

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA TAŞIYICI GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜL BAĞLI RESVERATROLÜN ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

EGE ALİCAN TOPÇU

**DANIŞMAN
PROF. DR. İLHAN YAYLIM**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP YÜKSEK LİSANS**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Danışmanım Prof. Dr. İlhan Yaylın, Prof. Dr. Şakir Ümit Zeybek, Doç. Dr. Mutlu Küçük, Doç. Dr. Afşin Kariper, Dr. Öğretim Üyesi Ceylan Hepokur, Dr. Öğretim Üyesi Armağan Caner, Öğretim Görevlisi Mehmet Tolgahan Hakan'a teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
İTHAF	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Meme Anatomisi ve Fizyolojisi.....	3
2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Oluşum Faktörleri	4
2.2.2. İnsan Epidermal Büyüme Faktörü (HER2).....	5
2.2.3. Hücrel Miyelositomatoz Onkogen (c-Myc)	5
2.2.4. Ras.....	5
2.2.5. Nükleer Faktör Kappa B	6
2.2.6. Protein Kinaz B	6
2.2.7. Beta Katenin.....	7
2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	7
2.3.1 Östrojen.....	7
2.3.2 Aile Hikayesi.....	7
2.3.3. Doğum Yaşı, Menopoz, Menarj ve Laktasyon	8
2.3.4. Hormon Replasman Terapileri ve Oral Kontraseptif Kullanımı	8
2.3.5. Obezite	8
2.3.6. Yaş ve Cinsiyet	9
2.3.7. Kalori Kısıtlaması	9
2.3.8. Metabolik Sendromlar	9
2.3.9. Radrasyon.....	9
2.3.10. Sigara ve Alkol Kullanımı	10
2.4. Resveratrol	10
2.4.1. Resveratrolün Doğal ve Sentetik Türevleri.....	11
2.4.2. Resveratrolün Anti Kanser Etkisi	11
2.4.3. Resveratrolün İltihap Azaltmada Etkisi	12
2.4.4. Resveratrolün Kalp Koruyucu Etkisi	13

2.4.5. Resveratrolün Nöroprotektif Etkisi.....	13
2.5. Nanoteknoloji ve Nanoparçacıkların Tıpta Kullanımı.....	13
2.6. Gümüş Nanoparçacıkları.....	13
2.6.1. Nano Gümüş Parçacıklarının Hücre Zarından Geçişİ.....	14
2.6.2. Gümüş Nanoparçacıkların Antibakteriyel İşlevleri	14
2.6.3. Reaktif Oksidatiflerin Meydana Gelişİ	15
2.6.4. Protein İnaktivasyonu ve DNA'nın Yok Edilmesi.....	15
2.6.5. Solunum Zinciri Enzimleri ve Hücre Zarı İnhibisyonu	15
2.6.6. Gümüş Nanoparçacıkların Anti Kanser Etkileri	15
2.7.1. Mcf-7 Hücre Hattı.....	16
2.7.2. Mda-Mb-231 Hücre Hattı	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Gümüş Nanoparçacıklarının Sentezi.....	18
3.2. AgNP'lerin Karakterize Edilmesi.....	18
3.2.1. AgNP FTIR Analizleri	18
3.2.2. UV-VIS Analizleri	18
3.2.3. Zetasizer Ölçümleri.....	19
3.2.4. SEM-EDX Analizi	19
3.5. Sitotoksosite Analizi	20
3.6. Apoptoz Ölçümü	20
3.6.1. Hücre Döngüsü	20
4.BULGULAR	22
4.1. AgNP FTIR Analizi Bulguları.....	22
4.2. UV-VIS Bulguları.....	24
4.3. Zeta Sizer Ölçüm Bulguları	25
4.4. Hücre Kültürü ve Apoptozis	28
4.5. Hücre Döngüsü	31
5.TARTIŞMA	33
KAYNAKLAR	37
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	51
ÖZGEÇMİŞ	52

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4. 1. Gümüş- Nanopartikül boyutlarının yüzdeleri	25
Tablo 4. 2. Gümüş-resveratrol nano partikül boyutlarının yüzdeleri	27
Tablo 4. 3. AgNP-Res ve Resveratrol'ün IC ₅₀ değerleri.....	29
Tablo 4. 4. Mcf-10a hücre hattında flow sitometri sonuçları.....	31
Tablo 4. 5. Mda-Mb-231 hücre hattında flow sitometri sonuçları.....	31
Tablo 4. 6. Res ve AgNP-Res'in Mda-Mb-231 hücre hattında hücre döngüsü oranları.	32



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1.Meme Anatomisi	3
Şekil 2. 2.Resveratrolün kimyasal yapısı.....	10
Şekil 4. 1.Ag-Nanopartiküllerin FTIR Spektrumu	23
Şekil 4. 2. Resveratrolün FTIR Spektrumu	23
Şekil 4. 3. Ag-Nanopartikül - Resveratrolün Spektrumu	23
Şekil 4. 4. Ag-Nanopartikül, Resveratrol, Ag-Resveratrolün UV-VIS Spektrumu.....	24
Şekil 4. 5.Gümüş Nanopartikül dağılım yüzde grafikleri.....	26
Şekil 4. 6.AgNPs Zeta Ölçümü (PDI: 0.471, 4.33 nm, Türetilmiş Sayım Oranı (kcps): 121.06, Zeta: -41.7 mV	26
Şekil 4. 7.Gümüş-res Nanopartikül dağılım yüzde grafikleri.....	27
Şekil 4. 8.AgNPs ve Resvaratrolün Zeta Ölçümü (PDI: 0.493, 32.67 nm, Türetilmiş Sayım Oranı (kcps): 92.65, Zeta: -15.0 mV)	28
Şekil 4. 9.Resveratrolün farklı derişimlerinde % canlılık.....	28
Şekil 4. 10.AgNp-Resveratrolün farklı derişimlerine % canlılık değişimleri	29
Şekil 4. 11.Mda-Mb-231 hücre hattında AgNP, Res ve AgNp-Res 24 saatlik inkübasyon sonucunda flow sitometri görüntüleri	30
Şekil 4. 12.Res ve AgNP-Res'in Mda-Mb-231 hücre hattında uygulanmaları sonucu DNA içeriğinin flow sitometri ile ölçümü	32

SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESİ

Ag(NO₃): Gümüş nitrat

Ag: Gümüş

AgNP: Gümüş nanopartikül

Bax: BCL-2 ilişkili X apoptoz regülatörü

BCL-2: B hücre lenfoma 2

c-MyC: Hücresel miyelositomatoz onkogen

CO₂: Karbondioksit

COX-2: Siklooksijenaz-2

CY1A1: sitokrom P450IA1

DMEM: Dulbecco's Modification of Eagles

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EDX: Enerji yayımlı X ışını analizi

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

ERK1/2: Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz ½

FBS: Fetal sıgır serumu

FSH: Folikül düzenleyici hormon

FTIR: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi

HER: İnsan epidermal büyüme faktörü

IC₅₀: İnhibisyon konsantrasyon değeri

LH: Luteinizan hormon

NaBH₄: Sodyum borhidrür

NFκB: Nükleer faktör kappa B

OH: Hidroksil

PBS: Fosfat tamponlu salin

Ph: Hidrojen potansiyeli

PKC: Protein Kinaz C

Res:Resveratrol

RNA: Ribonükleotid asit

ROS: Reaktif oksidatif türler

Rpm: dakikadaki devir sayısı

SEM: Elektron taramalı mikroskopu

SIRT1: Sirtuin 1

TNF α : Tümör nekroz faktör alfa

TSC: Trisodyum sitrat

UV: Ultraviyole ışın

XTT: (2,3-bis- (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) -2H-tetrazolium-5-carboxyanilide)

ÖZET

TOPÇU EA. Meme Kanseri Hücre Hattında Taşıyıcı Gümüş Nanopartikül Bağlı Resveratrolün Etkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Programı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2021.

Doğal bir fitoaleksinin olan resveratrolün toksik etkisi bulunmayan gümüş nanopartiküle bağlanması sonucu etkileri hücre hatları üzerinde XTT yöntemi ile IC_{50} değerleri hesaplanarak değerlendirildi. Kanser hücre hattı olarak Mda-Mb-231 ve Mcf-7 hatları kullanılır iken kontrol grubu olarak ise sağlıklı Mcf-10A hücre hattı kullanıldı.

FTIR ve Uv-Vis analizi ile resveratrolün gümüş nanopartiküle bağlanması kontrol edildi. Zeta Sizer ölçümü ile yüzey potansiyelindeki farklılıklar ölçüldü. Resveratrol ve gümüş nanopartikülün bağlandığı ortaya kondu.

IC_{50} değerleri sonucu Mda-Mb-231 hücre hattının duyarlı olduğu sonucuna varıldı ve bu hücre hattı flow sitometri ile incelendi. Flow sitometri sonucu Mda-Mb-231 hücre hattında canlılık azalışı ve erken apoptotik, geç apoptotik ve nekroz değerlerinde artış gözlemlendi.

Resveratrol tek başına hücre siklusunu G0/G1 evresinde durdurur iken gümüş nanopartikül ile birlikte kullanıldığında hücre siklusunu S evresinde durdurdu.

Sonuç olarak, resveratrol ve gümüş nanopartikülün bağlanabildiği tespit edildi. Resveratrol ve gümüş nanopartikülün birlikte kullanımı sonucu kanser hücresi üzerinde sitotoksikite gösterdiği, hücre siklusunu durdurduğu ve apoptozu artırması sebebiyle tedavide kullanılabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, resveratrol, gümüş nanopartikülü, Mda-Mb-231, Mcf-7

Bu çalışma, “İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi” tarafından desteklenmiştir. Proje No:

ABSTRACT

TOPCU EA. Investigation of effect of resveratrol binded to carrier silver nanoparticles in breast cell line. Istanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine Programme. Master Thesis. Istanbul. 2021.

The effects of resveratrol, a natural phytoalexin, as a result of binding to the non-toxic silver nanoparticles, were evaluated on cell lines by calculating the IC_{50} values using the XTT method. Mda-Mb-231 and Mcf-7 lines were used as a cancer cell lines, while MCF-10 healthy cell line was used as the control group.

As a result of IC_{50} values, it was concluded that the Mda-Mb-231 cell line was sensitive and this cell line was examined by flow cytometry. As a result of flow cytometry, a decrease in viability was observed in the Mda-Mb-231 cell line and increase in early apoptotic, late apoptotic and necrosis values was observed.

When used alone resveratrol arrests the cell cycle in the G0/G1 phase. If resveratrol and silver nanoparticles are used together, the cell cycle arrested at the S phase.

As a result of our present, it was determined that resveratrol and silver nanoparticles could be bound. A cytotoxic effect is observed on the cancer cell as a result of the combination of resveratrol and silver nanoparticles. Resveratrol and silver nanoparticles stop the cell cycle and increase apoptosis, so it was thought that it could be used in treatment.

“Key words”: Breast cancer, resveratrol, silver nanoparticle, Mda-Mb-231, MCF-7

The present work was supported by the “Research Fund of Istanbul University”. Project No:

GİRİŞ VE AMAÇ

Resveratrol (trans-3, 5, 4'-trihydroxystilbene) siyah üzüm başta olarak çok sayıda bitki tarafından kuraklık, soğuk hava, stres, yaralanma, ultraviyole ışınları (UV) ve mantar enfeksiyonlarına karşı üretilen flavanoid olmayan polifenolik doğal bir fitoaleksindir (1). Resveratrolün anti-kanser aktivitesi kanser hücrelerinin hücre döngüsü süreci, proliferasyonu, apoptozisi, metastazi, anjiyogenezi ve invazyonunu düzenleyen çeşitli hücre sinyal moleküllerinin modülasyonu aracılığı ile olmaktadır. Resveratrolün kemoterapiye direnç mekanizmalarının üstesinden gelerek kemoterapötik ajanlara karşı dirençli hücreleri duyarlı hale getirdiği de gösterilmiştir (2). Resveratrolün antitümör etkisinin ribonükleotid redüktaz, deoksiribonükleik asit (DNA) polimeraz, protein kinaz C, siklooksijenaz-2 (COX-2) aktivitelerinin baskılanması, karsinogenezin baskılanması, apoptotik hücre aktivasyonuna bağlı olabileceği de bildirilmiştir (3). Resveratrol, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozisin indüklenmesinde önemli rol oynamaktadır. Fakat apoptozis-indüklü etkileri farklı tümör hücrelerinde farklılık göstermektedir (4). İnsan promyelositik lösemi hücrelerinde resveratrolün hücrelerin çoğalmasını baskıladığı, apoptozisi etkin kıldığı, antiapoptotik onkoprotein B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2) artışı engelleyici ve DNA'da kırılmalara neden olduğu gösterilmiştir (5). Ayrıca resveratrolün prostat kanseri ve kolon kanserinde p53 bağımlı apoptozise aracı olduğu bildirilmiştir (6). K562 hücrelerinde resveratrol ile aktive olan protein kinaz C (PKC) ve ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (ERK1/2) p53 fosforilasyonu ve apoptozise neden olduğu rapor edilmiştir (7). Resveratrolün meme akciğer, prostat, kolorektal kanser, mide kanseri, özafagus tümörleri, pankreas kanseri, lösemi gibi çeşitli kanser türleri üzerine antiproliferatif olarak rol oynadığı bildirilmektedir (8). Resveratrolün, malignant hücrelerde özellikle DNA sentezinde rol oynayan bir enzim olan ribonükleotid redüktazı inhibe ederek tümör hücrelerinin büyümesini engellediği de gösterilmiştir (9). Ayrıca resveratrolün, kanserli hücrelerde, nükleer faktör kappa B (NFκB) aktivasyonunu inhibe ederek ve tümör nekroz faktör alfa (TNFα) üretimini azaltarak tümör gelişimini önlediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (10).

Çalışmamızda öncelikle resvarotrol iyi bir taşıyıcı ve toksisitesi olmayan gümüş nanopartiküle (AgNPs) bağlanacak ve gerekli karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra Mcf-7 ve Mda-Mb-231 hücre hatları üzerindeki etkileri incelenecektir.

Resveratrol ve gümüş nanopartikül bağı resveratrol'ün meme kanseri hücre hattı (Mcf-7 ve Mda-Mb-231) üzerine etkilerini araştırılacaktır. Kontrol olarak Mcf-10A sağlıklı meme hücre hattı kullanılacaktır.

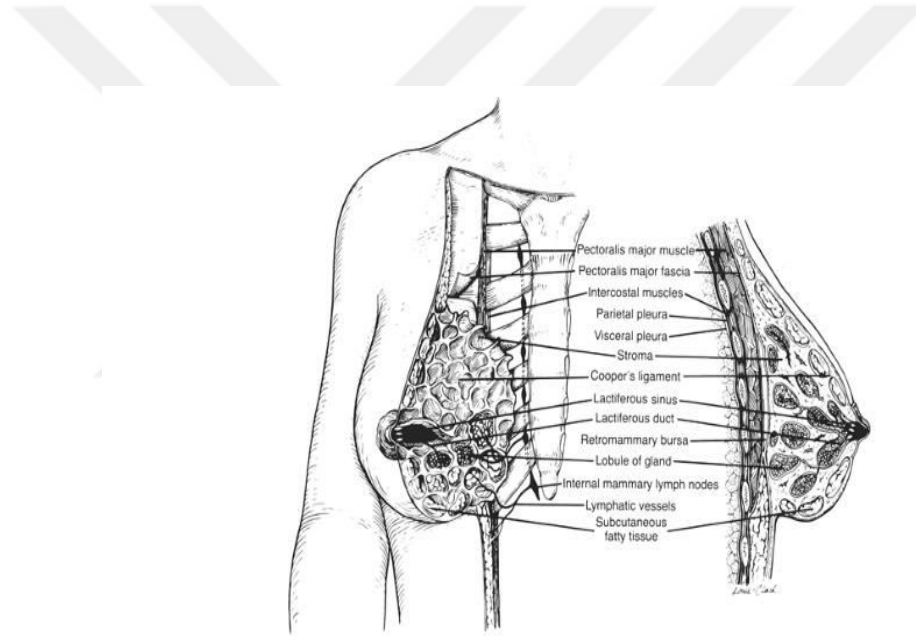
Pozitif kontrol olarak da takson kullanılarak hücre hatlarında hücre proliferasyonuna 2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT) ile bakılarak inhibisyon konsantrasyon değeri (IC_{50}) değerleri hesaplanacaktır.



