, (E): dH₂O

Çizelge 4.1'e baktığımızda, LO/N-CD'ler düşük konsantrasyonda az yüksek konsantrasyonda antibakteriyel etki göstermiştir. Bununla birlikte tüm konsantrasyonlarda en fazla *E. coli*'de antibakteriyel etki göstermiştir. LO özütü ise tüm bakterilerde aynı seviyede antibakteriyel etki göstermiştir. Antifungal aktivitesine baktığımızda ise, LO/N-CD'ler antifungal etkili olup en yüksek konsantrasyonda antifungal etkiyi artırmıştır.

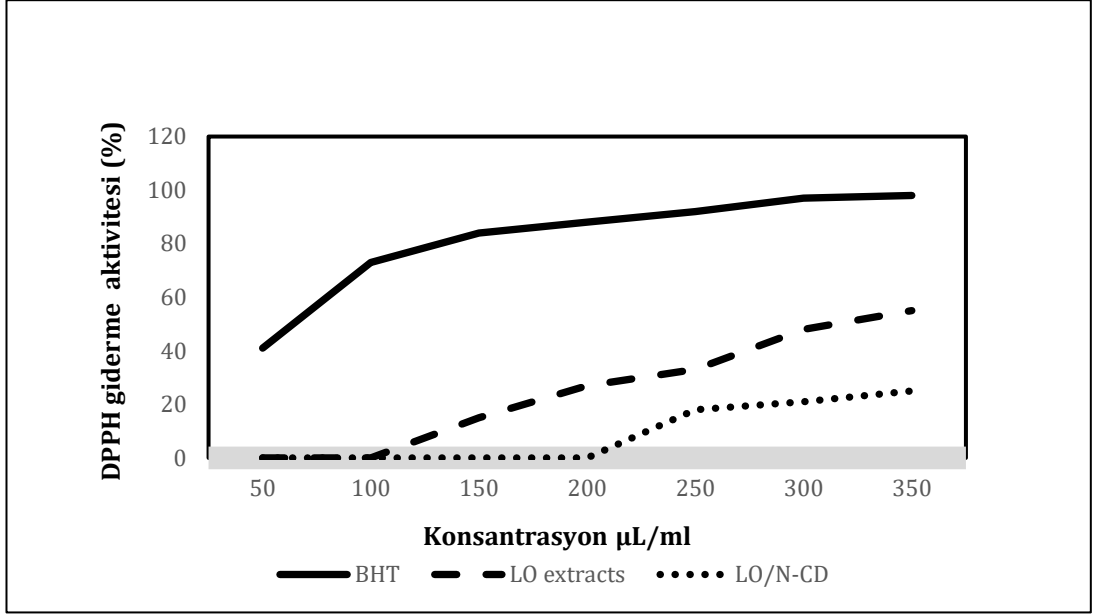
Çizelge 4.1 Mikroorganizmaların İnhibisyon Zon Çapları

Mikroorganizmalar	İnhibisyon Zon Çapları (mm)				
	20 LO/N-CD	40 LO/N-CD	60 LO/N-CD	LO Özütü	dH ₂ O
<i>S.Aureus</i> (+)	7	10,5	11,5	7	-
<i>B.Subtilis</i> (+)	7,5	9	10	7	-
<i>P.Aeruginosa</i> (-)	7	8,5	10	7	-
<i>E.Coli</i> (-)	8,5	11,5	13	-	-
<i>C.Albicans</i>	8	8	9	6,5	-

4.2.1.2 LO Özütü ve LO/N-CD'lerin Antioksidan Aktivite Analizi

L. Officinalis (LO) yaprak özütü ve bundan sentezlenen CD'lerin (LO/CD) antioksidan aktiviteleri DPPH analizi ile belirlendi. Bunun için numuneler 50, 100, 150, 200, 250, 300 ve 350 µL olmak üzere yedi konsantrasyonda hazırlandı. Standart olarak BHT kullanıldı ve numunelerin aktiviteleri BHT aktivitesi ile karşılaştırıldı.

Etanol ile hazırlanan DPPH çözeltisi mor renklidir. Çözeltiye eklenen numunelerin antioksidan aktivitesi varsa DPPH radikalini giderirler ve böylece mor rengi açılarak sarıya dönüşür. Eğer, renk ne kadar açılırsa absorbansı düşer. Bu durum yüksek antioksidan aktivitesi olduğunu gösterir. LO yaprak özütü ve LO/CD'lerin düşük konsantrasyonların DPPH radikalini giderme aktivitesi düşük iken, yüksek konsantrasyonların DPPH radikalini giderme aktivitesi yüksektir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 *Laurocerasus Officinalis* Özütü ve LO/N-CD'lerin DPPH Radikali Giderme Aktivitesi Değerleri

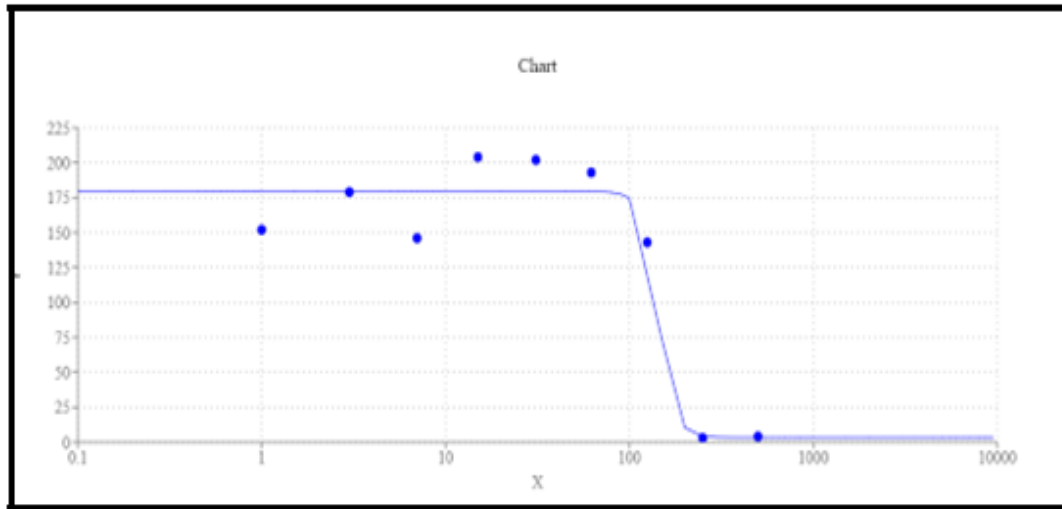
4.2.2 LO/N-CD'lerin Sitotoksite Tespiti

Bu tez çalışmasında, *Laurocerasus Officinalis* yaprak özütünün hidrotermal sentez yöntemiyle elde edilen LO/N-CD A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi WST-8 yöntemi ile ölçüldü ve hücre canlılığı üzerine etkileri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6'da verildi. 96 kuyulu kültür kapları kullanılarak planlanan 24 saatlik deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Kontrol gruplarında negatif kontrol gruplarında distile su pozitif kontrol gruplarında ise Etil metan sulfonat kullanıldı. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi A549 hücrelerine LO/N-CD'ler için 1,95-500 µg/mL aralığındaki 9 farklı konsantrasyon ile negatif ve pozitif kontrol grubu da dahil olmak üzere toplamda 11 grubun ölçümleri yapıldı.

Çizelge 4.2 LO/N-CD'lerin 24 Saatlik Çalışma Sonrası Absorbans Değerleri (ABS), Ortalama Yüzde Canlılıkları (ORT) ve Canlılık Değerlerinin Yüzde Standart Sapması

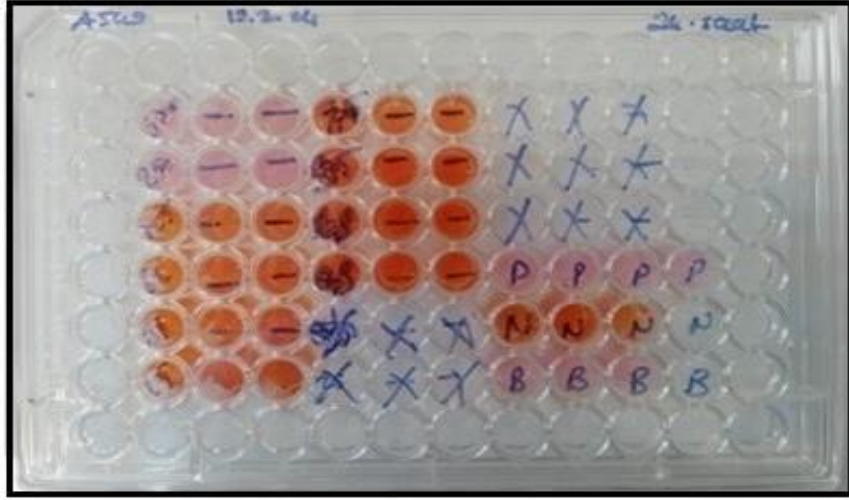
LO/N-CD dozları	ABS			ORT	STD
500 ug/mL	423	454	489	4,376	2,359
250 ug/mL	444	445	437	3,209	0,311
125 ug/mL	2,037	2,165	1,939	143,670	8,098
62.5 ug/mL	2,574	2,593	2,669	193,116	3,592
31,25 ug/mL	2,598	2,808	2,758	202,684	7,838
15,62 ug/mL	2,852	2,784	2,589	204,463	9,755
7,81 ug/mL	2.131	2,033	2,090	146,966	3,517
3,90 ug/mL	2,396	2,425	2,539	179,230	5,402
1,95 ug/mL	2,106	2,210	2,118	152,217	4,066
POZ	419	418	385	0,175	1,382
NEG	1,474	1,696	1,474	100,000	9,159
BLANK	416	401	399	0,000	0,664

* WST-8 sonuçları ortalama ve standart sapma (\pm) olarak verilmiştir. Hücre canlılığı negatif kontrole göre değerlendirildi. (-) kontrol olarak distile su, (+) kontrol olarak Etil metan sulfonat uygulandı.



Şekil 4.6 LO/N-CD'lerin A549 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkileri

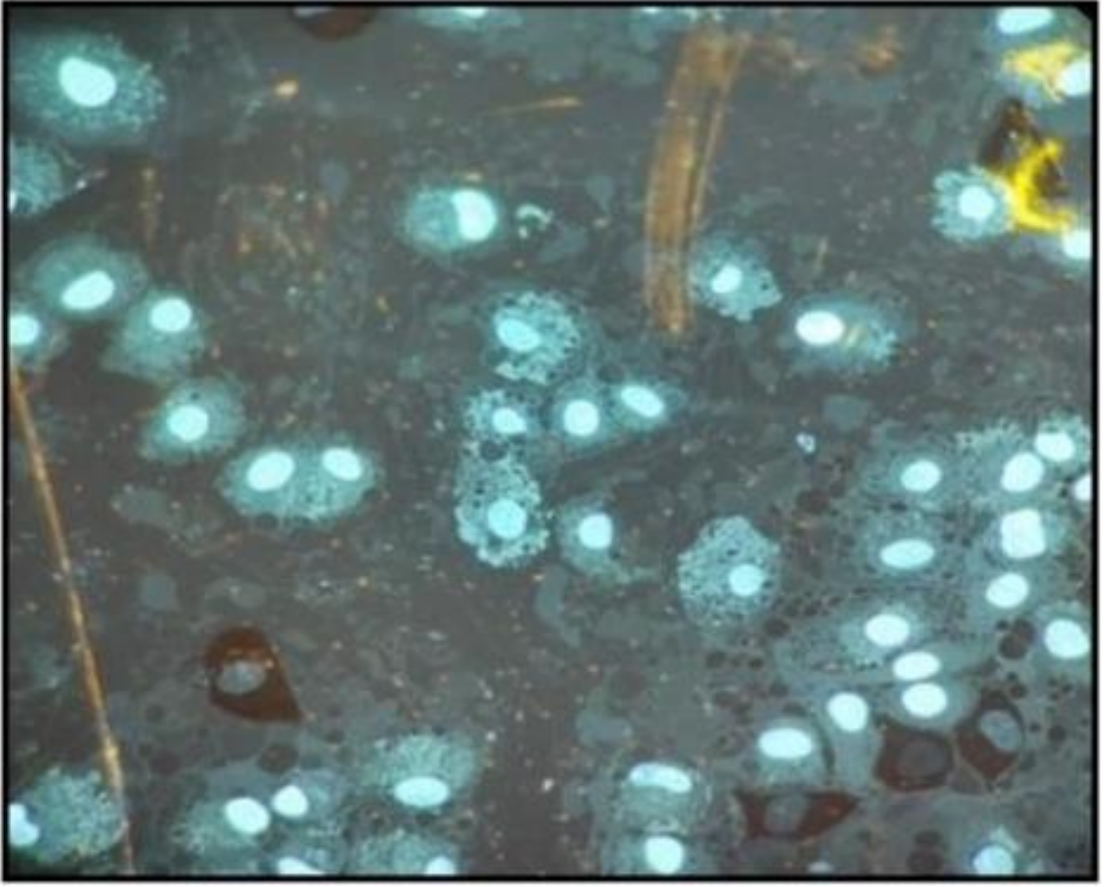
LO/N-CD'lerin 24 saatlik inkübasyon sonrası sitotoksik aktivitesi 1,95-500 ug/mL konsantrasyon aralığında, A549 hücreleri negatif kontrol distile su ile kıyaslandığında, önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı fakat doza bağımlı olarak 250-500 ug/mL konsantrasyonlarında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalttığı görülmüştür ($p < 0,05$). Bununla birlikte, LO/N-CD dozlarının sitotoksik aktivitesinin pozitif kontrol Etil metan sulfonat (EMS; Sigma Aldrich, M0880) dozlarına kıyasla yüksektir. LO/N-CD'ler için IC 50 dozu 143,8917 μ g/mL olarak belirlendi.



