



**SİLVER NANOPARTİKÜLLERİNİN *İN VİTRO*
PROSTAT VE BAŞ BOYUN KANSER MODELİ
ÜZERİNE SORAFENİB İLE SİNERJİSTİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve ARSLAN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ**

**2022
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SİLVER NANOPARTİKÜLLERİNİN *İN VİTRO* PROSTAT VE BAŞ BOYUN
KANSER MODELİ ÜZERİNE SORAFENİB İLE SİNERJİSTİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Merve ARSLAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ

Anabilim Dalı: Biyomedikal Mühendisliği

Erzurum

2022

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

12 / 12 / 2022

Merve ARSLAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİLVER NANOPARTİKÜLLERİNİN *İN VİTRO* PROSTAT VE BAŞ BOYUN KANSER MODELİ ÜZERİNE SORAFENİB İLE SİNERJİSTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve ARSLAN

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ

Erkeklerde sık görülen kanserler arasında olan prostat kanseri her yıl yüz binlerce ölüme neden olmaktadır. Hipofarenks kanseri, nadir görülen geç teşhis koyulan sağ kalım oranı düşük malign kanserlerdendir. Günümüzde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi metotlar ile kanser tedavisi yapılmaktadır. Fakat geleneksel kanser tedavilerinin yan etkileri vardır. Bu nedenle, mevcut çalışmaların çoğu kanserin tanı ve tedavisinde yeni yaklaşımlar bulmaya yönelmiştir. Kanser tedavisinde nanoteknolojiye dayalı kullanılan terapiler minimal yan etkiler ve yüksek özgünlükleriyle oldukça ilgi çekmektedir. Son yıllarda araştırmalar, gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) antikanser özelliklerine odaklanmıştır. Diğer taraftan, tirozin kinaz sinyal yollarını inhibe eden sorafenib tedavisi kanser tedavilerinde halihazırda kullanılmaktadır. Yapılan literatür taraması sonucu, AgNP ve sorafenibin PC3 (prostat kanseri) ve FaDu (farinks kanseri) hücre hatları üzerine sinerjistik etkilerinin çalışılmadığı tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında, PC3 ve FaDu hücrelerine AgNP ve sorafenib ayrı ve birlikte uygulanarak hücresel ve moleküler düzeyde etkileri incelenmiştir. Hücre proliferasyonunu belirleyen CVDK-8 testiyle PC3 ve FaDu hücrelerine karşı her bir etken maddenin IC₂₀ konsantrasyonları belirlenmiştir. Etken maddelerin PC3 ve FaDu hücrelerinde oluşturduğu apoptoz etkileri, kolorimetrik olarak ölçülüp kaspaz-3 proteini seviyesindeki değişimler western blot ile belirlenmiştir. Her iki hücre hattında da AgNP ve sorafenibin tek başına uygulamaları konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur. AgNP-Sorafenib kombinesinin PC3 hücrelerine kıyasla FaDu hücrelerinde hücre proliferasyonu inhibisyonunda daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Western blot analizinden izlenen kaspaz-3'ün ekspresyon verilerine göre, FaDu hücrelerinde AgNP ve AgNP-Sorafenib muamele gruplarında apoptozda anlamlı bir değişiklik gözlemlenirken, sorafenib muamele grubunda anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Mevcut çalışmadan ulaştığımız verilerin, nanotaşıyıcı ilaç sistemlerine yeni bakış açıları sağlayacağı umulmaktadır.

2022, 56 sayfa

Anahtar Kelimeler: AgNP, Apoptoz, Hipofarenks kanseri, Proliferasyon, Prostat kanseri, Sorafenib, Western blot analizi

ABSTRACT

MS. Thesis

INVESTIGATION OF SYNERGISTIC EFFECTS OF SILVER NANOPARTICLES WITH SORAFENIB ON *IN VITRO* PROSTATE AND HEAD AND NECK CANCER MODEL

Merve ARSLAN

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biomedical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ

Prostate cancer, one of the most common cancers in men. Hypopharyngeal cancer is a rare malignant cancer. Because traditional cancer treatments have side effects, most of the current studies are directed towards finding new approaches in the diagnosis and treatment of cancer. Therapies based on nanotechnology have attracted much attention with minimal side effects and high specificity. In recent years, research has focused on the anticancer properties of silver nanoparticles (AgNPs). Furthermore, sorafenib therapy, which inhibits tyrosine kinase signaling pathways, is already used in cancer treatments. According to literature review, we determined that the synergistic effects of AgNP and sorafenib on PC3 (prostate cancer) and FaDu (pharyngeal cancer) cells were not studied. In this thesis, AgNP and sorafenib were applied individually and together to PC3 and FaDu cells, their effects were examined at cellular and molecular levels. The IC₂₀ concentrations of each agent against PC3 and FaDu cells were determined by CVDK-8 assay. Apoptosis effects were measured colorimetrically and changes in caspase-3 expression levels were determined by western blot. In both cells, AgNP and sorafenib alone caused a concentration-dependent decrease in cell viability. It was observed that AgNP-Sorafenib combination was more effective in cell proliferation inhibition in FaDu cells compared to PC3 cells. According to Western blot analysis, a significant change in apoptosis was observed in the AgNP and AgNP-Sorafenib groups in FaDu cells, while no significant change was observed in the sorafenib group. It is expected data of this study will provide new perspectives on nanocarrier drug systems.

2022, 56 page

Keywords: AgNP, Apoptosis, Hypopharyngeal cancer, Proliferation, Prostate cancer, Sorafenib, Western blot analysis

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden ilgi ve alakasını kesmeyen, çalışmam boyunca bana sabırla yol gösteren, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez çalışmamı bilimsel temellerle tamamlamamı sağlayan değerli danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ'a,

Tez çalışmam esnasında bilgi ve birikimlerinden faydalandığım değerli hocam Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ'a,

Çalışmalarım esnasında bana destek olan, bilimsel ve deneysel anlamda yardımlarını aldığım Neslişah BARLAK, Özel ÇAPIK ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan, manevi desteklerini hep hissettiğim kıymetli dostlarıma,

Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi anlamda desteklerini, sevgilerini esirgemeyen kıymetli aileme sonsuz sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Merve ARSLAN
Aralık 2022

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Nanopartiküllerin Özellikleri	1
1.2. Gümüş Nanopartikülleri (AgNP'ler)	2
1.2.1. AgNP kaynaklı apoptoz ve kanser ilişkisi	4
1.3. Kanser	6
1.3.1. Prostat kanseri	9
1.3.2. Hipofarenks kanseri	10
1.3.3. Karsinogenez sürecinde apoptozis mekanizmasının rolü	12
1.3.4. Karsinogenez sürecinde tirozin kinazların rolü	15
1.3.4.1. Sorafenib	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Hücre kültürü	27
3.2.2. Hücre sayımı	27
3.2.3. Hücrelerin 96 kuyucuklu platelere ekimi	28
3.2.4. İlaçların hazırlanması	28
3.2.4.1. AgNP'lerin hazırlanması	28
3.2.4.2. Sorafenibin hazırlanması	29
3.2.5. AgNP ve sorafenibin hücrelere verilmesi	29
3.2.6. Hücre canlılık deneyi (CVDK-8 deneyi)	29

3.2.6.1. AgNP ve sorafenibin PC3 ve FaDu hücre hatlarına tek tek uygulanarak hücre canlılığının CDVK-8 ile değerlendirilmesi	30
3.2.6.2. AgNP ve sorafenibin PC3 ve FaDu hücre hatlarına kombine uygulanarak hücre canlılığının CDVK-8 ile değerlendirilmesi	30
3.2.7. Apoptozis	31
3.2.8. Western Blot	32
3.2.9. İstatistiksel Analiz	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	35
4.1. Araştırma Bulguları	35
4.1.1. AgNP’lerin prostat kanseri PC3 hücre hattının proliferasyonuna karşı etkisi	35
4.1.2. Sorafenibin prostat kanseri PC3 hücre hattının proliferasyonuna karşı etkisi	35
4.1.3. AgNP’lerin hipofarenks kanseri FaDu hücre hattının proliferasyonuna karşı etkisi	36
4.1.4. Sorafenibin hipofarenks kanseri FaDu hücre hattının proliferasyonuna karşı etkisi	37
4.1.5. AgNP ve sorafenibin kombine uygulamasının PC3 hücre hattında proliferasyon üzerine etkisinin değerlendirilmesi	39
4.1.6. AgNP ve sorafenibin kombine uygulamasının FaDu hücre hattında proliferasyon üzerine etkisinin değerlendirilmesi	39
4.1.7. AgNP ve sorafenib ikilisinin PC3 ve FaDu hücre hatlarının proliferasyonuna etkisinin kıyaslanması	40
4.1.8. AgNP ve sorafenib ikilisinin PC3 hücre hattında apoptoz üzerine etkisi	41
4.1.9. AgNP ve sorafenib ikilisinin FaDu hücre hattında apoptoz üzerine etkisi	42
4.1.10. AgNP ve sorafenib ikilisinin PC3 ve FaDU hücre hatlarında apoptoz üzerine etkilerinin kıyaslanması	43
4.1.11. AgNP ve sorafenib ikilisinin PC3 ve FaDU hücre hatlarına moleküler düzeyde etkisi	43
4.2. Tartışma	44
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
-----------------	-----------------

°	Derece
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
%	Yüzde

Kısaltmalar

AgNP	Gümüş nanopartikülü
AR	Androjen reseptör
CVDK-8	Cell viability detection kit-8
DMSO	Dimetil sülfoksit
FBS	Fetal Bovine Serum
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IC ₅₀	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
PSA	Prostat spesifik antijen
ROS	Reaktif oksijen türleri
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamine

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Nanopartikül boyutunun şematize edilmesi.....	1
Şekil 1.2. Gümüş nanopartiküllerin kullanıldığı bazı alanlar	3
Şekil 1.3. Gümüş nanopartiküllerinin ROS aracılığı ile hücreyi apoptozise götürmesi ...	6
Şekil 1.4. 2020 yılının tüm yaş ve cinsiyet gruplarının dahil olduğu küresel tahmini yeni kanser vakası oranları	8
Şekil 1.5. 2020 yılının tüm yaş ve cinsiyet gruplarının dahil olduğu küresel tahmini yeni kanser bağlı ölüm oranları	9
Şekil 1.6. Normal prostat ve benign (iyi huylu) prostat hiperplazi görünümü	10
Şekil 1.7. Farenks anatomisi	11
Şekil 1.8. İntrensek ve ekstrinsek apoptoz yolları	14
Şekil 1.9. RAF/MEK/ERK sinyal yolağı	16
Şekil 4.1. PC3 hücre hattına AgNP uygulanması sonucu gözlemlenen hücre canlılığı oranları	35
Şekil 4.2. PC3 hücre hattına sorafenib uygulanması sonucu gözlemlenen hücre canlılığı oranları	36
Şekil 4.3. FaDu hücre hattına AgNP uygulanması sonucu gözlemlenen hücre canlılığı oranları	37
Şekil 4.4. FaDu hücre hattına sorafenib uygulanması sonucu gözlemlenen hücre canlılığı oranları	38
Şekil 4.5. PC3 hücre hattına AgNP ve sorafenibin IC ₂₀ konsantrasyonlarının uygulanması sonucu gözlemlenen hücre canlılığı oranları	39
Şekil 4.6. FaDu hücre hattına AgNP ve sorafenibin IC ₂₀ konsantrasyonlarının uygulanması sonucu gözlemlenen hücre canlılığı oranları	40
Şekil 4.7. PC3 ve FaDu hücre hatlarına karşı uygulanan AgNP ve sorafenibin IC ₂₀ konsantrasyonlarının uygulanması sonucu elde edilen hücre canlılığı oranlarının kıyaslanması	41
Şekil 4.8. PC3 hücre hattına karşı uygulanan AgNP ve sorafenib IC ₂₀ konsantrasyonlarının oluşturduğu apoptoz yüzdeleri	42
Şekil 4.9. FaDu hücre hattına karşı uygulanan AgNP ve sorafenib IC ₂₀ konsantrasyonlarının oluşturduğu apoptoz yüzdeleri	42

Şekil 4.10. PC3 ve FaDu hücre hatlarına karşı uygulanan AgNP ve sorafenib IC ₂₀ konsantrasyonlarının uygulanması sonucu elde edilen apoptoz yüzdelerinin kıyaslanması.....	43
Şekil 4.11. AgNP ve sorafenib muamelesi sonrası FaDu hücre hattında kaspaz-3 proteininin western blot analizi.....	44



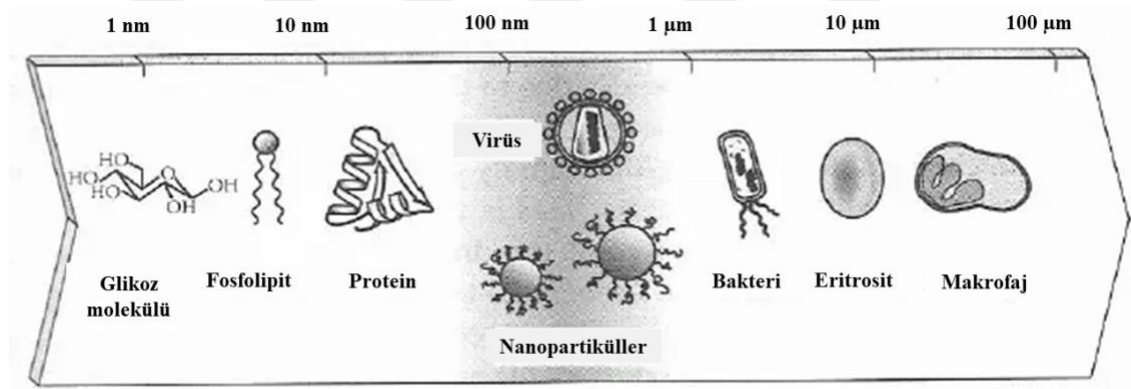
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Nanopartiküllerin sınıflandırılması	2
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi	21
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler, kimyasal maddeler ve kitlerin listesi	23
Çizelge 3.3. PC3 ve FaDu hücre hatlarına karşı uygulanan AgNP ve sorafenib konsantrasyonları.....	29
Çizelge 3.4. %10 oranında ayırma jeli için ihtiyaç duyulan materyaller	33
Çizelge 3.5. %12 oranında ayırma jeli için ihtiyaç duyulan materyaller	33
Çizelge 3.6. %4 oranında yürütme jeli için ihtiyaç duyulan materyaller.....	33
Çizelge 4.1. PC3 ve FaDu hücre hattına uygulanan AgNP ve sorafenibin IC ₂₀ konsantrasyonları.....	38

1. GİRİŞ

1.1. Nanopartiküllerin Özellikleri

Nanopartiküller, boyutları 1 ila 100 nm arasında değişen ufak materyallerdir (Khan et al. 2019). Ancak insan gözüyle algılanamayan bu nanopartiküller atomdan veya bir molekülden ise daha büyük boyutlardadır (Uyanıkgil ve Salmanoğlu 2020). Madde nano boyutta iken dökme malzeme, tek atom ya da molekül haldeki özelliklerinden farklı bir şekilde olağan dışı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler gösterebilmektedir (Anonymous 2022a). Nanopartiküller küçük boyutlarda olmalarına rağmen yüzey alanı olarak geniş olduklarından dolayı bu mümkün olmaktadır (Bayğu 2020). Nanopartiküllerin geniş yüzeyli olup hacimsel olarak küçük olmasının yanı sıra kuantum boyutundaki tesirleri, yüzeyinde bulunan atomlarının spesifik özellikleri ve elektronik yapıları onları öteki materyallerden farklı olmasını sağlamaktadır (Yetişgin ve Güney 2017).



Şekil 1. 1. Nanopartikül boyutunun şematize edilmesi (Yetişgin ve Güney 2017)'den değiştirilerek alınmıştır.

Nanoteknolojinin temelini oluşturan nanopartiküller gıda, elektronik, tekstil, kaplama ve boya, enerji, uzay alanı, otomotiv, tarım, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) kontrast maddeleri, doku mühendisliği, antimikrobiyal katkı maddeleri, DNA yapısının araştırılması, UV koruması, proteinlerin tespiti, hücre ve biyolojik materyallerin saflaştırılması gibi çeşitli birçok alanda kullanılmaktadır (Bayğu 2020). Nanopartiküller temel olarak karbon bazlı, inorganik bazlı, organik bazlı ve kompozit bazlı olarak sınıflandırılmaktadır (Uyanıkgil ve Salmanoğlu 2020).

Çizelge 1.1. Nanopartiküllerin sınıflandırılması (Uyanıkgil ve Salmanoğlu 2020)’den değiştirilerek alınmıştır.