2.GENEL BİLGİLER

2.1 Meme Anatomisi ve Fizyolojisi

Meme; baş ile karın arasındaki 2. ile 6. kaburgalar arasında konumlanmış bir salgı bezidir. Memenin katmanları dış katmanda deri, alt katmanda yağ doku ve iç kısımda meme dokusudur (11, 12, 13). Memenin başlıca vazifesi süt oluşumunu sağlamasıdır. Meme dış bölgesi diğer bölgeler ile mukayese ile daha fazla salgısal doku muhteva etmektedir ve bunun sonucu olarak lezyon oluşumu bu bölgede diğerlerine kıyasla daha sık gözlemlenebilir. Meme bezi boyutu; irsi faktörler, yaş, gebelik gibi etkenlere bağlı olarak farklılık sergileyebilir. Meme şeklini değiştiren bir diğer faktör ise yağ doku miktarıdır (14).



Şekil 2. 1.Meme Anatomisi (15)

Meme gelişimi hormonlar tarafından düzenlenmektedir. Erken ergenlik döneminde östrojen salgılanması görülmektedir. Hipotalamustan salgılanmış hormonlar hipofize gelerek buradan folikül düzenleyici hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) salgılanmasını sağlar. FSH vazifesi over foliküllerinin gelişimini uyarmaktır ve over foliküllerinde östrojen salgısı mevcuttur. Östrojen etkisinde cinsel organ ve meme gelişimi meydana gelmektedir. Yumurtlama görülmeyen dönemde ise östrojen memede bağ doku gelişimini, damarlaşmayı ve yağ doku stoklanmasını teşvik etmektedir. Yumurtlama evresinde progesteron hormonu salgılanması gözlemlenir. Östrojen ve progesteron hormonları etkisinde, meme gelişimi devam etmektedir (12, 13, 16).

2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi ve Oluşum Faktörleri

Kadınlar arasında tüm kanserlerin neredeyse %30'u meme kanseridir ve en sık gözlemlenen kanser türüdür (17). Türkiye'de ise meme kanseri, görülen tüm kanser türlerinin vaka sayısı olarak 1/4 'ine tekabül etmektedir (18).

Meme kanseri oluşum faktörü olarak tek bir sebepten söz edilemez. Meme kanseri oluşumunu; irsi yatkınlık, hormonal bozukluklar ve hormon terapileri, yaşam tarzı gibi pek çok etken arttırabilir (19).

DNA metilasyonlarının sonucu tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel baskılanmalarına neden olduğu düşünülmektedir. DNA metilasyonu, tümör baskılayıcı genler için inaktivasyon mekanizması olarak etki gösterdiği öne sürülmektedir (20).

Meme kanseri ile ilişkili pek çok gen tanımlanmış olup onkogenik aktivasyon mekanizmaları ve tümör baskılayıcı genler üzerine çeşitli inhibisyon mekanizmaları pek çok kanserde olduğu gibi meme kanserinde oldukça önem taşımaktadır.

2.2.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR); EGFR, insan büyüme faktörleri HER2, HER3 ve HER4'den meydana gelen reseptör familyasıdır. Epidermal büyüme faktör reseptörleri tirozin kinaz etkinliği gösterirler. EGFR üyeleri transfosforilasyonlar neticesinde heterodimer oluşumu ile çeşitli proteinlerin mekanizmalarını etkileyebilirler. Epidermal büyüme faktörünün (EGF) almaca bağlanması sonucu; epidermal büyüme faktörü hücre içine geçer ve bu epidermal büyüme faktör reseptörü otofosforilasyonuna sebeptir. EGF'nin hücre içine alınması ile subsrat düzeyinde fosforilasyon sebebiyle transkripsiyon faktörlerinin etkinliğinin artışı ile hücre bölünmesi teşvik edilir. Hücre bölünmesinin aşırı teşviki ile kanser hücrelerinde hücre sayısında kontrolsüz çoğalım gözlemlenmektedir (21, 22, 23).

EGFR gen kopya sayılarının kanserli hücrelerde sağlıklı hücrelere kıyas ile fazla oluşu onkogen özellik sergilediğinin kanıtıdır ve meme kanseri hücre hatlarında yüksek EGFR seviyeleri tespit edilmiştir (22).

2.2.2. İnsan Epidermal Büyüme Faktörü (HER2)

HER2 onkogeni, tirozin kinazlarla etkileşimi sonucu dimerleşme gösterirler ve dimerleşme sonucu almaç otofosforilasyonu neticesinde hücre içi sinyalleşmesinin ciddi oranda artışı ile gen çoğalmasına etkendirler (24, 25, 26, 27).

HER2'nin Her ailesiyle heterodimerizasyon oluşturması sonucu CerB-2 sinyallerinin aktifleşmesi ile CerbB-2 gen seviyesinde ve protein ekspresyonunda ciddi yükseliş meme kanserlerinde gözlemlenmiştir (28, 29, 30).

Meme kanserlerinde HER2'nin sağlıklı hücrelere mukayese ile daha fazla ekspresyonun gözlemlenmiş olup bu hastalığın seyrinin tanımlanmasında ve doğru tedavinin belirlenmesinde faktör olabilir (30).

HER2'nin aşırı ekspre edildiği kanser vakalarında, hastalar kemöterapiden daha az fayda gördüğü belirlenmiş ve HER2'nin aşırı ekspresyonunun kemöterapik direnci arttırdığı düşünülmektedir (25).

2.2.3. Hücresel Miyelositomatoz Onkogen (c-Myc)

c-Myc onkogeninin gen amplifikasyonu, meme kanserlerinin 1/5 'inde gözlemlenmiş ve c-Myc karsinogenez mekanizması arasında ilişki olabileceğinin düşünülmeye neden olmuştur. Agresif tip meme kanserlerinde c-Myc'nin çoğalması ile kanser hücre sayılarının artışı arasında ilişki mevcuttur (31).

c-Myc fosfoprotein olup; hücre çoğalması, hücre diferansiyasyonu ve planlı hücre ölümü apoptoz ile alakalı genlerin transkripsiyonuna etki etmektedir. c-Myc gen sayısındaki artış hücre siklusunu bozarak p53 yolağı ile hücrenin apoptoza yönlendirilmesinde etkilidir. c-Myc geninin fazla ekspresyonu veya gen üzerindeki mutasyonlar meme kanserine etkendir (31, 32, 33).

2.2.4. Ras

Sinyalleşmede görevli ve guanosin nükleosidlerini bağlayabilen Ras, GTP ile aktif hale gelerek protein kinazlarla etkileşimleri sonucunda mitoz bölünmenin teşvik edilmesinde etkilidirler. Nokta mutasyonları ile Ras onkogen özellik gösterebildiği gibi Ras' ın onkogen özellik göstermesinin diğer sebebi gen ekspresyonunda artıştır (34, 35, 36).

H-Ras-1 allel kaybı kötü prognoz ile ilişkilidir ve H-Ras-1 genotip analizinin prognostik yöntem olabileceği düşünülmektedir (37).

Ras ürünü olan p21, kanser oluşumunda etkili olup p21'in ekspresyonun yaşlı bireylerde yavaşlaması neticesinde hücre sayılarında kontrolsüz artış görülmekte, bu da kanser oluşumuna etki etmektedir. Ras onkogeni, radyasyon ve kemoterapiye karşı direnci yükseltmektedir (34, 35, 37, 38).

2.2.5. Nükleer Faktör Kappa B

Nükleer faktör kappa B'nin sentezi; G0 fazında hücre sitoplazmasında gerçekleşmektedir, aktivasyonu ise sitokinler, radyasyon gibi çeşitli uyaranlar ile gerçekleşmektedir (39, 40).

Nükleer faktör kappa B aktif halde iken IL2 aktivasyonunu sağlayarak Jasus Kinaz 3 uyarımına neden olur. Aktif haldeki Jasus Kinaz 3 apoptozdan kaçış mekanizmasında önemli STAT3 aktivasyonunu sağlamaktadır (41).

Nükleer faktör kappa B aktivasyonunun, anti kanser terapi rezidansı bakımından önemi söz konusudur (42). Nükleer faktör kappa B transkripsiyon faktörünün inhibe edilmesinin, meme kanseri de dahil bir çok kanser tiplerinde tümör nekroz faktör, kemoterapi ve radyoterapi duyarlılığına etkisi tespit edilmiştir (43, 44).

Nükleer faktör kappa B birçok uyaran ile indüklenmektedir. Nükleer faktör kappa B 'nin kemöterapik ajanlar ve gama radyasyon uyaranlar sonucu aktivasyonun apoptoz rezidansı ve kemöterapik dirence sebep olduğu ileri sürülmektedir (45, 46).

2.2.6. Protein Kinaz B

Karsinogenez mekanizmasında protein kinaz B aktivasyonunun hücre siklusundaki rolü oldukça önemlidir. Protein kinaz B, p21 sabit yapısının meydana gelişini teşvik etmektedir ve hücre siklusunun ilerleyişinde etkendir ve p21'in bozunmasını teşvik eden proteinin inhibisyonunda da etkilidir (47). Kontrolsüz protein kinaz B uyarısı neticesinde p27 hücre siklusunda inhibitör etki gösteremez ve tümör hücre sayısında artış gözlemlenir (48, 49).

Protein kinaz B'nin diğer direkt etkisi ise apoptoz sürecinde görülmektedir. Protein kinaz B kaspaz 9 için inhibitör özellik sergilerken, nükleer faktör kappa B tarafından uyarılarak antiapoptotik yanıt oluşturulmasında rol oynamaktadır (47).

2.2.7. Beta Katenin

Beta katenin proteini; hücrede wnt sinyal iletiminde ve adezyon bağlantılarında görev almaktadır. Sağlıklı hücrelerde beta katenin miktarı sabit tutulur iken, hücrede aşırı birikimleri sonucu çekirdeğe geçişleri tümörleşmeye sebeptir (50, 51).

Beta katenin adezyon bağlantılarındaki görevleri ile hücre morfolojisinde ve diferansiyasyon vb. düzenlemelerde etkilidir (51). Gelişim evresinde hücreler arası sinyal iletiminde görevli wnt sinyali beta kateninin nükleus ve sitoplazmada birikimine sebeptir (50).

Kanserde; beta kateninin hücrede birikiminde mutasyonların etkili olduğu bilinmektedir ve mutasyonlar beta katenin veya wnt sinyal sisteminde oluşabilir (52). CTNNB1 tarafından beta katenin kodlanmaktadır. CTNNB1 geninde meydana gelecek mutasyon beta kateninin hücre içinde birikime sebep olmaktadır (53, 54).

2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri

2.3.1 Östrojen

Yüksek konsantrasyonda östrojene uzun süre maruz kalmak kanser riskini artırır. (55, 56) Östrojenin, östrojen reseptöre bağlanması sonucu homodimerizasyon gözlemlenir. Homodimerizasyon oluşu ardından östrojen reseptör, östrojen elementine bağlanarak gen düzenlemesinde görev alır (57, 58, 59). Hücre sayısındaki artış DNA eşlenmesindeki yanlış eşleşmeyi arttırmaktadır. Östrojen reseptöre bağlanma neticesinde onkogen aktivasyonları ile karsinogeneze destek sağladıkları gözlemlenmiştir (60). Östrojenler, östrojen reseptörden bağımsız olarak genotoksik metabolitler ile kanser oluşumunu aktive edebilir (61). Östrojenler 2-OH ve 4-OH metabolitlere dönüşür ve bu metabolitlerin de 2,3 ve 3,4 kinonlara dönüşümü ile DNA pürin bazlarına bağlanmaları sonucu DNA katım ürünleri gözlemlenir. Katım oluşumlarının DNA'dan ayrılışı sonucu nokta mutasyonlara açık bölgeler meydana gelir ve bu mutasyonlar kanser ile sonuçlanmaktadır (62). Östrojen kinon oluşumları meme kanseri vakalarında, kontrol grupları ile kıyaslandığında çok daha fazla gözlemlenmiştir (63).

2.3.2 Aile Hikayesi

Aile hikayesinde meme biyopisi sonrası iyi huylu proliferatif kanser belirteci tespit edilen bireylerin varlığı ilişkili diğer aile bireylerinde meme kanseri risk artışına işaret etmektedir. Ailenin bir bireyinde meme kanseri teşhisi mevcut ise meme kanseri risk faktörü 1.9 misli artmaktadır. Meme kanseri teşhisi annede mevcutsa risk 2 misli artarken kız kardeşte meme kanseri teşhisi varsa 2.3 misli risk artışı belirlenmiştir. Hem anne hem kız kardeş meme kanseri teşhisli ise risk 3.6 misli artış göstermektedir. İkincil derece genetik yakınlık durumunda bulunan teşhislerde ise risk 1.5 misli artmaktadır (64).

BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar meme kanseri teşhisi konan bireylerin yaklaşık %10'unda gözlemlenmiştir. BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon gözlemlenen bireylerin riski yaşam süresince %40 ile %80 arasında artış sergilemektedir (65).

2.3.3. Doğum Yaşı, Menopoz, Menarj ve Laktasyon

İlk menstürasyon kanaması menarjin erken yaşta görülmesi ve menopozun olağan yaştan daha ileriki yaşlarda görülmesi gibi etkenler ile menopozdan sonra uygulanacak hormon kompleksleri karsinogenez oluşumunu teşvik eder. İlk menstürasyonun 11 yaştan ve altında olduğu kadınların meme kanserine yakalanma olasılığı 14 yaş ve üstü yaşlara kıyasla %20 fazladır (66). Menopoz evresinin başlangıcı için geciken her yıl riski %3 yükseltmektedir (67).

2.3.4. Hormon Replasman Terapileri ve Oral Kontraseptif Kullanımı

5 yıl süresince oral yoldan hormonal menopoz terapisi sonucu meme kanseri riskini %15 yükselmiş iken terapinin 10 yıla çıkması sonucu bu riski %34 yükseltmektedir (68).

Oral gebeliği önleyicilerin etkileri net olarak ortaya konmamakla beraber çalışmaların bazısında meme kanseri riskinde artış gözlemlenir iken bazı çalışmalarda ise net bağlantıya ulaşılamamıştır (69). Çalışmalardaki sonuçların değişik olmasının sebebinin oral gebeliği önleyiciler içeriğindeki farklılıkların olabileceği düşünülmektedir (68).

2.3.5. Obezite

Menopoz evresi öncesi kadınlarda obez kadınlar ile normal kilodaki kadınlar kıyaslandığında meme kanseri riski yarı misli artarken, menopoz sonrası evrede bu değer %25 artar. Obezitenin meme kanserini yükseltmedeki etkisi menopoz ile alakalıdır (70).

Menopoz sonrası obez ve östrojen/progesteron negatif kadınlarda meme kanseri riski %80 oranında ciddi bir değerde artmaktadır, bu risk yükselişi adipoz dokudaki androjenlerin östrojene çevrimi sonucu östrojen seviyesindeki yükselişi ile alakalıdır (71).

Bunların yanı sıra kadınlarda gözlemlenen ağırlık artışı, ağırlık kaybına uğrayan veya daha az ağırlık artışı gözlemlenen kadınlara göre meme kanseri riskini arttırmaktadır (72).

2.3.6. Yaş ve Cinsiyet

Kadınlarda meme kanseri riski, erkekler ile mukayese edildiğinde 100 misli fazladır. Cinsiyet farkına ilave olarak yaş artışı meme kanseri riskini ciddi oranda arttırmaktadır, 30 yaşındaki bir kadına göre 70 yaşındaki kadının meme kanseri riskine yakalanma oranı 10 misli fazladır (73).

2.3.7. Kalori Kısıtlaması

Diyet yoluyla kalori alımının düşürülmesi sonucu, hücre çoğalımında düşüş gözlemlenmiştir (74). Diyet yoluyla alınan enerjinin düşürülmesinin meme kanseri karşısında preventif etki göstermesi dolaşımdaki inflamatuvar sitokin ve interlökin düzeylerindeki düşüş ile ortaya çıkmaktadır (75).