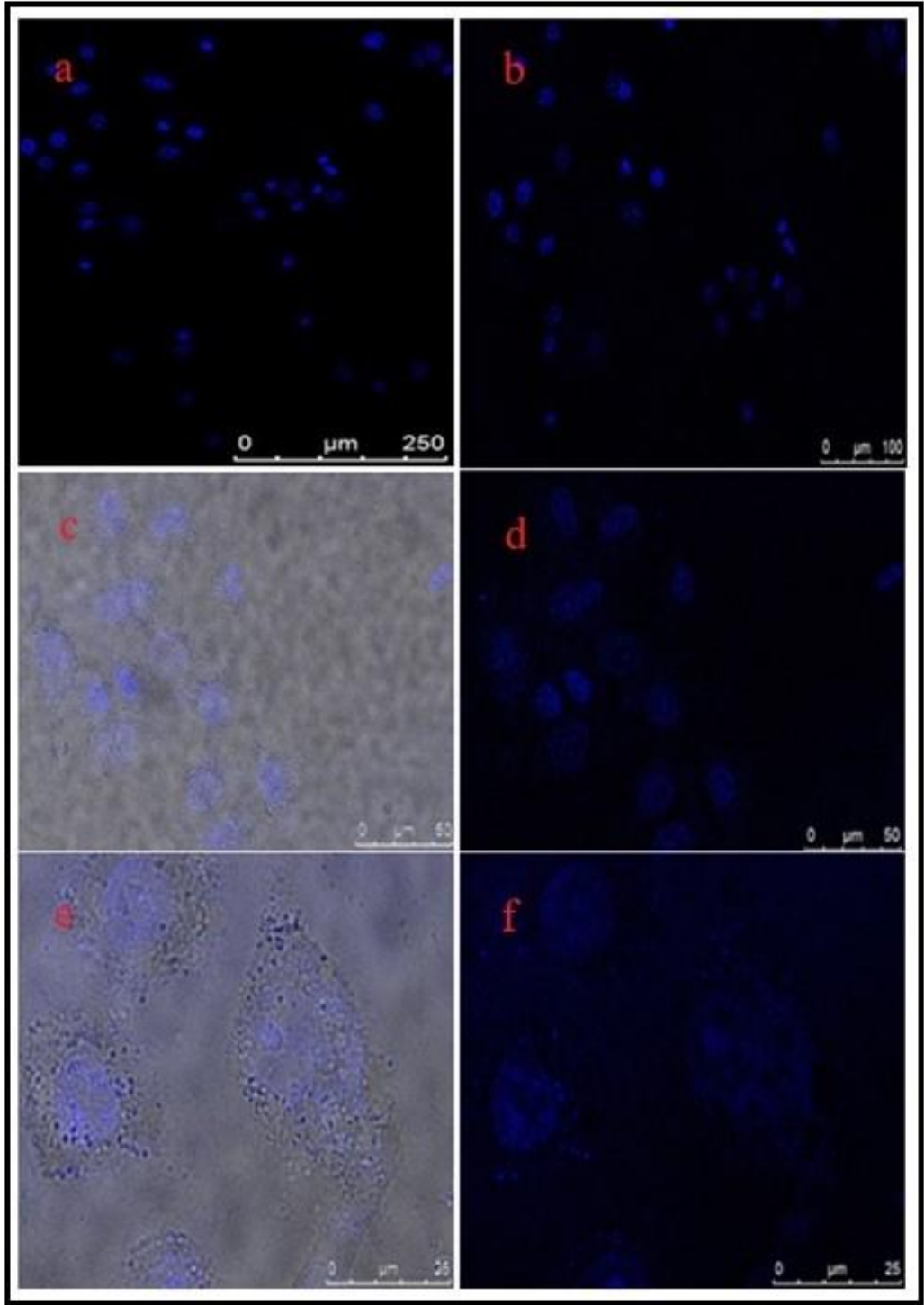
Şekil 4.7 LO/N-CD Uygulanmış Kuyucukların WST-8 Uygulaması Sonrası Görünümü

4.2.3 Konfokal Mikroskopi Yöntemi ile LO/N-CD'lerin A549 Hücre İçindeki Yerlerinin Belirlenmesi

Hidrotermal sentez yöntemiyle *L. officinalis* yaprak özütü ile sentezlenen LO/N CD'lerin nükleer lokalizasyonunu tespit etmek için A549 hücreleri 143,8917 µg/mL (IC50) konsantrasyonda LO/N-CD'i uygulandı. Bundan sonra hücreler metanol ile sabitlendi ve hücre çekirdekleri DAPI ile maviye boyandı ve hücre, konfokal mikroskopla yakalandı. Hücrenin çekirdeği DAPI ile boyandıktan sonra LO/N CD'lerle alınan görüntüler karşılaştırıldı. İmmüno Floresan görüntüleri, LO/N CD'lerin Şekil 4.8'de gösterildiği gibi çekirdeği hedeflediğini göstermektedir. Burada, DAPI ile boyanan çekirdek mavi görüntüde yakalanmıştır.



Şekil 4.8 A549 Hücrelerinin LO/N-CD ile Muamelesi Sonrasındaki Floresans Mikroskop Görüntüsü (10x Büyütme, 10µm Ölçek)



Şekil 4.9 461 nm lazer kullanılarak 48 saat boyunca 143,8917 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ile inkübe edilen A549 canlı hücrelerinin eş odaklı görüntüleri. Hücreler, konfokal mikroskopi kullanarak parlak alanları gözlemledi. Çekirdek DAPI (mavi) ile boyandı, karanlık alan ve mavi floresans görüntüleri birleştirildi a) bar 250 μm b) bar 100 μm , c-d) bar 50 μm ve e-f) bar 25 μm

4.3 Tartışma

Tez çalışmasında, *Laurocerasus Officinalis* yaprak özütünden hidrotermal yöntemiyle sentezlediğimiz karbon noktaları (CD), 10 nm'den küçük benzersiz yapı ve boyutlarda kimyasal, fiziksel, optik, elektronik vb. özellikler sergilemektedirler. Bu durum karbon noktalara biyoyumluluk, düşük toksisite, yüksek floresans şiddetli-kuantum verimi özellikleri ve işlevselleştirme kolaylığı sağlamaktadır.

Bitkiler, yeşil sentezde indirgeme ajanı ve organik madde kaynağı olarak tercih edilir. Bu nedenle, bu çalışmada karayemiş olarak da bilinen *L. Officinalis* yaprak özütleri fitokimyasal içeriğinin yüksek olması ve karbon noktalarının sentezinde karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. *L. Officinalis* yaprak özütü hidrotermal sentez yöntemiyle N (amin grubu-üre) katkılı karbon nokta (CD) yapıların biyolojik olarak indirgenmesinde kullanılmıştır. Sentez sonucunda bitki özütlerinde mor ve sarı renkten kahverengiye doğru bir renk değişimi görülmüştür. Bu renk değişiminin sebebi, bitki özütlerinde bulunan aktif moleküllerin karbon noktaları kararlı LO/N-CD'lere indirgemesinden kaynaklanmaktadır.

Son yıllarda, birçok bitki özütünün antimikrobiyal aktivitesi vurgulanmıştır. Bu bitkilerden biri olan Rosaceae familyasına ait olan *L. Officinalis* ve türleri sitotoksik, antimikrobiyal gibi çeşitli etkilerin olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. *L. Officinalis* bitkisi bu etkilerinin yanı sıra kolaylıkla bulunabilmesi ve sentezlenebilmesi nedeniyle tercih edilmiştir.

Karayemiş meyvesinin içerisinde, 75 kcal enerji, su, karbonhidrat, protein, glukoz, fruktoz, demir, C vitamini bulunmaktadır (TürKomp, 2024).

N-katkılı CD'ler, karbon açısından zengin ve moleküller arası H-bağı oluşturabilmelerinden dolayı suda iyi bir çözünürlüğe sahiptirler. Bu özelliklerinin yanında çalışmamızda stabiliteyi arttırmak için tercih edilmiştir.

L. Officinalis yaprak özütünden hidrotermal yöntemiyle sentezlediğimiz LO/N-CD seçmemizin amacı, akciğer kanser hücrelerini (A549) görüntülemesi ve kanser hücrelerini yok etmesidir.

Akciğer kanseri, hızla artan görülme sıklığı ve yüksek ölüm oranı nedeniyle tüm dünyada endişe kaynağıdır. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri'nde akciğer kanserinden ölüm oranı prostat, meme, kolorektal ve beyin kanserlerinden daha yüksektir. 2017 istatistiklerine göre; Amerikan Kanser Derneği'ne göre 2020 yılında yeni akciğer kanseri vaka sayısında ikinci sırada, ölüm sayısında ise ilk 10'da yer aldı (Siegel ve ark., 2020). Son yıllarda nanotıp platformları kanser hücrelerinin görüntülenmesinde (teşhis) ve tedavisinde kemoterapiye odaklanmıştır (Muhammad ve ark., 2021; Chen ve ark., 2021). Bu çalışmada sentezlediğimiz LO/N-CD'ler, oldukça küçük boyuta ve floresans özeliğe sahip olup tümör görüntüleme ve tümör hücrelerini yok etme amacıyla antineoplastik ajanlar olarak görev yapabilirler.

Bitkiler, yeşil sentezde indirgeme ajanı ve organik madde kaynağı olarak tercih edilir. Bu nedenle, bu çalışmada karayemiş olarak da bilinen *Laurocerasus Officinalis* özütleri kullanılmıştır. *L. Officinalis* yaprak özütü hidrotermal sentez yöntemiyle N (amin grubu-üre) katkılı karbon nokta (CD) yapıların biyolojik olarak indirgenmesinde kullanılmıştır. Sentez sonucunda bitki özütlerinde mor ve sarı renkten kahverengiye doğru bir renk değişimi görülmüştür. Bu renk değişiminin sebebi, bitki özütlerinde bulunan aktif moleküllerin karbon noktaları kararlı LO/N-CD'lere indirgemesinden kaynaklanmaktadır.

Hidrotermal yöntemle sentezlenen karbon noktaları farklı teknikler kullanılarak doğrulanmış ve karakterize edilmiştir. Sentez LO/N-CD'lerin morfolojisi, yüzey yükleri ve boyutları taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) tekniği ile karakterize edilmiştir. Optiksel özelliklerinin belirlenmesi için UV-Vis spektral analizi 200-600 nm aralığında gerçekleştirilmiştir.

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) inorganik ve organik malzemelerin (biyolojik ve nano yapıları malzemeler) eş zamanlı olarak kristal yapısının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Çalışmamızda TEM analizini sentez LO/N-CD'lerin yapısı hakkında bilgi edinmek için kullandık. TEM analiz verilerine göre, LO/N-CD'ler yaklaşık 3-5 nm boyutlarında monodispers dağılımlı ve küresel yapıda olduğu belirlendi.