Nanopartiküller-Nano yapılı malzemelerin sınıflandırılması			
Karbon bazlı nanomateriyaller	Organik bazlı nanomateriyaller	İnorganik bazlı nanomateriyaller	Kompozit bazlı nanomateriyaller
Fullerenler (C60)	Dendrimerler	Altın	Kitosan
Karbon nanotüpler (CNT)	Miseller	Gümüş	Polilaktik asit
Karbon nanofiberler	Lipozomlar	Titanyum dioksit	Hidroksi etil metakrilat
Grafen (Gr)	Polimer nanopartiküller	Çinko oksit	
		Demir oksit	
		Silisyum	
		Kuantum noktalar	

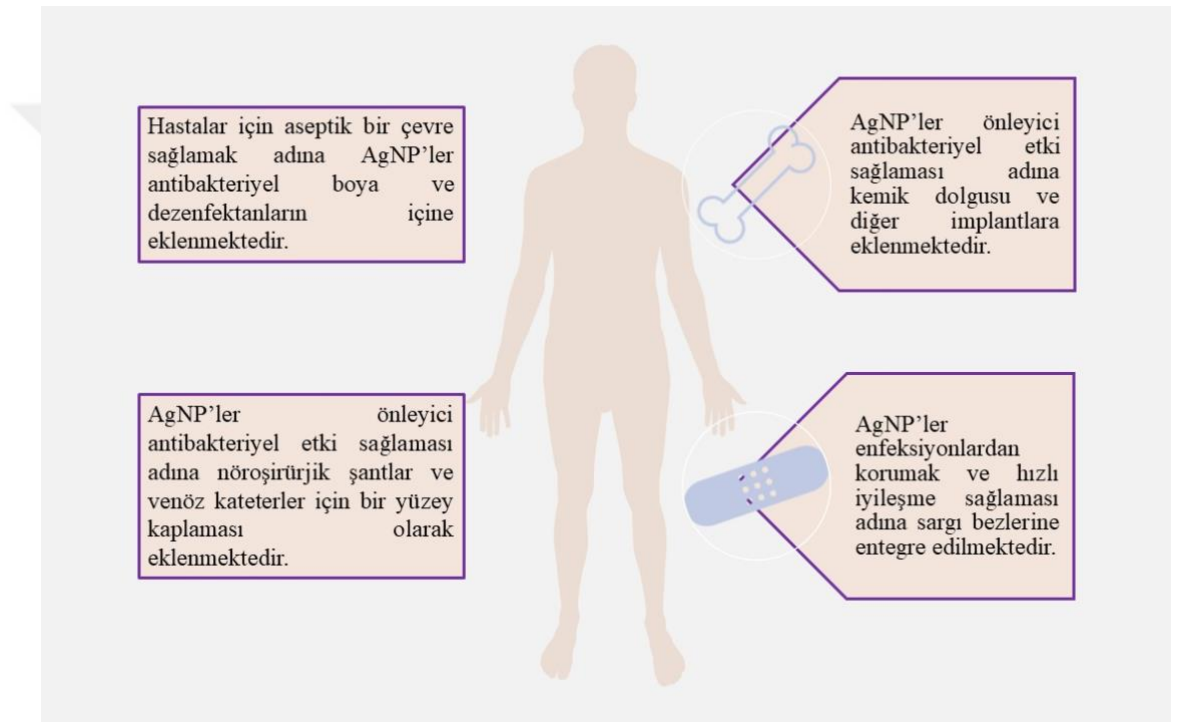
1.2. Gümüş Nanopartikülleri (AgNP’ler)

Metalik bir nanopartikül olan gümüş nanopartiküller nanoteknoloji alanında geniş bir ilgi odağı olmaktadır. Gümüş nanopartiküllerinin çeşitli kullanım alanları arasında protein algılama amacıyla inşa edilmiş biyosensör yapımı (Zhou et al. 2011), biyo görüntüleme (Lee et al. 2007), tümör bölgesinin lazer yardımıyla ısıtılıp büyümesini inhibe etmek kastıyla fototermal tedavi yöntemi (Park et al. 2020) ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı tıbbi-dental uygulamalar (Bapat et al. 2018; Hammamchi 2019) bulunmaktadır. Tüm değinilen bu noktalardan anlaşıldığı üzere gümüş nanopartikülleri çok farklı alanlarda rağbet görmektedir. Aynı zamanda gümüş nanopartikülleri reaktif oksijen türlerini (ROS) indükleyerek hücre içinde oksidatif stres oluşturması sebebiyle

1. GİRİŞ

hücre ölümüne neden olduğu için antikanser çalışmalarda da kullanılmaktadır (Sankar et al. 2013).

Bilim insanlarının dikkatini çeken AgNP'ler ve yaydıkları Ag^+ iyonları, oksidatif stresi molekül, organel ya da tüm hücre seviyesinde tetikleyebilmektedirler. Gümüş nanopartiküller lizozom, mitokondri, çekirdek dahil olmak üzere hücre zarı ve organellerinde güçlü bir oksidatif hasara neden olarak doğrudan apoptoza ya da nekroza sebebiyet vermektedirler (Zhang et al. 2014).



Şekil 1.2. Gümüş nanopartiküllerin kullanıldığı bazı alanlar (Chaloupka 2010)'den değiştirilerek alınmıştır.

Farklı hücre hatlarında AgNP maruziyeti sonucu hücrelerde membran sızıntısı, canlılık da azalma ve mitokondriyal aktivasyonda inhibisyon varlığı görülmektedir. Gümüş nanopartiküllerinin hücreler üzerindeki genel sitotoksik etki mekanizmasının ROS indüksiyonu vasıtasıyla olduğu dile getirilmektedir. In vitro deneylerde AgNP'lerin maruziyeti sonucu hücrede GSH miktarında azalma, ROS seviyesinde yükselme, lipid peroksidasyonu ve ROS duyarlı genlerin ekspresyonunda artma olmaktadır. Nanopartikül aracılı ROS seviyesindeki bir artış DNA hasarı, apoptozis ve nekrozis ile ilişkilendirilmektedir (Foldbjerg et al. 2011). Ayrıca yapılan bir çalışmada gümüş nanopartiküllerinin konsantrasyona miktarına bağlı olarak laktat dehidrogenaz (LDH),

ROS ve kaspaz-3'ün aktivasyonu aracılığıyla kanser hücresinde sitotoksiste gösterdiği belirtilmektedir (Gurunathan et al. 2013).

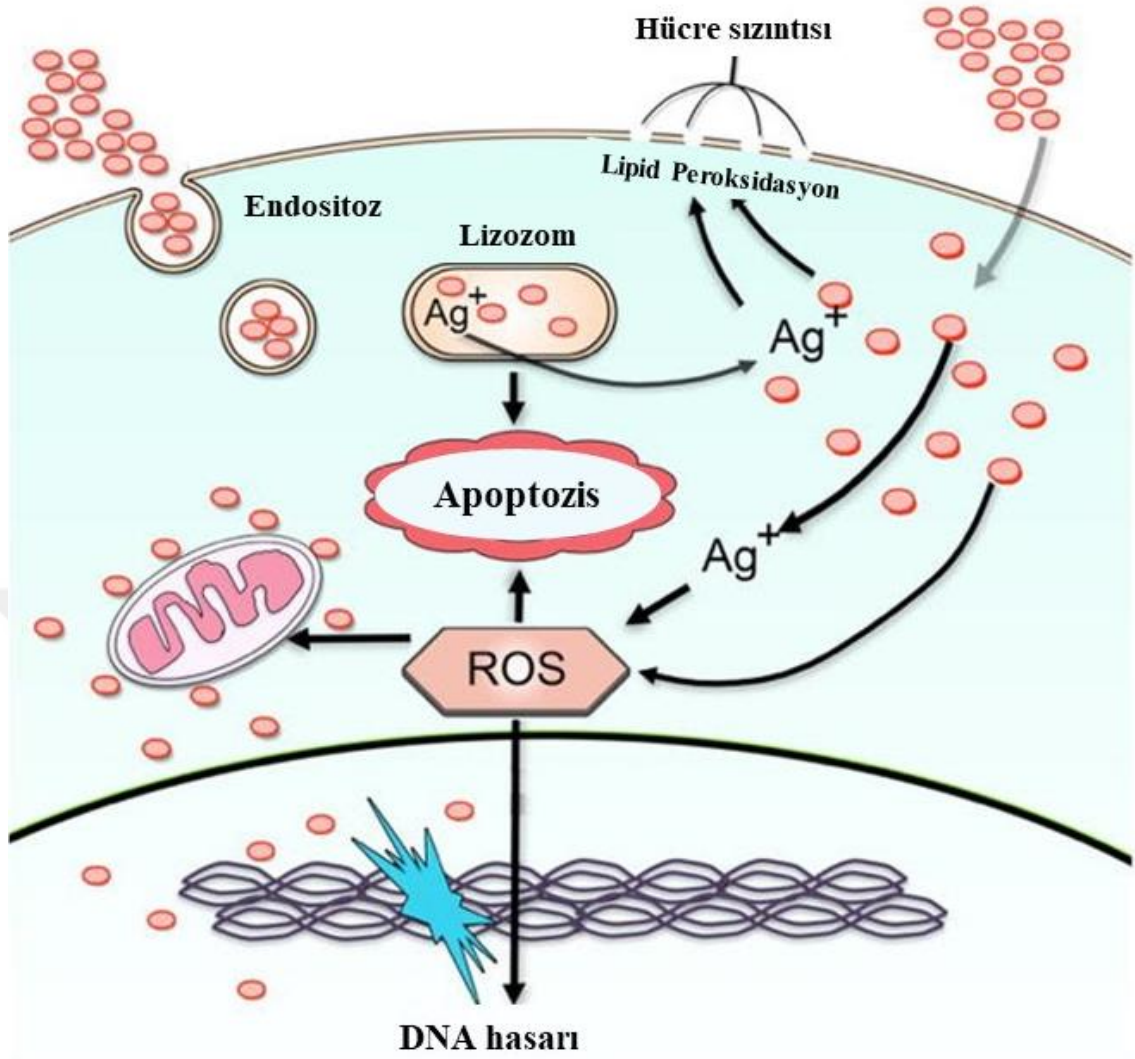
Çoğunlukla zamana, konsantrasyona ve enerjiye bağımlı olarak endositoz yoluyla hücre içine alınan gümüş nanopartiküllerinin hedef aldığı ana organeller endozom ve lizozom olmaktadır. Lizozomların asidik ortamına maruz kalan nanopartiküller ROS oluşumunu tetiklemektedir (Wei et al. 2014). Oksidatif hasara neden olan yanlış eşlemlere yol açması sebebiyle DNA'nın bütünlüğü açısından önemli bir tehdit olarak görülen ROS'lar arasında süperoksitler (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) bulunmaktadır (Klug et al. 2011). *In vivo* çalışmalara göre H_2O_2 ve AgNP arasındaki reaksiyonlar Ag^+ iyonlarının yayılımı ile sonuçlanmaktadır. Bu reaksiyonun hücre kültür medyumuna ya da sitoplazmadaki proteinler ile etkileşime geçerek meydana gelebileceği varsayılmaktadır. Sitoplazma, hücre zarı ve mitokondrinin iç zarında bulunan moleküllerin tiyol gruplarıyla etkileşime giren AgNP'ler ve yayılmış Ag^+ iyonları, lipid peroksit yayılımına, hücre membranı ve mitokondriyal sistemlerin geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır. Hücre membranındaki hasar, sitoplazmik içeriğin sızması ve nekroz ile sonuçlanıp lizozomal membranın yırtılması lizozom aracılı apoptozu aktive etmektedir. Ayrıca hasara uğrayan mitokondri işlevini yerine getiremediğinden elektron transferi bozulmakta ve bu sebeple mitokondriye bağlı apoptoz gerçekleşmektedir (Wei et al. 2014).

Ayrıca AgNP'lerin bakterisidal etki mekanizmasında da benzer bir durum olup AgNP'lerin direkt olarak bakteri hücre membranına zarar verdiğine dair kanıtlar olsa da gümüş nanopartiküllerinden gümüş iyonlarının (Ag^+) yayılması ile membran geçirgenliğinin artması, proton motif gücün kaybı, hücresel komponentlerin sızması ve DNA replikasyonunun bozulması aracılığıyla AgNP'ler bakterisidal aktiviteye sebep olmaktadır (Jones and Hoek 2010).

1.2.1. AgNP kaynaklı apoptoz ve kanser ilişkisi

İnsan vücudundaki sağlıklı hücrelerin sayısı, çoğalması, farklılaşması ve ölümü (apoptoz) var olan mükemmel bir denge ile korunmaktadır. Kanser hücrelerinin çoğalması, farklılaşması ve hayatta kalması protoonkogenlerin onkogenlere

dönüşmesinden kaynaklanmaktadır. Protoonkogenler ise nokta mutasyonu, translokasyon, insersiyon ve gen amplifikasyonu ile aktive olup onkogenleri oluşturmaktadırlar. Onkogenler, gittikleri hücrelerde transformasyona neden olan genlerdir. Bunlara karşılık olarak insan vücudunda hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını engelleyen tümör baskılayıcı genler de bulunmaktadır. Tümör baskılayıcı genler ya hücre döngüsünü inhibisyona uğratarak ya hücre farklılaşmasını tetikleyerek ya da hücreyi apoptoza göndererek kontrolsüz çoğalmanın önüne geçmektedirler. Ayrıca onkogenik sinyal yolları aşırı aktivasyona uğramışsa bu yolların inhibisyonunu sağlayarak hücre proliferasyonunu dengede tutmaktadırlar. Fakat tümör baskılayıcı genlerde oluşabilecek herhangi bir fonksiyonel kayıp (mutasyonlar gibi) hücrenin kontrolsüz çoğalması ve apoptoz inhibisyonu ile kanserleşmeye neden olmaktadır (Bozgeyik 2020).



Şekil 1.3. Gümüş nanopartiküllerinin ROS aracılığı ile hücreyi apoptoze götürmesi (Wei et al. 2014)'dan değiştirilerek alınmıştır.

1.3. Kanser

Kanser, bazı vücut hücrelerinin kontrolsüz çoğaldığı ve vücudun diğer bölümlerine yayılma (metastaz yapma) potansiyeli olan bir hastalıktır (Anonymous 2021a). Yaşlanmış ya da hasar almış hücreler ölür ve sağlıklı hücreler ihtiyaca göre yeni hücreler oluşturup bu hücrelerin yerine geçerler. Bu düzen bozulduğunda denetlenemeyen hücre çoğalması ve metastaz engelleyici mekanizmalarda anormallikler görülür. Karsinogenezis çevresel, genetik, viral kaynaklı enfeksiyon, kişinin beslenme tarzı, tütün kullanımı ve alkol tüketimi gibi yaşam şekline dayalı birçok faktör ile bağlantılıdır (Bozgeyik 2020).

Karsinogenez oluşumu için sadece kontrolsüz çoğalma yeterli değildir. Bu hücrelerin sağlıklı diğer hücelere yayılma (invazyon) ve dolaşım yoluyla tümörün köken aldığı hücreden daha uzakta bulunan diğer sağlıklı hücelere yayılma (metastaz) potansiyeline sahip olması gerekmektedir (Aliustaoğlu 2009). Kanseri hücrelerde hücre döngüsü kontrol noktalarını ve programlı hücre ölümünü denetleyen genler mutasyona uğramış ya da yanlış ifade ediliyor olabilmektedir. Böylece kontrolsüz bir şekilde kanserli hücreler çoğalmaktadır. İnsan hayatını tehdit eden hastalıkların başında gelen kanser hastalığı iyi huylu (benign) ya da kötü huylu (malign) tümör olabilmektedir. Benign tümörler önemli bir hasara yol açmasa da malign tümörler metastaz yapma kabiliyetine sahiptirler (Klug et al. 2011).

Kanserler, kanserin kaynaklandığı doku tipine (histolojik tip) ve birincil bölgesine ya da vücutta ilk kanserin başladığı yere göre iki yolla sınıflandırılmaktadır. Histolojik tipe göre yüzlerce farklı kanser türü olmasına rağmen 6 ana kategoride toplanabilmektedirler (Anonymous 2022b).