2.3.8. Metabolik Sendromlar

Kan şekerinin yüksek seyri, yüksek düzeyde seyreden trigliserit, obezite, yüksek tansiyon, yüksek düzeyde insülin gibi faktörler meme kanseri ile alakalı faktörlerdir ve meme kanseri riskini arttırmaktadırlar (76). Beden kitle indeksinde olacak artış meme kanseri riskini %12 yükseltirken, yüksek değer gösteren trigliserit %8, yüksek gözlemlenen açlık şekeri %19, yüksek tansiyon %13, düşük seyreden yüksek yoğunluklu lipoprotein düzeyi %39 oranında arttırmaktadır (77).

2.3.9. Radrasyon

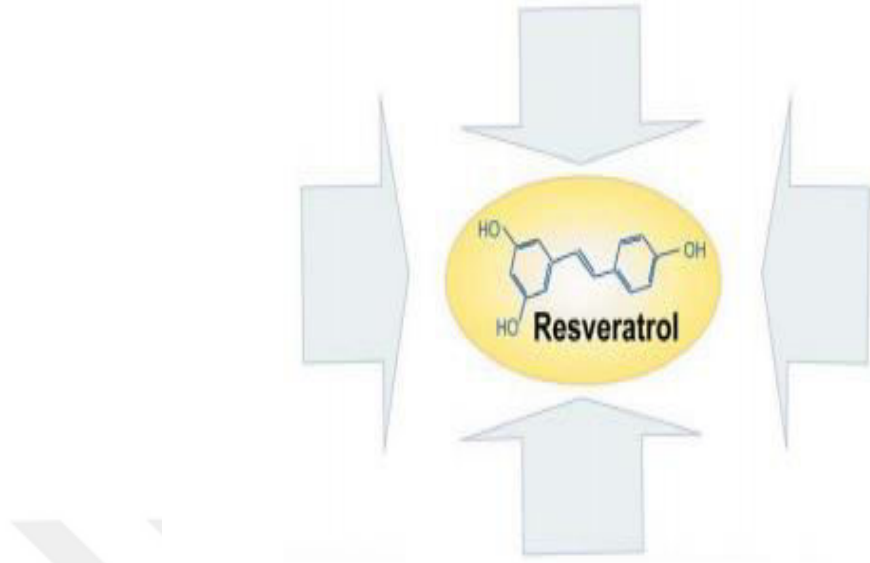
Radrasyon DNA üzerinde sarmal yapıda değişikliklere, pürin halkalaşmasına ve DNA'nın yapısının oluşturulmasında rol oynayan fosfadiester bağ kırılımında rol oynamaktadır. (78) Terapi amaçlı uygulanan radrasyona maruz kalmak dahi meme kanseri riskini yükseltmektedir (79). Radrasyona maruz kalınan yaş düştükçe, meme kanseri riski artmaktadır (80). Radyografi, mamografi uygulamaları dahil radrasyon meme kanseri riskini yükselttiği için bu uygulamalara karar verilirken dikkatli olunmalıdır (81).

2.3.10. Sigara ve Alkol Kullanımı

Alkol tüketmeyen kadınlar ile günlük 35-44 gram alkol kullanan kadınlar mukayese edildiğinde meme kanseri riski %32 yükselirken, günlük 45 gram ve fazla alkol kullanan kadınlarda %46 risk yükselişi gözlemlenmektedir (82). Sigara tüketimi ile meme kanseri riski arasındaki bağlantı tam olarak aydınlatılamamış dahi olsa sigara tüketimi sonucu menopoza öncesi kanserinde artış gözlemlenmiştir (83). Sigara tüketimine erken yaşta başlanması ve sigaranın etkilerine maruziyetin artması ile meme kanseri riskinin yükseleceği düşünülmektedir (84).

2.4. Resveratrol

Resveratrol, Japonya'da Takaoka'nın çalışmalarıyla 1939 tarihinde Veratrum grandiflorumdan sentezlenmiştir (85). Resveratrol fitoalaksin karakter sergilemektedir ve fitoalaksin bitkilerce hastalığa vesile olabilecek mikro canlılara müdafaa amacı ile üretilen bir maddedir (86).



Şekil 2. 2.Resveratrolün kimyasal yapısı (87)

2.4.1. Resveratrolün Doğal ve Sentetik Türevleri

Resveratrol, polihidroksistilben ailesinin alt grubuna mensup bir polifenol yapıdır. Stilbenler bitkilerde biyolojik aktivite gösteren bir sınıftır. Sadece stilbenlerden trans-piceid ve trans resveratrol insanda beslenme sonucu gözlemlenmektedir. Diğer form resveratroler ise cis formuna sahip astrigin ve pisetonrol olarak bilinmektedir (88).

Bu cis forma sahip yapılar naturel olarak ortaya çıkmıştır. Biyoaktif vasıf sergileyen resveratrolerin çoğu trans forma aittir (89). Resveratrolün çeşitli biyolojik aktiviteleri bilinmektedir.

2.4.2. Resveratrolün Anti Kanser Etkisi

Karsinogenezin resveratrol tarafından inhibe edilebileceği ilk olarak fare cilt kanseri üzerindeki çalışmada bulunmuştur (90).

Resveratrol, tümör oluşumunun başlangıcında gerçekleşen olayları inhibe etme yeteneğindedir. Resveratrol ile terapi uygulanan insan lösemi HL-60 hücrelerinde serbest radikal oluşumu resveratrol tarafından baskılanmıştır (91).

Resveratrol, hidroksiller ve süperoksitler tarafından indüklenen ve hücreler tarafından üretilen radikalleri temizlemektedir (92).

Resveratrolün N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidinin mutajenitesini inhibe ettiği bilinmekte ve bu resveratrolün anti mutajen etkisinin bir göstergesidir (93).

Resveratrolün, anti kanser olarak bir diğer işlevi ise hücre zarlarını lipid peroksidasyonuna ve radikal oksijen türlerinden kaynaklanan DNA hasarına karşı korumasıdır (92).

İnsan meme kanseri hücre hattı Mcf-10A üzerinde resveratrol; 2, 3, 7, 8-tetraklorodibenzo-P-dioksin tarafından indüklenen sitokrom P450IA1 (CY1A1) VE 1B1 (CYIB1) ekspresyonunu ve bunların katalitik etkilerini inhibe edebilmektedir (94).

Resveratrol, çevresel arıl hidrokarbon benzo [a] piren (B[a]P) tarafından indüklenen ve CYPIA1/1A2 enzim aktivitesini ve kanserojen ekspresyonunu yukarı düzenleyen sinyal transdüksiyon yolunu baskılayarak, Mcf-7 ve karaciğer kanser hücre hattı HepG2 hücrelerinde katalize edilmiş CYP1A aktivasyonunu ortadan kaldırabilir. (94).

Resveratrol ayrıca insan lösemi K562 hücrelerinde kanserojen detoksifiye edici kinon oksidoreduktaz-1 aktivitesini ve ekspresyonunu arttırmaktadır (95).

Fare karaciğeri kanser hücresi Hepalcl7 hücrelerinde faz-II detoksifiye edici metabolik enzim kinon redüktaz aktivitesi resveratrol tarafından indüklenmektedir (96).

Resveratrol, nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2 'nin aktivasyonu aracılığıyla antioksidan ve faz-II detoksifiye edici enzimlerin aktivitesini ve ekspresyonunu arttırmaktadır (97).

Resveratrol, Mcf-10F hücrelerinde estradiol-3,4-kinon veya 4-hidroksiestradiol terapisinden sonra kinon oksidoreduktaz-1'in artışına neden olmuştur. (98)

İn vitro çalışmalar sonucunda, resveratrolün apoptozu indüklediği ve bu özelliği ile anti proliferatif aktivite sergilediği gözlemlenmiştir. Resveratrol, siklin ve siklin bağımlı kinazları değiştirerek G0/G1 fazında hücre siklusu inhibisyonuna neden olur (99, 100, 101).

Resveratrol; siklin D1, siklin D2 ve siklin E'nin ekspresyonunu azaltarak ve p21 ekspresyonunu arttırarak insan cilt kanseri A431 hücresinin gelişimini azaltmıştır.

Resveratrol ayrıca Mcf-7 ve prostat kanseri hücresi DU-145 hücresinde p21 ve p53

indüksiyonuna bağı olarak siklin D1 ekspresyonunu modüle ederek hücre proliferasyonunu baskılamaktadır (102).

Resveratrol, Bcl-2 ailesi proteinlerini değiştirerek hücre ölümünü indüklemektedir, resveratrol tarafından Bcl-2 ailesinden antiapoptotik proteinlerin inhibisyonu ve pro apoptotik proteinlerin aktivasyonunda kaspaz aktivasyonu ve sitokrom c salınımı için bir mekanizma olduğu gösterilmiştir (103). Bu etkilerin p53 ile alakalı olabileceği düşünülmektedir ki p53 tarafından Mda-Mb-231 hücrelerinde sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunu arttırması sonucu p21'i aktive ettiği ve farklı pro apoptotik genlerin transkripsiyonuna neden olduğu gözlemlenmiştir (104).

2.4.3. Resveratrolün İltihap Azaltmada Etkisi

Öncül iltihap yapıcı molekül üretiminde mühim olan siklooksijenaz enziminin, resveratrol tarafından sınırlandırılabilir. Kronik ve akut kaynaklı gözlemlenen ödemlerin, lipopolisakkarit temelli solunum yolu iltihaplarının ve kemik inflamasyonlarının resveratrol etkisi altında azalım sergilediği gözlemlenmiştir (105).

2.4.4. Resveratrolün Kalp Koruyucu Etkisi

Resveratrolün kalp koruyucu etkisi pek çok sinyal yolağı ile alakalı olabilmektedir. Resveratrol, nikotinamid adenin dinükleotid bağımlı deasetilaz sirtuin 1 (SIRT1) aktivitesi ile damar oluşumunu ve gelişimini teşvik etmekte ve akabinde oksidatif baskıyı azaltmaktadır (106). Resveratrolün, kalp fonksiyonlarını kalp krizi sonrası düzelttiğine dair araştırmalar mevcuttur (107).

2.4.5. Resveratrolün Nöroprotektif Etkisi

SIRT1 aktivasyonunu arttıran resveratrol, nöroprotektif etkisini Alzheimer, epilepsi gibi hastalıklar üzerinde yapılan çalışmalarda göstermiştir (108). Resveratrol, sıçan deneylerinde Bcl-2 ilişkili X apoptoz regülatörü (Bax) protein ekspresyonunu baskılayarak Bcl-2 protein dışı vurumunu arttırmıştır (109).

2.5. Nanoteknoloji ve Nanoparçacıkların Tıpta Kullanımı

Nanopartiküller 1-100 nanometre boyutlara sahip olan ve bu nanopartikülleri inceleyen bilim alanı nanoteknoloji olarak adlandırılmaktadır. Tıp alanı dahil nanoteknoloji birçok gelişme yaratmaktadır (110). Nanoparçacıklar diğer maddelerden yalnızca küçük boyutları ile değil; biyolojik davranışları, kimyasal etkileşimleri gibi

vasıfları ile de ayrılmaktadırlar. Nanoparçacıklar tıp alanında başlıca hedeflenmiş hücrelere gen transferi, ilaç dağıtım sistemlerindeki spesifik bağlanma özellikleri ve tıbbi görüntüleme alanında kullanılmaktadır. Nanoparçacıklar, tanı ve tedavide diğer maddeler ile mukayese edilemez derecede spesifik özellik ortaya koyarlar. Nanoteknoloji ve nanoparçacıklar kanser terapilerinde, ilaç yan etkilerinin azaltılmasında, ilaçların hücre içine taşınmasında, oküler vakaların analiz ve tedavisinde, tıbbi görüntülemelerde, kemiklerin yeniden onarımının hızlandırılmasında, organ nakillerinde organ reddinin engellenmesinde, fototermal tümör yok edilmesi işlemlerinde kullanılmaktadır (111, 112, 113, 114).

2.6. Gümüş Nanoparçacıkları

Gün geçtikçe bakteriler antibiyotiklere rezistans geliştirmekte ve antibiyotik ilaçlarının yetersiz halde kalmaları neticesinde enfeksiyon tedavilerinde olumsuz sonuçlar gözlemlenmektedir. Enfeksiyon tedavilerinde bakteri direncinin üstünden gelmek amacı ile nanoparçacıklardan yararlanma fikri ortaya çıkmış ve buna uygun girişimler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam etmektedir. Anti bakteriyel işleve sahip nanoparçacıklara verilebilecek en yaygın kullanımı olan örneklerden biri ise gümüştür. Gümüş nanoparçacıkları (AgNPs), algılayıcı ışınlar ile inceleme, kataliz ve anti bakteriyel özellik sergilemesi özellikleri ile tıp alanında kullanımı mevcuttur. Bunlara ilaveten yara kaynaklı enfeksiyonlarda AgNPs uygulamaları tercih edilmektedir (115, 116).

AgNPs ler biyolojik algılayıcı girişimdeki başarıları ve çok eski zamandan beri bilinmekte olan anti bakteriyel etkileri ile pek çok çalışmada yer edinen bir materyal olmuştur. Öyle ki, Grek uygarlığından beri gümüşün anti bakteriyel etkisi keşfedilmiş ve besin saklanması için gümüş malzemeden imal ürünler tercih sebebi olmuştur. Kitlesel ölümlere sebep olan 1500'lü yılların veba pandemisinde soylular mutfak gereçlerinde gümüşten imal gereçler kullanmış ve salgından daha az etkilenmişlerdir. Hücre zarından hızlı geçme yeteneğinde gümüş nanoparçacığı, anti biyolojik niteliği ile tıp ve ecza biliminin en ilgi duyduğu nanoparçacıklardan olmuştur ve terapi amaçlı kullanımları oldukça fazladır (117).

2.6.1. Nano Gümüş Parçacıklarının Hücre Zarından Geçiş

Gümüş nanoparçacığı antibakteriyel etkisini, bakteri vb. hücre zarı ve varsa hücre duvarını geçerek DNA'yı işlevini engellemesi ile sergiler. Neticede bu engelleme ile mikroorganizma artışı engellenmiş olur. Nanoparçacık gümüş sayesinde serbest kalan elektronlar, hücre zarının yapısını bozarak DNA ve ribonükleotid asit (RNA) eşlenmesine engel olarak çoğalmanın önüne geçmiş olur (117, 118).

2.6.2. Gümüş Nanoparçacıkların Antibakteriyel İşlevleri

Nanoparçacık gümüşler bakterilerin metabolik faaliyetlerini değişme uğratma yeteneğindedir (119).

Bakterilerin metabolizmasını değiştirme özelliği ile gümüş nanoparçacıkları terapiler için bir seçenek haline gelmektedir ki bu nanoparçacıklar ayrıca biyofilmlere girebilmektedirler (120).Bakteriler ile etkileşime girebilen gümüş nanoparçacıkları antibakteriyel işlevlerini sergileyebilirler öyle ki bu temas hidrofobik çekim, Wan der Walls etkileşimi, almaçlara bağlanma veya elektrik çekim kuvveti ile olabilir. Bakteriye temas eden gümüş nanoparçacıkların bakteri zarını geçişinin ardından hücre zar yapısı ve faaliyeti değişime uğrar. Bu bozulma ile geçirgenliğin değişmesiyle görülen elektrolit dengesizlikler, oksidatif baskı DNA ve ribozomları etkileyerek enzim bozunmaları ve proteinlerin aktif formlarından çıkış gözlemlenir (118, 121).

2.6.3. Reaktif Oksidatiflerin Meydana Gelişi

Gümüş nanoparçacıkların antibakteriyel etkisinin sağlanmasının bir yolu bu nanoparçacıklar tarafından üretilen reaktif oksidatif türler (ROS)tur. ROS, hidroksil radikaller, tekli oksijen, peroksit radikal ve hidrojen peroksit gibi oksidanlardan meydana gelmektedir (122, 123).

2.6.4. Protein İnaktivasyonu ve DNA'nın Yok Edilmesi

Gümüş atomları tabiatı itibari ile tiyol gruplarına bağlanırlar ve bunun neticesinde enzim fonksiyonları faaliyet gösteremezler. Gümüş iyonlarının kendi pürin ve pirimidin çiftleri arasında değişime uğrayarak hidrojen bağlarına etki ederek yapısını değiştirdiği ve DNA molekülünü parçaladığı kayıt olunmuştur. Bu iyonların hücre içerisinde DNA'ya tutunma eğilimi kesin olarak aydınlatılmıştır (124).