Birçok literatürde karbon öcöleri olarak biyolojik materyal kullanımında başarılı CD'lerin sentezlendiği görölmektedir. Hidrotermal sentez yöntemiyle muz suyundan elde edilen CD'lerin küresel şekilli ve 1,5 nm - 4,5 nm arasında değişen dar bir boyut dağılımında olduğu TEM mikrograflarından doğrulanmıştır (De ve Karak, 2013). Karbon tozundan hazırlanan CD'lerin TEM görüntüsünde CD'lerin küresel morfolojide boyutunun ile 1,5 ile 6 nm (ortalama 4 nm) arasında olduğu kaydedilmiştir (Li ve ark., 2015). *Azadirachta indica* yaprakları kullanılarak sentezlenen CD'lerin HR-TEM görüntüsünde ortalama boyutlarının yaklaşık 3,5 nm agregat oluşturmayan, monodispers yapıda siyah küresel morfolojide olduğu görölmüştür (Gedda ve ark., 2023).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, birçok bitki özütünün antimikrobiyal aktivitesi vurgulanmıştır. Bu bitkilerden biri olan Rosaceae familyasına ait olan *L. Officinalis* ve türleri sitotoksik, antimikrobiyal gibi çeşitli etkilerin olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. *L. Officinalis* bitkisi bu etkilerinin yanı sıra kolaylıkla bulunabilmesi ve sentezlenebilmesi nedeniyle tercih edilmiştir.

Karayemiş meyvesinin içerisinde, 75 kcal enerji, su, karbonhidrat, protein, glukoz, fruktoz, demir, C vitamini bulunmaktadır (TürKomp, 2024).

N-katkılı CD'ler, karbon açısından zengin ve moleküller arası H-bağı oluşturabilmelerinden dolayı suda iyi bir özünörlüğe sahiptirler. Bu özelliklerinin yanında çalışmamızda stabiliteyi arttırmak için tercih edilmiştir.

Bitkiler, yeşil sentezde indirgeme ajanı ve organik madde kaynağı olarak tercih edilir. Bu nedenle, bu çalışmada karayemiş olarak da bilinen *Laurocerasus Officinalis* özütleri kullanılmıştır. *L. Officinalis* yaprak özütü hidrotermal sentez yöntemiyle N (amin grubu-üre) katkılı karbon dot (CD) yapıların biyolojik olarak indirgenmesinde kullanılmıştır. Sentez sonucunda bitki özütlerinde mor ve sarı renkten kahverengiye doğru bir renk değişimi görölmüştür. Bu renk değişiminin sebebi, bitki özütlerinde bulunan aktif moleküllerin karbon noktaları kararlı LO/N-CD'lere indirgemesinden kaynaklanmaktadır.

Karbon noktaların sentezlendiği farklı teknikler kullanılarak doğrulanmış ve karakterize edilmiştir. Sentez CD'lerin morfolojisi, yüzey yükleri ve boyutları taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve fourier

dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) tekniği ile karakterize edilmiştir. Optiksel özelliklerinin belirlenmesi için UV-Vis spektral analizi 200-700 nm aralığında gerçekleştirilmiştir.

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) inorganik ve organik malzemelerin (biyolojik ve nano yapıları malzemeler) eş zamanlı olarak kristal yapısının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Çalışmamızda TEM analizini sentez CD'lerin yapısı hakkında bilgi edinmek için kullandık. TEM analiz verilerine göre, LO/N-CD'ler yaklaşık 3-5 nm boyutlarında monodispers dağılımlı ve küresel yapıda olduğu belirlendi.

Birçok literatürde karbon öcülleri olarak biyolojik materyal kullanımında başarılı CD'lerin sentezlendiği görülmektedir. Hidrotermal sentez yöntemiyle muz suyundan elde edilen CD'lerin küresel şekilli ve 1,5 nm - 4,5 nm arasında değişen dar bir boyut dağılımında olduğu TEM mikrograflarından doğrulanmıştır (De ve Karak, 2013). Karbon tozundan hazırlanan CD'lerin TEM görüntüsünde CD'lerin küresel morfolojide boyutunun ile 1,5 ile 6 nm (ortalama 4 nm) arasında olduğu kaydedilmiştir (Li ve ark., 2015). *Azadirachta indica* yaprakları kullanılarak sentezlenen CD'lerin HR-TEM görüntüsünde ortalama boyutlarının yaklaşık 3,5 nm agregat oluşturmayan, monodispers yapıda siyah küresel morfolojide olduğu görülmüştür (Gedda ve ark., 2023).

L. Officinalis yaprak özütünden sentezlenen LO/N-CD'lerin optik özelliklerini değerlendirmek için UV-Vis absorpsiyonu kullanıldı. Çalışmamızda karbon noktalarda 257, 374 ve 460 nm değerlerinde pikler gözlenmiştir. 257 nm'deki pik, N-CD'lerin karbonize çekirdeğindeki aromatik alanların $\pi-\pi^*$ geçişine, 374 ve 460 nm'de pikler ise $n-\pi^*$ geçişine atfedilmiştir. Genel olarak, hidrotermal sentez yöntemiyle elde edilen karbon noktaların birçoğunda benzer pikler gözlenmiştir. Örneğin, nitrojen katkılı karbon noktaları polietilenimin varlığında sitrik asit ile hidrotermal işlem kullanılarak sentezlenene N-CD'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumu 360 ve 235 nm'de zirveler göstermiştir (Lu ve ark., 2016). Başka bir çalışmada, ürea'dan sentezlenen bor, azot katkılı karbon kuantum noktaları (B, N CQD'lerin) ve CQD'lerin UV-görünür spektrumu, 320 nm, 360 nm ve 430 nm'de üç absorpsiyon bandı göstermiştir (Mousa ve ark., 2023). Aserola suyunun karbonizasyon yöntemiyle

basitçe ısıtılmasıyla sentezlenen C noktaları ise 282 nm'de ortalanmış ve 343 nm'de omuzda belirgin bir UV-vis absorpsiyon bandı sergilemiştir. Araştırmacı bu absorpsiyon bantlarını sırasıyla C=C bağının $\pi-\pi^*$ geçişlerine ve C=O bağının $n-\pi^*$ geçişlerine atfetmiştir (Carvalho ve ark., 2019). Bu da karbon benzeri nanopartikül yapısının hidrotermal prosedür yoluyla elde edilmesine bağlamıştır (Zhuo ve ark., 2015).

Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, bitki özütü ve karbon noktalarında bulunan bileşikleri veya fonksiyonel grupları (kimyasal bağları) tanımlamak için önemli bir yöntemdir. Bununla birlikte FTIR, fonksiyonel grupları ayırt etmek ve tanımak için zaman kazandıran bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Grube ve ark., 2008). Şekil 4.3'de LO özütünün ve sentezlenen LO/N-CD'lerin yüzeyinde bulunan bileşenlerin ve fonksiyonel grupları gösterilmektedir. -COOH (karboksil) ve -NH₂ (amino) gibi hidrofilik fonksiyonel grupların varlığı, biyomedikal uygulamalar için uygunluğunu desteklemektedir. Bu fonksiyonel gruplar, moleküllerin suda çözünürlüğünü artırır ve yüzeylerinde hidrofilik etkiler oluşturur (Russo ve ark., 2007; Sarkar ve ark., 2017).

Çalışmamızda FTIR spektrumuna göre LO/N-CD'ler 3734, 3217, 2337, 2266, 2129, 2067, 1566, 1396, 1280, 1080, 671 cm⁻¹ belirgin bantlar vermişlerdir. 3217 cm⁻¹'deki güçlü bant orta fenollerin ve alkollerin -OH ve N-H'nin simetrik ve asimetrik gerilmesine atfedilebilir. 1566 cm⁻¹'deki güçlü absorpsiyon bandı flavonoidlerin aromatik halka uzanımına ait ve -NH₂ ile amid (-C=O) bağlarının varlığını gösterir. Bu, harici nitrojen kaynağı ilavesi olmadan N katkılı karbon noktalarının oluşumunu doğrulamaktadır. 1396 cm⁻¹'deki karakteristik bant, doymamış alken yapısında (C=C) C-H'nin bükülme titreşimini gösterir. 1280 cm⁻¹'lik bant, -C-N gerilebilir aromatik aminlerin varlığından kaynaklanmaktadır. 1080 cm⁻¹'deki dar bant C-O- C'nin varlığı ve 671 cm⁻¹'deki soğurma bandı C-X (X: halojen) gerilme titreşimlerini göstermektedir. 2300-200 cm⁻¹'de gözlenen zayıf bantlar nitril grubunun (-CN) varlığına bağlanabilir.

Bu bulgular, sentezlenen LO/N-CD'lerin sisteme mükemmel suda çözünürlük ve biyoyumluluk kazandıran hidroksil, karbonil ve amino grupları ile kendiliğinden işlevselleştiğini göstermektedir. Karbon nokta sentezinin yapıldığı diğer çalışmalarda

da benzer bantlar gözlenmiştir. Örneğin, Biçer ve Bilmişoğlu Biçer 2020 çalışmalarında kırmızı soğandan karbon kuantum noktaları sentezlemişler ve 3237 cm^{-1} 'de aromatik C-H gözlemişler ve Karbon kuantum noktalarının yüzeyinde -OH, -NH ve C-X gibi grupların bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu özellikleri sayesinde su içinde yüksek çözünürlüğe sahiptirler ve biyomoleküllerle etkileşerek bağlayıcı (linker) olarak kullanılacakları belirlenmiştir. Daha önceki yapılan çalışmalarda karboksilik grubun varlığı, 3450 cm^{-1} (O-H) karakteristik absorpsiyon bantları, 1651 cm^{-1} (C=O) gerilme titreşim bandı ve 1122 cm^{-1} (C-O) gerilme titreşim bantları ile doğrulandı (Zhu ve ark., 2012).

Ayrıca, N-H'nin titreşim ve deformasyon bantlarına atanan 1557 cm^{-1} 'deki bir keskin tepe ve $\text{-C}\equiv\text{N}$ olduğu varsayılan 2250 cm^{-1} 'deki küçük bir tepe, streptavidin için gerekli olan amino içeren fonksiyonel grupların varlığına işaret eder (Hsu ve Chang 2012; Liang ve ark., 2013).

Ayrıca, 1396 ve 671 pikleri karakteristik olup daha önceki karbon noktalarında 2924, 1391 ve 675 cm^{-1} 'deki üç bariz soğurma zirvesi sırasıyla C-H, C=C ve =C-H'nin gerilme ve bükülme titreşimleriyle ilişkili olduğu ve bu da alkil ve aril gruplarının varlığını göstermiştir (Roy ve ark. 2015).

Muktha ve ark., (2020)'de azot katkılı yeşil sentez karbon noktalarının, $3400\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ 'de güçlü bant -OH veya -NH gerilminden, $2200\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen zayıf bant nitril grubu ve $1550\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ 'deki güçlü absorpsiyon bandı, -NH₂ ile amid (-C=O) bağlarını göstermiştir. 1100 cm^{-1} 'de C-O-C'nin ve düzlem dışı -OH bükülmesinden dolayı ortaya çıkan 661 cm^{-1} civarındaki soğurma bandı gözlenmiştir.

Yao ve ark., (2018) yaptığı çalışmasında yine bizim çalışmamıza uygun olarak 1594 cm^{-1} 'deki bant N-H'nin bükülme titreşimini sergiliyordu.

Çalışmada kullanılan *L. Officinalis* (taflan) bitkisi Rosaceae familyasına aittir. Yaklaşık 100-120 cins ve 3000-4000 tür barındıran bir bitki familyasıdır. *Laurocerasus Officinalis* yaprakları şeker, tanen, kalsiyum, oksalat, emülsin, prunasin içerir.

Analiz sonucunda LO özütünün ve sentezlenen LO/N-CD'lerin FTIR spektrumlarının kendi aralarında benzer olduğu görülmüştür.

LO özütünün FTIR spektrumunun, 3309 ve 3116 cm^{-1} 'de alkollü hidroksilin (R-OH) gerilme titreşimi gösterdi. 2900 cm^{-1} 'deki küçük bant C-H gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. PO_4^{-3} gruplarının titreşim bantlarındaki bükülme ise 671 cm^{-1} olarak gözlemlendi. Bu durum LO/N-CD'lerin yapısına PO_4^{-3} gruplarının entegre olduğunu göstermektedir. Titreşim bantları incelendiğinde 1697 cm^{-1} ve 1651 cm^{-1} 'deki soğurma bandı NH_2 grupları kuvvetli bant göstermiş ve bu pikler sırasıyla ester karbonil (COOR) gruplarının ve karboksilat iyon germe bandının ($-\text{COO}-$) absorpsiyonuna atfedildi.