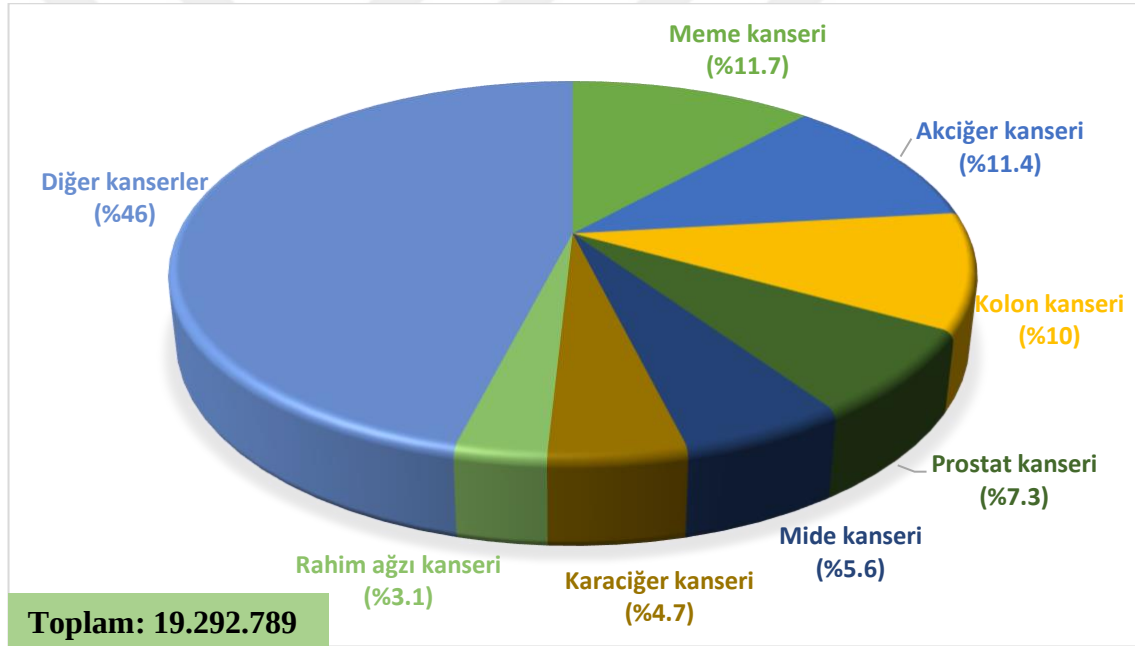
1. Karsinoma
2. Sarkoma
3. Miyelom
4. Lösemi
5. Lenfoma
6. Karışık Tipler

Karsinomlar, tüm kanser vakalarının %80-90'ını oluşturmakla birlikte epitel kökenli malign bir neoplazmadır. Karsinomlar adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom olarak ikiye ayrılmaktadır. Adenokarsinom organ ya da bezde gelişirken skuamöz hücreli karsinom skuamöz epitelden kaynaklanmaktadır. Sarkomlar, bağ dokudan kaynaklanan kanserler olmakla birlikte kemik, tendon, kas, kıkırdak gibi bölümlerde oluşabilmektedir. Miyelom, kemik iliğinin plazma hücrelerinden kaynaklanan bir kanser çeşidi olmakla birlikte bu plazma hücreleri kanda bulunan bazı proteinleri üretmektedir. Lösemi, kan kanseri ya da sıvı kanser olarak da bilinen kemik iliği kanseridir. Lenfomalar, lenfatik sistemin bezlerinde ya da düğümlerinde gelişen katı kanserler olmakla birlikte beyaz kan hücrelerinde veya lenfosit üreten bir damarda

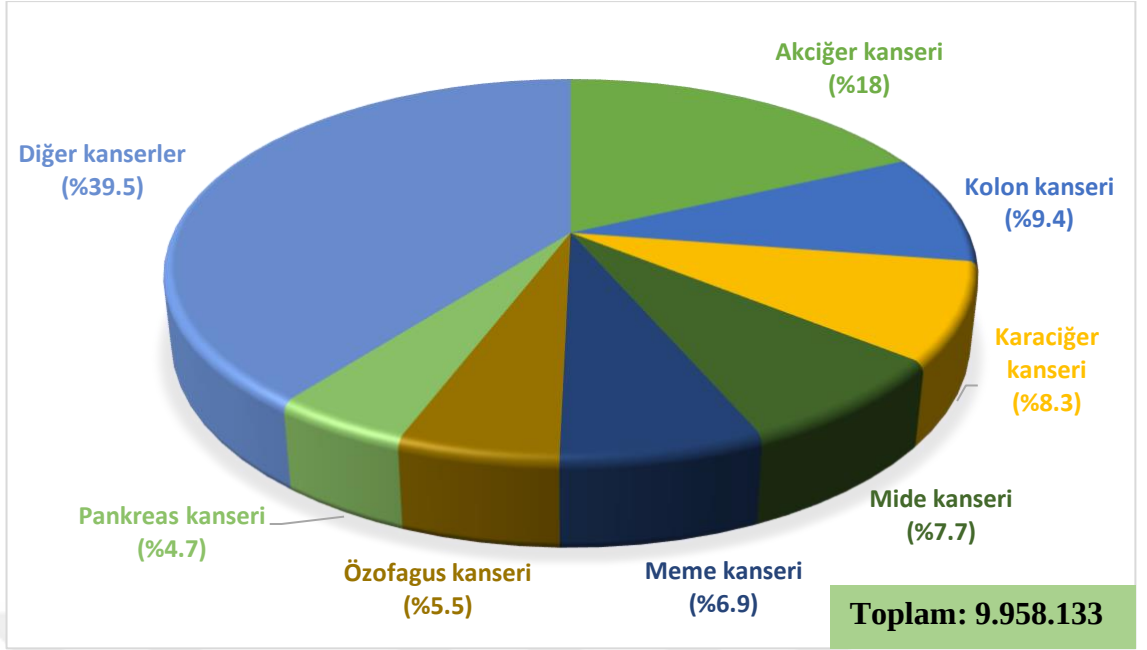
1. GİRİŞ

gelişebilmektedir. Karışık tip kanser çeşitleri arasında adenoskuamöz karsinom, karsinosarkom, karışık mezodermal tümör ve teratokarsinom çeşitleri yer almaktadır (Anonymous 2022b).

Dünya Sağlık Örgütü'nün bir alt kuruluşu olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) Küresel Kanser Gözlemevi GLOBOCAN 2020 veri tabanına göre 2020 yılı içerisinde toplam 19,3 milyon yeni kanser vakası ve buna bağlı yaklaşık 10 milyon ölüm bildirilmiştir. Erkeklerde en sık görülen kanserler arasında olan prostat kanseri 1,4 milyon yeni vaka sayısı ile tüm kanserlerin %7,3'ünü oluşturmakta iken hipofarenks kanserleri ise nadir görülüp 84,2 bin vaka ile tüm vücut kanserlerinin yaklaşık %1' ini oluşturmaktadırlar.



Şekil 1.4. 2020 yılının tüm yaş ve cinsiyet gruplarının dahil olduğu küresel tahmini yeni kanser vakası oranları (Anonymous 2020)'den değiştirilerek alınmıştır.



Şekil 1.5. 2020 yılının tüm yaş ve cinsiyet gruplarının dahil olduğu küresel tahmini kansere bağlı ölüm oranları (Anonymous 2020)'den değiştirilerek alınmıştır.

1.3.1. Prostat kanseri

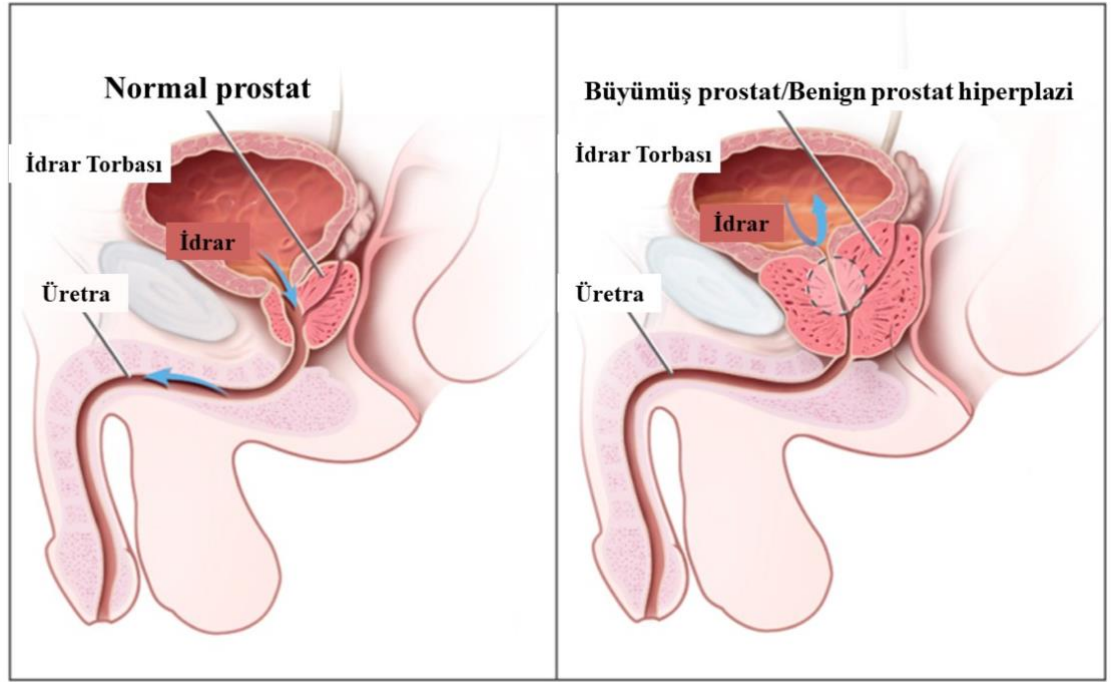
Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı (IARC) GLOBOCAN 2020 verilerine göre ülkemizde meme kanserinden sonra en sık görülen kanser prostat kanseri olup mortalite açısından akciğer ve meme kanserlerinden sonra yer almaktadır.

Prostat bezi, mesanenin hemen altında yer alan, içerisinden idrar kanalının geçtiği ve ayrıca spermleri testislerden getiren tüplerin açıldığı salgı üreten bir organdır. Asıl görevi meniği oluşturan sıvının bir bölümünü salgılamasıdır. Büyümemiş hali ile yaklaşık bir ceviz boyutundadır (Wein and Kolon 2021).

Normal prostat epitelyumu lüminal epitel hücreler, bazal hücreler ve prostat bezinin her tarafına yayılmış küçük nöroendokrin (NE) hücre komponenti içermektedir (Hu et al. 2015). Prostat kanserlerinin çoğunluğu androjen reseptör (AR), prostat spesifik antijen (PSA) ekspresyonu ve glandüler oluşumu içeren luminal farklılaşma özellikleriyle birlikte bazal hücrelerin yokluğu ve kötü huylu tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile karakterize olup adenokarsinom olarak adlandırılmaktadırlar. Adenokarsinomların çoğu androjen bağımlıdır. Prostatik epitelyal tümörün azınlığı ise duktal tip adenokarsinoma, müsinöz (kolloid) karsinom, taşlı yüzük hücreli karsinom ve küçük

1. GİRİŞ

hücreli (nöroendokrin) karsinom (SCNC) gibi çeşitli formlardan oluşmaktadır (Grignon 2004). SCNC, nadir tümörler arasında olup tüm prostat karsinomlarının %1'inden fazlasını oluşturmamaktadırlar. SCNC tümör hücreleri, adenokarsinomların aksine AR ve PSA için negatiftir (Yao et al. 2006). Oldukça agresif olan SCNC'ler, lokal olarak ilerlemiş ya da uzak metastaz şeklinde kendisini gösterebilmektedir. En sık kullanılan SCNC hatlarından biri olan PC3 hücre hattı da kemik metastazından elde edilmiştir (Kaighn et al. 1979). PC3 hücre hattı androjen bağımsız olup PSA ve AR eksprese etmemektedirler (Bokhoven et al. 2003). Mevcut prostat kanseri tedavilerinden olan AR sinyalini engelleyen hormon tedavileri, aşırı agresif SCNC hatlarında yanıt vermediğinden var olan tedaviler yetersiz kalmaktadır (Papandreou et al. 2002).



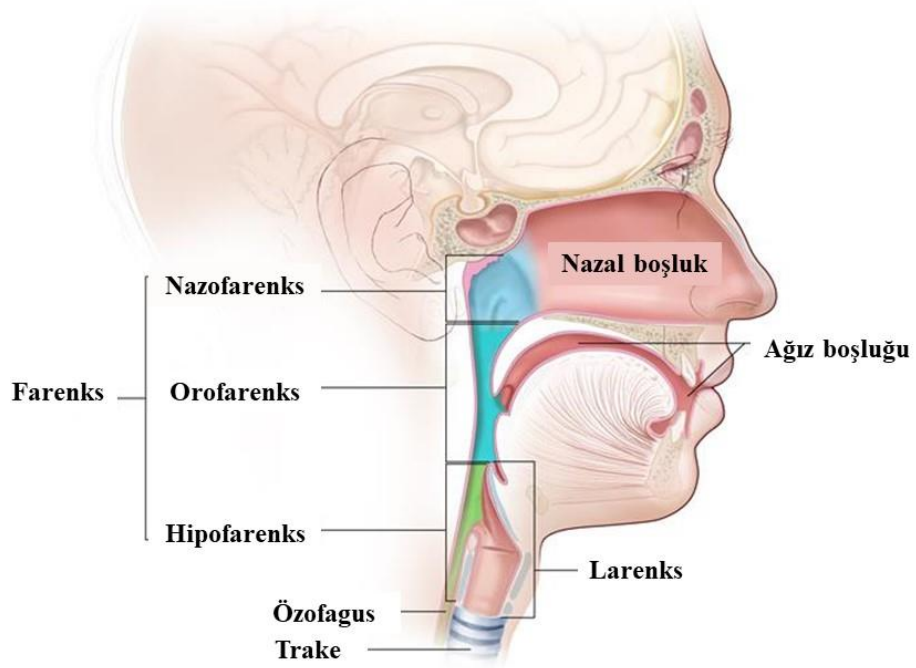
Şekil 1.6. Normal prostat ve benign (iyi huylu) prostat hiperplazi görünümü (Anonymous 2021b)'den değiştirilerek alınmıştır.

1.3.2. Hipofarenks kanseri

IARC GLOBOCAN 2020 verilerine göre sadece bir yılda 84,2 bin yeni hipofarenks kanseri vakası görülürken yine sadece bir yılda 38,6 bin mortalite hipofarenks kanseri sebebiyle görülmektedir. Tüm baş boyun kanserleri arasında hipofarenks kanserleri nadir görülen tümörlerden olsa da malign özellikte olup sağ kalım oranı düşük ve prognozu en kötü olanların başında yer almaktadır (Garneau et al. 2018).

Farenks bölgesi, burnun arakasında yer alan boyun bölgesinden aşağı doğru inen ve yemek borusu ile soluk borusunun üstünde biten yaklaşık 12-13 cm uzunluğunda içi boş bir tüp olup yediğimiz yemek soluduğumuz hava dahil ilgili yerlerine giderken farenksten geçmektedir. Hipofarenks bölgesi ise farenksin (boğazın) alt kısmında yer almaktadır.

Farenks Anatomisi



Şekil 1.7. Farenks anatomisi (Anonymous 2012)’den değiştirilerek alınmıştır

Bir baş boyun kanseri olan hipofaringeal tümörlerin ezici çoğunluğu skuamöz hücreli karsinomlardan oluşmaktadır. Hipofaringeal skuamöz hücre karsinomalı (HSCC) hastaların çoğunluğu erkek olup bu hastaların tütün ve alkol kullanımı geçmişleri olmaktadır (Avinçsal et al. 2018).

Baş boyun kanseri (HNC) onkogen aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucu oluşmaktadır. Normal epitelden invaziv karsinomaya doğru hücre değişirken hiperplazi, displazi veya in situ karsinom olmaktadır. HNC’lerde sıklıkla p16 ve p53 tümör baskılayıcı genlerde genetik değişiklikler olmaktadır (Mehrotra and Yadav 2006). Bu kanser tipinde p16 geninin inaktivasyonu hücre büyümesinde defektlere, tümör oluşumunda katkıya sebep olmaktadır. Apoptozu indüklemeye, hücre döngüsünü kontrol

etmede anahtar rol oynayan p53 geni, çeşitli mekanizmalarla inaktive edildiği zaman mutasyonlara, delesyonlara, aralarında skuamöz hücre karsinomasının (SCC) da olduğu farklı kanser türlerinde hücresel ve viral proteinlerle bağlanmaya neden olmaktadır (Weinberg 1991). Baş boyun skuamöz hücre karsinoması (HNSCC) vakalarının %90'ı ya da daha fazlasında epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR) proteini ekspresyonunda yükselme olmaktadır (Grandis and Tweardy 1993). EGFR ligandının bağlanması apoptozun önlenmesi, anjiyogenez, metastatik potansiyel, çoğalma ve gen transkripsiyonu gibi birçok yolağı, reseptöre bağlı tirozin kinaz aktivasyonunu kapsayan moleküler kaskad ile sonuçlanmaktadır (Argiris et al. 2008).

1.3.3. Karsinogenez sürecinde apoptozis mekanizmasının rolü

DNA hasarı ya da kromozomal hasar düzeltilemeyecek kadar ciddi boyutta olduğu durumlarda hücre programlı ölüme diğer adıyla apoptozise gidebilmektedir. Apoptoz, sağlıklı hücrelerde gelişim esnasında da gerçekleşebilmekte olup hücrenin genetik olarak kontrol edildiği ve geri çevrilemeyecek sorunların olduğu hallerde ölüme gittiği bir süreçtir. Hücre içi sindirimden sorumlu olan kaspaz adı verilen bir grup proteaz sürece dahil olduktan sonra başlayan apoptoz basamakları sırasıyla şu şekilde olmaktadır (Klug et al. 2011):

- Nükleer DNA parçalara ayrılır.
- Hücre içi yapılarda bozulmalar olur.
- Apoptotik cisimcikler (küçük küreler şeklinde) oluşur.
- Apoptotik cisimcikler fagositik hücreler tarafından içeri alınır.