2.6.5. Solunum Zinciri Enzimleri ve Hücre Zarı İnhibisyonu

Araştırmalar neticesinde nanoparçacık gümüşün mikroorganizma hücre duvarı ve hücre zarına yapıştığı, tiyol ile ilişkileriyle solunum enzim faaliyetlerini bozduğu ve hücre ölümüne sebebiyet verdikleri kayıt olunmuştur (125).

Çoklu rezistans özelliği sergileyen izolat terapilerinde nanoparçacık gümüş ile çeşitli antibiyotikler beraber uygulanmış, oldukça az miktarlarda dahi antibiyotik etkisinin anlamlı derecede artış gösterdiği gözlemlenmiştir (126).

Mevcut olunan ortamın hidrojen potansiyeli (pH) seviyesi, katyon sayısı, yüzey durumu ve nanoparçacığın boyutu, gümüş nanoparçacığın toksisitesi ile alakalıdır ve Holt araştırmasında potasyum artışının gümüş nanoparçacığının toksisitesini arttırdığını ortaya koymuştur (127, 128).

2.6.6. Gümüş Nanoparçacıkların Anti Kanser Etkileri

AgNP'ler hücrelere difüzyon, fagositoz veya endositoz yoluyla girerek mitokondriye, sitoplazmaya ve çekirdeğe doğru yönelebilirler. AgNP'lerin serbest radikal (ROS) oluşumu, anti proliferasyon metabolizması ile ilişkilendirilir. AgNP'lerin mitokondriye, çekirdeğe ve redoks aktif organellere translokasyonu ROS oluşum sonucudur. Kansere hücre hatları ve normal hücre hatlarında ROS; membran yapısının bozulmasında, mitokondriyal hasarda, oksidatif stresle alakalı DNA hasarında etkilidir (129, 130, 131, 132).

Düşük AgNP konsantrasyonları; glutatyon, glutatyon peroksidazlar ve süperoksidaz dismutaz gibi antioksidan artışlarını teşvik edebilir (129).

AgNP'lerin redoks aktivitesiyle, sitotoksikite ve genotoksikite kaynaklı programlanmış hücre ölümünde rol oynadığı ve bu özelliği ile tümör çoğalımına karşı terapide kullanılabileceği düşünülmektedir (133, 134, 135, 136).

ROS bağımlı yollar AgNP sitotoksikiteğinde önemli rol oynamaktadır. İsviçre Albino farelerde farklı konsantrasyonlarda AgNP sonucu doza bağlı olarak apoptoz artışı gözlemlenmiştir (137). Yine bu tip farelerde oksidatif stres artışı gözlemlenmiştir (138, 139, 140).

ROS üretimi sitotoksosite ve genotoksosite ölçüsü olarak yorumlanmaktadır bunun sebebi matriks metaloproteinazların ekspresyonlarında değişikliğe sebep olması, DNA hasarına ve apoptoz mekanizması ile hücre ölümüne sebep olmalarıdır (137).

AgNP'lerin, insan glioblastoma hücreleri U251 ve IMR90 hücrelerinde G0/G1 VE S ve G2/M hücre siklusu geçişlerini durdurduğu gözlemlenmiştir (141).

Mda-Mb-231 meme kanseri hücre hatlarında ise erken apoptoz, geç apoptoz ve nekrotik hücre ölümünde AgNP etkisi gözlemlenmiştir (142, 143, 144).

2.7. Hücre Hatları

2.7.1. Mcf-7 Hücre Hattı

Mcf-7 hücre hattı ilk olarak Dr. Soule ve meslektaşlarınca Michigan Kanser Vakfı'nda 69 yaşında metastatik durumda bir kadından izole edilmiş ve izole edildiği yerin adının baş harfleri ile isimlendirilmiştir (145). Mcf-7 hücre hattı zayıf yayılma sergileyen, östrojen bağımlı ve halis nitelikte bir hücre hattı olup, uzun yıllardır Dünya çapında anti kanser çalışmalarda model olarak kullanılmıştır. Mcf-7 hücre hattı, östrojen almaç alfa için kullanılması sebebiyle meme kanseri ile alakalı çalışmalarda tercih edilmektedir. Mcf-7 hattının tek klonu ortamda östrojen eksikliğinde dahi gelişebilmektedir. Mcf-7 hücre hattında östrojen almaç pozitif fakat HER2 negatiftir. Mcf-7 hücre hatları kemoterapiye duyarlıdır (146).

2.7.2. Mda-Mb-231 Hücre Hattı

Mda-Mb-231 hücre hattı adını ilk defa izole edildiği MD Anderson Kanser Merkezi'nden almıştır (147).

Mda-Mb-231 hücre hattı ilk olarak 51 yaşında kadından sağlanmıştır. Östrojen, Mda-Mb-231 östrojen almaç alfa, HER2 almaç ve progesteron negatif hattır. Kemoterapiye değişik oranlarda direnç sergilerler (146). Yapışkan yapıları sebebi ile yayılmacı hücre özelliği sergilerler, proteinleri parçalama özelliği ile ekstrasellüler matriksi delme kapasitesindedir. Düşük tutunma niteliği sergilerler (148).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı ve Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Tüm kimyasal analitik saflıkta kullanıldı. Gümüş nitrat (AgNO_3), sodyum borhidrür (NaBH_4), trisodyum sitrat (STC), resveratrol Sigma Aldrich'ten satın alındı.

3.1. Gümüş Nanoparçacıklarının Sentezi

Hepokur ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı çalışmaya göre bu adım gerçekleştirildi (149). Bu boyutlar başlangıç olarak Hepokur ve arkadaşlarının referans aldığı gibi Agnihotri ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınladıkları makalede uygun olduğu belirtilen 2-10 nm aralığındaki boyutlarda sentezlendi (150). Bunun için 1×10^{-3} M gümüş nitrat $\text{Ag}(\text{NO}_3)$, 2×10^{-3} M sodyum borohidrit (NaBH_4) ve 4.5×10^{-3} M trisodyum sitrat (TSC) kullanıldı. 1:1 oranında sodyum borohidrit (NaBH_4) ve trisodyum sitrat (TSC) karışımı karanlık bir ortamda 60°C 'de 30 dakika karıştırıldıktan sonra 90°C 'de 1:1 oranında damla damla gümüş nitrat çözeltisi ilave edildi. Elde edilen sıvı AgNP çözeltisi $+4^\circ\text{C}$ 'de karanlık ortamda saklanacaktır.

3.2. AgNP'lerin Karakterize Edilmesi

Bu basamakta sentezlenen AgNP'lerin ve ilaç bağlı AgNP'lerin karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. AgNP FTIR Analizleri

AgNP ve ilaç bağlı AgNP lerin infrared spektrumu, DTGS detektörü ve her spektrum için 10 tarama kullanılarak 4 cm^{-1} çözünürlüğe sahip bir Perkin Elmer Spectrum 400 spektrometresi ile kaydedilmiştir (149). Hem AgNP hem de ilaç bağlı AgNP Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) spektrumları karşılaştırılmıştır.

3.2.2. UV-VIS Analizleri

Optik ölçümler Hach Lange 500 Spektrofotometre ile yapılmıştır. Ölçümün optik spektrumu, 300-800 nm dalga boyu aralığında kaydedilmiştir (149). AgNP nin karakteristik dalga boyundaki absorpsiyonu ilaç bağlandığında absorpsiyonu ve dalga boyunda ki değişiklik izlenmiştir.

3.2.3. Zetasizer Ölçümleri

AgNP ölçümleri, bir Zeta sizer Nano ZS (ZEN1010) ile donatılmış (Malvern Instruments Ltd., Malvern, İngiltere) üzerinde 25°C sıcaklıkta yapılmıştır. Daha önce boyut analizi yapılmış olan AgNP lere ilaç bağlandığında tanecik boyutunda büyüme görülmüştür. Bu büyümenin de mümkün olduğu kadar 100 nm nin altında kalabilmesi için AgNP - ilaç derişim oranı ayarlanmıştır. Buna göre 1mg/1mL ilaç derişimi ile AgNP nin 1:1 (w/w) oranında tanecik boyutu 50 nm nin altında kalmıştır.

3.2.4. SEM-EDX Analizi

AgNP ve ilaç bağı AgNP lerin yüzey özellikleri EVO40 LEO bilgisayar kontrollü dijital tarama elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak araştırılmıştır. AgNP ve ilaç bağı AgNP ler nano boyutta oldukları için yüksek çözünürlükte görüntü alınabilmesi için iletken substratlar üzerine damlatılıp, kurutulduktan sonra SEM cihazında ve buna bağı olarak enerji yayımlı X ışını analizi (EDX) analizleriyle hem yüzey karakterizasyonu hem de elementel analizleri yapılmıştır. Böylelikle Zetasizer ile analiz ettiğimiz boyutlar SEM cihazı ile sağlaması yapılmıştır (149).

3.3. Hücre Kültürleri

Hücre kültürü çalışmaları ATCC'den temin edilen insan meme hücre hatları (Mcf-7) ve (Mda-Mb-231) ile normal insan meme hücre hattı (Mcf-10A) üzerinde gerçekleştirildi.

%10 fetal sığır serumu (FBS), %1 L-Glutamin, 100 IU/ml penisilin içeren besiyeri Dulbecco's Modification of Eagles (DMEM) ortamı kullanıldı. Hücre hatları, %95 nem ve %5 karbondioksit (CO₂) ile 37⁰C sıcaklıkta inkübatörde yeniden üretildi.

Mcf-10A hücreleri kültür çalışması; %5 (w/v) at serumu, 100U/ml penisilin, 100 mg/ml streptomisin, 0.5 mg/ml hidrokortizon, 100 ng/ml kolera toksin, 10 mg/ml insülin, 10 ng/ml epidermal büyüme faktörü ve %1 (w/v) L-glutamin (Sigma Chemical CO., St, MO.) ortamında gerçekleştirildi.

3.4. Gümüş Nanoparçacıkların Resveratrole Bağlanması

Gümüş parçacıklar kullanılarak 100 µM bir çözelti hazırlandı. Bu çözeltinin 10 mL'si bir behere kondu, 100 µM resveratrol çözeltisi ilave edildi ve 25⁰C sıcaklıkta 24 saat boyunca manyetik bir karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra santrifüj edilerek FTIR analizi yapıldı. İlacın bağlandığı sonucuna ulaşıldıktan sonra aynı hacimde seyreltildi ve testler için ilaç (+) nanoparçacıklar kullanıldı.

3.5. Sitotoksosite Analizi

Resveratrol (Res) ve 10 nm boyutundaki nanoparçacıkların sitotoksosite etkisi; Mcf-7, Mda-Mb-231 ve Mcf-10 hücre hatları üzerinde 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide (XTT) kullanılarak araştırıldı. İnhibisyon konsantrasyon (IC_{50}) değerleri XTT analizlerine göre hesaplandı. Mda-Mb-231 hücre hattında maksimum seçicilik gösteren nanoparçacık ve resveratrolün etkili dozajı belirlendi ve AgNPs-Res etkileşimi ortaya çıktı.

3.6. Apoptoz Ölçümü

Apoptotik görüntüleme Anneksin V yöntemi ile yapıldı. Anneksin V yöntemi; apoptoza yönelen hücrelerde hücre iç yüzeyinde bulunması gereken fosfatidilserin moleküllerinin hücre dışına çıkması sonucunda fosfatidilserine tutunabilen FITC benzeri floresan maddelerin apoptotik hücreyi tespit edilebilir hale getirmesi prensibine dayanan bir metoddur (151, 152, 153, 154, 155).

MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde seçici toksisite gösteren AgNPs-Res, AgNPs ve resveratrolün rolünü bulmak için Annexin V (apoptozis) ticari kitleri kullanıldı ve sitometrik ölçümler yapıldı. Steril 6 çukurlu plakalar kullanıldı. Uygun AgNP, AgNPs-Res ve resveratrol dozajları, 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda plaka kaldırılarak hücreler PBS ile yıkandı ve tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ile işleme tabi tutuldu. Dakikada 800 devir (rpm)'de 8 dakika süre ile santrifüjlendi. Elde edilen hücreler tripan mavisini ile sayıldı, ardından 5 μ L Annexin V eklendi. Karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. İnkübasyondan sonra buzun üzerine 400 μ L bağlama tamponu ilave edildi ve akış sitometrisi ölçüldü.

3.6.1. Hücre Döngüsü

MDA-MB-231 hücreleri, oyuk başına 10^6 hücre konsantrasyonunda 6 oyuklu bir plakaya yerleştirildi, daha sonra 24 saat inkübe edildi. Örneklerin maksimum IC_{50} değerleri uygulandı ve 24 saat tekrar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra numune çıkarıldı, üç kez 5 μ L fostat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Plakalara 1 μ L tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi ilave edildi. Hücreler, her biri 4 μ L DMEM ortamı içeren falcon tüplerinde toplandı ve hücre süspansiyonları 300g'de 5 dakika santrifüjlendi. 10 μ L hücre süspansiyonları her biri 10 μ L tripan mavisini ile karıştırıldı ve hücre sayımları neubauer lamda yapıldı.

Her bir tüpteki hücre sayısı 10^6 olarak belirlendi. Hücreler 3 saat -20°C sıcaklıkta tutuldu. Tüm süpernatantlar dikkatlice çıkarıldı. Süpernatant μL PBS içinde çözüldükten sonra, 200 μL bir muse hücre döngüsü kitine yerleştirildi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve akış sitometresinde okundu. Sonuçlar % hücre olarak verildi.

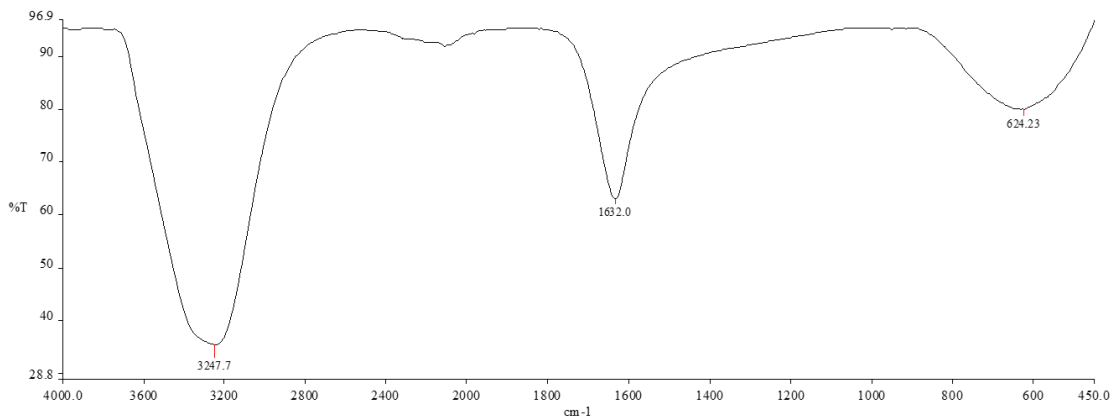


4.BULGULAR

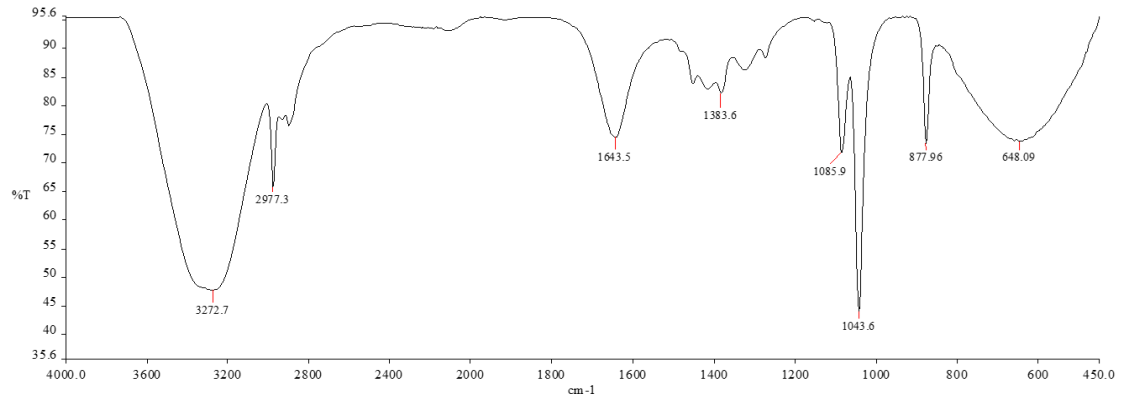
4.1. AgNP FTIR Analizi Bulguları

AgNP ve AgNP bağlanmış resveratrolün AgNP FTIR spektrumları belirlenmiş ve resveratrolün AgNP'ye bağlanması FTIR analizi sonuçları ile değerlendirilmiştir.