Bu durum, bazı NH_2 gruplarının kısmen LO/N-CD'lerin içine gömülmesinin sonucu olabilir. Ayrıca, LO özütünün spektrumunda yaklaşık 2920 cm^{-1} civarında bulunan CH_2 ve CH_3 gruplarına atfedilen germe bantları daha belirginken, LO/N-CD'de bu bantlar daha zayıf olarak gözlenmiştir. Ayrıca, yaklaşık 1742 cm^{-1} ve yaklaşık 3268 cm^{-1} piklerindeki iki zirve, LO özütünün fenolik bileşiklerden gelen C=O ve O-H gruplarını temsil etmektedir. Taflan özütleri, içerdikleri negatif yüklü gruplar nedeniyle LO/N-CD'lere göre daha düşük katalitik aktivite sergilemiştir. Bununla birlikte, yüksek katalitik aktivite, negatif yüklü gruplar ve Cu^{2+} iyonlarına sahip LO/N-CD'lerle ilişkilendirilmiştir. Bu negatif yüklü gruplar, Fenton benzeri reaksiyonlar aracılığıyla LO/N-CD'lerde Cu^+ iyonları oluşturarak substratı oksidasyona uğratabilir.

FT-IR analizinin sonuçları, polimerik hidroksil grubunun 3456 cm^{-1} , lipidin 1780–1708 cm^{-1} , ester karbonil-COOR ve karboksilat iyon gerilmesinin ($-\text{COO}-$) 1732 –1621 cm^{-1} , amid 1575 – 1480 cm^{-1} , proteinlerin CH_3 'ü 1455 cm^{-1} , fosforil 1350– 1188 cm^{-1} , P = O'su, simetrik olmayan C-O-C gerilmesi 1234 cm^{-1} , piranoid halkası 1100 – 1010 cm^{-1} , α -glikozit bağı ve β -glikozit bağı 818–92 cm^{-1} , SO_3 – simetrik germe 778.03 cm^{-1} , bromo bileşiği 690 – 550 cm^{-1} ve iyodo bileşiği 620 – 420 cm^{-1} varlığını gösterir.

1519 cm^{-1} 'deki kuvvetli bant proteinlerden gelen amid N-H gerilmesidir (Coates, 2000). 2900 cm^{-1} civarındaki absorpsiyon bantları alifatik CH_2 gruplarına ait C-H simetrik gerilme titreşimleridir. Rosaceae familyasına ait bitkilerle yapılan karbon nokta sentezlerinde LO özütüne yakın spektrumlar olduğu gözlenmiştir. Taflan meyve özütlerinin içerdiği PO_4^{-3} gruplarının titreşim bantlarındaki eğilme

1044 cm^{-1} , bükülme ise 557 cm^{-1} olarak gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda 1732 ve 1621 cm^{-1} 'lik absorpsiyon bantları sırasıyla ester karbonil (COOR) gruplarının ve karboksilat iyon germe bandının (COO) absorpsiyonuna atfedilmiştir (Zha ve ark., 2014).

Karayemiş tohumlarının 1640 cm^{-1} 'deki soğurma bantları, C=O grubunun gerilme titreşiminin varlığına işaret eder (Wang, 2018). Bu durum CD sentezinin başarılı olduğunu göstermiştir.

UV-VIS spektroskopisi, ultraviyole, morötesi ve görünür ışık bölgelerini kapsayan, organik moleküllerin, iyonların veya komplekslerin tanımlanmasında kullanılan bir yöntemdir. Spektrumdaki piklerin konumu ve bağıl yoğunluğu LO/N-CD konsantrasyonundan bağımsız olduğu görüldü.

Antimikrobiyal aktivite, bakteri ve fungusların üremesinin engellenmesiyle (inhibisyon) belirlenen bir yöntem olup antimikrobiyal ajanın bakteri türüne karşı *in-vitro* etkinliğini saptamak amacı ile uygulanan testlerdir. Büyüme inhibisyonu, CD'lerin yüzeyindeki pozitif yüklerin bakteri ve mantarların hücre zarlarındaki negatif yükler ile etkileşimi sonucu oluşan membran lizisi sonucu bakteri/mantar zarında fiziksel ve mekanik yırtılmanın tetiklenmesiyle sentez CD'lerin, bitki özütlerinin iç zarlara geçmesi yoluyla meydana gelir (Varghese ve Balachandran, 2021).

Bu tez çalışmamızda, antibakteriyel ve antifungal aktivitelerin sonuçları Çizelge 4.1'de sunuldu. Antimikrobiyal aktivite , dört farklı bakteri (iki gram pozitif – *S.aureus*, *B.subtilis*- ve iki gram negatif –*P.aeruginosa*, *E.coli*, - ve bir mantar – *C.albicans*-) kullanılarak ölçüldü ve test mikroorganizmaların üzerinde oluşturdukları inhibisyon çapları kaydedildi. LO/N-CD'lerin antibakteriyel etkisi LO/N-CD konsantrasyonundaki (mg/mL) artışla doğrusal olarak arttı; bu, LO/N-CD'lerin konsantrasyona bağlı bir şekilde bakterilerin büyümesini etkili bir şekilde engelleyebildiğini ortaya koyuyor. Bakterilerin zon çaplarına bakıldığında *S.aureus*, *B.subtilis* *P.aeruginosa*, *E.coli* ve *C.albicans*'ın en çok etkiyi 60 LO/N-CD'de gösterdiği görülmüştür. Kısaca, sentez CD'ler bakteriler üzerinde mantarlardan çok daha fazla etkilidir. Sentez CD'lere bitki özütleri mantarlardan ziyade bakterilerle daha çok antimikrobiyal etki göstermiştir. LO özütü ile karşılaştırıldığında sonuçlar, LO/N-CD'lerin, test edilen diğer mikroplara (*B. subtilis* ve *P. aeruginosa*) kıyasla E.

coli ve *S. aureus*'ın büyümesini daha etkili bir şekilde engellediğini ortaya çıkardı. İnhibisyon bölgesi tüm bakteriyel organizmalar için 6,5 ila 13 mm bu değerlerin ölçülmüştür. Bakteriyel hücre duvarının sentetik bileşikler ve CD'ler tarafından parçalanmasının ardındaki mekanizma, organizmanın ölümüne neden olan elektrolit kaybına bağlı olabileceği daha önce bildirilmişti (Jhonsi ve ark., 2016; Feng ve ark., 2013; Topalã ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda olduğu gibi yeşil sentez CD'lerin antibakteriyel etkisi bir çok çalışmada doğrulanmıştır. Bunlardan bir tanesi yeşil sentez yöntemi ile *Kombucha fungus* (Çay mantarı)dan sentezlenen kuantum karbon noktaları (CQD) olup 24 ve 48 saatte *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeuroginosa*'a karşı antibakteriyel etkisi göstermiştir (Turhan, 2023). Gedda ve ark., (2023), CD'lerin antibakteriyel ve antifungal aktivitelerde inhibisyon gösterdiğini ve bu etkinin bakteri ve mantarların hücre zarı ile etkisini ile membran lizisi sonucu olabileceğini doğrulamaktadır (Gedda ve ark.2023). Başka bir çalışmada, sentez floresan karbon noktalarının (TCD'lerin) antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. TCD'lerin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri, TCD konsantrasyonundaki artışla doğrusal olarak arttığını kaydetmişlerdir (Jhonsi ve ark., 2018).

Oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri (ROS) inflamatuvar süreçler, kanser ve hatta yaşlanma gibi patolojilerin bilinen ajanları olduğundan, farmakolojik uygulamalara sahip olabilecek biyouyumlu antioksidan malzemeler için büyük önem taşımaktadır (Scherlinger ve ark., 2021; Galadari ve ark., 2017). Antioksidanlar serbest radikalleri temizleme veya nötrleştirme yeteneğine sahiptir. Serbest radikal temizleme özelliğini değerlendirmenin etkili ve yerleşik bir yöntemi DPPH testidir. Serbest radikallerin varlığı DPPH'nin mor renkte görünmesine neden olur. Karbon noktalarının elektronik transfer ve eklenti oluşumu gibi iki ayrı mekanizmanın kombinasyonu yoluyla serbest radikalleri temizleme yetenekleriyle iyi bilinmektedir (Beuerle ve ark., 2008; Okuda ve ark., 2000). Antioksidan aktiviteye sahip CD'lere DPPH eklendiğinde, hidrojen/radikal ilavesinden dolayı renk sonunda sarıya dönüşür. CD'lerin H⁺ iyonlarını bağışlama yeteneği COOH, OH/NH₂ yüzey fonksiyonel gruplarının varlığına dayanmaktadır. Bu, 30 dakikalık bir inkübasyon süresinden sonra gözlenen, 517 nm'de yoğunluk azalmasıyla sonuçlanır. Çalışmamızda LO/N-CD'lerin antioksidan aktivitesi 50, 100, 150, 200, 250, 300 ve 350 µl olmak üzere 7 farklı konsantrasyonlarda değerlendirilmiştir. Sentez LO/N-CD'lerin antioksidan aktivitesi

düşük konsantrasyonlarda (50-150 µl) gözlenmemiştir. 200 µl'de konsantrasyonda hızla artmış ve mordan soluk sarıya renk dönüşümü eşlik etmiştir. 250 µl'den sonra stabil kalmış ve bu konsantrasyondan sonra sarı renk çok hafif bir şekilde açılmıştır. Son zamanlarda, N-katkılı CD'lerin antioksidan aktivitesi yani radikal temizleme aktivitesi, zengin amino yüzeylerine atfedildi. (Lim ve ark., 2015). Çok sayıda rapor CD'lerin etkili antioksidanlar olarak kullanılabileceğini kanıtlamıştır (Ji ve ark., 2019). Domates suyundan elde edilen CD'lerin (TCD) antioksidan aktivitesi 4 ila 20 ppm arasında değişen beş farklı CD konsantrasyonu test edilmiş ve TCD'ler en düşük konsantrasyonda bile güçlü bir inhibisyon gösterdiği kaydedilmiştir (Rodríguez-Varillas ve ark., 2022). Başka bir çalışmada *Azadirachta indica* yapraklarından sentezlenen CD'lerin antioksidan aktivitesi farklı konsantrasyonlarda (5-50 µg/mL) değerlendirilmiştir. Bu CD'lerin serbest radikal aktivitesinde %16'dan %77'ye kademeli bir artış göstermiş artan konsantrasyona mordan soluk sarıya renk dönüşümü eşlik ettiği rapor edilmiştir (Gedda ve ark., 2023). Başka bir çalışmada, doğal öncü olarak sarımsak kullanılarak 200 °C'de hidrotermal sentez yoluyla hazırlanan S ve N katkılı C noktalarının elverişli radikal temizleme aktivitesi rapor edilmiştir. Bu C-noktaları serbest radikalleri birkaç dakika içinde söndürmüş ve doza bağımlı aktivite göstermiştir (Zhao ve ark., 2015). Hurma pekmezinden yaklaşık pH 11'de mikrodalga ışınlamıyla sentezlenen karbon nano-noktalarının antioksidan aktivitesi standart antioksidan moleküllerin (BHT ve L-askorbik asit) temizleme aktivitesiyle karşılaştırılabilir nitelikte olduğu rapor edilmiştir (Das ve ark., 2014). Karbon kaynağı olarak *Thymus vulgaris* L. esansiyel yağından tek aşamalı hidrotermal koşullar altında yeşil, düşük toksisiteli ve iyi biyouyumluluğa sahip floresan karbon noktaların (CD'ler) doğal antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir (Bayat ve ark., 2019). Doğal ürünlerden C noktalarının doğrudan sentezlendiği çalışmalarda serbest radikal temizleme özellikleri genel olarak iyi tanımlanmış olsa da, mekanizmanın kapsamlı bir analizi ve açıklaması nadiren rapor edilmiştir.

CD'lerin sitotoksitesisi, farklı memeli hücre hatları ve farklı CD kompozisyonu ve yüzey işlevselleştirmesi kullanılarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Wang, 2015; Wang 2011; Li ve ark., 2014). CD'ler doğası gereği sitotoksik olmadığı ve bu nedenle çeşitli biyomedikal uygulamalar için uygun olduğu kabul edilmiştir (Wang 2011).