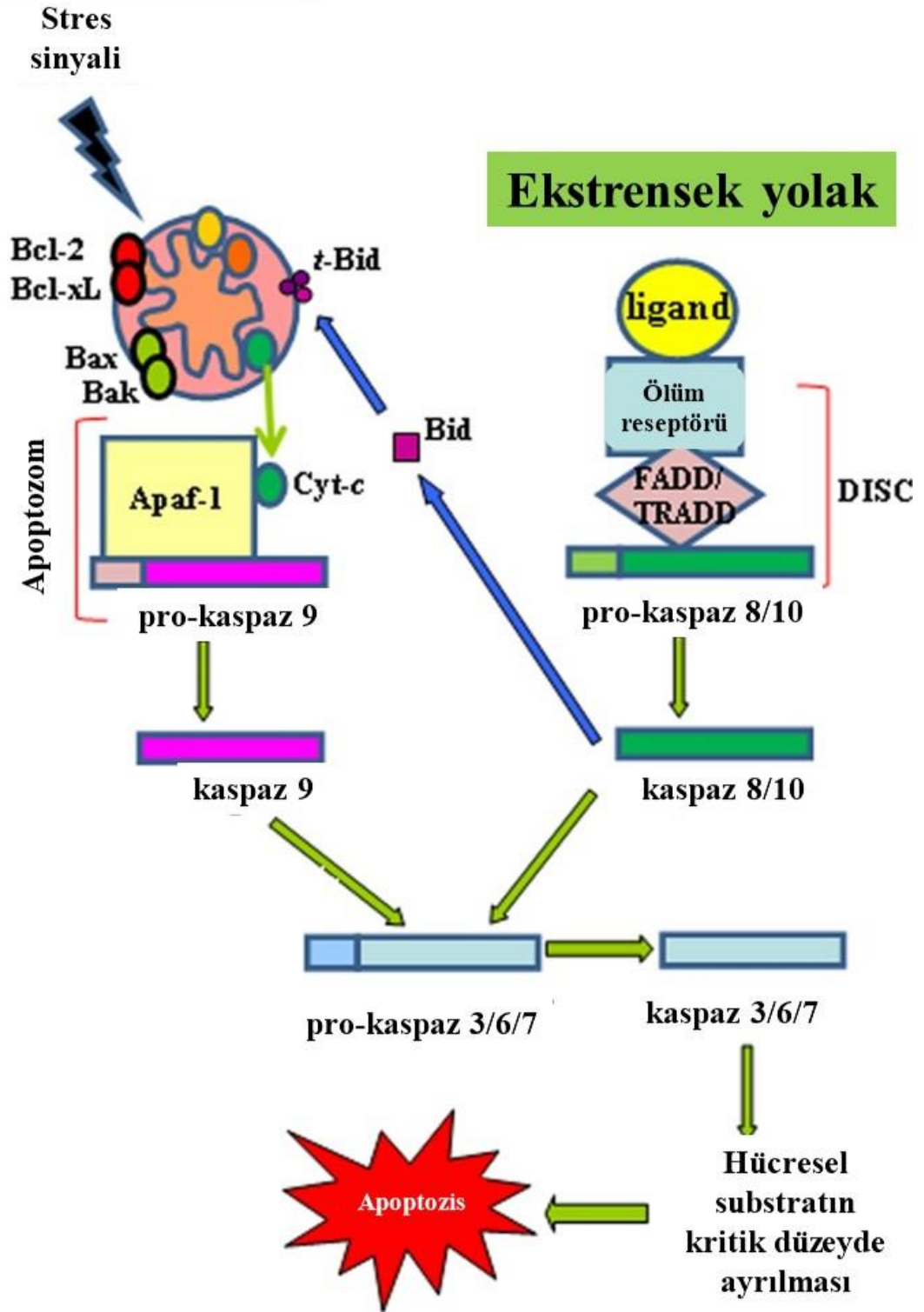
Apoptoz mekanizmasının merkezindeki kaspazlar hem başlatıcı hem de infazcı görevinde yer almaktadırlar. Kaspaz üç farklı şekilde aktive olmaktadır: Mitokondriyal (intrensek-içsel), ölüm reseptörü (ekstrensek-dışsal) ve intrinsek endoplazmik retikulum yolağı (O'Brien 2008).

İntrensek yolak, sitokrom-c (Cyt-c)'nin sitoplazmik salınmasıyla Apaf-1 ve kaspaz-9 ile apoptozom kompleksini oluşturmasıyla kaspaz-3'ün aktivasyonunda rol almaktadır. Ekstrensek yolak ise ölüm reseptörüne bağlanan ligand sayesinde kaspaz-8'i

aktive etmektedir (Pistritto 2016). Mitokondriyal ve ölüm reseptörü yolağı kaspaz-3'te birleşmektedir (Kroemer et al. 2007). Mitokondriden bağımsız olduğu düşünülen intrensek endoplazmik retikulum yolağı, kaspaz-12'ye bağlıdır (Bozgeyik 2020).



İntrensek yolak



Şekil 1.8. İntrensek ve ekstrinsek apoptoz yolları (Pistritto et al. 2016)'dan değiştirilerek alınmıştır.

Apoptoz mekanizması normalde yukarıda anlatıldığı gibi gerçekleşirken karsinogenez sürecinde hücre bölünmesi ve ölümü arasında dengenin bozulduğu bir durum olmaktadır. Hücreyi ölüme götürecek sinyali alamayan kanser hücresinde apoptoz yolağının herhangi bir adımında hata olabilmektedir. Tümör baskılayıcı gen olan p53 genin inaktivasyonu tümör büyümesini ve gelişmesini hızlandırıp apoptozun azalmasına neden olmaktadır (Wong 2011).

1.3.4. Karsinogenez sürecinde tirozin kinazların rolü

Hücrelerin bölünmesinde, sinyal iletiminde, proliferasyonda, farklılaşmada rol alan, hücre canlılığı ve hareketinde etkili olan tirozin kinaz enzimleri ATP’de bulunan fosforu hedeflenen proteine transfer ederek proteinlerin fosforilasyonunu katalizlemektedir (Paul and Mukhopadhyay 2004; Zhang et al. 2009).

Tirozin kinazlar iki sınıfa ayrılmaktadır:

1. Reseptör protein kinazlar (RTK)
2. Non-reseptör protein kinazlar (sitoplazmik protein kinazlar)

RTK’lar, tirozin kinazların alt sınıfı olup hücre dışı sinyallere yanıt olarak hücre büyümesine, çoğalmasına, hayatta kalmasına ve metabolizmasına dair çeşitli işlevleri olan hücre yüzey reseptörüdür (Blume-Jensen and Hunter 2001). RTK’lar, insülin reseptörü (IR), EGFR/ErbB, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) gibi 58 reseptörden 20 alt aileye sahiptirler (Lemmon and Schlessinger 2010).

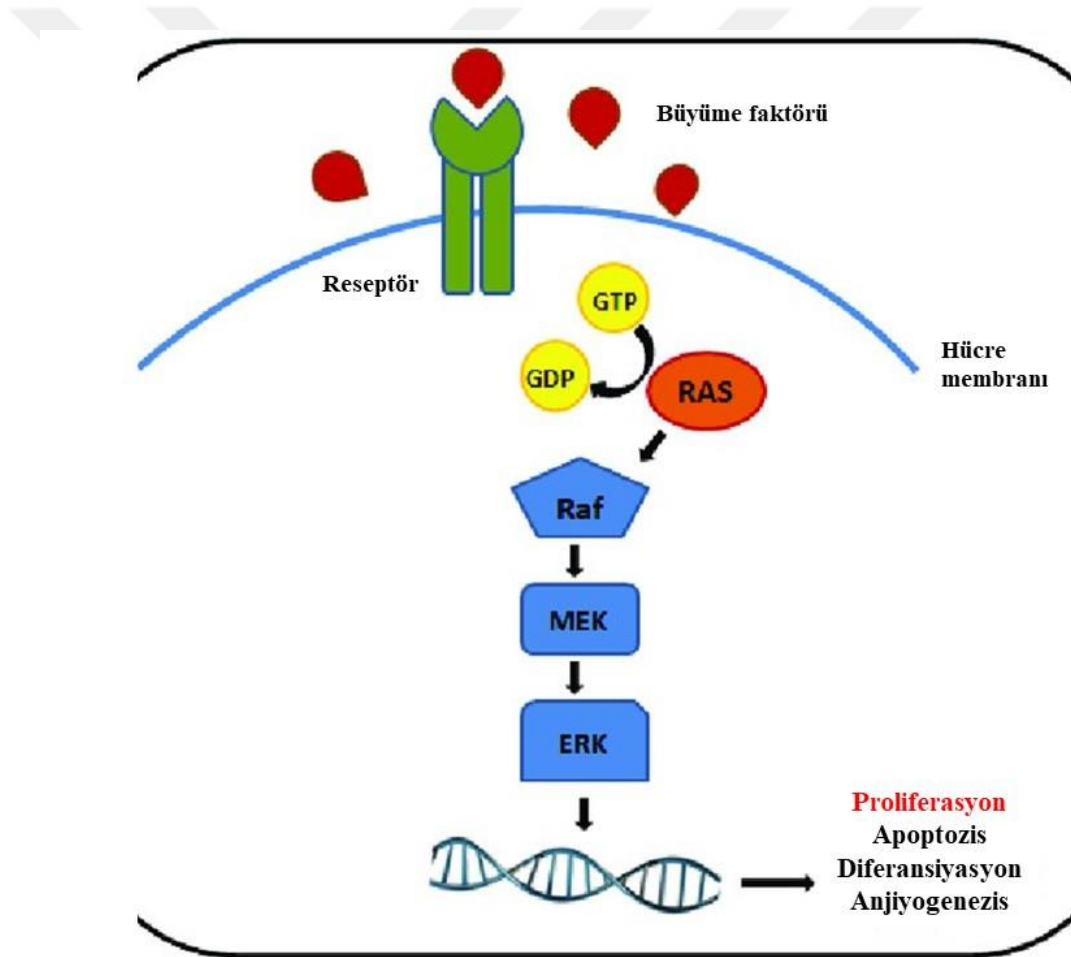
Tirozin kinaz enzimleri çeşitli mekanizmalarla inhibisyona uğramaktadır. Bazı inhibitörler ATP veya substratın bağlanma bölgesine bağlanıp kinaz enzimlerini geri dönüşümsüz bir şekilde inhibe edebilmektedirler. Diğer bir mekanizma ise tirozin kinazların dimerizasyona uğramalarını engelleyip tirozin kinazların birleşmesinin önüne geçilerek inhibe etmektir (Kwak et al. 2005). Reseptör tirozin kinaz ve ligandlara karşı antikor oluşturulmasıyla ligand bağlanmasının önüne geçilerek kinaz enzimleri inhibe

1. GİRİŞ

edilebilmektedir. Ve son olarak ısı şok proteinleri ile stabil olan tirozin kinazlar ısı şok proteinlerine bağlandığında BCR-ABL ve HER-2'ye bağlanamayacağından kinazın inhibisyonu gerçekleşmiş olmaktadır (Krause and Van Etten 2005).

1.3.4.1. Sorafenib

Sorafenib etken maddesi, reseptör tirozin kinazları ve RAF/MEK/ERK sinyal yolağını hedefleyerek tümör büyümesini inhibe etmektedir (Abdelgalil 2019). Ayrıca sorafenib, VEGFR-2/PDGFR-beta sinyal dizisini inhibe ederek tümör anjiyogenezini bloke etmektedir (Anonymous 2022c).



Şekil 1.9. RAF/MEK/ERK sinyal yolağı (Vural et al. 2018)'den değiştirilerek alınmıştır

Sorafenib, Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yolağında Raf-1, B-Raf ve kinaz aktivitesinin inhibisyonu ile tümör hücre büyümesini baskılamaktadır. Sorafenib, trombosit kaynaklı büyüme faktör reseptörünü (PDGFR- β), vasküler endotelial büyüme

faktör reseptörünü (VEGFR), hepatosit faktör reseptörünü (c-KIT) ve tümör anjiyogenezini engellemek için diğer proteinleri hedefleme kabiliyetine sahiptir. (Tang et al. 2020) Serin/teonin kinaz olan Raf kinazı, Ras onkogeni (membran lokalize protein) tarafından aktive edildiğinde çekirdekte gen transkripsiyonunu uyararak tümörü destekleyen hücresel etkilere yol açmaktadır. Hem normal hem de tümör ile ilişkili anjiyogenezisin birincil aracı olan VEGF bu etkiyi endotelial hücre bölünmesinin ve göçünün indüksiyonu, endotelial hücre yaşlanmasını geri çevirerek ve apoptozdan koruyarak endotelial hücrenin hayatta kalmasını sağlayan mekanizmalarla sağlamaktadır. Endotelial hücre yüzeyindeki reseptörler (VEGFR 1,2,3) ile etkileşime giren VEGFR, intraselüler tirozin kinaz reseptörünün otofosforilasyonuna neden olmaktadır. Kapiller endotelial hücre yüzeyinde reseptörü olan PDGF, bu reseptörlere bağlandığında endotelial hücre hareketliliğinde ve apoptozda etkisi olmaktadır (Mousa 2008).

Sorafenib tedavisi sonucu hücrede intrensek ve ekstrensek apoptoz yolları indüklenmektedir. Ayrıca kanser hücresinin invazyonunu ve hücre göçünü azaltan sorafenib, nükleer faktör- κ B (NF- κ B)'nin inaktivasyonunu sağlayıp anti-apoptotik ve NF- κ B tarafından kodlanan metastazla ilişkili proteinlerin ekspresyonunu azaltmaktadır (Wu et al. 2021).

Sorafenib tek bir ajan olarak kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olabilmektedir. ERK1/2 sinyalinin inhibe olması vasıtasıyla sadece BAX ve BAK proteinlerini BH3'ten ayırmak için BCL-2, BCL-XL, ve MCL-1'in etkilerini azaltan gelişmiş BIM ekspresyonuna neden olan sorafenib, pro-apoptotik bir protein olan NOXA proteinini regüle etmektedir (Booth et al. 2020).

Nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte kanser tedavilerinde yeni yaklaşımlar da gündeme gelmektedir. Bu sebeple biyouyumlu gümüş nanopartikülleri antikanser ajan olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra sorafenib tedavisi, hormon tedavisine dirençli prostat hastalarında Faz II çalışmalarında kullanılmaktadır ve tedavinin kalitesi ve genel sağkalım olumlu sonuçlar vermiştir (Zaborowska et al. 2012). Aynı zamanda sorafenib konsantrasyona bağlı olarak hipofaringeal tümör olan FaDu hücre hattında da hücre canlılığında azalmaya yol açmıştır (Möckelmann et al. 2016) Yapılan literatür

incelemeleri sonucunda antikanser ajan olarak kullanılan gümüş nanopartikülleri ile hücre büyüme-çoğalma yolağına tesir eden multikinaz bir inhibitör olan sorafenibin in vitro prostat ve hipofarenks kanseri üzerinde sinerjistik etkilerinin çalışılmadığı görülmektedir. Bu sebepten ötürü bu tez çalışmasında; AgNP ve sorafenibin androjenden bağımsız prostat kanseri olan PC3 ve hipofarenks kanseri olan FaDu hücre hatları üzerinde canlılık ve apoptozis üzerine etkilerinin olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmaktadır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

AgNP'lerin antikanser etkisini araştırmak amacıyla rahim ağzı kanseri olan HeLa hücre hattında telomerez ve telomerin olası mekanizması incelenmiş; AgNP'lerin telomerez aktivitesini inhibe edip telomer kısalması ve fonksiyon bozukluğu oluşturduğu buna bağlı olarak HeLa hücrelerinde sitotoksositeye neden olduğu gösterilmiştir (Chen et al. 2018).

AgNP'lerin antiproliferatif potansiyeli, karaciğer kanseri olan HepG2, meme kanseri olan MCF-7 ve akciğer kanseri olan A549 hücre hatlarında çalışılmış; AgNP'lerin normal hücre hattı olan Vero hücrelerinde düşük toksisiteye neden olup çalışmada kullanılan kanser hücrelerindeki tedavisinde ise hücre büzülmesi, membran kabarması, hücre çürümesi morfolojileri ile kendisini gösteren apoptozise ve nekrozise neden olduğu gösterilmiştir (Devanesan et al. 2021).

AgNP'lerin antikanser potansiyeli, meme ve kolorektal kanserleri üzerinde MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), yara çizik (scratch assay) ve comet deneyleri ile değerlendirilmiş; RT-PCR aracılığıyla AgNP'lerin kanser hücrelerine karşı toksisitesi apoptotik genler olan p53, Bax, kaspaz-3 genleri ve antiapoptotik bir gen olan BCl-2 genin ekspresyonu ile gösterilmiştir. AgNP tedavisinin ROS üretimini fazlasıyla arttırdığı ve antimetastaz potansiyeli olduğu rapor edilmiştir (Khan et al. 2021).

Hormona duyarlı prostat adenokarsinomu olan LNCaP hücre hattı ve hormona dirençli prostat kanseri olan PC3 hücre hattı üzerinde AGNP'lerin sitotoksitesi araştırılmış; AgNP tedavisi PC3 ve LNCaP hücrelerinde sitoplazmik membranda, mitokondride, hücre çoğalmasında ve hücre döngüsünde hasarı indükleyip değişik morfolojik görünüme yol açtığı görülmüştür. Bu hasarlar, prostat kanseri hücrelerinin G0/G1 ve G2/M kontrol noktalarında durması proliferasyonun bloke edilip hücrenin ölüme gitmesiyle sonuçlanmıştır (Morais et al. 2021).

Prostat adenokarsinomu PC3 hücre hattı ile insan dermal fibroblast hücresi HFS hücre hattı üzerinde AgNP'lerin antikanser aktivitesi incelenmiş ve PC3 hücre hattında

konsantrasyona bağılı olarak antiproliferasyona yol açtığı görülmüştür (Abdellatif et al. 2022).

İnsan kolorektal kanseri olan HCT 116, meme kanseri olan MDA-MB-231 ve hipofarenks kanseri olan FaDu hücrelerine karşı sitotoksiteyi belirlemek adına AgNP'ler kullanılmış; yapılan MTT deneyi sonucu AgNP'lerin toksisite oluşturduğu izlenmiştir (Alqahtani et al. 2020).

Baş-boyun skuamöz hücre karsinomasına (HNSCC) karşı multikinaz bir inhibitör olan sorafenib kullanılmış; sorafenib bu hücrelerde epitel büyüme faktör reseptörlerinin otofosforilasyonunu inhibe edip sorafenibe bağılı hücre ölümünün gerçekleştiği görülmüştür (Beizaei et al. 2019).