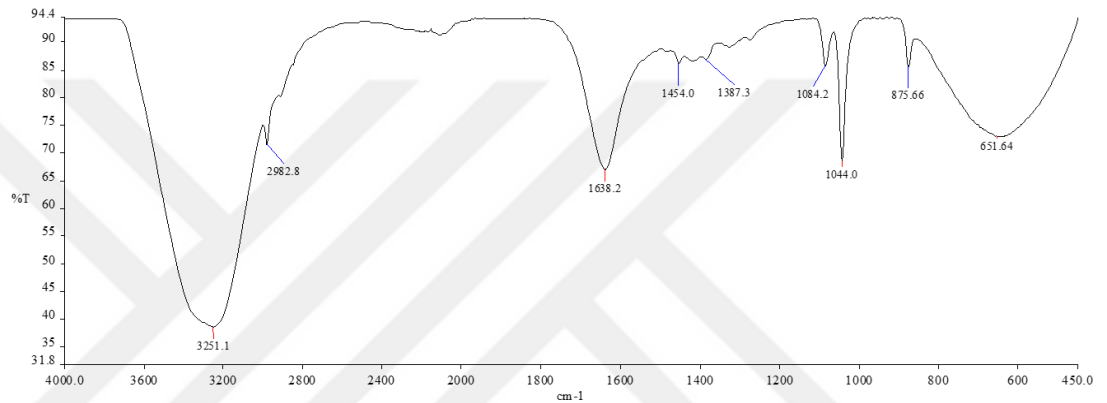
Şekil 4.1- 4.1.1 ve 4.1.2' de sırayla AgNP, Resveratrol, AgNP-Res. spektrumları verilmiştir. Şekil 4.1'de 3247 cm^{-1} de hidroksil ($-\text{OH}$) titreşim piki görülürken, 1632 cm^{-1} dalga sayısında sitratın karakteristik karboksil bandı görülmektedir. Gümüş iyonlarının gümüşe indirgenmiş ($\text{Ag}^+ > \text{Ag}^0$) halinin spesifik bir göstergesi olan 624 cm^{-1} de dalga sayısındaki stretching vibrations ile tespit edilmiştir. Şekil 4.1.1'de Resveratrole ait FTIR spektrumuna göre 3247 cm^{-1} de $-\text{OH}$ titreşim piki görülürken, 2977 cm^{-1} de $-\text{CH}$ alifatik gruba ait titreşim piki görülmüştür. $1643\text{-}1383\text{ cm}^{-1}$ de resveratrolün aromatik halkasına ait spesifik $-\text{C}-\text{C}$ titreşim piki, $1085\text{-}1043\text{ cm}^{-1}$ de $-\text{C}-\text{O}$ resveratrolün aromatik halka uçlarında bağlı olan aromatik $\text{C}-\text{OH}$ ya ait alkol hidroksi grubuna ait titreşim piki, 877 cm^{-1} de aromatik grubun $-\text{CH}$ titreşim piki ve 648 cm^{-1} de parmak izi bölgesinde aromatik gruba ait spesifik pik tespit edilmiştir (85). Resveratrolün AgNP'ye bağlanmasından sonra Şekil 4.1.2'de Şekil 4.1.1' ye piklerde kaymalar tespit edilmiştir. Bu resveratrolün AgNP'ye bağlandığının ciddi bir göstergesidir. Resveratrol'ün 3247 cm^{-1} de hidroksil ($-\text{OH}$) titreşim pikinin 3251 cm^{-1} ye, 2977 cm^{-1} de $-\text{CH}$ alifatik gruba ait titreşim piki 2982 cm^{-1} ye, $1643\text{-}1383\text{ cm}^{-1}$ de resveratrolün aromatik halkasına ait spesifik $-\text{C}-\text{C}$ titreşim piklerinin ise $1638\text{-}1387\text{ cm}^{-1}$ kaydığı görülmüştür. En önemlisi AgNP'nin karakteristik piki 624 cm^{-1} den 651 cm^{-1} e kayması resveratrolün AgNP'ye bağlandığının çok ciddi bir göstergesidir.



Şekil 4. 1. Ag-Nanopartiküllerin FTIR Spektrumu



Şekil 4. 2. Resveratrolün FTIR Spektrumu

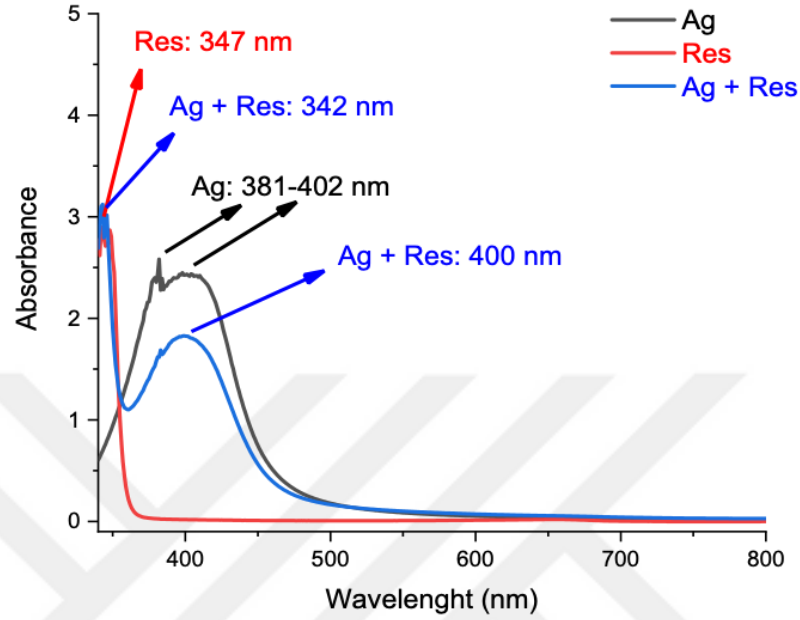


Şekil 4. 3. Ag-Nanopartikül - Resveratrolün Spektrumu

4.2. UV-VIS Bulguları

UV-VIS Spekturumu 300-800 nm aralığında Res, AgNP ve Res+AgNP için üç farklı ölçüm alınmıştır (Şekil 4.2). AgNP nin karakteristik 381 nm civarındaki piki net bir şekilde görülmektedir. AgNP ye ilaç bağlandığında bu pikin 400 nm ye kaydığı görülmektedir. Aynı zamanda Res'in 347 nm de ki maksimum absorpsiyonun AgNP ye bağlandığında 342 nm ye kaydığı anlaşılmıştır. UV-VIS'de genellikle bu bölgede $n-\pi^*$ ve $\pi-\pi^*$ geçişleri görülür. Res aromatik halka grupları ve hidroksil gruplarına sahip olduğu için bu elektronik geçişleri görmek normaldir. Fakat AgNP'ye bağlandığında

hidroksil grubundaki oksijende bulunan serbest elektronlardan da gümüş (Ag) metalinin d orbitallerine olan geçişler de bu bölge de görülmektedir.



Şekil 4. 4. Ag-Nanopartikül, Resveratrol, Ag-Resveratrolün UV-VIS Spektrumu

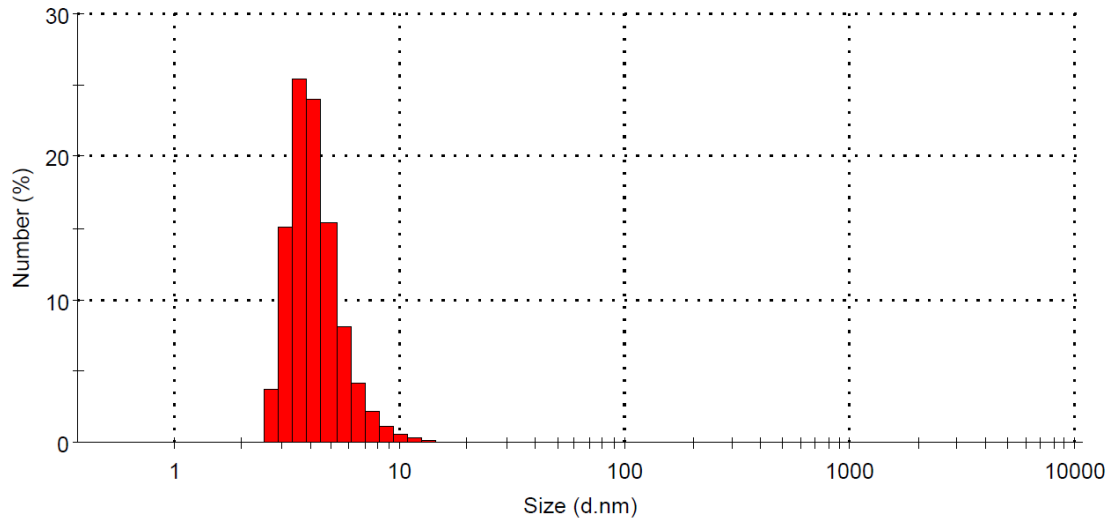
4.3. Zeta Sizer Ölçüm Bulguları

Zeta sizer ölçümüne göre gümüş nanopartikül ve resveratrolün Zeta Sizer bulguları şekil 4.3. ve 4.3.1’de verilmiştir. AgNP lerin boyutları 2 nm den 10 nm lere kadar dağılırken (PDI: 0.471, 4.33 nm, Derived Count Rate (kcps): 121.06) Res bağlandığında (PDI: 0.493, 32.67 nm, Derived Count Rate (kcps): 92.65) 24 nm den 50 nm kadar dağılım sergilemişlerdir. AgNP nin yüzey potansiyeli -41.7 yüzey yükleri (mV) iken Res bağlandığında -15.0 mV a düşmüştür. Bu da Res’in AgNP’ye bağlandığının çok ciddi bir göstergesidir. Aynı zamanda PDI değerlerinin 0.5 in altında

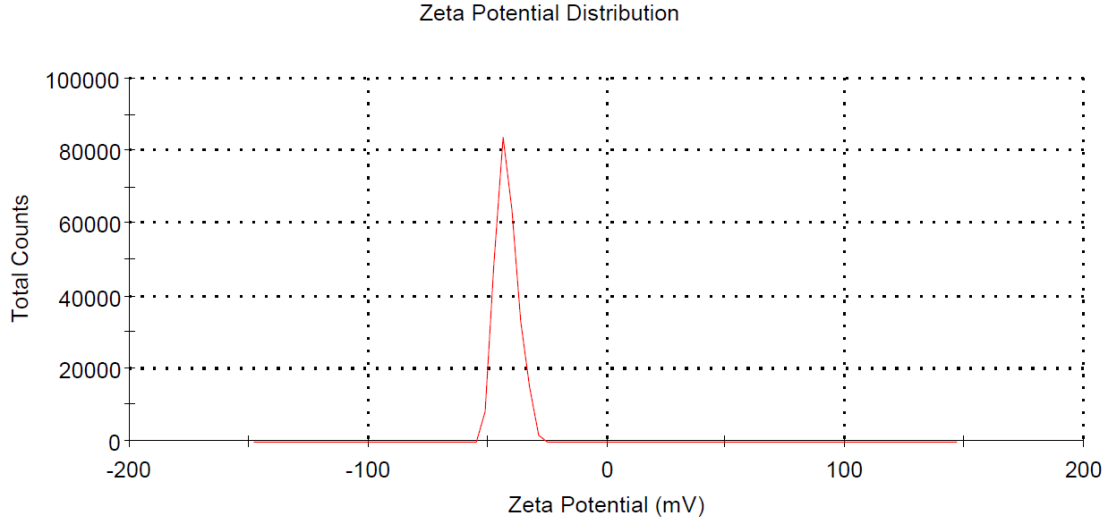
olması nanopartiküllerin kalitesini gösterirken Derived Count Rate (kcps) değerlerinin 100 e yakın ya da daha yüksek olması da nanopartiküllerin derişiminin çok daha düşük olmadığının bir göstergesidir.

Tablo 4. 1. Gümüş- Nanopartikül boyutlarının yüzdeleri

Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
0,4000	0,0		5,615	8,1		78,82	0,0		1106	0,0	
0,4632	0,0		6,503	4,1		91,28	0,0		1281	0,0	
0,5365	0,0		7,531	2,1		105,7	0,0		1484	0,0	
0,6213	0,0		8,721	1,1		122,4	0,0		1718	0,0	
0,7195	0,0		10,10	0,5		141,8	0,0		1990	0,0	
0,8332	0,0		11,70	0,3		164,2	0,0		2305	0,0	
0,9649	0,0		13,54	0,1		190,1	0,0		2669	0,0	
1,117	0,0		15,69	0,1		220,2	0,0		3091	0,0	
1,294	0,0		18,17	0,0		255,0	0,0		3580	0,0	
1,499	0,0		21,04	0,0		295,3	0,0		4145	0,0	
1,736	0,0		24,36	0,0		342,0	0,0		4801	0,0	
2,010	0,0		28,21	0,0		396,1	0,0		5560	0,0	
2,328	0,0		32,67	0,0		458,7	0,0		6439	0,0	
2,696	3,7		37,84	0,0		531,2	0,0		7456	0,0	
3,122	15,1		43,82	0,0		615,1	0,0		8635	0,0	
3,615	25,5		50,75	0,0		712,4	0,0		1,000e4	0,0	
4,187	24,0		58,77	0,0		825,0	0,0				
4,849	15,3		68,06	0,0		955,4	0,0				



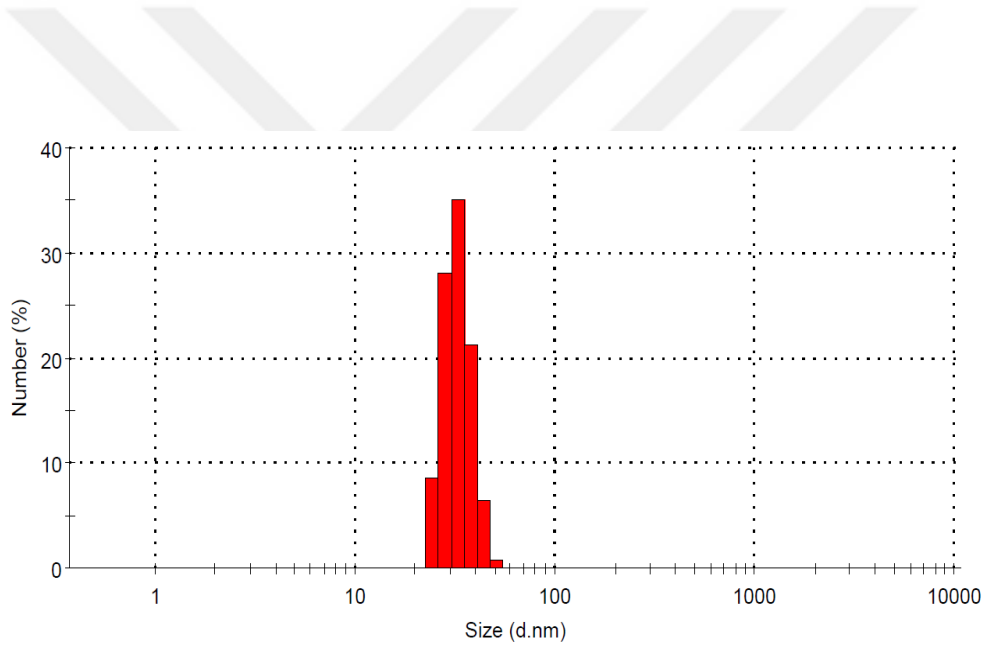
Şekil 4. 5. Gümüş Nanopartikül dağılım yüzde grafikleri