Çalışmamızda sentezlediğimiz LO/N-CD'lerin sitotoksitesini A549 hücreleri üzerinde kolorimetrik WST-8 yöntemi ile test edildi. Hücreler, 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125 ve 500 µg/mL CD çözeltisi konsantrasyonlarıyla uygulandı. Hücre canlılığı analizi, LO/N-CD'lerin, A549 hücrelerinin büyümesini doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde inhibe etmiştir. Çizelge 4.2'de, LO/N-CD'ler çok düşük konsantrasyonda (1.95 µg/mL) 125 µg/mL'ye kadar çoğalmayı uyardı; bundan sonra artan konsantrasyonla canlılık azaldı. LO/N-CD'lerin görünürdeki düşük toksisitesi, LO/N-CD'lerin 100 µg/mL'den başlayan IC50 değerleri sergilediğini gösteren önceki çalışmalarla tutarlıdır. Bu, LO/N-CD'lerin düşük sitotoksitesini ve yüksek biyouyumluluğunu gösterir ve hücre içi görüntüleme için kolaylığını sağlar. 24 saat sonra elde edilen wst-8 sonuçları, konsantrasyon arttıkça hücre canlılığının azaldığını gösterdi.

Literatürde, CD'lerin konsantrasyona bağlı toksisitesi birçok çalışmada gösterilmiştir. Tiyoüre ve Sitrik asit ile hazırlanan sülfür ve nitrojen katkılı karbon noktaların sitotoksitesini A549 hücreleri üzerinde 24 saatlik etiketlemeden sonra kanser hücrelerinin canlılığı kolorimetrik MTT yöntemiyle test etmişlerdir. CD'ler 0,1 µg/mL (düşük konsantrasyonda) 10 µg/mL'ye kadar hücrelerin çoğalmasını artırmış, fakat yüksek konsantrasyonlarda canlılığın azaldığını kaydetmişlerdir (Kavuranpala, 2021). Başka bir çalışmada mikrodalga destekli yöntemle sentezlenen Ag@CD'lerin sitotoksitesini, HeLa hücre hatlarına karşı MTT testi ile belirlendi. Ag@CD'ler yaklaşık $50 \pm 1:0$ µg/mL IC50 değeri (%50 hücre ölümünün gözlemlendiği konsantrasyon) ile HeLa hücrelerinde en yüksek inhibisyonunu gösterirken, yaklaşık $180 \pm 0:5$ µg/mL değeriyle minimum toksisiteyi göstermiştir. Sitotoksite çalışmaları Ag@CD'lerin antiproliferatif etkisini doza bağlı bir şekilde gösterdiği kaydetmişlerdir (Priyadarshini ve ark., 2022). Burada, ışıkla ışınlanmış laboratuvarında sentezlenmiş CD'lerin hem normal (HEK293 böbrek epitel hücreleri) hem de kötü huylu (HeLa rahim ağzı kanseri hücreleri ve HepG2 hepatoselüler karsinoma hücreleri) insan hücreleri için toksik olan moleküllere dönüştüğü kaydedilmiştir (Liu ve ark., 2021). Araştırmacılar sentez, floresan karbon noktalarının (TCD'lerin) sitotoksitesini araştırmak için, TCD'lerin L6 normal sıçan miyoblast hücrelerinin yanı sıra MCF 7 insan meme karsinomu hücrelerine (500 µg/mL) yönelik maksimum inhibitör konsantrasyonunu (200 µg/mL) inceledikleri çalışmalarında TCD'lerin, 48 saat sonra

L6 hücrelerinin büyümesini engellemediğini kaydetmişlerdir. Bu TCD'lerin biyoyumlu yapısını kanıtlamıştır (Jhonsi ve ark., 2018). *Thymus vulgaris* L. den sentezlenen CD'lerin 1400 mg/L'de hücreler için yaklaşık %76 canlılığı muhafaza eden hücrelerle düşük sitotoksosite sergilediğini göstermiştir (Bayat ve ark., 2019). Genel olarak, hem bizim sentezlediğimiz CD'lerde hem de literatürde biyolojik materyallerden sentezlenen CD'lerin hücrelerle biyoyumlu olduğu ve biyomedikal uygulamalar için güvenli olduğu yönünde ön izlenim vermiştir.

Son yıllarda, karbon noktaları düşük maliyet, iyi biyoyumluluk, kolay yüzey modifikasyonu, zengin renkler ve uyarım dalga boyuna bağlı fotoluminesans davranışları gibi çekici özelliklerinden dolayı yakın zamanda önemli floresan nanomalzemeler olarak ortaya çıkmıştır (Sun ve ark., 2006). Bu özelliklerinden dolayı, karbon noktalar çoğunlukla floresans görüntüleme, özellikle de biyogörüntüleme için kullanılır. Biyolojik arka planın mavi otofloresansı ve ultraviyole veya mavi ışığın uyarım için yıkıcılığı nedeniyle, mavi yayan karbon noktalarının biyogörüntüleme uygulanması zordur. Bu nedenle yüksek fotoluminesans emisyonu ve düşük sitotoksosite ile kırmızı floresans yayan karbon noktalarının sentezi, biyomedikal uygulamalarda yüksek kalitede biyogörüntüleme elde etmek için önemli bir yere sahiptir (Fan ve ark., 2016; Liu ve ark., 2019).

Bu amaçla, *Laurocerasus Officinalis* yaprak özütü kullanarak sentezlediğimiz LO/N-CD'lerin hücre içi lokalizasyonunu tespit etmek için A549 hücreleri, IC50 konsantrasyonu uygulandı. Bu CD'lerin ışık saçılma özellikleri, parlak bir mercekle kullanılarak konfokal mikroskopla görüntülendi. İmmüno Floresan görüntüleri, LO/N-CD'lerin Şekil 4.8'de gösterildiği gibi çekirdeği hedeflediğini göstermektedir. DAPI ile boyanmış çekirdek mavi renktedir.

Bir çalışmada, hücre görüntüleme için kullanılmak amacıyla sitrik asit ve tiyoüre ile nitrojen ve sülfür katkılı karbon noktalar sentezlendiği çalışmada karbon noktalar uygulanan A549 hücrelerinin canlı hücre görüntülemesi 3 saat inkübasyondan sonra, karbon noktaların çekirdeğine taşındığı DAPI boyama ile konfokal mikroskopunda kanıtlanmıştır (Kavuranpala, 2021). Başka bir çalışmada, pfenilendiamin ve sisteamin hidroklorür kullanarak 160 derecede 16 saatte N, S-CD'yi sentezledirler. Bu sentez CD'leri MCF-7 hücrelerinde in vitro hücre alım yoluyla 405 nm lazerle

uyarıldığında parlak sarı-yeşil emisyon gösteren, minimum sitotoksositeye ve mükemmel biyouyumluluğa sahip karbon noktalarını konfokal mikroskobu ile görselleştirdiler (Zhang ve ark.2018).

Jiang ve arkadaşları o-fenilendiamin (oPD), m-fenilendiamin (mPD) ve p-fenilendiamin (pPD) kullanarak solvotermal yolla farklı bölgelerde iyon yayan çok renkli CD'leri sentezlemeyi başardılar. Bu farklı nitrojen katkılı CD'ler, düşük sitotoksosite ve tek dalga boyu uyarımı altında hücrel görüntüleme için kullanılmıştır. Ayrıca bu karbon noktaları, 405 nm lazer uyarımı sonucunda konfokal mikrograflarla MCF-7 hücrelerinin sitoplazmik bölgelerinde olduklarını kanıtlayan biyogörüntüleme gerçekleştirdi (Jiang ve ark., 2015).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ülkemizin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde doğal olarak yetişen *Laurocerasus Officinalis* bitkisi karbon kaynağı olarak kullanıldı. Bu bitkilerden elde edilen özütler kullanılarak ilk kez hidrotermal sentez yöntemi ile floresans özellikli azot (amin grubu-üre) katkılı karbon nokta yapıları (LO/N-CD) başarılı bir şekilde sentezlendi. *Laurocerasus Officinalis* bitkisinin birçok karbon kaynağına kıyasla ekonomik olması, kolay ulaşılabilir olması, uzun ömürlü bitki türü olması, antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik etkileri olması açısından oldukça önem taşımaktadır.

Sentezlenen karbon noktaların yaklaşık boyutlarının 3-5 nm arasında olduğu TEM ile belirlendi.

Optiksel özelliklerinin belirlenmesi için yapılan UV-VIS absorpsiyon ölçümlerinde 257, 374 ve 460 nm değerinde 3 pik gözlenmiştir. 257 nm'deki pik, N-CD'lerin karbonize çekirdeğindeki aromatik alanların $\pi-\pi^*$ geçişine, 374 ve 460 nm'de pikler O, N atomlarının kenar fonksiyonel grup elektronlarının $n-\pi^*$ geçişine atfedilmiştir. Ayrıca, bu piklerin sentez karbon noktaların yapısında bulunan LO/N-CD konsantrasyonundan bağımsız olduğu görüldü.

FT-IR Spektrofotometresi yapısal karakterizasyonu sonucunda yapıda C-O-C, N-H, O-H, C-H, C-N C-C ve C-O gruplarının bulunduğunu ve karbon noktal sentezinin başarılı olduğunu gösterdi. Sentezlenen LO/N-CD'lerin sisteme mükemmel suda çözünürlük ve biyoyumluluk kazandıran hidroksil, karbonil ve amino grupları ile kendiliğinden işlevselleştiğini göstermektedir.

Antimikrobiyal aktivite sonuçlarında gram negatif bakteride (*E.coli*) üreme gram pozitif bakterilerden ve mantar (*C.Albicans*) dan daha fazladır. Yine, LO özütünde üreme farklı konsantrasyonlarda/miktardaki LO/N-CD'lerden daha azdır. LO Özütüne Gram negatif bakteride (*E.coli*) duyarlılık yoktur.

LO yaprak özütü ve LO/CD'lerin antioksidan aktiviteleri DPPH analizi ile 50-350 μ L konsantrasyon aralığında ölçüldü. LO yaprak özütü ve LO/CD'lerin düşük konsantrasyonların DPPH radikalini giderme aktivitesi düşük iken, yüksek konsantrasyonların DPPH radikalini giderme aktivitesi yüksektir.

LO/N-CD A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi 24 saatlik inkübasyon sonrası 1,95-500 ug/mL konsantrasyon aralığında WST-8 yöntemi ile belirlendi. LO/N-CD'lerin doza bağımlı olarak 250-500 ug/mL konsantrasyonlarında (yüksek konsantrasyonlarda) hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalttığı görülmüştür ($p < 0,05$). Bununla birlikte, düşük LO/N-CD dozlarının sitotoksik aktivitesinin pozitif kontrole (Etil metan sulfonat) kıyasla yüksektir. LO/N-CD'ler için IC 50 dozu 143.8917 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi.

Hidrotermal sentez yöntemiyle *L. officinalis* yaprak özütü ile sentezlenen LO/N-CD'lerin A549 hücrelerinin içerisinde bulunup bulunmadığını saptamak için konfokal mikroskopi yöntemi kullanılmıştır. LO/N-CD'lerin hücre çekirdeğine girdiği ve sitoplazmaya dağıldığı görülmüştür.

Bu tez çalışmasında Hidrotermal sentez yöntemiyle sentezlenmiş olan LO/N-CD'lerin hücrenin hangi bölgelerinde ışığa verdiğini belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için floresan görüntülerinde LO/N-CD'lerin hem çekirdekçik hem de hücre sitoplazmasında ışığa yapmıştır. Daha sonra konfokal mikroskop ile LO/N-CD'lerin ışığa yaptığı yerlerin daha yüksek çözünürlüklü görüntüleri elde edilmiştir. Konfokal görüntülerinde karbon noktaları hem hücre çekirdeğinde hem de sitoplazmada mavi renkte ışığa yapmaktadır.