İleri metastatik renal hücre karsinomuna (mRCC) sahip hastalarda bir tirozin kinaz inhibitörü olan sorafenib tedavisinin klinik yararı olduğu analiz edilmiştir (Inamoto et al. 2020).

Sorafenib tedavisinin konsantrasyona bağılı olarak PC3, DU145 ve 22Rv1 prostat kanseri hücrelerinde canlılığı azalttığı apoptozu indükleyip MAPK yolağını inaktive ettiği gösterilmiştir. Prostat kanseri hücrelerinde sorafenib tedavisinin hücresel otofajiyi indüklediği görülmüştür (Ullén et al. 2010).

Prostat kanseri olan PC3 hücreleri ve kontrol için kullanılan HUVEC hücreleri üzerinde nobiletin ve sorafenib ilaçlarının potansiyel sinerjistik etkilerini araştırmak için yapılan bir çalışmada nobiletin ve sorafenib kombine tedavisinin PC3 hücre hattında daha fazla apoptotik hücre ölümüne, Bax, CDKN1A ve Rb1 seviyelerinin yukarı regülasyonu ile G0/G1 kontrol noktasında hücre döngüsünün durmasına neden olduğu görülmüştür (Güney Eskiler et al. 2019).

FaDu hücre hattında kullanılan sorafenib tedavisi sonucu tedavi edilmeyen FaDu hücre hattına göre tümör büyümesinin ve biyodağılımının azaldığı görülmüştür (Terry et al. 2014).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında yapılan tüm uygulamalar, Erzurum Teknik Üniversitesi'ne bağlı Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (YÜTAM) laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi Çizelge 3.1'de; kullanılan sarf malzemeler, kimyasal maddeler ve kitlerin listesi ise Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihazın Adı	Cihazın Kullanım Amacı	Cihazın Markası
Buzdolabı (+4°C)	+4°C'de depolanması gereken kimyasal ve besiyerleri için kullanılmıştır.	Edesa
Derin Dondurucu (-20°C)	-20°C'de depolanması gereken kimyasallar için kullanılmıştır.	Templow
Derin Dondurucu (-80°C)	Dondurulmuş hücre ve etken maddenin depolanması için kullanılmıştır.	ESCO Lexicon®
Epoch Spektrofotometre	Hücre canlılığının absorbands değeri ile ölçümünde kullanılmıştır.	BioTek EPOCH
CO ₂ İnkübatör	Hücre kültürlerinin inkübasyon sırasında doğal vücut ortamını oluşturmak için kullanılmıştır.	ESCO Celculture CO ₂ Incubator

Çizelge 3.1. (Devam)

Cihazın Adı	Cihazın Kullanım Amacı	Cihazın Markası
Laminar air-flow (Class II Safety Cabinet)	Arındırılmış, steril koşullarda hücre kültür deneylerinin yapılması için kullanılmıştır.	ESCO NordicSafeTM
Mini Santrifüj	Flask yüzeyinden kaldırılan hücrelerin çöktürülmesi için kullanılmıştır.	WiseSpin
Soğutmalı Santrifüj	Protein izolasyonu esnasında ve AgNP'lerin çöktürülmesi amacıyla kullanılmıştır.	Hettich Zentrifugen
Su Banyosu	Hücre kültürüne gerekli olan malzemelerin doğal vücut ısısına gelmesi için kullanılmıştır.	Wisd WiseBath
Vorteks	Karışımları homojen hale getirmek amacıyla kullanılmıştır.	Wisd Wisemix VM-10
Mikropipet	Doğru ölçülerde sıvıların alınması için kullanılmıştır.	Axypet
İnvert Mikroskop	Hücre görüntülemek amacıyla kullanılmıştır.	Leica
Otoklav	Laboratuvarda kullanılan malzemelerin steril olmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır.	Tomy SX-500E
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Proteinleri kaynatırken kullanılmıştır.	Bioer, ch 202

Çizelge 3.1. (Devam)

Cihazın Adı	Cihazın Kullanım Amacı	Cihazın Markası
Hassas Terazı (0,0001)	İlaç, kimyasal gibi toz maddelerin hassas tartımı için kullanılmıştır.	Shimadzu ATX 224
Masaüstü pH Metre	Solüsyon pH'larını ayarlamak için kullanılmıştır.	Adwa, AD1000
Blotlama Cihazı	+4°C'de depolanması gereken kimyasal ve besiyerleri için kullanılmıştır.	Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™
Jel Görüntüleme Cihazı	-20°C'de depolanması gereken kimyasallar için kullanılmıştır.	Bio-Rad ChemiDoc
Saf Su Cihazı	Saf su elde etmek için kullanılmıştır.	Millipore Direct- Q-3 UV

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler, kimyasal maddeler ve kitlerin listesi

Malzemenin Adı	Kullanım Amacı	Alındığı Firma
96 well plate	Hücre canlılığı deneylerinde kullanılmıştır.	Corning® Costar®
RPMI 1640	PC3 ve FaDu hücre hatları için kullanılmıştır.	Gibco®
Fetal Bovine Serum (FBS)	Hücre büyümesi için gerekli olan faktörleri sağlaması amacıyla kullanılmıştır.	Gibco®

Çizelge 3.2. (Devam)

Malzemenin Adı	Kullanım Amacı	Alındığı Firma
Trypsin	Hücre pasajlanması esnasında flaska tutunan hücreleri yüzeyden ayırmak için kullanılmıştır.	Gibco®
L-Glutamine	Kültüre alınan hücrelerin büyümesi amacıyla kullanılmıştır.	Sigma-Aldrich®
Penicilin-Streptomycin	Olası kontaminasyon riskine karşı besiyeri içinde kullanılmıştır.	Gibco®
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Hücre pasajında, protein izolasyonunda, Western Blot için gerekli karışımları hazırlarken kullanılmıştır.	EcoTech Biotechnology ® (Turkey)
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Hücre dondurma işleminde ve etken madde çözücüsü olarak kullanılmıştır.	Sigma-Aldrich®
Trypan Blue	Hücre sayımı yaparken hücreleri boyamak için kullanılmıştır.	Sigma-Aldrich®
Cell Viability Detection Kit-8 (CVDK-8)	Hücre canlılığını belirleme amacıyla kullanılmıştır.	EcoTech Biotechnology ® (Turkey)
Petri Dish	Protein izolasyonu yaparken hücreleri kültüre etmek için kullanılmıştır.	Corning® Costar®
İzopropanol	SDS jeli hazırlarken kullanılmıştır.	Sigma-Aldrich®

Çizelge 3.2. (Devam)

Malzemenin Adı	Kullanım Amacı	Alındığı Firma
Akrilamit	Jel polimerleşmesini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.	BioShop
Bis-akrilamit	Jel polimerleşmesini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.	Sigma-Aldrich®
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine (TEMED)	Akrilamit polimerizasyonunu hızlandırmak amacıyla kullanılmıştır.	Sigma-Aldrich®
Ponceau	Western Blot deneyinde jelin membrana transferi sonrasında membrandaki bantları görüntülemek amacıyla kullanılmıştır.	EcoTech Biotechnology ® (Turkey)
RIPA Lysis Buffer	Protein izolasyonu yaparken hücreleri parçalamak amacıyla kullanılmıştır.	EcoTech Biotechnology ® (Turkey)
Süt Tozu	Antikor muamelesi öncesinde spesifik olmayan bağlanmaları önlemek ve membranı bloklamak amacıyla kullanılmıştır.	EcoTech Biotechnology ® (Turkey)
PMSF	Protein izolasyonu esnasında hücre içindeki proteinlerin parçalanmasını önlemek amacıyla kullanılmıştır.	Roche®

Çizelge 3.2. (Devam)

Malzemenin Adı	Kullanım Amacı	Alındığı Firma
BSA	Primer antikoru hazırlamak amacıyla kullanılmıştır.	BioShop
Laemmli Sample Buffer 10x	Western Blot deneyinde jele yüklenecek örnekleri hazırlamak amacıyla kullanılmıştır.	EcoTech Biotechnology ® (Turkey)
Proteaz İnhibitör Kokteyl	Protein izolasyonunda proteazları inhibe edip proteinlerin parçalanmasını önlemek amacıyla kullanılmıştır.	Thermo Scientific®
Whatman Kâğıdı	Western Blot deneyinde jelden membrana transfer işlemi yaparken sandviç modeli oluşturmak adına ve transfer tamponunun iletimini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.	Sigma-Aldrich®
Nitroselüloz Membran	Jelden membrana protein transferi için kullanılmıştır.	Sigma-Aldrich®
Dithiothreitol (DTT)	Apoptoz deneyinde kullanılmıştır.	EcoTech Biotechnology ® (Turkey)
β -actin Antikor	Membrandaki proteinlerin içinden spesifik olan bir proteine bağlanması amacıyla kullanılmıştır.	Santa Cruz Biotechnology®

Çizelge 3.2. (Devam)

Malzemenin Adı	Kullanım Amacı	Alındığı Firma
Caspase-3 Antikor	Membrandaki proteinlerin içinden spesifik olan bir proteine bağlanması amacıyla kullanılmıştır.	Santa Cruz Biotechnology®
Sorafenib	Araştırma konusu olan PC3 ve FaDu hücre hatlarına karşı tedavi maksadıyla kullanılmıştır.	MedChem Express®
AgNP	Araştırma konusu olan PC3 ve FaDu hücre hatlarına karşı tedavi maksadıyla kullanılmıştır.	Sigma-Aldrich®

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

Tez kapsamında kemik metastazı olarak kendini gösteren androjenden bağımsız prostat kanseri olan PC3 hücre hattı ve skuamöz hücreli bir karsinom hastasının hipofaringeal tümöründen izole edilmiş FaDu hücre hattı kullanılmıştır. Her iki hücre hattı içinde RPMI 1640 kullanılmıştır. Hücre kültüründe kullanılacak RPMI 1640 besiyeri içerisinde %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Penisilin-streptomisin olacak şekilde hazırlanmıştır ve bu besiyeri +4°C’de saklanmıştır. T25 flask içerisinde hücreler ekilmiş; 37°C’de %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Çoğalan hücreler yoğunluğa göre 2-3 günde pasajlanmıştır.

3.2.2. Hücre Sayımı

Kültüre edilen hücreler %70-80 konfluensiye ulaştınca flask içerisindeki besiyeri çekilmiş ardından PBS ile yıkama yapıldıktan sonra tripsin ile flask yüzeyinden kalkması

ve 8.000 rpm’de santrifüj ile hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant uzaklaştırılmış ve dipte kalan çökelek 1 mL besiyerinde çözölmüş ve pipetaj ile homojen hale getirilmiştir. 15 µl tripan blue ve 15 µl besiyerinde çözölmüş hücre alınarak karıştırılmış ve hemositometre lamına bu karışımından 15 µl konulmuştur ardından invert mikroskop yardımıyla hücre sayımı yapılmıştır. Mililitrede bulunan toplam canlı hücre sayısı (3.1) numaralı formöl baz alınarak bulunmuştur.

$$\text{Hücre Sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü} (2) \times 10.000 \quad (3.1)$$

3.2.3. Hücrelerin 96 kuyucuklu platelere ekimi

Hücre sayımı işlemini gerçekleştirdikten sonra hem PC3 hem de FaDu hücre hattı için 96 kuyucuklu well platelerin her kuyucuğunda 100 µl besiyeri içerisinde 2.500 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan hücrelerin morfoloji alması için uygun ortamı sağlayan 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat bekletilmiştir.

3.2.4. İlaçların hazırlanması

25 mL şişe içerisinde süspansiyon şeklinde olan 100 nm partiköl boyutundaki AgNP’ler Sigma-Aldrich firmasından ticari olarak temin edilmiştir. 2-8°C arasında saklanması gereken AgNP’ler +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Tirozin kinaz inhibitörü olan sorafenib toz şeklinde (100 mg) MedChem Express firmasından ticari temin edilmiştir. Hazırlanan sorafenib stok çözeltileri -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.1. AgNP’lerin hazırlanması

Sigma-Aldrich firmasından ticari olarak temin edilen 25 mL hacminde sitabilizör olarak sodyum sitrat içeren 0,02 mg/mL sulu tampon içindeki AgNP (100 nm) süspansiyonu 1-2 dk vorteks yapılmıştır. Vorteks işleminde sonrasında şişe içerisinde 2 mL AgNP süspansiyonu eppendorf tüpe alınarak daha önceden +4°C 5.500 rpm devire ayarlanan soğutmalı santrifüje konularak 1 saat santrifüj işleminde gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işleminde ardından üstte kalan süpernatantın berrak olması herhangi bir partiköl olmaması kontrol edilerek 1800 µl’si çekilmiştir. Dipte kalan 200 µl pelet iyice

vortekslenerek 5 µg/mL, 10 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonları sırasıyla 20 µl, 40 µl ve 80 µl olacak şekilde alınmıştır.

3.2.4.2. Sorafenibin hazırlanması

MedChem Express firmasından ticari temin edilen 100 mg toz sorafenib firma talimatına göre hazırlanmıştır. Molekül ağırlığı 464,83 g/mol olan sorafenib hassas terazi yardımıyla 4,64 mg tartılarak 1 mL DMSO'da çözülmuş ve 10 mM'lık ana stok çözelti hazırlanmıştır. Bu 10 mM'lık ana stok çözeltiden (3.2) numaralı formül baz alınarak 5 mM ve 100 µM ara stoklar hazırlanmıştır. Ardından sorafenib ara stoklarıyla 1 µM, 10 µM ve 25 µM konsantrasyonları hazırlanmıştır.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2 \quad (3.2)$$

3.2.5. AgNP ve sorafenibin hücrelere verilmesi

PC3 ve FaDu hücre hatlarına karşı uygulanan AgNP ve sorafenib konsantrasyonları Çizelge 3.3'te gösterilmiştir. PC3 ve FaDu hücre hattı için kullanılan AgNP konsantrasyonları NC, 5 µg/mL, 10 µg/mL ve 20 µg/mL olarak belirlenirken; sorafenib konsantrasyonları NC, 1 µM, 10 µM ve 25 µM olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. PC3 ve FaDu hücre hatlarına karşı uygulanan AgNP ve sorafenib konsantrasyonları.

İlaçlar	Konsantrasyonlar			
AgNP	NC	5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
Sorafenib	NC	1 µM	10 µM	25 µM

3.2.6. Hücre canlılık deneyi (CDVK-8 deneyi)

96 kuyucuklu well platelere her bir konsantrasyon için 3 tekrarlı olacak şekilde ekilen hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra ertesi gün besiyeri çekilip yerine stokları önceden hazırlanmış etken madde konsantrasyonlarına göre RPMI 1640 besiyeri

kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan etken maddeli besiyeri kuyunun dip yüzeyine adhere olmuş hücrelerin üzerine eklenmiştir. Ardından hücreler 24 saat inkübe olduktan sonra hücre canlılığı CVDK-8 (Cell Viability Detection Kit-8, EcoTech Biotechnology) ile değerlendirilmiştir.

3.2.6.1. AgNP ve sorafenibin PC3 ve FaDu hücre hatlarına tek tek uygulanarak hücre canlılığının CDVK-8 ile değerlendirilmesi

PC3 ve FaDu hücreleri her bir konsantrasyon için 3 tekrar olacak şekilde 96 kuyucuklu well platelere ekilmiştir. 24 saat inkübasyonun ardından besiyeri çekilmiştir yerine hücreler AgNP uygulaması için NC, 5 µg/mL, 10 µg/mL ve 20 µg/mL; sorafenib uygulaması için ise NC, 1 µM, 10 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında RPMI 1640 besiyeri ile muamele edilmiştir. AgNP ve sorafenibin hücre canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için 24 saat inkübasyondan sonra besiyeri çekilip üretici firmanın protokolüne göre hazırlanan %10 CVDK-8 solüsyonu her bir kuyucuğa eklenmiştir. Işık almayacak şekilde plate 37°C’de 3 saat inkübe edilmiştir ve her saat başı 3 kere Epoch 2 Microplate Spectrophotometer cihazı ile 450 nm’de absorbans ölçümü alınmıştır.

3.2.6.2. AgNP ve sorafenibin PC3 ve FaDu hücre hatlarına kombine uygulanarak hücre canlılığının CDVK-8 ile değerlendirilmesi

PC3 ve FaDu hücre hatlarına karşı tek tek AgNP ve sorafenib uygulanması sonucu 450 nm’de alınan ölçümlere göre Probit Analizi ile IC₂₀ değerleri hesaplanmıştır. PC3 hücre hattı için AgNP IC₂₀ konsantrasyonu 20 µg/mL; sorafenib IC₂₀ konsantrasyonu 10 µM olurken FaDu hücre hattı için AgNP IC₂₀ konsantrasyonu 6 µg/mL; sorafenib IC₂₀ konsantrasyonu 5 µM olmuştur. AgNP IC₂₀ ve sorafenib IC₂₀ konsantrasyonları bir arada uygulanarak hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün besiyeri çekilerek %10 CVDK-8 solüsyonu eklenerek 37°C’de 3 saat karanlıkta plate inkübe edilmiş ve saat başı 450 nm’de ölçüm alınmıştır. Böylece PC3 ve FaDu hücre hatlarına karşı AgNP ve sorafenibin sinerjistik etkisi değerlendirilmiştir.