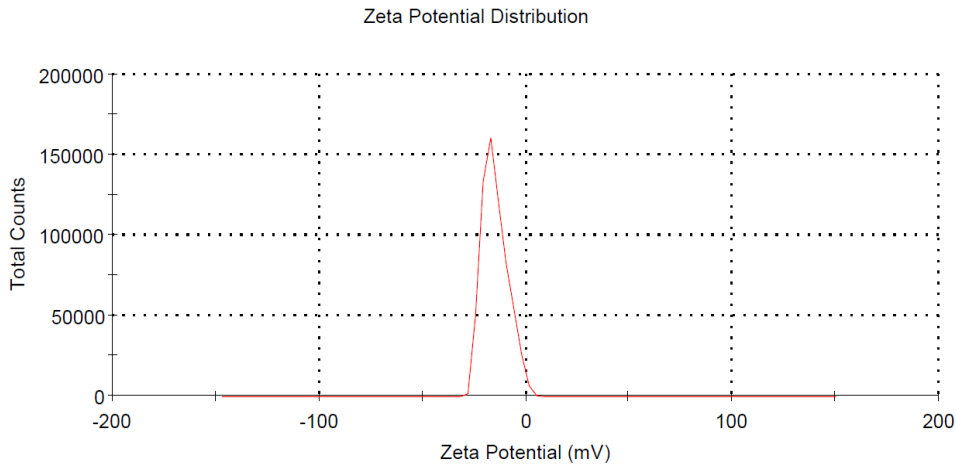
Şekil 4. 6.AgNPs Zeta Ölçümü (PDI: 0.471, 4.33 nm, Türetilmiş Sayım Oranı (kcps): 121.06, Zeta: -41.7 mV

Tablo 4. 2.Gümüş-resveratrol nano partikül boyutlarının yüzdeleri

Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
0,4000	0,0		5,615	0,0		78,82	0,0		1106	0,0	
0,4632	0,0		6,503	0,0		91,28	0,0		1281	0,0	
0,5365	0,0		7,531	0,0		105,7	0,0		1484	0,0	
0,6213	0,0		8,721	0,0		122,4	0,0		1718	0,0	
0,7195	0,0		10,10	0,0		141,8	0,0		1990	0,0	
0,8332	0,0		11,70	0,0		164,2	0,0		2305	0,0	
0,9649	0,0		13,54	0,0		190,1	0,0		2669	0,0	
1,117	0,0		15,69	0,0		220,2	0,0		3091	0,0	
1,294	0,0		18,17	0,0		255,0	0,0		3580	0,0	
1,499	0,0		21,04	0,0		295,3	0,0		4145	0,0	
1,736	0,0		24,36	8,5		342,0	0,0		4801	0,0	
2,010	0,0		28,21	28,0		396,1	0,0		5560	0,0	
2,328	0,0		32,67	35,1		458,7	0,0		6439	0,0	
2,696	0,0		37,84	21,2		531,2	0,0		7456	0,0	
3,122	0,0		43,82	6,4		615,1	0,0		8635	0,0	
3,615	0,0		50,75	0,8		712,4	0,0		1,000e4	0,0	
4,187	0,0		58,77	0,0		825,0	0,0				
4,849	0,0		68,06	0,0		955,4	0,0				



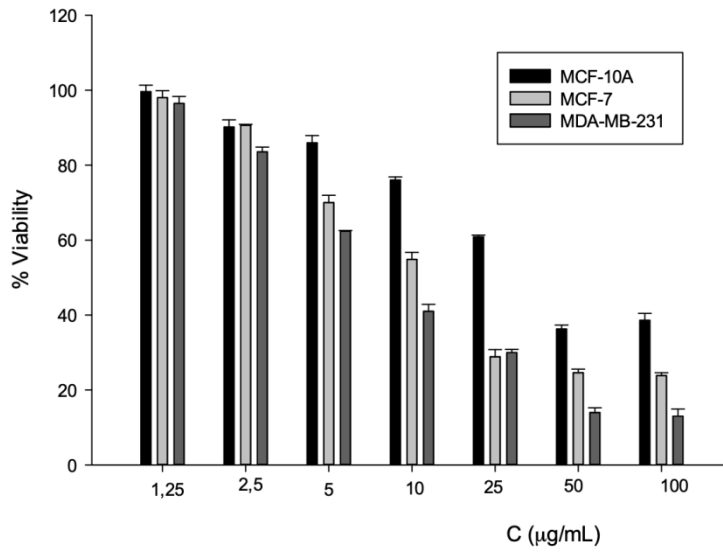
Şekil 4. 7.Gümüş-res Nanopartikül dağılım yüzde grafikleri



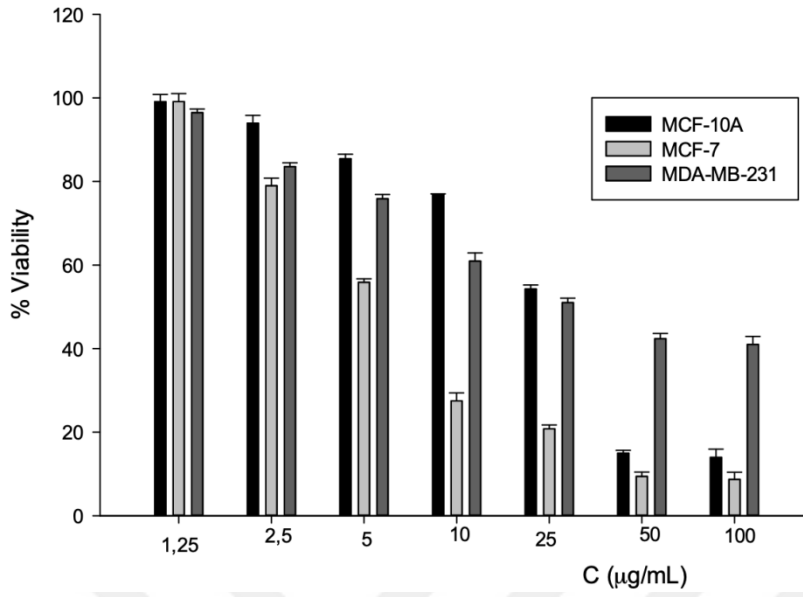
Şekil 4. 8. AgNPs ve Resveratrolün Zeta Ölçümü (PDI: 0.493, 32.67 nm, Türetilmiş Sayım Oranı (kcps): 92.65, Zeta: -15.0 mV)

4.4. Hücre Kültürü ve Apoptozis

Mcf-7, Mda-Mb-231 meme kanseri hücre hatlarında ve kontrol grubu Mcf-10A hücre hattında AgNP-Res ve resveratrolün 24 saatlik uygulaması sonucunda Şekil 4.4. ve Şekil 4.4.1 ile gösterilmiştir.



Şekil 4. 9. Resveratrolün farklı derişimlerinde % canlılık



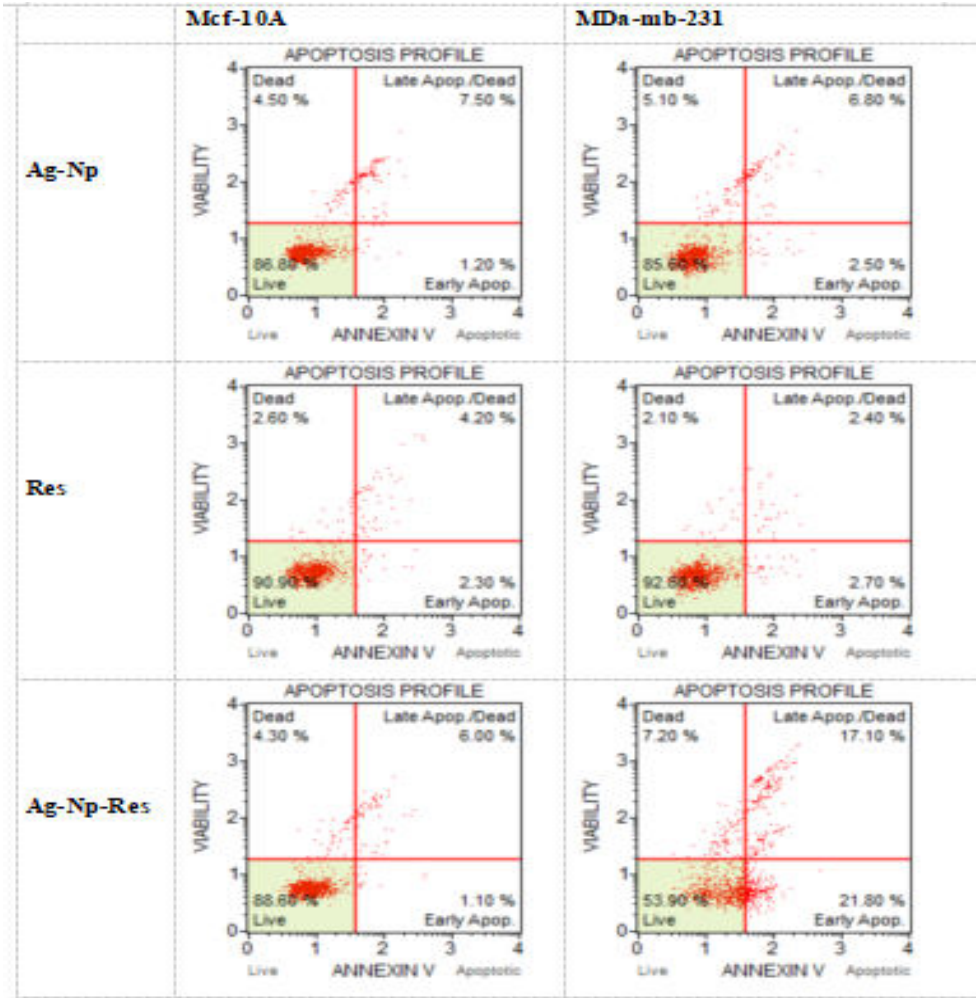
Şekil 4. 10. AgNP-Resveratrolün farklı derişimlerine % canlılık değışimleri

Çizilen grafiklerden IC₅₀ değeri hesaplandı ve Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 4. 3. AgNP-Res ve Resveratrol’ün IC₅₀ değeri

Hücre hattı		IC ₅₀ (µg/mL)
MCF-7	AgNP-Res	5,49 ±0,04
	Res	8,06±002
MDA-MB-231	AgNP-Res	5,66±0,03
	Res	7,02±0,04
MCF-10A	AgNP-Res	19,36±0,13
	Res	16,96±0,72

IC₅₀ değeri hesaplandıktan sonra seçiciliği yüksek olan MDA-MB-231 hücre hattında apoptotik görüntüleri görüntülemek amacıyla flow-sitometride Anneksin V ticari kitleri kullanılarak alındı. Flow sitometriden alınan görüntüler Şekil 4.4.2'de verilmiştir.



Şekil 4. 11. Mda-Mb-231 hücre hattında AgNP, Res ve AgNp-Res 24 saatlik inkübasyon sonucunda flow sitometri görüntüleri

Flow sitometri sonuçlarına göre erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve canlı hücre sayıları belirlendi. Elde edilen görüntülerden Tablo 4 ve Tablo 5 oluşturuldu ve apoptoz/nekroz oranı hesaplandı.

Tablo 4. 4.Mcf-10a hücre hattında flow sitometri sonuçları

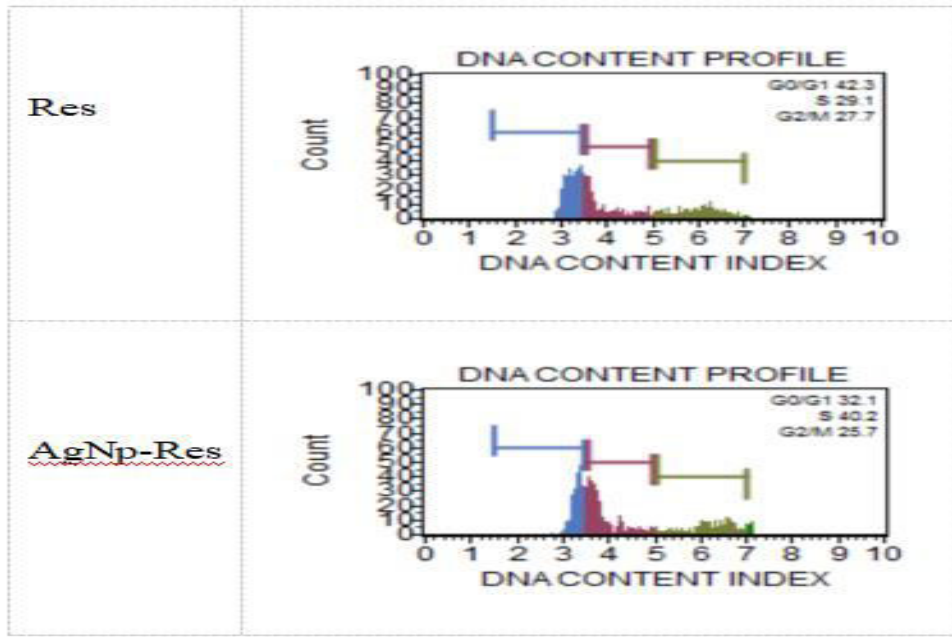
	Canlılık	Erken Apoptotik	Geç Apoptotik	Nekroz	Apoptoz/Nekroz
AgNp	86,80	1,20	7,50	4,50	1,93
Res	90,90	2,30	4,20	2,60	2,50
AgNp-Res	88,60	1,10	6,00	4,30	1,65

Tablo 4. 5.Mda-Mb-231 hücre hattında flow sitometri sonuçları

	Canlılık	Erken Apoptotik	Geç Apoptotik	Nekroz	Apoptoz/Nekroz
AgNp	85,60	2,50	6,80	5,10	1,82
Res	92,80	2,70	2,40	2,10	2,43
AgNp-Res	53,90	21,80	17,10	7,20	5,40

4.5. Hücre Döngüsü

Yapılan çalışmada hücre döngüsünde Res ve AgNp-Res'in hücreyi hangi fazda durduğunu tespit etmek için flow sitometride görüntülendi. Elde edilen veriler Şekil 4.5.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 12.Res ve AgNP-Res 'ın Mda-Mb-231 hücre hattında uygulanmaları sonucu DNA içeriğinin flow sitometri ile ölçümü

Tablo 4. 6.Res ve AgNP-Res 'ın Mda-Mb-231 hücre hattında hücre döngüsü oranları

	G0/G1	S	G2/M
Res	42,3	29,1	27,7
AgNP-Res	32,1	40,2	25,7

Resveratrol uygulanması sonucu; G0/G1 fazında 42.3, S fazında 29.1 ve G2/M fazında 27.7 değerleri gözlemlenir iken AgNP-Res uygulanması sonucunda G0/G1 fazında 32.1, S fazında 40.2 ve G fazında 25.7 değerleri tespit edilmiştir

5.TARTIŞMA

Nanoparçacıklar tıp alanında başlıca hedeflenmiş hücrelere gen transferi, ilaç dağıtım sistemlerindeki spesifik bağlanma özellikleri ve görüntüleme alanında kullanılmaktadır. Nanoparçacıklar, tanı ve tedavide diğer maddeler ile mukayese edilemez derecede spesifik özellik ortaya koyarlar. Nanoteknoloji ve nanoparçacıklar kanser terapilerinde, ilaç yan etkilerinin azaltılmasında, ilaçların hücre içine taşınmasında, oküler vakaların analiz ve terapisinde, tıbbi görüntülemelerde, kemiklerin yeniden onarımının hızlandırılmasında, organ nakillerinde organ reddinin engellenmesinde, fototermal tümör yok edilmesi işlemlerinde kullanılmaktadır (112, 113, 114).