Son yıllarda, biyolojik materyallerden karbon noktalarının sentezlendiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Fakat, bu çalışmalarda biyolojik materyallerin biyoaktif içeriklerinin farklılığı ve karbon noktalarının farklı sentez yöntemleri, elde edilen karbon noktalarını birbirinden benzersiz kılmaktadır. Elde edilen bu karbon noktalarının antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkileri gibi biyolojik aktiviteleri birbirinden ve etkileşime girdiği hücreye bağlı olarak değişmesi beklenmektedir. Bu bakımından her ne kadar son yıllarda artan sayıda çalışma yapılsa da mevcut çalışmaların yetersiz olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, hem bizim yaptığımız çalışmada hem de önceki yapılan çalışmalarda karbon noktalarının hücre çekirdeğine kadar ulaştığı kanıtlanmıştır. Karbon noktalarının boyutlarının sadece birkaç nm olması sonucu hücre çekirdeğine kadar nüfus etmesi ve ışığa yapması kanser hücrelerini görüntüleme oldukça elverişli hale getirmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abd Elkodous, M. Olojede, SO. Sahoo, S. & Kumar, R. (2023). Recent advances in modification of novel carbon-based composites: Synthesis, properties, and biotechnological/biomedical applications. *Chemico-Biological Interactions*, 379, 110517.
- Akdeniz, F. & Gündoğdu, M. (2007). Direct and alkali medium liquefaction of *Laurocerasus Officinalis* Roem. *Energy Conversion and Management*, 48,189-192.
- Akkuş İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, *Mimoza Yayınları*, Konya.
- Alaşalvar, C. Al-Farsı, M. & Shahhıdı, F. (2005). Compositional Characteristics and Antioxidant Camponents of Cherry Laurel Varieties and Pekmez. *Journal of Food Science*, 47-52.
- Alpınar, K. & Yazıcıoğlu, E. (1991). Taflan (*Laurocerasus officinalis* Roemer) meyvaları üzerinde farmasötik botanik yönünden bir araştırma. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildirisi*, Eskişehir, 81, 9.
- Altekruse, SF. Kosary, CL. Krapcho, M. Neyman, N. Aminou, R. & Waldron, W. (2010). Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Cancer Statistics Review, 1975–2007. National Cancer Institute: Bethesda, MD, USA.
- Arıkan, S. (1992). “Bazı tohumlu bitki ekstrelerinin çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki antibakteriyel etkileri”. *Kükem Dergisi*, 15(2), 39-47.
- Aydın, A. Erenler, R. Yılmaz, B. & Tekin, Ş. (2016). Antiproliferative effect of cherry laurel. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 3(3), 217-228.
- Ayla, Ş. Ötkem, G. & Parlayan, C. (2018). ZNF304 gen ifadesinde artış ve CXCR4’de azalma ile prostat kanserinde anoikis değişebilir. *Ege Tıp Dergisi*, 57(3), 157-162.
- Barman, MK. & Patra, A. (2018). Current status and prospects on chemical structure driven photoluminescence behave our of carbon dots. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 37, 1-22.
- Bayat, A. Masoum, S. & Hosseini, ES. (2019). Natural plant precursor for the facile and eco-friendly synthesis of carbon nanodots with multifunctional aspects. *Journal of Molecular Liquids*, 281, 134-140.
- Baytop T. (1999). Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi Geçmiste ve Bugün, Nobel Tıp Kitabevi Yayınları, İstanbul, 2, 18-56.
- Berridge, MV. & Tan, AS. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 474-482.

- Beuerle, F. Lebovitz, R. & Hirsch, A. (2008). Antioxidant properties of water-soluble fullerene derivatives. *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, 51-78.
- Bhushan, B. (2018). Springer Handbook of Nanotechnology, Berlin/Heidelberg, Germany.
- Bıçer, A. & Bilmişoğlu Bıçer, K. (2020). Kırmızı Soğandan Karbon Kuantum Noktaların Sentezi ve Fotolüminesans Özelliklerinin İncelenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24(1), 48-56.
- Bing, W. Sun, H. Yan, Z. Ren, J. & Qu, X. (2016). *Small*, 12, 4713–4718.
- Block, KI. Gyllenhaal, C. Lowe, L. Amedei, A. Amin, A. Aquilano, K. Arbiser, J. Arreola, A. Arzumanyan, A. & Ashraf, SS. (2015). Designing a broad-spectrum integrative approach for cancer prevention and treatment. *Semin. Cancer Biology*, 35, 276–S304.
- Bray, F. Ferlay, J. Soerjomataram, I. Siegel, RL. Torre, LA. & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Byrappa, K. & Yoshimura, M. (2001). Handbook of Hydrothermal Technology, ISBN 081551445X, William Andrew.
- Çağlayan, MO. Mindivan, F. & Şahin, S. (2022). Sensor and bioimaging studies based on carbon quantum dots: the green chemistry approach. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52(4), 814-847.
- Cangır, AK. Yumuk, PF. Sak, SD. Akyürek, S. Eralp, Y. Yılmaz, Ü. & Demirkazık, A. (2022). Lung cancer in Turkey. *Journal of Thoracic Oncology*, 17(10), 1158-1170.
- Cao, L. Sahu, S. Anilkumar, P. Bunker, CE. Xu, J. Fernando, KS. & Sun, YP. (2011). Carbon nanoparticles as visible-light photocatalysts for efficient CO₂ conversion and beyond. *Journal of the American Chemical Society*, 133(13), 4754-4757.
- Carvalho, J. Santos, LR. Germino, JC. Terezo, AJ. Moreto, JA. Quites, FJ. & Freitas, RG. (2019). Hydrothermal synthesis to water-stable luminescent carbon dots from acerola fruit for photoluminescent composites preparation and its application as sensors. *Materials Research*, 22, e20180920.
- Çevik, S. (2001). “Synthesis and Characterization of New Vanadium Oxide Phases Incorporating Polyoxo Ligands”, Doctor of Philosophy Thesis, Illionis Institute of Technology, Chicago, USA.
- Chen, J. (2021). Dually acid- and gsh-triggered bis (β cyclodextrin) as drugs delivery nanoplatform for effective anticancer monotherapy. *Nanotechnology*, 32, 145714.
- Coates, J. (2000). Kızılötesi Spektrumun Yorumlanması: Pratik Bir Yaklaşım. İçinde: Meyers, RA. Ed.: *Analitik Kimya Ansiklopedisi*, John Wiley & Sons Ltd. Chichester, 10881-10882.

- Dağlıoğlu, C. & Kaci, FN. (2020). Pasif tümör hedefli inorganik ilaç nanotaşıyıcıların akciğer sağlıklı ve kanser hücreleri üzerindeki uzun dönemli etkisi, *Politeknik Dergisi*, 23(3), 649-656.
- Das, B. Dadhich, P. Pal, P. Srivas, PK. Bankoti, K. & Dhara, S. (2014). Carbon nanodots from date molasses: new nanolights for the in vitro scavenging of reactive oxygen species. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(39), 6839-6847.
- Das, R. Dhiman, A. Kalita, P. Karak, N. & Mandal, D. (2019). Carbondot-based nanocomposites for environmental remediation: recent advances and future perspectives. *Chemical Engineering Journal*, 375, 121971.
- Das, S. Kundu, M. Jena, BC. & Mandal, M. (2020). Causes of cancer: physical, chemical, biological carcinogens and viruses. *In Biomaterials for 3D Tumor Modeling*, 607-641.
- Das, TK. & Ganguly, S. (2023). Revolutionizing Food Safety with Quantum Dot–Polymer Nanocomposites: From Monitoring to Sensing Applications. *Foods*, 12, 2195.
- De, B. & Karak, N. (2013). A green and facile approach for the synthesis of water soluble fluorescent carbon dots from banana juice. *Royal Society of Chemistry Advances*, 3(22), 8286-8290.
- Demain, AL. & Vaishnav, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology*, 4, 687–99.
- Demir, S. Turan, İ. Demir, F. Ayazoğlu, E. & Aliyazıcıoğlu, Y. (2017). Cytotoxic effect of *Laurocerasus Officinalis* Extract on human cancer cell lines. *Journal of Research in Pharmacy*, 21, 121-126.
- Diantini, A. Subarnas, A. Lestari, K. Halimah, E. Susilawati, Y. Supriyatna, S. Julaeha, E. Achmad, TH. Suradji, EW. Yamazaki, C. Kobayashi, K. Koyama, H. & Abdullah, R. (2012). Kaempferol-3-Orhamnoside isolated from the leaves of *Schima wallichii* Korth. inhibits MCF-7 breast cancer cell proliferation through activation of the caspase cascade pathway. *Oncology Letters*, 3, 1069-1072.
- Dou Q. Fang, X. Jiang, S. Chee, PL. Lee TC. & Loh, XJ. (2015). *Royal Society of Chemistry*, 5, 46817–46822.
- Du, XY. Wang, CF. Wu, G. & Chen, S. (2021). The rapid and large-scale production of carbon quantum dots and their integration with polymers. *Angewandte Chemie International Edition*, 60(16), 8585-8595.
- Eken, A. Baldemir, A. Ünlü-Endirlik, B. Bakır, E. & İlgün, S. (2017). Essential element and metal content of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* roem.) fruit and seeds. *Journal of Health Sciences*, 26(1), 1-4.
- Ezati, P. Priyadarshi, R. & Rhim, JW. (2022). Prospects of sustainable and renewable source-based carbon quantum dots for food packaging applications. *Sustainable Materials and Technologies*, 33, e00494.
- Fan, Y. Guo, X. Zhang, Y. Lv, Y. Zhao, J. & Liu, X. (2016). Efficient and stable red emissive carbon nanoparticles with a hollow sphere structure for white light-emitting diodes. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(46), 31863-31870.

- Feng, L. Zhao, A. Ren, J. & Qu, X. (2013). Lighting up left-handed Z-DNA: photoluminescent carbon dots induce DNA B to Z transition and perform DNA logic operations. *Nucleic Acids Research*, 41(16), 7987-7996.
- Galadari, S. Rahman, A. Pallichankandy, S. & Thayyullathil, F. (2017). Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress. *Free Radical Biology and Medicine*, 104, 144–164
- Ganguly, S. & Margel, S. (2023). Fluorescent quantum dots-based hydrogels: Synthesis, Fabrication and multimodal biosensing. *Talanta Open*, 8, 100243.
- Gedda, G. Sankaranarayanan, SA. Putta, CL. Gudimella, KK. Rengan, AK. & Girma, WM. (2023). Green synthesis of multi-functional carbon dots from medicinal plant leaves for antimicrobial, antioxidant, and bioimaging applications. *Scientific Reports*, 13(1), 6371.
- Gomez, E. Burgos, L. Soriano, C. & Marin, J. (1998). Amygdalin content in the seeds of several apricot cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 184-186.
- Güder, A. & Korkmaz, H. (2012). Investigation of antioxidant activity and total anthocyanins from blackberry (*Rubus Hirtus Waldst and Kit*) and cherry laurel (*Laurocerasus Officinalis Roem*). *Asian Journal of Chemistry*, 24(10), 4525-4231.
- Hochhegger, B. Alves, GR. Irion, KL. Fritscher, CC. Fritscher, LG. & Concatto, NH. (2015). PET/CT Imaging in Lung Cancer: Indications and Findings. *Journal Brasileiro de Pneumologia*, 41, 264–74.
- İslam, A. (2002). Kiraz cherry laurel (*Prunus Laurocerasus*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30(4), 301-302.
- İslam, A., (2005). Karayemiş yetiştiriciliği ve önemi. *Ege Karadeniz Dergisi*, 28(4), 25-32.
- Jhonsi, MA. & Thulasi, S. (2016). A novel fluorescent carbon dots derived from tamarind. *Chemical Physics Letters*, 661, 179-184.
- Jhonsi, MA. Ananth, DA. Nambirajan, G. Sivasudha, T. Yamini, R. Bera, S. & Kathiravan, A. (2018). Antimicrobial activity, cytotoxicity and DNA binding studies of carbon dots. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 196, 295-302.
- Ji, Z. (2019). Tuning the functional groups on carbon nanodots and antioxidant studies. *Molecules* 24, 152. <https://doi.org/10.3390/molecules24010152>.
- Jiang, K. Sun, S. Zhang, L. Lu, Y. Wu, A. & Cai, C. (2015). Red, green, and blue luminescence by carbon dots: full-color emission tuning and multicolor cellular imaging. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(18), 5360-5363.
- Ju, E. Li, T. Liu, Z. Silva, SR. Wei, S. Zhang, X. & Gao, SJ. (2020). Specific inhibition of viral MicroRNAs by carbon dots-mediated delivery of locked nucleic acids for therapy of virus-induced cancer. *ACS Nano Journal*, 14(1), 476-487.
- Kabir, SR. Nabi, MM. Haque, A. Zaman, RU. Mahmud, ZH. & Reza, MA. (2013). Pea lectin inhibits growth of Ehrlich ascites carcinoma cells by inducing