3.2.7. Apoptozis

PC3 ve FaDu hücreleri sayılarak her bir petri dishe 80.000 hücre ekilmiş ve morfoloji alması için 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler morfoloji aldıktan sonra besiyeri çekilip AgNP ve sorafenib IC₂₀ konsantrasyonlarına göre RPMI 1640 besiyeri ile hazırlanmıştır. İlaçlı besiyeri ile muamele edilen hücreler 37°C’de inkübe edilmiştir. %1’i DTT, %1’i PMSF ve %98’i Lysis Buffer olacak şekilde lizis tampon karışımı hazırlanmıştır. Her petri dish için 50-75 µl arasında lizis tampon karışımı kullanılmıştır. Hücre ölümünün aşırı olduğu petri dishlerde besiyeri atılmayıp santrifüj yapılmış süpernatant uzaklaştırılıp kalan pelet kısmı da kullanılmıştır. Petri dishlerden besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkama yapılmış ve hazırlanan lizis tampon petri dishlere aktararak scraper aracılığıyla kazıma işlemi yapılmıştır. Kazıma işleminin ardından eppendorf tüp içerisine alınan hücreler önceden +4°C 10 dk 13.000 rpm devire ayarlanmış soğutmalı santrifüjde santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. 96 kuyucuklu well plate kuyucuklarına 2 tekrar olacak şekilde eppendorf tüpten 5 µl olacak şekilde örnek alınarak kuyulara yüklenmiştir. Blank olarak ise hazırlanan lizis tampon karışımından 5’er µl kullanılmıştır. Ardından her bir kuyuya 100’er µl Comassie brilliant blue boya eklenmiştir. Plate çalkalayıcıda 30 sn 37°C’de çalkalandıktan sonra 595 nm’de konsantrasyon ölçümü alınmıştır. Konsantrasyon ölçümleri (3.3) numaralı formül baz alınarak hesaplanmıştır.

$$y = 0,0766x - 0,121 \quad (3.3)$$

Yukarıdaki formül baz alınarak konsantrasyonlar hesaplanmıştır ve hesaba göre her örnekten 3 tekrar olacak şekilde 96 kuyucuklu well plate kuyularına eklenmiştir. Blank yine daha önce hazırlanan lizis tamponu olmuştur. Reaksiyon tamponuna %1 oranında DTT eklenmiştir. 96 kuyucuklu well plate kuyularına eklenmiş 5 µl örnek ve blank üzerine 50 µl reaksiyon tamponu ve 5 µl substrat eklenerek kuyudaki total hacmin 100 µl olması sağlanmıştır. Plate 30 sn 37°C’de plate çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra 15 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 405 nm’de 2 saat boyunca her 15 dakikada bir olacak şekilde ölçüm alınmıştır. Alınan ölçüm değerleri excel dosyasında ilgili hesaplamalarla değerlendirilmiştir.

3.2.8. Western blot

İnkübe edilmiş PC3 ve FaDu hücreleri her bir petri dishe 100.000 hücre gelecek şekilde sayılarak ekilmiş ve 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün AgNP, sorafenib ve AgNP-Sorafenib kombinasyonu IC₂₀ konsantrasyonuna göre hücrelere verilmiştir. İlaçlı besiyeri ile muamele edilen hücrelerden 24 saat inkübasyondan sonra ertesi gün proteinlerin izolasyonu işlemi yapılmıştır. Protein izolasyonu işlemi yapılırken buz üzerinde çalışılmıştır. %1’i proteaz inhibitörü, %1’i PMSF ve %98’i RIPA Lysis Buffer olan lizis tamponu hazırlanmıştır. Petri dish içindeki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra +4°C’den alınan PBS ile yıkama yapılmış ardından 100-120 µl arasında değişen lizis tamponu her bir petri dishe eklenmiştir. Scraper aracılığıyla buz üzerinde kazıma işlemi yapıldıktan sonra hücreler eppendorf tüpe aktarılmıştır. Hücrelerin parçalanmasıyla içindeki proteinlere ulaşabilmek için eppendorf tüpler 3 defa sıvı azot içerisine daldırılıp dondur çöz işlemi yapılmıştır. Soğutmalı santrifüj cihazında +4°C’de 13.000 rpm devirde 10 dk santrifüj işlem yapılmış süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. 96 kuyucuklu well plate kuyucuklarına 2 tekrar şeklinde 5’er µl örnek ve hazırlanan lizis tamponu (blank) alınarak kuyulara yüklenmiştir. Ardından her bir kuyuya 100’er µl Comassie brilliant blue boya eklenmiştir. Plate çalkalayıcıda 30 sn 37°C’de çalkalandıktan sonra 595 nm’de protein konsantrasyonu ölçümü alınmıştır. Protein konsantrasyonu ölçümleri (3.4) numaralı formül baz alınarak hesaplanmıştır. Eppendorf tüp içinde geriye kalan protein örnekleri üzerine 10x Laemli Buffer eklenmiş 100°C’de 5 dk kuru blok cihazında kaynatılmıştır. Kaynatılan protein örnekleri -80°C’de muhafaza edilmiştir.

$$y = 0,0766x - 0,121 \quad (3.4)$$

Molekül ağırlıklarına göre izole edilen proteinleri ayırmak için iki farklı yüzdelerde %4 ve %10 olacak şekilde SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. Jel hazırlığı esnasında ihtiyaç duyulan materyaller Çizelge 3.4, Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. %10 oranında ayırma jeli için ihtiyaç duyulan materyaller

Alt jel (Ayırma Jeli) (%10)	Hacim
Distile Su	1,4 mL
Akrilamid (%29) + Bisakrilamid (%1)	1,65 mL
Tris-HCl (pH:8.8)	1,875 mL
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (%10)	50 µl
APS (Amonyum persülfat) (%10)	50 µl
TEMED	2 µl

Çizelge 3.5. %12 oranında ayırma jeli için ihtiyaç duyulan materyaller

Alt jel (Ayırma Jeli) (%12)	Hacim
Distile Su	1 mL
Akrilamid (%29) + Bisakrilamid (%1)	2 mL
Tris-HCl (pH:8.8)	1,875 mL
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (%10)	50 µl
APS (Amonyum persülfat) (%10)	50 µl
TEMED	2 µl

Çizelge 3.6. %4 oranında yürütme jeli için ihtiyaç duyulan materyaller

Üst jel (Yürütme Jeli) (%4)	Hacim
Distile Su	2,175 mL
Akrilamid (%29) + Bisakrilamid (%1)	397,5 µl
Tris-HCl (pH:8.8)	375 µl
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (%10)	30 µl
APS (Amonyum persülfat) (%10)	30 µl
TEMED	7,5 µl

β-aktin proteinini incelerken %10'luk; kaspaz-3 proteinini incelerken %12'lik SDS-PAGE jelinden yararlanılmıştır. APS ve TEMED hariç tüm bileşenler bir kapta karıştırıldıktan sonra APS ve TEMED aynı anda eklenerek hızlıca iki cam arasına

dökülmüştür. Alt jel döküldükten sonra hızlıca alt jel üzerine küçük cam çizgisine kadar izopropanol dökülmüştür. 40-45 dk içerisinde alt jelin donması beklendikten sonra izopropanol dökülmüştür ve kurutma kâğıdı ile kuruladıktan sonra üst jel hazırlanıp iki cam plaka arasına dökülmüş ve tarak takılmıştır. Ardından +4°C’de yaklaşık 40-45 dk jelin donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra tarak çıkarılıp tank içerisine 1x yürütme tamponu (1x Running Buffer) eklenerek jel yerleştirilmiştir. Tarak sayesinde oluşan kuyucuklara örnekler yüklenmiştir. Cihaz güç kaynağına bağlandıktan sonra 80 voltta çalıştırılmış ve bantlar açılınca voltaj seviyesi 110 volta çıkarılarak örnek proteinlerin yürütme işlemi yapılmıştır.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel çıkarılıp fazla kısım kesilmiştir. Ayrı kaplar içerisine 1x transfer tamponu (1x Transfer Buffer) alınarak whatman kâğıdı ve nitroselüloz membran daha iyi transfer olması açısından ıslatılmıştır. Transfer tamponu ile ıslatılmış whatman kâğıdı Trans Blot Turbo cihazının kapağına yerleştirilip nitroselüloz membran üzerine jel konumlandırıldıktan sonra tekrar bir whatman kâğıdı jel üzerine getirilerek sandviç modeli oluşturulmuştur. Trans Blot Turbo cihazında 25 volt 1,3 amperde 3 kez 7 dk olacak şekilde jel içeriğinin tamamen nitroselüloz membrana transferi gerçekleştirildikten sonra Ponceau boyası ile yatay çalkalayıcıda 5 dk çalkalama işlemi yapılmıştır. Ponceau işleminin ardından PBST ile 3 kez 5 dk yıkama işlemi yapılmıştır. Bu esnada %5 oranında hazırlanan süt tozu yatay çalkalayıcıda çalkalanmıştır. PBST ile yıkama işlemi bittikten sonra 1 saat süt tozu (bloklama) ile membranlar yatay çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Ardından PBST ile tekrar 3 kez yıkama yapılmıştır ve ilgili antikor ile bir gece +4°C’de muamele (overnight) edilmiştir. Ertesi gün bantlar ClearBand ECL Western blot substrat yardımı alınarak ChemiDoc MP cihazıyla görüntülenmiştir.

3.2.9. İstatistiksel analiz

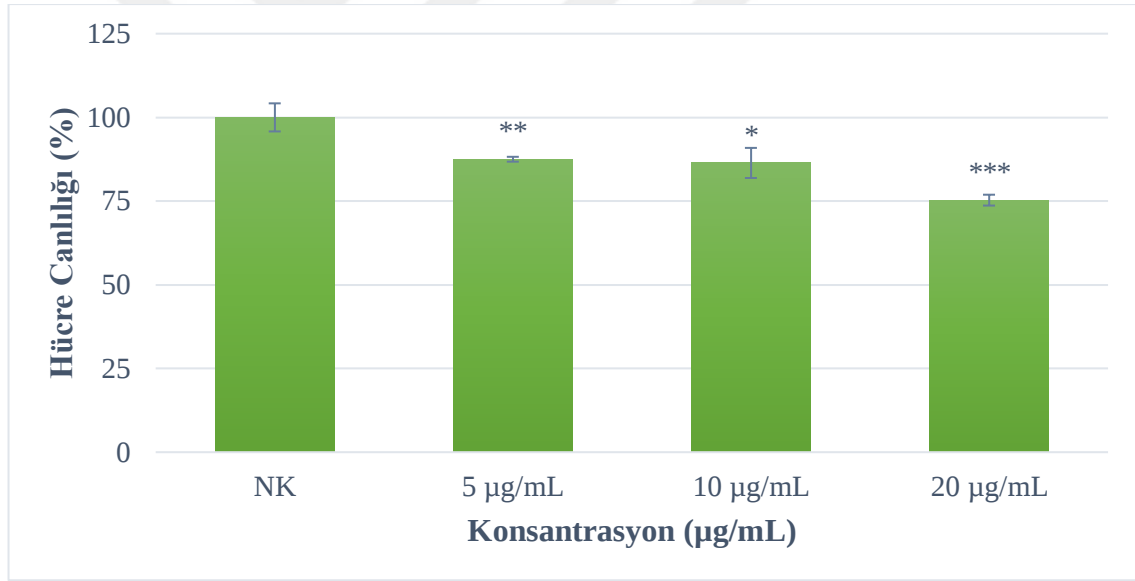
Uygulamalar 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde sunulan veriler Student’s t test yardımıyla analiz edilmiştir. Veriler arasındaki farklılık $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. AgNP'lerin prostat kanseri PC3 hücre hattının proliferasyonuna karşı etkisi

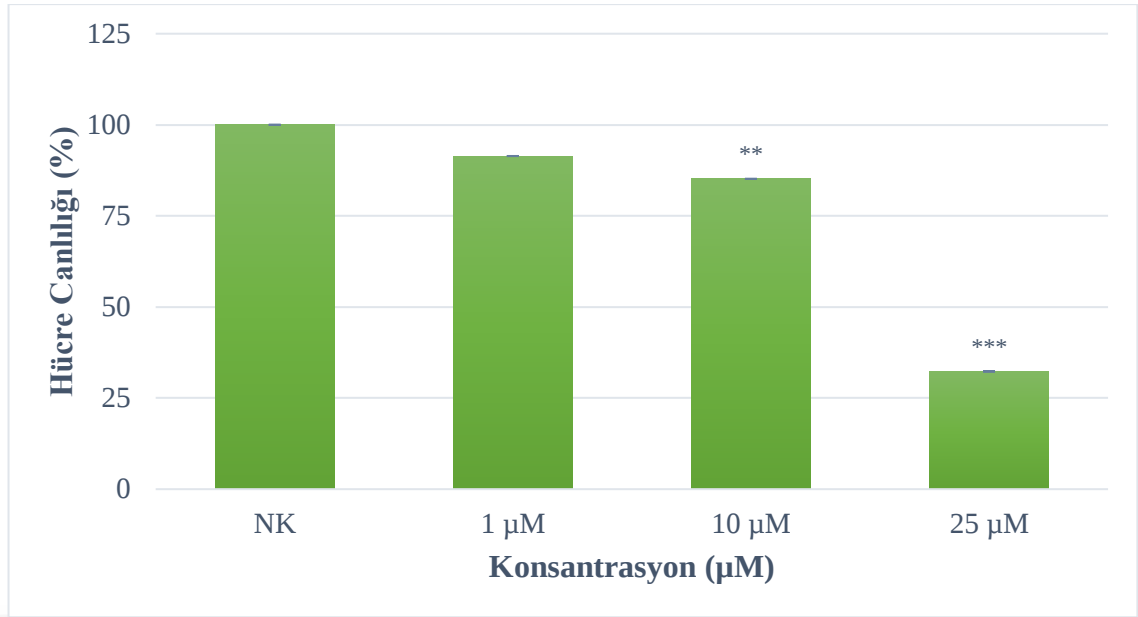
Androjenden bağımsız kemik metastazı prostat kanseri olan PC3 hücre hattı üzerinde hücrede ROS oluşumunu indükleyerek oksidatif strese dolayısıyla hücre ölümüne götüren AgNP'lerin etkisi araştırılmıştır. Kültüre edilen hücreler 24 saat boyunca 0 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonlarında AgNP ile muamele edilmiştir. AgNP'lerin konsantrasyona bağlı olarak PC3 hücre hattında hücre canlılığını azalttığı görülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. PC3 hücre hattına AgNP uygulanması sonucu gözlemlenen hücre canlılığı oranları (NK: Negatif Kontrol; * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) ve *** ($p<0,001$), NK'ye kıyasla).

4.1.2. Sorafenibin prostat kanseri PC3 hücre hattının proliferasyonuna karşı etkisi

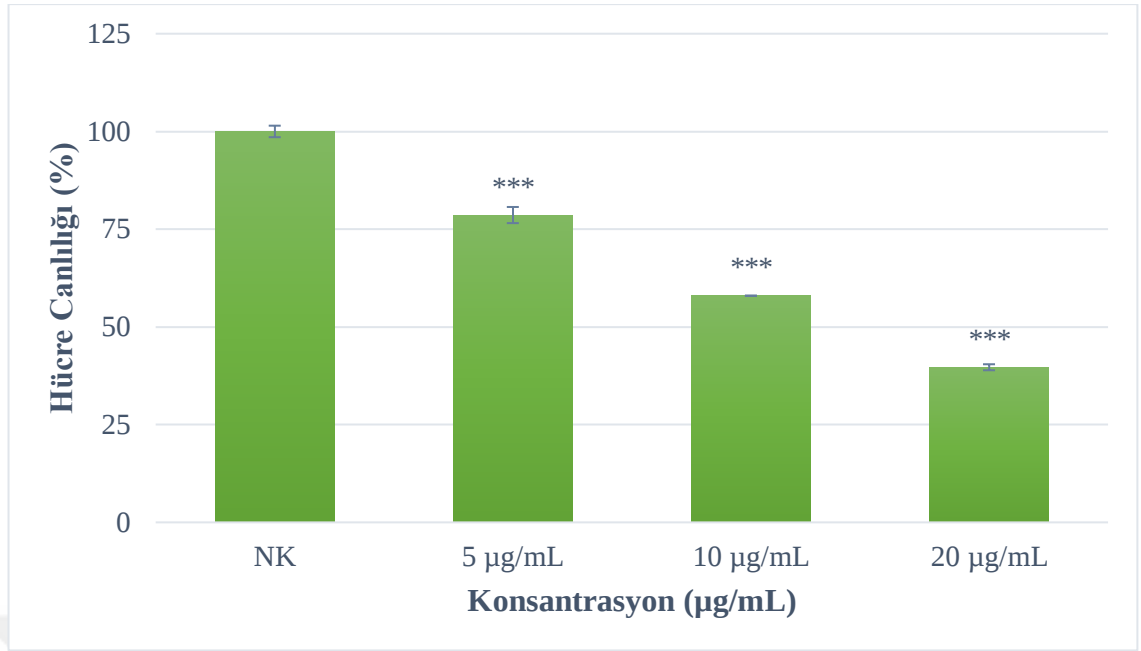
Tümör büyümesini inhibe eden birden fazla tirozin kinazın inhibitörü olan sorafenibin 0 µM, 1 µM, 10 µM ve 25 µM konsantrasyonları PC3 hücre hattına 24 saat uygulanarak hücre canlılığına etkisi araştırılmıştır. PC3 hücre hattında sorafenibin konsantrasyona bağlı hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. PC3 hücre hattına sorafenib uygulanması sonucu gözlemlenen hücre canlılığı oranları (NK: Negatif Kontrol; * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) ve *** ($p<0,001$), NK'ye kıyasla).