Anti bakteriyel işleve sahip nanoparçacıklara verilebilecek en yaygın kullanımı olan örneklerden biri ise gümüştür. Gümüş nanoparçacıkları (AgNPs), algılayıcı ışınlar ile inceleme, kataliz ve anti bakteriyel özellik sergilemesi özellikleri ile tıp alanında kullanımı mevcuttur. Bunlara ilaveten yara kaynaklı enfeksiyonlarda AgNPs uygulamaları tercih edilmektedir (115, 116). Gümüş nanoparçacığı antibakteriyel etkisini, bakteri vb. hücre zarı ve varsa hücre duvarını geçerek DNA'yı işlevini engellemesi ile sergiler. Neticede bu engelleme ile mikroorganizma artışı engellenmiş olur. Nanoparçacık gümüş sayesinde serbest kalan elektronlar, hücre zarını yırtarak DNA ve ribonükleotid asit (RNA) eşlenmesine engel olarak çoğalmanın önüne geçmiş olur(117, 118). Bizde çalışmamızda ortalama 5nm boyutunda gümüş nanopartikül elde ettik.

Gümüş nanopartikül ve gempitobinin birlikte kullanımı, ovaryum kanserine karşı anti tümör ajan seçeneği olarak ortaya çıkmaktadır. Gümüş nanopartiküllerinin potansiyel olarak gempitobine duyarlılığı arttırabileceği düşünülmektedir(156).

MCF-7 hücre hattı, 72 saat boyunca Au ve Res ile uygulamaya maruz bırakılmıştır. Res uygulanan gruplarda G0/G1 fazında azalma ve S fazı yüzdesinde artış gözlemlenmiştir. Au uygulanan gruplar Res uygulaması ile benzer sonuçlar göstermişlerdir. Au tek başına uygulandığında hücrede fazlarda önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir. Au-Res bileşiği uygulanması sonucu elde edilen değişimin Res kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Au düşük toksisite göstermesi nedeniyle tercih

edilmiştir. Au nanopartikülleri negatif yüklü olması sebebiyle hücre içine girişte avantajlıdır(157).

Resveratrol (trans-3, 5, 4'-trihydroxystilbene) siyah üzüm başta olarak çok sayıda bitki tarafından kuraklık, soğuk hava, stres, yaralanma, ultraviyole ışınları (UV) ve mantar enfeksiyonlarına karşı üretilen flavanoid olmayan polifenolik doğal bir fitoaleksindir (1). Resveratrolün anti-kanser aktivitesi kanser hücrelerinin hücre döngüsü süreci, proliferasyonu, apoptozisi, metastazı, anjiyogenezi ve invazyonunu düzenleyen çeşitli hücre sinyal moleküllerinin modülasyonu aracılığı ile olmaktadır. Resveratrolün kemoterapiye direnç mekanizmalarının üstesinden gelerek kemoterapötik ajanlara karşı dirençli hücreleri duyarlı hale getirdiği de gösterilmiştir (2).

Resveratrolün antitümör etkisinin ribonükleotid redüktaz, deoksiribonükleik asit (DNA) polimeraz protein kinaz C, siklooksijenaz-2 (COX-2) aktivitelerinin baskılanması, karsinogenezin baskılanması, apoptotik hücre aktivasyonuna bağlı olabileceği de bildirilmiştir (3).

Resveratrol, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozisin indüklenmesinde önemli rol oynamaktadır. Fakat apoptozis-indüklü etkileri farklı tümör hücrelerinde farklılık göstermektedir (4). İnsan promyleositik lösemi hücrelerinde resveratrolün hücrelerin çoğalmasını baskıladığı, apoptozisi etkin kıldığı, antiapoptotik onkoprotein Bcl-2 artışını engellediği ve DNA'da kırılmalara neden olduğu gösterilmiştir (5).

Resveratrol, meme kanseri de dahil olmak üzere, pek çok kanser türünde kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılamaktadır (87, 158).

Doksorubisin insan neoplazma tedavilerinde yaygın olarak kullanılsa dahi, doksorubisin artışıyla görülen kardiyomiyopati doksorubisin tedavisinin uygulanması için kısıtlayıcıdır. Kardiyoprotektif resveratrol ile doksorubisinin yan etkisinin azaltılması amacıyla Mcf-7 hücre hattı üzerinde çalışma yapılmıştır. (159, 160) Resveratrol ve doksorubisinin beraber kullanımı sonucu, sadece doksorubisin kullanımına göre apoptozda artış, hücre siklusunun S ve G2 evrelerinde duraksama gözlemlenmiştir. S ve G1 fazında DNA replikasyonu için kullanılan ribonükleotid redüktaz enziminin inhibisyonu vardır. Resveratrol ve doksorubisinin birlikte kullanımı

ile resveratrolün hücre siklusunu S evresinde durdurması sonucu daha yüksek oranda Mcf-7 kanser hücresinin doksorubisin etkisine maruz kaldığı, Mcf-7 hücreleri içine alınan doksorubisinin konsantrasyonunun arttığı gözlemlenmiştir (161, 162, 163, 164, 165).

Crowell ve ark. tarafından 2004 yılında yapılan bir çalışmada (3000 mg/kg) konsantrasyonunda resveratrol kullanıldığında renal toksisiteye sebep olabilmektedir. Yüksek dozda resveratrol ile tedavi edilen hayvanlarda böbrek tübül dilatasyonu, papiller nekroz akut pelvik inflamasyon ve nefropati insidansında artış gözlemlenmiştir (166).

Serrero ve ark. resveratrolün, otokrin büyüme uyarıcılarının seviyelerini inhibe ettiğini ve büyüme faktörü alfa1 dönüştürdüğünü Mda-Mb-231 meme kanseri hücre hattında göstermiştir (167).

2008 yılında Caddeo ve ark. tarafından yapılan çalışmada düşük konsantrasyonda resveratrolün herhangi bir toksisite belirtisi olmaksızın hücre sayısını arttırdığını gösterirken, yüksek dozda resveratrol konsantrasyonunun sonucunda hücre fonksiyon durumu bozulması sebebiyle hücre membran bütünlüğünde değişim olduğu tespit edilmiştir (168). Çalışmamız AgNP-Res ve resveratrol uygulamaları meme kanseri hücre hatları üzerinde yapıldı. Mcf-7 'de AgNP-Res ve resveratrolün IC₅₀ değeri ; 5,49 ve 8,06; Mda-Mb-231AgNP-Res ve Resveratrolün IC₅₀ değeri ; 5,66 ve 7,02 'dir. Mcf-10A'da ise AgNP-Res ve resveratrolün IC₅₀ değeri 19,37 ve 16,96'dir. Bu nedenle Mda-Mb-231 hücre hattında daha etkili olduğu gözlemiştir.

Can ve ark. tarafından 2012 yılında yapılan çalışmada resveratrolün çoğalmayı engelleyici etkisi; 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide iç tuzu (XTT) analizi ile belirlenmiştir. Resveratrolün duyarlı K562 ve dirençli K562/IMA-3 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri, Kaspaz-3 aktivitesindeki değişiklikler, mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) kaybı ve Anneksin V (FITC) ile apoptoz yoluyla belirlenmiştir (7).

Resveratrolün hücreleri, hücre döngüsünün farklı aşamalarında tutuklayarak ve hücre çoğalmasında yer alan genleri düzenleyerek tümör hücrelerinin kemosenitivitesini arttırdığını göstermiştir. Kemoterapiye dirençli B16 melanomda resveratrol, siklin D1'in aşağı regülasyonunun eşlik ettiği doksorubisini indükleyerek

sitotoksisteyi arttırmıştır. Resveratrol ile tedavi sonucu G1-S fazında hücre döngüsü tutuklanmasında bir artış gözlemlenmiştir (2).

Yaptığımız çalışmada ise; resveratrol uygulanması sonucu; G0/G1 fazında, iken AgNP-Res uygulanması sonucunda S fazında durdurmuştur.

Gatouillat ve ark. tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada polifenol bileşik olan resveratrolün kemopreventif etkilerini doksorubine dirençli B16 melanom hücre alt hattında (B16/DOX) büyümesini inhibe etmesi ile göstermiştir. Hücre G1 fazında tutuklanmış apoptoz indüklenmiştir. Resveratrol uygulanan farelerde melanomun büyümesinin engellendiği gözlemlenmiş ve bu veriler kemoterapiye dirençli tümörlerin tedavisinde resveratrolün tek başına ve diğer kemoterapik ajanlarla kombinasyon halinde potansiyel etkisini ortaya koymuştur (6).

Çalışmamızda FTIR ve UV-VİS analizleri sonucunda resveratrolün gümüş nanopartiküle bağlanabildiği sonucuna ulaşıldı. Zeta Sizer ölçümü ile tanecik boyutunda ve yüzey potansiyelinde meydana gelen değişimler ile resveratrol ve gümüş nanoparçacıkları ile kompleks elde edildiği ortaya kondu. Flow sitometri sonuçlarına bakarak Mda-Mb-231 hücre hattının AgNP-Res'e daha duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda Mda-Mb-231 hücre hattında AgNP-Res uygulaması sonucu erken apoptotik, geç apoptotik ve nekroz değerlerinde artış gözlemlendi. Mda-Mb-231 kanser hücre hattında canlılık azalışı gözlemlenir iken, kontrol grubu Mcf-10A üzerinde ciddi bir değişiklik olmaması AgNP-Res'in sitotoksik etkisinin kanser hücre hattı üzerinde etkili olur iken sağlıklı hücrelere toksik etki etmeyeceğine dair bulgu olabilir. AgNP-Res uygulaması sonucu hücre siklusunun S fazında durdurulduğunun gözlemlenmesi ile AgNP-Res'in kanser hücre gelişimini engellediği düşünülmektedir.

Sonuç olarak AgNP-Res uygulamasının özellikle Mda-Mb-231 hücre hattında sitotoksiste gösterirken, kontrol hücre hattında toksik etki göstermemesi ve hücre siklusunu durdurabilmesi ile kanser hücrelerinin hedeflenmesine için iyi bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1.Kavas GO, Aribal-Kocatürk, Büyükkacı DI. Resveratrol: Is There Any Effect On Healthy Subject? *Biological Trace Element Research*, 2007; 118: 250-254.
2. Gupta S.C ve ark. Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011; 1215: 150-160.
3. Yar A.S ve ark. The effects of resveratrol on COX-1 and COX-2 mRNA and protein levels in diabetic rat kidneys. *Mol Biol Rep*, 2010; 37: 2323–2331.
4. Bai Y ve ark. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Science*, 2010; 101: 488-493.
5. Correia-Da-Silva M ve ark. Dual anticoagulant/antiplatelet persulfated small molecules. *Eur J Med Chem*, 2010; 46 (6): 2347-58.
6. Gatouillat G ve ark. Resveratrol induces cell-cycle disruption and apoptosis in chemoresistant B16 melanoma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010; 110: 893- 902.
7. Can G ve ark. Apoptotic effects of resveratrol, a grape polyphenol, on imatinib-sensitive and resistant K562 chronic myeloid leukemia cells. *Anticancer Research*, 2012; 32: 2673-2678.
8. Athar M ve ark. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007; 224: 274-283.
9. SzekeresT ve ark. Chemopreventive effects of resveratrol and resveratrol derivatives. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 2011; 1215: 89-95.
10. Martin AR ve ark. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br.J. Pharmacol*, 2006; 147: 873–885.
11. Çimen A. *Anatomi*. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1994. pp 748-750

12. Değerli A. *Genel Cerrahi*. İstanbul: Nobel Kitabevleri; 1995. pp 279-276.
13. Moore KL. *Clinically Oriented Anatomy*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1992. pp 45-48
14. Samur G. *Anne Sütü*. Ankara: Sağlık Bakanlığı Yayınları; 2008. pp 9-20
15. Romrell LJ ve Bland KI. Anatomy of the breast, axilla, chest wall, and related metastatic sites. In: Bland KI, Copeland EM III, eds. *The breast: comprehensive management of benign and malignant diseases, 4th ed*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2009. pp 21–38.
16. Alowami S ve ark. Mammographic density is related to stroma and stromal proteoglycan expression. *Breast Cancer Res*, 2003; 5(5): R129–35.
17. Hall N ve ark. Muir-Torre syndrome: a variant of the cancer family syndrome. *J Med Genet*, 1994; 31: 627.
18. Skrabonek P. False premises and false promises of breast cancer screening. *Lancet*, 1985; 316-320.
19. DeBruin LS ve Josephy PD. Perspectives on the chemical etiology of breast cancer. *Environ Health Perspect*, 2002; 110(1): 119-28.
20. Collins N ve ark. **Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarian cancers.** *British Journal of the Cancer*, 1997; 76(9):1150-1156.
21. Gelmann EP. **Oncogenes in human breast Cancer.** In: **The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases. Vol I.** Ed: Bland KI, Copeland EM. Philadelphia: *WB saunders Company*; 1998, pp: 499-517.
22. Klijn JGM ve ark. **The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients.** *Endocr Rev*, 1992; 13: 3- 17.
23. Dickson RB ve Lippman ME. Cancer of the breast. In *Cancer: Principles and Practice of Oncology. Fifth Edition*, Ed: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. pp: 1541-1557.

24. Akiyama T ve ark. The product of the human c-erbB-2 gene: A 185- Kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 1986; 232:1644.
25. Jeffrey S. Ross ve Fletcher J. Her-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 1999; 112(Suppl):53.
26. Wallis Y L ve Macdonald F. Oncogens. *J Clin Pathol: Mod Pathol*, 1999; 52: 55.
27. McCann AH ve ark. Prognostic significance of c-erbB-2 and Estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res*, 1991; 51: 3296.
28. Eliyatkin N ve ark. Meme Kanserinde HER-2/NEU (C-ERB-B2) Durumunun Önemi: Hangi Yöntemle Değerlendirmek Daha Uygun?. Meme Sağlığı Dergisi/*Journal of Breast Health*, 2013; 9(4).
29. Kurebayashi JJ. Biological and clinical significance of her2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer*, 2000; 8(1):45-51.
30. Jeffrey S. Ross ve Fletcher J. The HER-2/neu Oncogene in breast cancer: Prognostic factor, Predictive Factor and Target for Therapy. *The Oncologist*, 1998; 3: 237.
31. Osborne C ve ark. Oncogenec and tumorsupressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapetic applications. *Oncologist*, 2004; 9: 361-77.
32. Liao DJ ve Dickson RB. C-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 7(3):143-164, 2000.
33. Berns JJ ve ark. Human breast cancer; correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science*, 1987; 235:177.
34. Walker RA ve Wilkinson N. p21 ras protein expression in benign and malignant human breast. *J Pathol*, 1988; 156:147-153.
35. von Lintig FC ve ark. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2000; 62(1):51-62.
36. Whittaker JL ve ark. Differential expression of cellular oncogenes in benign and malignant human breast tissue. *Int J Cancer*, 1986; 38: 651-655.
37. Theillet C ve ark. Loss of a cHaras-1 allele and aggressive human primary breast carcinomas. *Cancer Res*, 1986; 46: 4776-4781.

38. Pethe V ve Shekhar PV. Estrogen inducibility of c-Ha-ras transcription in breast cancer cells. Identification of functional estrogen-responsive transcriptional regulatory elements in exon 1./ intron 1 of the cHa ras gene. *J. Biol Chem*, 1999; 43: 30969-30978.
39. Andela VB ve ark. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB. *Cancer Res*, 2000; 60(23): 655762.
40. Arlt A ve ark. Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 2002; 62(3): 910-6.
- 41. Grivennikov S ve Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010; 21(1):11-19.**
42. SA Nopajaroonsri C. Inhibition of NF kappa B with proteasome inhibitors enhances apoptosis in human lung adenocarcinoma cells in vitro. *Anticancer Res*, 2001; 21(1A):39-44.
43. Wang CY ve ark. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*, 1996; 274(5288):784-7.
44. Batra RK ve ark. IkappaBalpha gene transfer is cytotoxic to squamous-cell lung cancer cells and sensitizes them to tumor necrosis factor-alpha-mediated cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999; 21(2):238-45.
45. ThornberryNA ve Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998; 281(5381):1312-6.
46. Deveraux QL ve Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, 1999; 13(3):239-52.
47. Chang F ve ark. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: A target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 2003; 17: 590-603.
48. Viglietto G ve ark. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med*, 2002; 8: 1136-44.