- apoptosis and G2/M cell cycle arrest in vivo in mice. *Phytomedicine*, 20(14), 1288-1296.
- Kamal, A. Ashraf, M. Vardhan, MV. Faazil, S. & Nayak, VL. (2014). Synthesis and anticancer potential of benzothiazole linked phenyl pyrido pyrimidine ones and their diones as mitochondrial apoptotic inducers. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24, 147-151.
- Kamran, SC. Gonzalez, AB. Ng, A. Haas-Kogan, D. & Viswanathan, AN. (2016). Therapeutic radiation and the potential risk of second malignancies. *Cancer*, 122, 1809-1821.
- Kang, H. Kim, DY. & Cho, J. (2023). Top-Down Fabrication of Luminescent Graphene Quantum Dots Using Self-Assembled Au Nanoparticles. *ACS Omega*, 8, 5885–5892.
- Kavuranpala, T. (2021). A Thesis Submitted to the Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master Of Science in Chemistry, İzmir.
- Kedare, SB. & Singh, RP. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48 (4), 412-422.
- Khoshnood, A. Farhadian, N. Abnous, K. Matin, MM. Ziaee, N. & Yaghoobi, EN. (2023). Doped-carbon quantum dots with ultra-high quantum yield photoluminescent property conjugated with folic acid for targeted drug delivery and bioimaging applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 444, 114972.
- Kil, HY, Seong, ES, Ghimire, BK, Chung, M. Kwon, SS. Goh, EJ, Heo, K. Kim, MJ, Lim, JD. Lee, D. & Yu, CY. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of crude Sorghum extract. *Food Chemistry*, 115, 1234-1239.
- Ko, EC. Raben, D. & Formenti, SC. (2018). The Integration of Radiotherapy with Immunotherapy for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 24, 5792–806.
- Kozower, BD. Lerner, JM. Detterbeck, FC. & Jones, DR. (2013). Special Treatment Issues in Non-Small Cell Lung Cancer:Diagnosis and Management of Lung Cancer: *American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*, 143, e369S–99.
- Krishnamoorthy, M. & Ashwini, P. (2011). Anticancer activity of Cynodondactylon L. extract on Ehrlich ascites carcinoma. *Journal of Environmental Research and Development*, 5(3), 551-557.
- Krishnamurthi K. (2007). Screening of natural products for anticancer and antidiabetic properties. *Health Administrator*, 1-2, 69-75.
- Krystyjan, M. Khachatryan, G. Grabacka, M. Krzan, M. Witczak, M. Grzyb, J. & Woszczak, L. (2021). Physicochemical, Bacteriostatic, and Biological Properties of Starch/Chitosan Polymer Composites Modified by Graphene Oxide, Designed as New Bionanomaterials. *Polymers*, 13, 2327.

- Krystyjan, M. Khachatryan, G. Khachatryan, K. Krzan, M. Ciesielski, W. Zarska, S. & Szczepankowska, J. (2022). Polysaccharides Composite Materials as Carbon Nanoparticles Carrier. *Polymers*, 14, 948.
- Kubitscheck, U. (2017). Fluorescence microscopy: from principles to biological applications. Ed.: John Wiley and Sons, 2-470.
- Kuo, WS. Shen, XC. Chang, CY. Kao, HF. Lin, SH. Wang, JY. & Wu, PC. (2020). Multiplexed graphene quantum dots with excitation-wavelength-independent photoluminescence, as two-photon probes, and in ultraviolet–near infrared bioimaging. *ACS Nano*, 14(9), 11502-11509.
- Kwon, W. Lee, G. Do, S. Joo, T. & Rhee, SW. (2014). Size-controlled soft-template synthesis of carbon nanodots toward versatile photoactive materials. *Small*, 10(3), 506-513.
- Laudise, RA. (1970). The Growth of Single Crystals. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, California University, New Jersey, USA, 352pp.
- Li, CL. (2014). Carbon dots prepared from ginger exhibiting efficient inhibition of human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 4564–4571.
- Li, H. He, X. Kang, Z. & Huang, H. Liu, Y. & Liu, J. (2010). Biosensing and bioimaging based on carbon dots. *Analytical Methods*, 2(7), 1106-1111.
- Li, S. Wang, L. Chusuei, CC. Suarez, VM. Blackwelder, PL. Micic, M. & Leblanc, RM. (2015). Nontoxic carbon dots potently inhibit human insulin fibrillation. *Chemistry of Materials*, 27(5), 1764-1771.
- Li, W. Liu, Y. Wang, B. Song, H. Liu, Z. Lu, S. & Yang, B. (2019). Kilogram-scale synthesis of carbon quantum dots for hydrogen evolution, sensing and bioimaging. *Chinese Chemical Letters*, 30(12), 2323-2327.
- Li, Y. Zhong, X. Rider, AE. Furman, SA. & Ostrikov, K. (2014). Fast, energy efficient synthesis of luminescent carbon quantum dots. *Green Chemistry*, 16, 2566–2570.
- Lim, CS. Hola, K. Ambrosi, A. Zboril, R. & Pumera, M. (2015). Graphene and carbon quantum dots electrochemistry. *Electrochemistry Communications*, 52, 75-79.
- Lim, SY. Shen, W. & Gao, Z. (2015). Carbon quantum dots and their applications. *Chemical Society Reviews*, 44(1), 362-381.
- Liu, ML. Chen, B. Li, CM. & Huang, CZ. (2019). Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications. *Green Chemistry*, 21(3), 449-471.
- Liu, X. Yang, Q. Zhang, G. Li, Y. Chen, Y. Weng, X. Wang, Y. Wang, Y. & Zhu, X. (2014). Antitumor pharmacological evaluation of extracts from *Stellera chamaejasme* L based on hollow fiber assay. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 116.
- Liu, J. Li, D. Zhang, K. Yang, M. Sun, H. & Yang, B. (2018). One-step hydrothermal synthesis of nitrogen-doped conjugated carbonized polymer dots with 31% efficient red emission for in vivo imaging. *Small*, 14(15), 1703919.

- Liu, ML. Chen, B. Li, CM. & Huang, CZ. (2019). Carbon Dots: Synthesis, Formation Mechanism, Fluorescence Origin and Sensing Applications. *Green Chemistry*, 21, 449–471.
- Liu, M. Xu, Y. Niu, F. Gooding, JJ. & Liu, J. (2013). Carbon quantum dots directly generated from electrochemical oxidation of graphite electrodes in alkaline alcohols and the applications for specific ferric ion detection and cell imaging. *Analyst*, 141(9), 2657-2664.
- Liu, N. Shi, Y. Guo, J. Li, H. Wang, Q. Song, M. & Sun, X. (2019). Radioiodinated tyrosine based carbon dots with efficient renal clearance for single photon emission computed tomography of tumor. *Nano Research*, 12, 3037-3043.
- Liu, YY. Yu, NY. Fang, WD. Tan, QG. Ji, R. Yang, LY. & Miao, AJ. (2021). Photodegradation of carbon dots cause cytotoxicity. *Nature Communications*, 12(1), 812.
- Livshits, Z. Rao, RB. & Smith, SW. (2014). An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32, 167–203.
- Liyana-Pathirana, CM. Shahidi, F. & Alasalvar, C. (2006). Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus Officinalis* Roem.) and its concentrated juice. *Food Chemistry*, 99, 121-128.
- Lobachev, AN. (1973). Crystallization Processes under Hydrothermal Conditions. Consultants Bureau, New York, USA, 255pp.
- Lu, S. Guo, S. Xu, P. Li, X. Zhao, Y. Gu, W. & Xue, M. (2016). Hydrothermal synthesis of nitrogen-doped carbon dots with real-time live-cell imaging and blood–brain barrier penetration capabilities. *International Journal of Nanomedicine*, 6325-6336.
- Grube MO. Muter, S. Strikauska, M. Gavare, B. & Limane, J. (2008). *Indian Microbiology: Biotechnology*, 35, 1545.
- Malik, S. Muhammad, K. & Waheed, Y. (2023). Nanotechnology: A revolution in modern industry. *Molecules*, 28, 661.
- Man, S. Gao, W. Wei, C. & Liu, C. (2012). Anti-cancer drugs from traditional toxic Chinese medicines. *Phytotherapy Research*, 26, 1449-1465.
- Mehta, VN. Jha, S. Basu, H. Singhal, RK. & Kailasa, SK. (2015). One-step hydrothermal approach to fabricate carbon dots from apple juice for imaging of mycobacterium and fungal cells. *Sensors and Actuators B*, 213, 434–443
- Meric-Bernstam, F. Johnson, A. Holla, V. Bailey, AM. Brusco, L. Chen, K. Routbort, M. Patel, KP. Zeng, J. & Kopetz, S. (2015). A decision support framework for genomically informed investigational cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 107, 98.
- Metere, A. & Giacomelli, L. (2017). Absorption, metabolism and protective role of fruits and vegetables polyphenols against gastric cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21, 5820–58.

- Miao, X. Qu, D. Yang, D. Nie, B. Zhao, Y. Fan, H. & Sun, Z. (2018). Synthesis of carbon dots with multiple color emission by controlled graphitization and surface functionalization. *Advanced Materials*, 30(1), 1704740.
- Mohammed, L.J. & Omer, K.M. (2020). Dual functional highly luminescence B, N Co-doped carbon nanodots as nanothermometer and Fe³⁺/Fe²⁺ sensor. *Scientific Reports*, 10(1), 3028.
- Moraga, P. (2016). Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: *A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study*, 390, 1151–1210.
- Mousa, MA. Abdelrahman, HH. Fahmy, MA. Ebrahim, DG. & Moustafa, AH. (2023). Pure and doped carbon quantum dots as fluorescent probes for the detection of phenol compounds and antibiotics in aquariums. *Scientific Reports*, 13(1), 12863.
- Mozioglu E. (2022). *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(2), 600-611.
- Muhammad N. (2021). Silver nanoparticles functionalized paclitaxel nanocrystals enhance overall anti-cancer effect on human cancer cells Nanotechnology 32 085105 [48] Gurunathan S et al 2015 Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by bacillus tequilensis and calocybe indica in mda-mb-231 human breast cancer cells: targeting p53 for anticancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 4203.
- Muktha, H. Sharath, R. Kottam, N. Smrithi, SP. Samrat, K. & Ankitha, P. (2020). Green synthesis of carbon dots and evaluation of its pharmacological activities. *BioNanoScience*, 10, 731-744.
- Ness, AR. & Powles, JW. (1997). Meyve ve Sebzeler ve Kardiyovasküler Hastalık: Bir İnceleme. *Uluslararası Epidemiyoloji Dergisi*, 26, 1-13.
- Nićiforović, N. Mihailović, V. Masković, P. Solujić, S. Stojković, A. & Pavlović Muratspahic, D. (2010). Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3125-3130.
- Nocito, G. Calabrese, G. Forte, S. Petralia, S. Puglisi, C. Campolo, M. & Conoci, S. (2021). Carbon dots as promising tools for cancer diagnosis and therapy. *Cancers*, 13(9), 1991.
- Nurunnabi, M. Khatun, Z. Huh, KM. Park, SY. Lee, DY. Cho, KJ. & Lee, YK. (2013). In vivo biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots. *ACS Nano*, 7(8), 6858-6867.
- Nwaneshiudu, A. (2012). Introduction to Confocal Microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12), 1-5.
- Okuda, K. Hirota, T. Hirobe, M. Nagano, T. Mochizuki, M. & Mashino, T. (2000). Synthesis of various water-soluble G60 derivatives and their superoxide-quenching activity. *Fullerene Science and Technology*, 8(3), 127-142.