4.1.3. AgNP'lerin hipofarenks kanseri FaDu hücre hattının proliferasyonuna karşı etkisi

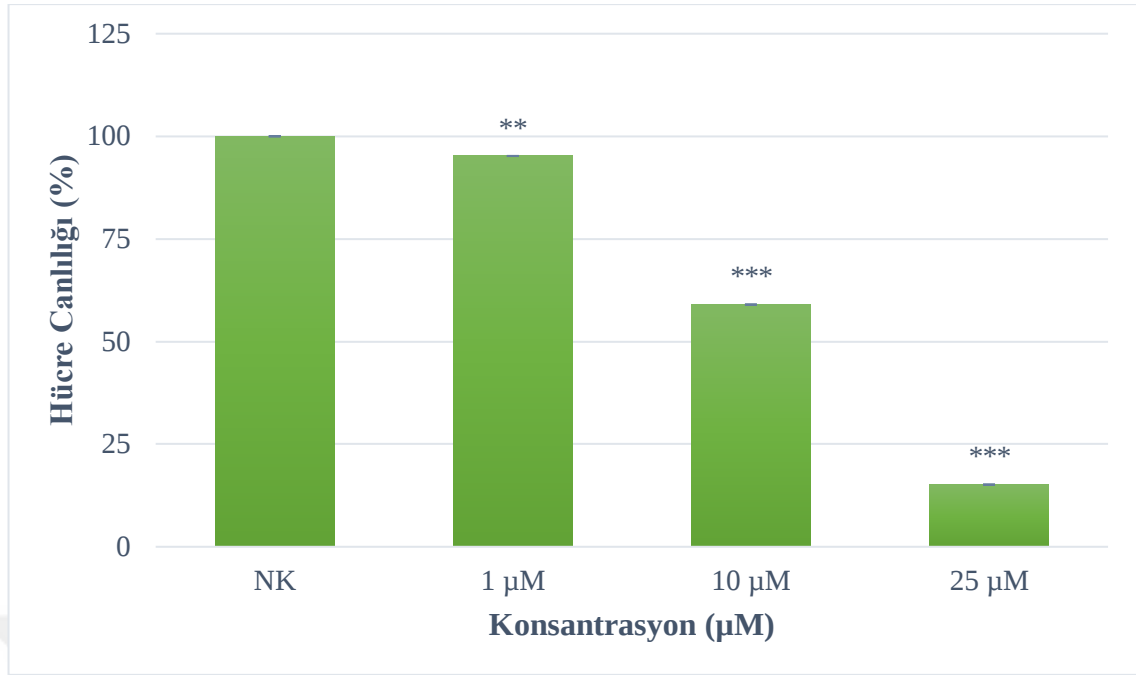
Hipofaringeal tümörden izole edilmiş FaDu hücre hattı üzerinde AgNP'lerin hücre canlılığına etkisini incelemek adına 24 saat boyunca 0 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonlarında AgNP maruziyeti sağlanmıştır. AgNP'lerin konsantrasyona bağlı olarak FaDu hücre hattının ölümüne ve hücre canlılığının azalmasına neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. FaDu hücre hattına AgNP uygulanması sonucu gözlemlenen hücre canlılığı oranları (NK: Negatif Kontrol; * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) ve *** ($p<0,001$), NK'ye kıyasla).

4.1.4. Sorafenibin hipofarenks kanseri FaDu hücre hattının proliferasyonuna karşı etkisi

FaDu hücre hattına sorafenib etken maddesinin 0 µM, 1 µM, 10 µM ve 25 µM konsantrasyonları 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Sonuçlara göre sorafenib FaDu hücre hattında konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını azaltmış ve hücre ölümüne neden olmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. FaDu hücre hattına sorafenib uygulanması sonucu gözlemlenen hücre canlılığı oranları (NK: Negatif Kontrol; * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) ve *** ($p<0,001$), NK'ye kıyasla).

PC3 ve FaDu hücre hatlarına AgNP ve sorafenib maruziyeti sonrasında hücre canlılığı üzerine etkilerinden elde edilen veriler kullanılarak her iki bileşik için hesaplanan IC_{20} konsantrasyonları Çizelge 4.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. PC3 ve FaDu hücre hattına uygulanan AgNP ve sorafenibin IC_{20} konsantrasyonları.

	AgNP	Sorafenib
PC3	20 µg/mL	10 µM
FaDu	6 µg/mL	5 µM

4.1.5. AgNP ve sorafenibin kombine uygulamasının PC3 hücre hattında proliferasyon üzerine etkisinin değerlendirilmesi

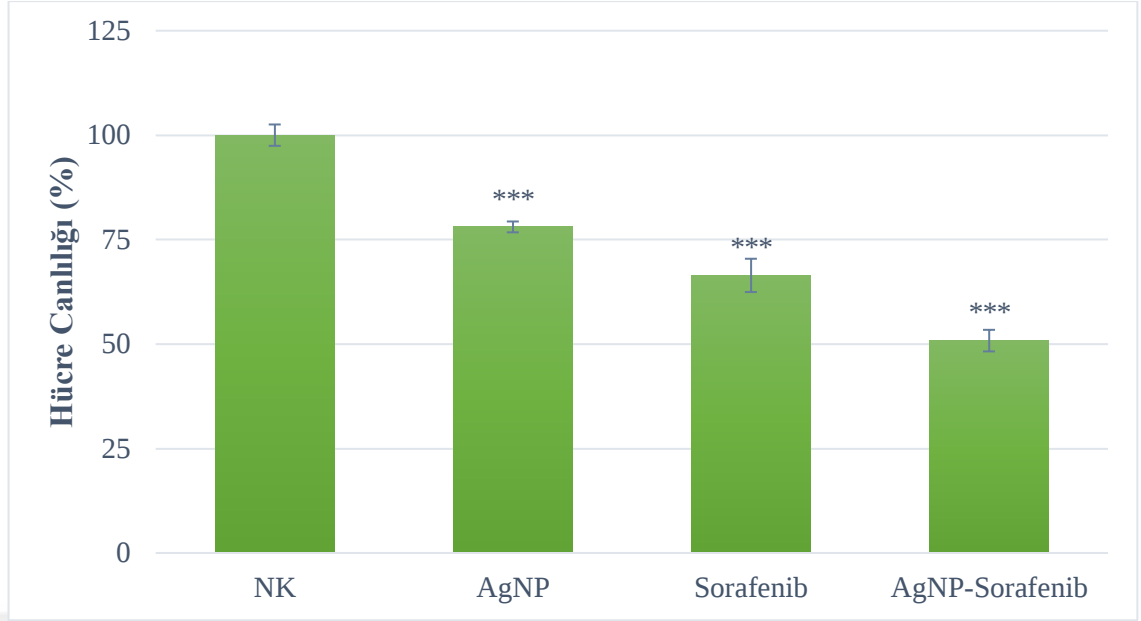
PC3 hücre hattında AgNP, sorafenib ve AgNP-Sorafenib muamele gruplarının hücre canlılığına olan etkisi araştırılmıştır. AgNP ve sorafenib uygulamalarının PC3 hücre hattında hücre canlılığı üzerindeki etkisi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. PC3 hücre hattına AgNP ve Sorafenibin IC₂₀ konsantrasyonlarının uygulanması sonucu gözlemlenen hücre canlılığı oranları (NK: Negatif Kontrol; * (p<0,05), ** (p<0,01) ve *** (p<0,001), NK'ye kıyasla).

4.1.6. AgNP ve sorafenibin kombine uygulamasının FaDu hücre hattında proliferasyon üzerine etkisinin değerlendirilmesi

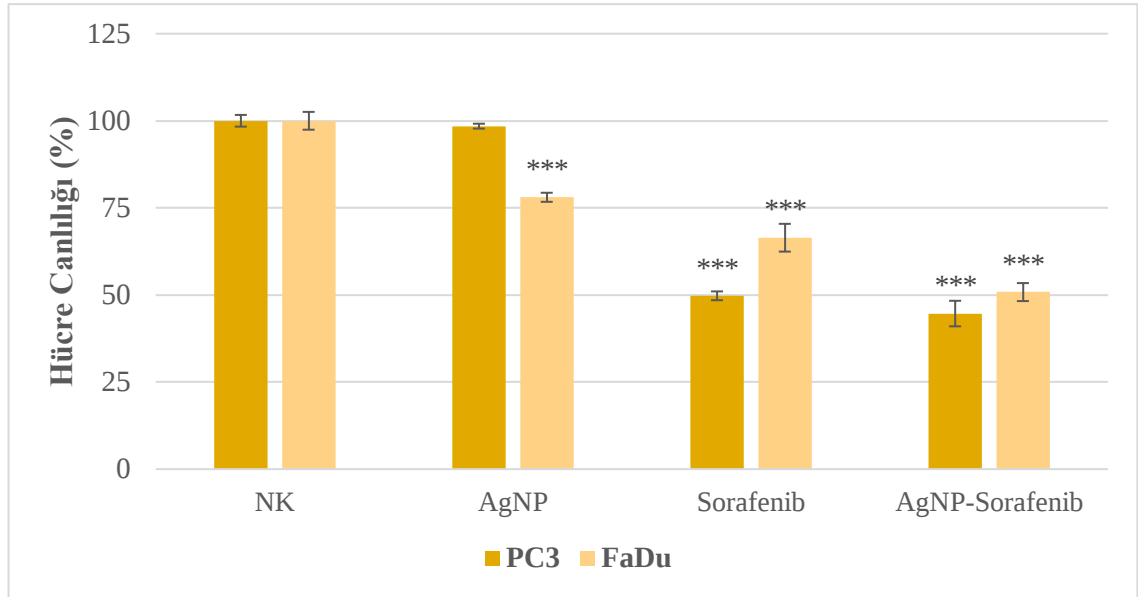
FaDu hücre hattına AgNP, sorafenib ve AgNP-Sorafenib muamele grupları IC₂₀ konsantrasyonları ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, FaDu hücrelerinde AgNP-Sorafenib muamele grubunun hücre proliferasyonunu inhibe ettiğine rastlanılmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. FaDu hücre hattına AgNP ve Sorafenibin IC₂₀ konsantrasyonlarının uygulanması sonucu gözlemlenen hücre canlılığı oranları (NK: Negatif Kontrol; * (p<0,05), ** (p<0,01) ve *** (p<0,001), NK'ye kıyasla).

4.1.7. AgNP ve sorafenib ikilisinin PC3 ve FaDu hücre hatlarının proliferasyonuna etkisinin kıyaslanması

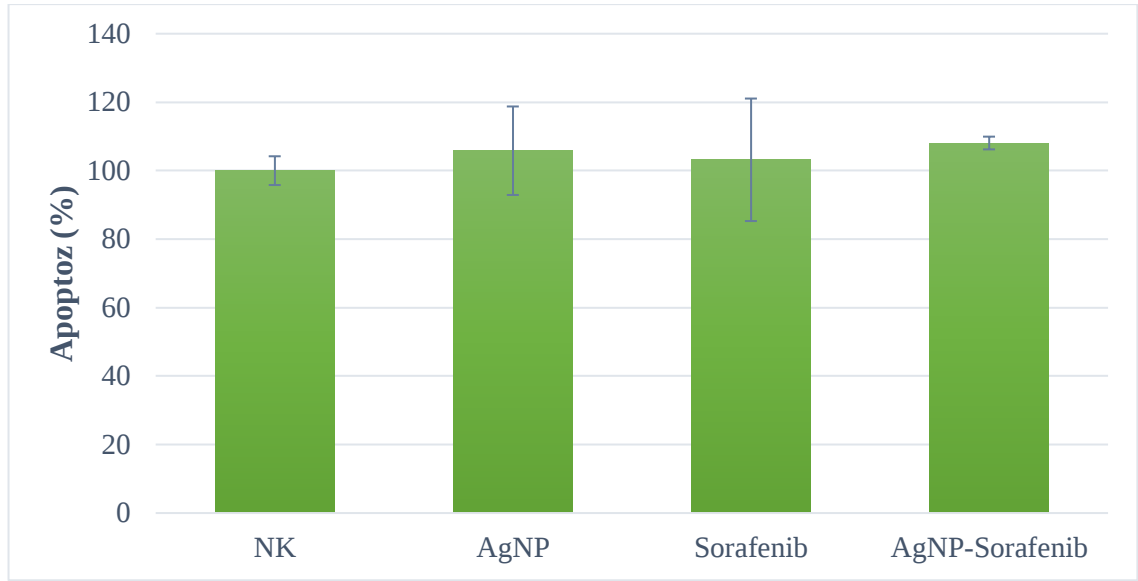
PC3 ve FaDu hücre hatlarına karşı 24 saat boyunca uygulanan AgNP ve sorafenib kombinesinin FaDu hücre hattında hücre canlılığını azaltmada ve hücreyi ölüme götürmede PC3 hücre hattına kıyasla daha tesirli olduğu görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. PC3 ve FaDu hücre hatlarına karşı uygulanan AgNP IC₂₀ ve sorafenib IC₂₀ konsantrasyonlarının uygulanması sonucu elde edilen hücre canlılığının kıyaslanması (NK: Negatif Kontrol; * (p<0,05), ** (p<0,01) ve *** (p<0,001), NK'ye kıyasla).

4.1.8. AgNP ve sorafenib ikilisinin PC3 hücre hattında apoptoz üzerine etkisi

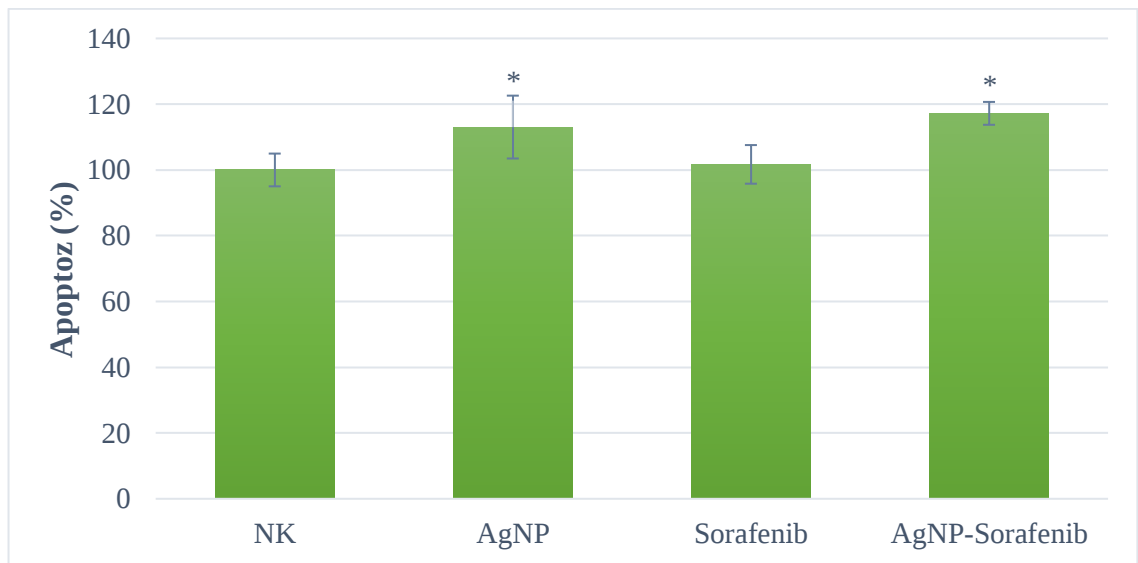
PC3 hücre hattında AgNP, sorafenib ve AgNP-Sorafenib muamele gruplarının apoptoza karşı etkisi incelenmiştir. Her ne kadar AgNP ve sorafenib muamele grupları apoptozu indüklese de PC3 hücre hattında apoptozda anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. PC3 hücre hattına karşı uygulanan AgNP ve sorafenib IC₂₀ konsantrasyonlarının oluşturduğu apoptoz yüzdeleri (NK: Negatif Kontrol; * (p<0,05), ** (p<0,01) ve *** (p<0,001), NK'ye kıyasla).