49. Liang J ve ark. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27mediated G1 arrest. *Nat Med*, 2002; 8: 1153-60.
50. Butz S ve Kemler R. Distinct cadherin-catenin complexes in Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion. *FEBS Lett*, 1994; 355: 195-200.
51. Enver T ve Ashworth A. Receptor and secreted targets of wnt-1/b catenin signaling in mouse mammary epithelial cells. *BMC Cancer*, 2005; 5: 3.
52. Everly DN ve ark. Accumulation of cytoplasmic β -catenin and nuclear glycogen synthase kinase 3 β in epstein-barr virus-infected cells. *J Virol*, 2004; 78: 11648–116
53. Wu R ve ark. Diverse Mechanisms of β -catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res*, 2001; 61: 8247-8255.
54. Wright K ve ark. Beta-catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumours. *Int J Cancer*. 1999; 27: 625-629.
- Dorgan JF ve ark. Relation of prediagnostic serum estrogen and androgen levels to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 1996; 5(7):533–9.
- 55.Dorgan JF ve ark. Relation of prediagnostic serum estrogen and androgen levels to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 1996; 5(7):533–9.
- 56.Kabuto M ve ark. A Prospective Study of Estradiol and Breast Cancer in Japanese Women 1.Cancer Epidemiol. *Biomarkers Prev*, 2000; 9: 575–79.
- 57.Yue W ve ark. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids* 2013; 78(2):161–70.
58. Kumar V ve Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*, 1988; 55(1):145–56.
59. Gruber CJ ve ark. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*, 2002; 346(5):340–52.
60. Hall JM ve McDonnell DP. Coregulators in Nuclear Estrogen Receptor Action: From Concept to Therapeutic Targeting. *Mol Interv*, 2005; 5(6):343–57.
61. Preston-Martin S ve ark. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res* 1990, 50(23):7415–21.

62. Cavalieri EL ve Rogan EG. Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011; 125: 169–80.
63. Rogan EG ve ark. Relative imbalances in estrogen metabolism and conjugation in breast tissue of women with carcinoma: potential biomarkers of susceptibility to cancer. *Carcinogenesis*, 2003; 24(4):697–702.
64. Pharoah P.D ve ark. Family history and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 1997; 71(5):800-809.
65. Frank T.S ve ark. Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *Journal of Clinical Oncology*, 1998; 16(7): 2417-2425.
66. Brinton LA ve ark. Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer Investigation*, 1988; 6(3): 245-254.
67. Trichopoulos D ve ark. Menopause and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 1972; 48(3):605-613.
68. Kaminska M ve ark. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny*, 2015; 14(3): 196-202.
69. Collaborative G. Breast cancer and hormonal contraceptives: further results. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Contraception*, 1996; 54:1S-106S.
70. Van den Brandt P ve ark. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *American Journal of Epidemiology*, 2000; 152(6): 514-527.
71. Toniolo P. G ve ark. A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute*, 1995; 87(3): 190-197.
72. Barnes-Josiah D ve ark. Early body size and subsequent weight again as predictors of breast cancer incidence. *Cancer Causes & Control*, 1995; 6(2): 112-118.
73. Altekruse S ve ark. SEER cancer statistics review, 1975-2007. *Bethesda, MD: National Cancer Institute*, 2010; 7.

74. Harvie M ve Howell A. Energy balance adiposity and breast cancer—energy restriction strategies for breast cancer prevention. *Obesity Reviews*, 2006; 7(1): 33- 47.
75. Thompson H ve ark. Weight control and breast cancer prevention: are the effects of reduced energy intake equivalent to those of increased energy expenditure? *The Journal of Nutrition*, 2004; 134(12): 3407S-3411S.
76. Bjørge T ve ark. Metabolic syndrome and breast cancer in the me-can (metabolic syndrome and cancer) project. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2010; 19(7):1737-1745.
77. Esposito K ve ark. Metabolic syndrome and risk of cancer systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 2012; 35(11): 2402-2411.
78. Akpoyraz M ve Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Dergisi*, 1995; 48: 253-262.
79. Uzal C ve Çaloğlu M. Kanser Etyolojisinde iyonizan radyasyonun yeri. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2002; 19: 177-182.
80. Land C.Eve ark. Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1990. *Radiation Research*, 2003; 160(6):707-717.
81. Golubicic I ve ark. Risk factors for breast cancer: is ionizing radiation among them? *Journal of BUON:Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 2007; 13(4): 487-494.
82. Hamajima N ve ark. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *British Journal of Cancer*, 2002; 87(11): 1234-1245.
83. Land S. R ve ark. Cigarette smoking, physical activity, and alcohol consumption as predictors of cancer incidence among women at high risk of breast cancer in the NSABP P-1 Trial. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2014; 23(5):823-832.
84. Cui Y ve ark. Cigarette smoking and breast cancer risk: update of a prospective cohort study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2006; 100(3):293-299.

85. Nonomura S ve ark. Chemical constituents of polygonaceous plants. *I. Studies on the components of Ko-jokon (Polygonum cuspidatum SIEB et ZUCC.). Yakugaku Zasshi*, 1963; 83: 988–990.
86. Singh KC ve ark. Diabetic complications in pregnancy: is resveratrol a solution? *Exp Biol Med*, 2013; 238(5):482-490.
87. Aggarwal BB ve ark. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 2004; 24: 2783-2840.
88. Kasiotis K ve ark. Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*, 2013; 13: 0278-6915.
89. Quideau S ve ark. Resveratrol still has something to say about aging! *Angewandte Chemie International Edition*, 2012; 51: 6824- 6826.
90. Tome-Carneiro J ve ark. Resveratrol and clinical trials: The crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr. Pharm. Des*, 2013; 19: 6064–6093.
91. Sharma S ve ark. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res*, 1994; 54: 5848–5855.
92. Leonard S.S ve ark. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem. Biophys. Res, Commun*. 2003; 309:1017–1026.
93. Kim H.J ve ark. Cytotoxic and antimutagenic stilbenes from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Arch. Pharm. Res*, 2002; 25: 293–299.
94. Ciolino H.P ve Yeh G.C. Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol. *Mol. Pharmacol*, 1999; 56: 760–767.
95. Beedanagari S.R ve ark. Resveratrol inhibits dioxin-induced expression of human CYP1A1 and CYP1B1 by inhibiting recruitment of the aryl hydrocarbon receptor complex and RNA polymerase II to the regulatory regions of the corresponding genes. *Toxicol. Sci*, 2009; 110: 61–67.
96. Heo Y.H ve ark. Induction of quinone reductase activity by stilbene analogs in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Arch. Pharm. Res*, 2001; 24: 597–600.

97. Lu F ve ark. Resveratrol prevents estrogen-DNA adduct formation and neoplastic transformation in MCF-10F cells. *Cancer Prev. Res*, 2008; 1: 135–145.
98. Zahid M ve ark. Prevention of estrogen-DNA adduct formation in MCF-10F cells by resveratrol. *Free Radic. Boil. Med*, 2008; 45:136–145.
99. Wolter F ve ark. Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *J. Nutr*, 2001; 131:2197–2203.
100. Benitez D.A ve ark. Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. *J. Androl*, 2007; 28: 282–293.
101. Bai Y ve ark. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Sci*, 2010; 101:488–493.
102. Kim Y.A ve ark. Involvement of p21WAF1/CIP1, pRB, Bax and NF- κ B in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells. *Int. J. Oncol*, 2003; 23: 1143–1149.
103. Delmas D ve ark. Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: Apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe. *Curr. Med. Chem*, 2011; 18: 1100–1121.
104. Van Ginkel P.R ve ark. Natural products induce a G protein-mediated calcium pathway activating p53 in cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 2015; 288:453–462.
105. Baur JA ve Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, 2006; 5: 493-506.
106. Chung JH ve ark. Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications. *Trends Cell Biol*, 2012; 22(10): 546-54.
107. Zhang C ve ark. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis in mice through SIRT1-mediated deacetylation of p53. *Cardiovasc Res*, 2011; 90: 538-545.
108. Albani D ve ark. Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders. *Biofactors*, 2010; 36(5): 370-6

109. Liu C ve ark. Resveratrol improves neuron protection and functional recovery in rat model of spinal cord injury. *Brain Res*, 2011; 1374: 100-9.
110. Allhoff F. The coming era of nanomedicine. *Am J Bioeth*, 2009; 9(10): 3-11.
111. Sahoo SK ve ark. The present and future of the nanotechnology in human health care; nanomedicine: nanotechnology. *Biology and Medicine*, 2007; 3(1): 20-31.
112. Maheshwari PV ve Gupta NV. Advances of nanotechnology in healthcare. *International Journal of Pharmtech Research*, 2012; 4(3): 1221-7.
113. Kocaefe Ç. Nanotıp: yaşam bilimlerinde nanoteknoloji uygulamaları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2007; 38: 33-8.
114. Straggers N ve ark. Nanotechnology: the coming revolution and its implications for consumers clinicians and informatics. *Nurs Outlook*, 2008; 56: 268-74.
115. Pandit R. Green synthesis of silver nanoparticles from seed extract of *Brassica nigra* and its antibacterial activity. *Nusantara Biosci*, 2015; 7(1): 15-19.
116. Rai M ve ark. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 2009; 27(1): 76-83.
117. Samanta S ve ark. Synthesis of Silver Nanostructures of Varying Morphologies Through Seed Mediated Growth Approach. *Journal of Molecular Liquids*, 2010; 153: 170-173
118. Huh AJ ve Kwon YJ. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release*, 2011; 156(2): 128–145.
119. Chatzimitakos TG ve Stalikas CD. Qualitative Alterations of Bacterial Metabolome after Exposure to Metal Nanoparticles with Bactericidal Properties: A Comprehensive Workflow Based on (1)H NMR, UHPLC-HRMS, and Metabolic Databases. *Journal of Proteome Research*, 2016; 15(9): 3322–3330.
120. Zhao L ve Ashraf M.A. Influence of Silver-hydroxyapatite Nanocomposite Coating on Biofilm Formation of Joint Prosthesis and Its Mechanism. *West Indian Med J*, 2015; 64(5): 506-513.

121. Shrivastava S ve ark. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 2007; 18(22): 225103.
122. Yang W ve ark. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology*, 2009; 20(8): 085102.
123. Raffi M ve ark. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against E. coli ATCC-15224. *Journal of Material Science and Technology*, 2008; 24 (2): 192-196.
124. Jung WK ve ark. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Applied of Environmental Microbiology*, 2008; 74(7): 2127-2128.
125. Liao S.Y ve ark. Interaction of Silver Nitrate with Readily Identifiable Groups.: Relationship to the Antibacterial Action of Silver Ions, *Letters in Applied Microbiology*, 1997; 25: 279-283.
126. Feng Q ve ark. A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *J Biomed Mater Res*, 2000; 52(4):662-668.
127. Can C ve Körlü A. Antibakteriyel Tekstil Üretiminde Sıkça Kullanılan Gümüşün Etki Mekanizması ve Toksisitesi. *Electronic Journal of Textile Technologies*, 2011; 5(3): 54-59. Erişim tarihi: 24.02.2021
128. Holt K ve Bard A. Interaction of Silver (I) Ions with the Respiratory Chain of Escherichia Coli: An Electrochemical and Scanning Electrochemical Microscopy Study of the Antimicrobial Mechanism of Micromolar Ag. *Biochemistry*, 2005; 44(39):13214-23.
129. Arora S ve ark. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol. Lett*, 2008; 179: 93–100.
130. Piao MJ ve ark. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol. Lett*, 2011; 201: 92–100.
131. Foldbjerg R ve ark. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch. Toxicol*, 2011; 85: 743–750.
132. Chairuangkitti P ve ark. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicol. In Vitro*, 2013; 27: 330–338.

133. Kim S ve ark. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro*, 2009; 23: 1076–1084.
134. Yong T ve ark. Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. *Nat. Commun*, 2019; 10: 3838.
135. Bohmert L ve ark. Cytotoxicity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2. *Arch. Toxicol*, 2012; 86: 1107–1115.
136. Bohmert L ve ark. Molecular mechanism of silver nanoparticles in human intestinal cells. *Nanotoxicology*, 2015; 9: 52–860.
137. Van Aerle R ve ark. Molecular mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Environ. Sci. Technol*, 2013; 47: 8005–8014.
138. Asharani P.V ve ark. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 2008; 19: 255102.
139. Gurunathan S ve ark. 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. *Int. J. Nanomedicine*, 2015, 10: 4203–4222.
140. Lee K.J ve ark. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano*, 2007; 1(2):133–143.
141. AshaRani P.V ve ark. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 2009; 3: 279–290.
142. Aziz Mousavi S.M.A ve ark. H. Characterization of Biosynthesized Silver Nanoparticles Using *Lactobacillus rhamnosus* GG and its in Vitro Assessment Against Colorectal Cancer Cells. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2019; 1–7.
143. Kaba S.I ve Egorova E.M. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. *Nanotechnol. Sci. Appl*, 2015; 8: 19–29.
144. Azizi M ve ark. Anti-cancerous effect of albumin coated silver nanoparticles on MDA-MB 231 human breast cancer cell line. *Sci. Rep*, 2017; 7: 5178.

145. Soule H ve ark. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 1973; 51(5): 1409- 1416.
146. Holliday D. L ve Speirs V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 2011; 13(4): 215.
147. Cailleau R ve ark. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro*, 1914(11): 911-915.
148. Neve R ve ark. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell*, 2006; 10(6): 515-527.
149. Hepokur C ve ark. Silver nanoparticle/capecitabine for breast cancer cell treatment. *Toxicol In Vitro*, 2019; 61: 104600.
150. Agnihotri S ve ark. Size-Controlled Silver Nanoparticles Synthesized over the Range 5 -100 nm Using the Same Protocol and Their Antibacterial Efficacy. *RSC Advances*, 2014; 4: 3974-3983.
151. Bratton DL ve ark. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flipflop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem*, 1997; 272: 26159–26165.
152. Gatti R ve ark. Comparison of Annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J. Histochem. Cytochem*, 1998; 46: 895–900.
153. Kopman G ve ark. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.*, 1994; 84: 1415–1420.
154. Overbeeke R. ve ark. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 1998; 3: 115.
155. Zhang G ve ark. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotechniques*, 1997; 23: 525–531.
156. Yuan Yg ve ark. Silver nanoparticles enhance the apoptotic potential of gemcitabine in human ovarian cancer cells: combination therapy for effective cancer treatment. *Int J Medicine Nanomedicine*, 2017; 12: 6487-6502.

157. Lee D ve ark. Gold nanoparticles conjugated with resveratrol induce cell cycle arrest in MCF-7 cell lines. *Applied Biological Chemistry*, 2019; 62: 33.
158. Nobili S ve ark. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res*, 2009; 59: 365-378.
159. Buzadar AS ve ark. Early and delayed clinical cardio toxicity of doxorubicin. *Cancer*, 1981; 55(12):2761–2765.
160. Kantrowitz NE ve Bristow MR. Cardiotoxicity of antitumor agents. *Prog Cardiovasc Dis*, 1984; 27(3): 195–200.
161. Dörrie J ve ark. Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase 9 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res*, 2001; 61(12):4731–4739.
162. Ragione FD ve ark. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 250(1):53–58.
163. Gusman J ve ark. reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, 2001; 22 (8):1111–1117.
164. Bernhard D ve ark. Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to Fas independent apoptosis in CEM-C7H2 acute leukemia cells. *Cell Death Differ*, 2000; 7(9):834–842.
165. Joe AK ve ark. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines, *Clin. Cancer Res*, 2002; 8(3): 893 –903.
166. Crowell JA ve ark. Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci*, 2004; 82: 614–619.
167. Serrero G ve Lu R. Effect of resveratrol on the expression of autocrine growth modulators in human breast cancer cells. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2001; 3(6): 969-979.
168. Caddeo C ve ark. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *Int J Pharm*, 2008; 363: 183–191.

MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA TAŞIYICI GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL BAĞLI RESVERATROLÜN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%9

BENZERLİK ENDEKSİ

%7

İNTERNET
KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%4

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

adumilas.adu.edu.tr

İnternet Kaynağı

%2

2

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

%1

3

Submitted to Afyon Kocatepe University

Öğrenci Ödevi

%1

4

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

%1

5

Submitted to Yildirim Beyazıt Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%1

6

acikerisim.istanbul.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%1

7

www.freepatentsonline.com

İnternet Kaynağı

<%1

8

www.mikrobiyolbul.org

İnternet Kaynağı

<%1