- Öztürk H., (2009). *Jurinea Consanguinea* 'nın Antioksidan ve Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Edirne.
- Ponduru, HK. Gurubilli, CSR. Mudunuru, S. & Banisetti, DK. (2023). Green synthesis of nano particles from biodegradable waste extracts and their applications. *International Journal of Pharmacognosy and Chemistry*, 4, 46–54.
- Pourmadadi, M. Nouralishahi, A. Shalhaf, M. Shabani Shayeh, J. & Nouralishahi, A. (2023). An electrochemical aptasensor for detection of prostate-specific antigen-based on carbon quantum dots-gold nanoparticles. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 70, 175–183.
- Präbst, K. Engelhardt, H. Ringgeler, S. & Hübner, H. (2017). Basic colorimetric proliferation assays: *MTT*, *WST*, and resazurin. *Cell viability assays: Methods and Protocols*, 1-17.
- Priyadarshini, E. Meena, R. Bohidar, HB. Sharma, SK. Abdellatif, MH. Saravanan, M. & Rajamani, P. (2022). Comparative In Vitro Cytotoxicity Study of Carbon Dot-Based Organometallic Nanoconjugates: Exploration of Their Cell Proliferation, Uptake and Localization in Cancerous and Normal Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1, 3483073.
- Protocol Guide, (2022). WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability. n.d. [https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-reagent-wst-1-\(Erişim tarihi: 29.05.2022\)](https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-reagent-wst-1-(Erişim tarihi: 29.05.2022)).
- Rajandeeep, K. Kapoor, K. & Harpreet, K. (2011). Plants as a source of anticancer agents. *Journal of Natural Products Plant Resource*, 1(1), 119-124.
- Ray, SC. Saha, A. Jana, NR. & Sarkar, R. (2009). Fluorescent carbon nanoparticles: synthesis, characterization, and bioimaging application. *Journal of Physical Chemistry C*, 113(43), 18546–18551.
- Rivera, MP. Mehta, AC. & Wahidi, MM. (2013). Establishing the Diagnosis of Lung Cancer:Diagnosis and Management of Lung Cancer: American College of Chest Physicians Evidence-based Clinical Practice Guidelines. *Journal of Chest Surgery*, 143, 142–65.
- Rocco, D. Moldoveanu, VG. Feroci, M. Bortolami, M. & Vetica, F. (2023). Electrochemical Synthesis of Carbon Quantum Dots. *ChemElectroChem*, 10(3), e202201104.
- Roditi, (2007). “Hydrothermal Cristal Growth - Quarts,” 2007. [http://www.roditi.com/SingleCrystal/Quartz/Hydrothermal_Growth.html-\(Erişim tarihi: 21.05.2012\)](http://www.roditi.com/SingleCrystal/Quartz/Hydrothermal_Growth.html-(Erişim tarihi: 21.05.2012)).
- Rodríguez-Varillas, S. Fontanil, T. Obaya, ÁJ. Fernández-González, A. Murru, C. & Badía-Laiño, R. (2022). Biocompatibility and antioxidant capabilities of carbon dots obtained from tomato (*Solanum Lycopersicum*). *Applied Sciences*, 12(2), 773.

- Roy, P. (2015) Photoluminescent carbon nanodots: synthesis, physicochemical properties and analytical applications. *Journal of the Materials Today Chemistry*, 18(8), 447–58.
- Russo, EB. (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry and Biodiversity*, 4(8), 1614–48.
- Sahu, S. Behera, B. Maiti, TK. & Mohapatra, S. (2012). Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents. *Chemical Communications*, 48, 8835–8837.
- Sarkar, S. Banerjee, A. Halder, U. Biswas, R. & Bandopadhyay, R. (2017). Degradation of synthetic azo dyes of textile industry: a sustainable approach using microbial enzymes. *Water Conservation Science and Engineering*, 2(4), 121–131.
- Sauer, T. Neto, GC. Jose, HJ. & Moreira, RFP. (2002). Kinetics of photocatalytic degradation of reactive dyes in a TiO₂ slurry reactor. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 149(1–3), 147–154.
- Scherer, R. & Godoy, HT. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3), 654–658.
- Scherlinger, M. & Tsokos, GC. (2021). Reactive oxygen species: The Yin and Yang in Immunity. *Autoimmunity*, 20, 102869.
- Sebaugh, JL. (2011). Guidelines for accurate EC₅₀/IC₅₀ estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10(2), 128–134.
- Serafini, M. Bellocco, R. Wolk, A. & Ekström, AM. (2002). Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer. *Gastroenterology*, 123, 985–91.
- Sharma, OP. & Bhat, TK. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202–1205.
- Shi, W. Han, Q. Wu, J. Ji, C. Zhou, Y. Li, S. Gao, L. Leblanc, RM. & Peng, Z. (2022). Synthesis Mechanisms, Structural Models, and Photothermal Therapy Applications of Top-Down Carbon Dots from Carbon Powder, Graphite, Graphene, and Carbon Nanotubes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1456.
- Siegel, R. (2020). Cancer statistics CA: Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 70, 7–30.
- Siegel, RL. Miller, KD. & Jemal, A. (2018). Cancer Statistics CA: Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 68, 7–30.
- Singh, R. K. Kumar, R. Singh, DP. Savu, R. & Moshkalev, SA. (2019). Progress in microwave-assisted synthesis of quantum dots (graphene/carbon/semiconducting) for bioapplications: a review. *Materials Today Chemistry*, 12, 282–314.
- Singhal, G. Bhavesh, R. Kasariya, K. Sharma, AR. & Singh, RP. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaf extract and

- screening its antimicrobial activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 2981–2988.
- Spiess, AN. & Neumeyer, N. (2010). An evaluation of R² as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 10, 6, 1471-2210.
- Sun, D. Collins, DJ. Ke, Y. Zuo, J. & Zhou, H. (2006). “Construction of Open Metal Organic Frameworks Based on Predesigned Carboxylate Isomers: From Achiral to Chiral Nets”. *European Journal of Chemistry*, 12, 3768-3776.
- Sun, YP. Zhou, B. Lin, Y. Wang, W. Fernando, KA. Pathak, P. Mezziani, MJ. Harruff, BA. Wang, X. Wang, H. Luo, PG. Yang, H. Kose, ME. Chen, B. Veca, LM. & Xie, SY. (2006). Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 7756–7757
- Morita, T. (2010). “Piezoelectric Materials Synthesized by the Hydrothermal Method and Their Applications,” *Materials*, 3, 12, 5236-5245.
- Tan, TL. Nulit, R. Jusoh, M. & Rashid, SA. (2023). Recent developments, applications and challenges for carbon quantum dots as a photosynthesis enhancer in agriculture. *RSC Advances*, 13, 25093–25117.
- Thangaraj, B. Solomon, PR. & Ranganathan, S. (2019). Synthesis of carbon quantum dots with special reference to biomass as a source-a review. *Current Pharmaceutical Design*, 25(13), 1455-1476.
- Thillaivanan, S. & Samraj, K. (2014). Challenges, Constraints and Opportunities in Herbal Medicines-A Review. *International Journal of Herbal Medicine*, 2(1), 21-24.
- Topală, T. Bodoki, A. Oprean, L. & Oprean, R. (2014). Experimental techniques employed in the study of metal complexes-DNA–interactions. *Expedition Technology*, 62(6), 1.
- Turhan NI. (2023). Yeşil Sentez Yöntemi İle Kuantum Karbon Nokta Üretimi, Karakterizasyon Ve Nanofiber Yapıdaki Antibakteriyel Performanslarının Araştırılması, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya.
- TürKomp (2024). Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı, versiyon 1.0. <https://turkomp.tarimorman.gov.tr/foodkarayemis-570->(Erişim tarihi: 10.01.2024).
- Ünal E. (2006). Türkiye florasında doğal olarak yetişen bazı bitki türlerinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Varghese, M. & Balachandran, M. (2021). Antibacterial activity of carbon dots against Gram-positive and Gram-negative bacteria: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9, 106821.

- Wang, B. (2018). Chemical characterization and ameliorating effect of polysaccharide from Chinese jujube on intestine oxidative injury by ischemia and reperfusion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 386–391.
- Wang, B. Li, J. Tang, Z. Yang, B. & Lu, S. (2019). Near-infrared emissive carbon dots with 33.96% emission in aqueous solution for cellular sensing and light-emitting diodes. *Science Bulletin*, 64(17), 1285-1292.
- Wang, J. (2015). Opportunities and challenges of fluorescent carbon dots in translational optical imaging. *Current Pharmaceutical Design*, 21, 5401–5416 (2015).
- Wang, L. Zhu, S. Wang, H. Qu, S. Zhang, L. & Zhang, Y. (2014). Common origin of green luminescence in carbon nanodots and graphene quantum dots. *ACS Nano*, 8(3), 2541-2547.
- Wang, Q. Zhang, S. Wang, B. Yang, X. Zou, B. Yang, B. & Lu, S. (2019). Pressure-triggered aggregation-induced emission enhancement in red emissive amorphous carbon dots. *Nanoscale Horizons*, 4(5), 1227-1231.
- Wang, X. Feng, Y. Dong, P. & Huang, J. (2019). A mini review on carbon quantum dots: preparation, properties, and electrocatalytic application. *Frontiers in Chemistry*, 7, 671.
- Wang, Y. (2011). Carbon dots of different composition and surface functionalization: cytotoxicity issues relevant to fluorescence cell imaging. *Experimental Biology and Medicine*, 236, 1231–1238.
- WSTs, (2013). "Water Soluble Tetrazolium Salts (WSTs)" interchim.com. Interchim Retrieved, 08-12.
- Wu, S. Li, H. Futaba, DN. Chen, G. Chen, C. Zhou, K. Zhang, Q. Li, M. Ye, Z. & Xu, M. (2022). Structural design and fabrication of multifunctional nanocarbon materials for extreme environmental applications. *Advanced Materials*, 34, 2201046.
- Xiao, L. (2019). Carbon dots alleviate the toxicity of cadmium ions (Cd 2+) toward wheat seedlings. *Environmental Science: Nano*, 6(5), 1493-1506.
- Yadav, M. Jain, S. Bhardwaj, A. Nagpal, R. Puniya, M. Tomar, R. Singh, V. Parkash, O. Prasad, TR. Marotta, F. & Yadav, H. (2009). Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update. *Journal of Medicinal Food*, 12(3), 473–484.
- Yan, Y. Gong, J. Chen, J. Zeng, Z. Huang, W. Pu, K. & Chen, P. (2019). Recent advances on graphene quantum dots: from chemistry and physics to applications. *Advanced Materials*, 31(21), 1808283.
- Yang, ST. Cao, L. Luo, PG. Lu, F. Wang, X. Wang, H. Meziani, MJ. Liu, Y. Qi, G. & Sun, YP. (2009) Carbon dots for optical imaging in vivo. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 11308–11309.
- Yang, ST. Wang, X. Wang, H. Lu, F. Luo, PG. Cao, L. Meziani, MJ. Liu, JH. Liu, Y. Chen, M. Huang, Y. & Sun, YP. (2009) Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents. *Journal of Physical Chemistry C*, 113(42), 18110–18114.

- Yang, P. Zhu, Z. Zhang, T. Zhang, W. Chen, W. Cao, Y. Chen, M. & Zhou, X. (2019). Orange-emissive carbon quantum dots: Toward application in wound pH monitoring based on colorimetric and fluorescent changing. *Small*, 15, 1902823.
- Yao, H. Li, J. Song, Y. Zhao, H. Wei, Z. & Li, X. (2018). Synthesis of Ginsenoside re-based carbon dots applied for bioimaging and effective inhibition of cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 6249–6264.
- Yao, S. Lyu, S. An, Y. Lu, J. Gjermansen, C. & Schramm, A. (2018). Microalgae–bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 126 (2), 359-368.
- Yıldırım S. (2006). Bazı Heracleum L. (Umbelliferae) taksonlarının antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi., Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale.
- Zha, S. Zhao, Q. Chen, J. Wang, L. Zhang, G. Zhang, H. & Zhao, B. (2014). Extraction, purification and antioxidant activities of the polysaccharides from maca (*Lepidium Meyenii*). *Carbohydrate Polymers*, 111, 584-587.
- Zhang, HJ. Chen, YL. Liang, MJ. Xu, LF. Qi, SD. Chen, HL. & Chen, XG. (2014). Solid-phase synthesis of highly fluorescent nitrogen-doped carbon dots for sensitive and selective probing ferric ions in living cells. *Analytical Chemistry*, 86, 9846–9852.
- Zhang, Z. Pei, K. Yang, Q. Dong, J. Yan, Z. & Chen, J. (2018). A nanosensor made of sulfur-- nitrogen co-doped carbon dots for “off-on” sensing of hypochlorous acid and Zn (II) and its bioimaging properties. *New Journal of Chemistry*, 42(19), 15895-15904.
- Zhao, S. Lan, M. Zhu, X. Xue, H. Ng, TW. Meng, X. & Zhang, W. (2015). Green synthesis of bifunctional fluorescent carbon dots from garlic for cellular imaging and free radical scavenging. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(31), 17054-17060.
- Zhu, C. Zhai, J. & Dong, S. (2012). Bifunctional fluorescent carbon nano-dots: green synthesis via soy milk and application as metal-free electro catalysts for oxygen reduction. *Chemical Communications*, 48(75), 9367.
- Zhuo, Y. Miao, H. Zhong, D. Zhu, S. & Yang, X. (2015). One-step synthesis of high quantum-yield and excitation-independent emission carbon dots for cell imaging. *Materials Letters*, 139, 197-200.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Damla ERGİN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik Mimarlık Fakültesi
Bölümü	Biyomedikal Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	2018
Yüksek Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mezuniyet Tarihi	2024