4.1.9. AgNP ve sorafenib ikilisinin FaDu hücre hattında apoptoz üzerine etkisi

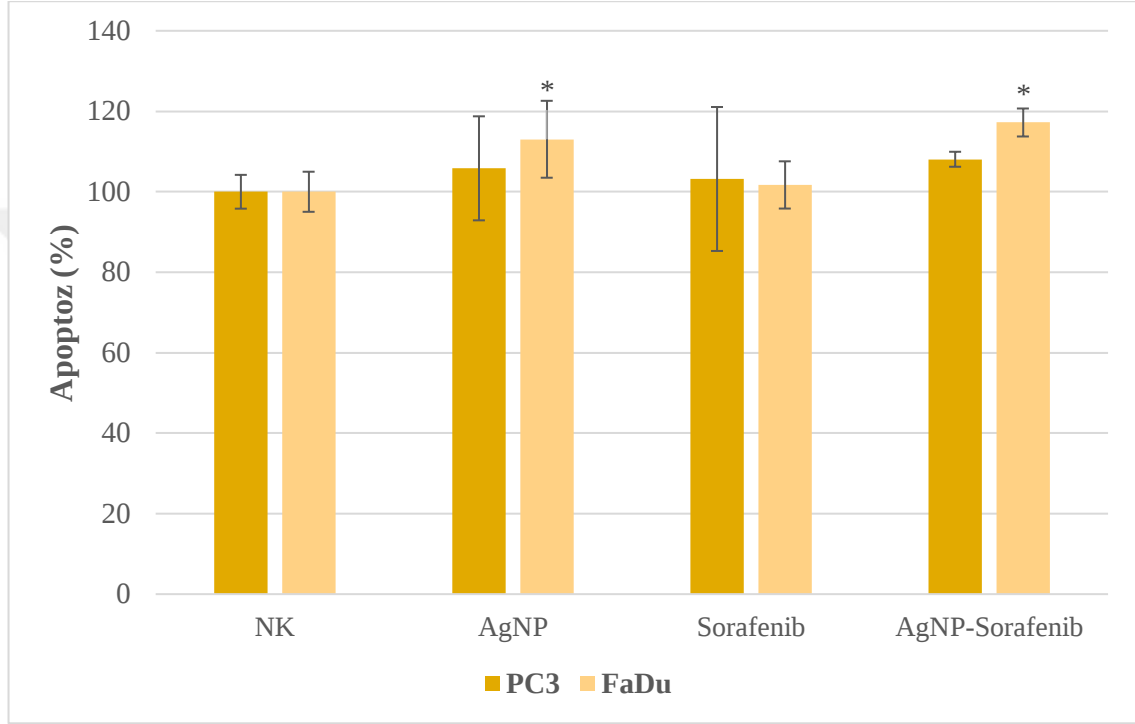
FaDu hücre hattında AgNP, sorafenib ve AgNP-Sorafenib muamele gruplarının apoptoza karşı etkisi incelenmiştir. FaDu hücre hattında AgNP ve AgNP-Sorafenib muamele grupları apoptozda istatistiksel açıdan anlamlı bir değişikliğe yol açmışken; sorafenib muamele grubunda anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. FaDu hücre hattına karşı uygulanan AgNP ve sorafenib IC₂₀ konsantrasyonlarının oluşturduğu apoptoz yüzdeleri (NK: Negatif Kontrol; * (p<0,05), ** (p<0,01) ve *** (p<0,001), NK'ye kıyasla).

4.1.10. AgNP ve sorafenib ikilisinin PC3 ve FaDu hücre hatlarında apoptoz üzerine etkilerinin kıyaslanması

Hem PC3 hem de FaDu hücrelerinde AgNP, sorafenib ve AgNP-Sorafenib muamele gruplarının etkisi kıyaslandığında apoptozu indüklemeye, FaDu hücrelerindeki etkinin PC3 hücrelerine göre daha iyi olduğu görülmüştür (Şekil 4.10).

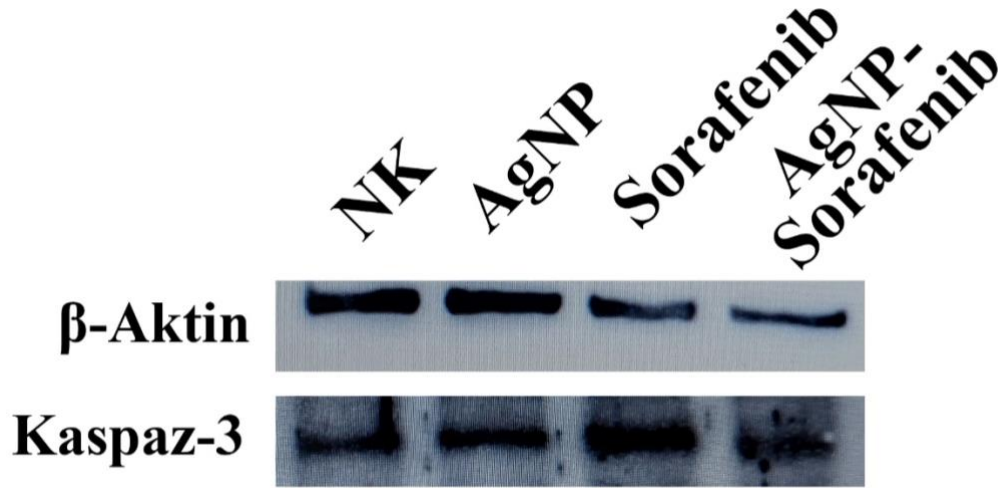


Şekil 4.10. PC3 ve FaDu hücre hatlarına karşı uygulanan AgNP ve sorafenib IC₂₀ konsantrasyonlarının uygulanması sonucu elde edilen apoptoz yüzdelerinin kıyaslanması (NK: Negatif Kontrol; * (p<0,05), ** (p<0,01) ve *** (p<0,001), NK'ye kıyasla).

4.1.11. AgNP ve sorafenib ikilisinin PC3 ve FaDu hücre hatlarına moleküler düzeyde etkisi

AgNP ve sorafenibin oluşturduğu kansere dair hücresel etkileri gözlemlemek için apoptoz yolağının son aşamalarında bulunan kaspaz-3 proteininin ifadesi PC3 ve FaDu kanser hücrelerinde western blot deneyi ile araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, tek başına tatbik edilen AgNP muamelesinin her iki kanser hücresinde de belli miktarlarda apoptozu tetiklediği izlenmiştir. FaDu hücre hattında kontrol grubuna kıyasla AgNP muamele grubu, kaspaz-3 proteini ekspresyon seviyesini arttırmıştır. Yine aynı şekilde

AgNP-Sorafenib muamele grubunun kaspaz-3 ifadesi negatif kontrole kıyasla artmıştır. AgNP ve sorafenib etken maddelerinin kombine kullanımı FaDu hücrelerinde sinerjistik olarak apoptozu indüklemiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. AgNP ve sorafenib muamelesi sonrası FaDu hücre hattında kaspaz-3 proteininin western blot analizi.

4.2. Tartışma

IARC GLOBOCAN 2020 verilerine göre tüm dünyada prostat kanseri 1,4 milyon hastası ve 375 bin ölüm vakası ile insidans oranı ikinci sırada yer alan bir kanser iken hipofarenks kanseri ise 84,2 bin hastası ve 38 bin ölüm vakası ile nadir olsa da sağ kalım oranı düşük olan malign bir kanser tipidir (Garneau et al. 2018). Prostat kanseri tedavisi için androjen üretimini bloke eden hormonal tedaviler (Desai et al. 2021), radyasyon tedavisi (Kamran and D'Amico 2020), kemoterapi ve immünoterapi gibi yöntemler kullanılmaktadır (Sandhu et al. 2021). Hipofarenks kanseri hastalarının ise genel sağlık durumu kötü olduğundan ve ciddi beslenme zorluğu yaşadıklarından dolayı tedavileri zor olmaktadır. Hipofarenks kanseri tedavisi için primer tümörün ya da metastaz yapmış bölgenin cerrahi yolla alınması, radyasyon tedavisi, kemoterapi ve immünoterapi gibi seçenekler olsa da (Eckel and Bradley 2019), her iki kanser tipi içinde mevcut tedavi yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Halihazırda kanser tedavisi için popüler hale gelmiş kemoterapinin ayırım gözetmeden sağlıklı hücrelere sitotoksikite göstermesi ve çoklu ilaç direncini indükleyebilmesi kemoterapinin dezavantajları arasında yer almaktadır (Wu et al. 2014; Pérez-Herrero and Fernández-Medarde 2015). Bu sebeple mevcut çalışmamızda

androjenden bağımsız kemik metastazı prostat kanseri (PC3) ve skuamöz hücreli bir karsinom olan hipofarenks kanseri (FaDu) tedavilerine yeni yaklaşımların geliştirilmesi adına, ROS oluşumunu tetikleyerek hücre ölümünü gerçekleştiren AgNP ve hücre döngüsünü engelleyerek tümör büyümesini inhibe eden tirozin kinaz inhibitörü sorafenibin sinerjistik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla PC3 ve FaDu hücre hatlarına, AgNP ve sorafenib etken maddeleri muamele edilmiş ardından hücre proliferasyonunu belirlemek adına CVDK-8 deneyi; hücre ölümü ve apoptotik etkileri moleküler seviyede belirlemek adına apoptozis ve western blot deneyleri yapılmıştır.

Mevcut tez çalışmasında, PC3 hücre hattına AgNP ve sorafenib tek başına uygulandığında hücre proliferasyonunun konsantrasyona bağlı olarak azaldığı gözlemlenirken, AgNP-Sorafenib kombine uygulandığında ise hücre proliferasyonundaki değişimin istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. PC3 hücre hattında tek başına AgNP'lerinin 5 µg/mL, 10 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonları sırasıyla %12,5, %13,6 ve %24,7 hücre ölümüne sebep olurken; tek başına sorafenibin 1 µM, 10 µM ve 25 µM konsantrasyonları sırasıyla %8,6, %14,8 ve %67,7 hücre ölümüne neden olmuştur. IC₂₀ konsantrasyonlarındaki AgNP-sorafenib kombinesi PC3 hücre hattına muamele edildiğinde ise hücre ölümü %55,3 olmuştur. Aynı şekilde, FaDu hücre hattına da tek başına AgNP ve sorafenib uygulandığında konsantrasyona bağlı bir biçimde hücre proliferasyonunun azaldığı, AgNP-Sorafenib kombine uygulamasının ise hücre proliferasyonunu iyi bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. FaDu hücre hattına tek başına AgNP'lerinin 5 µg/mL, 10 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonları sırasıyla %21,4, %42 ve %60,3 hücre ölümüne sebep olurken; tek başına sorafenibin 1 µM, 10 µM ve 25 µM konsantrasyonları sırasıyla %4,8, %41 ve %84,8 hücre ölümüne neden olmuştur. IC₂₀ konsantrasyonlarındaki AgNP-sorafenib kombinesi FaDu hücre hattına uygulandığında hücre ölümü %49,2 olmuştur. Bu tez çalışmasının sonuçlarına benzer şekilde, farklı tümör hücre hatları üzerine yürütülen bir çalışmada AgNP'lerin IC₅₀ konsantrasyonları akciğer, kolon, meme ve prostat kanseri olmak üzere 4 farklı hücre hattına uygulanmış (A549, HCT116, MCF7 ve PC3) hücre proliferasyonunun konsantrasyon-yanıt ilişkisine bağlı olarak azaldığı MTT yöntemiyle ortaya konmuştur (Othman et al. 2019). Yapılan başka bir çalışmada yine MTT deneyi aracılığıyla sorafenibin insan anaplastik tiroid kanseri (ATC) hücrelerinde, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Ishihara et al. 2019). İnsan renal hücreli karsinom (RCC) hücreleri üzerinde sorafenib ve

PH1/pHGFK1 nanopartiküllerin sinerjistik etkilerini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada RCC hücre hattı üzerinde kombine uygulamanın sinerjistik olarak anti-tümör aktiviteyi arttırdığı görülmüştür (Gao et al. 2019). Mevcut tez çalışmasında apoptozis deneyi ile apoptoz oranlarını belirlemek ve buna bağlı olarak western blot deneyi ile kaspaz-3 proteini seviyelerini tespit etmek adına PC3 ve FaDu hücre hatlarına hem tek başına AgNP ve sorafenib hem de AgNP-Sorafenib kombinesi uygulanmıştır. PC3 hücre hattında tek başına AgNP uygulaması %105,8; tek başına sorafenib uygulaması %103,2 ve AgNP-Sorafenib kombine uygulaması %108 oranlarında apoptotik ölüme neden olmuştur. PC3 hücre hattına daha yoğun AgNP ve sorafenib uygulanmış ve apoptozis indüklenmesi gerçekleşmesine rağmen apoptoz oranları düşük kalmıştır. FaDu hücre hattına da yine hem tek başına AgNP ve sorafenib hem de AgNP-Sorafenib kombinesi uygulanmıştır. FaDu hücre hattında tek başına AgNP uygulaması %113; tek başına sorafenib uygulaması %101,7 ve AgNP-Sorafenib kombine uygulaması %117,2 oranlarında apoptotik ölüme neden olmuştur. FaDu hücre hattında AgNP ve AgNP-Sorafenib muamele grubunda apoptozda anlamlı bir değişiklik gözlemlendiği kaydedilirken; sorafenib muamele grubunda anlamlı bir değişiklik olmadığı izlenmiştir. Elde edilen apoptotik ölüm oranlarını doğrulamak maksadıyla kaspaz-3 proteini ifadesini gösteren western blot analizi yapılmıştır. İntrensek ve ekstrinsek apoptoz yollarının sonunda birleştiği kaspaz-3 proteininin ifade düzeyi apoptozis olayını teyit eden bilgileri vermektedir (Zhang et al. 1999; Elmore 2007). İnsan meme kanseri hücreleri (MCF-7 ve MDA-MB- 468) üzerinde yürütülen bir çalışmada AgNP'lerin etkileri hücre canlılığı, intrasellüler ROS ölçümü, apoptozis deneyleri ile araştırılıp AgNP'lerin JNK fosforilasyonuna neden olduğu böylece JNK aktivasyonu ile otofajinin indüklendiği ayrıca hücrede ROS seviyesinin arttığı ve apoptozisin indüklendiği görülmüştür (Fageria et al. 2019). Yine bir başka çalışmada insan kolon kanseri hücresi olan HT-29 hücre hattında hücre canlılığı, apoptozis, p53 proteinin ifadesi western blot deneyi aracılığıyla incelenmiş; farklı konsantrasyonlarda AgNP'lerin HT-29 hücrelerine verilmesi sonucu MTT deneyi ile hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı, apoptotik hücrelerin konsantrasyona bağlı bir şekilde arttığı ve bununla ilişkili olarak western blot analizi ile p53 protein ekspresyonunun AgNP ile muamele edilen HT-29 hücrelerinde arttığı raporlanmıştır (Shathviha et al. 2021). Primer insan karaciğer kanseri üzerinde yürütülen bir çalışmada ise hepatosellüler karsinoma (HCC) hücre hatlarında sorafenibin etkilerini araştırmak amacıyla p53 yönünden mutant olan PLC/PRF/5 hücre hattı ve p53 yönünden normal olan HepG2 hücre hatları kullanılmış ve sorafenibin HCC tümör hücre

hatlarında hücre çoğalmasını inhibe ederek apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir (Liu et al. 2006). Böbrek üstü beze bağlı endokrin tümör çeşidi olan adrenokortikal karsinom (ACC) üzerinde tirozin kinaz inhibitörü olan sorafenibin etkilerini incelemek amacıyla H295R hücre hattı sorafenib ile muamele edilmiş ve sorafenibin hücre canlılığını azaltıp apoptotik hücre ölümünü tetiklediği görülmüştür (Cerquetti et al. 2021). İnsan HCC hücre hatlarından olan Huh7 ve MHCCLM3 hücre hatları üzerinde sorafenib ve kurkuminin polimerik nanopartikülünün birlikte tedavisinin sinerjistik sonuçlarını araştırmak amacıyla yapılan bir uygulamada araştırmacılar kombine tedavinin hücre döngüsünü durdurduğunu ve apoptozu indüklediğini rapor etmişlerdir (Hu et al. 2015). Fare kökenli katı Ehrlich karsinoması (SEC) üzerine hem tek başına çinko oksit nanopartikülleri (ZnO-NP) ve sorafenib hem de söz konusu ajanların kombinasyon şeklinde muamelesinin anti-tümör etkilerini değerlendirmek maksadıyla yapılan bir çalışmanın verileri; ZnO-NP'lerin sorafenib ile kombinasyonunun, MTT deneyi vasıtasıyla tümör hücreleri proliferasyonunda azalma oluşturduğunu; ROS oluşumu, sitokrom-c salınımı ve kaspaz-3 proteini ekspresyon seviyelerinde artma sağladığını ve bunlara bağlı olarak iyi bir sinerji ortaya koyan ZnO-NP ile sorafenib kombinasyonunun monoterapiye kıyasla daha etkili ve güvenli antikanser aktivitesi olduğunu göstermiştir (Nabil et al. 2020).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mevcut tez çalışması, AgNP ve sorafenibin iki farklı kansere ait olan PC3 (prostat kanseri) ve FaDu (hipofarenks kanseri) hücrelerine karşı sinerjistik etkilerine ilişkin yeni katkılar sunmaktadır. Çalışma sonuçları, AgNP ve sorafenibin her iki hücre hattına da (PC3 ve FaDu) tek başına kullanılmasının hücre canlılığını konsantrasyona bağlı bir şekilde azalttığını ortaya koymuştur. Buna ek olarak, AgNP ve sorafenib sinerjisinin FaDu hücrelerine karşı hücre proliferasyonunu inhibe etmede PC3 hücrelerine kıyasla daha etkili sonuç verdiğiyle karşılaşılmıştır. FaDu hücrelerinde AgNP ve AgNP-Sorafenib muamele grupları apoptozda anlamlı değişiklik sağlamışken, sorafenib muamele grubu anlamlı bir değişiklik sağlamamıştır. AgNP ve sorafenib uygulamalarının *in vitro* etkileri yukarıda bahsedildiği gibidir. Fakat klinik araştırması için sorafenib tedavisi her ne kadar bazı kanser hastalarının tedavisinde aktif olarak kullanılsa da AgNP'nin tek başına ve sorafenib ile kullanıldığında *in vivo* etkilerinin nasıl olacağının araştırılması gereklidir. Ayrıca elde edilen bulguların yeni nanotaşıyıcı ilaç sistemleri için oldukça faydalı bilgiler sunduğu kanaatine varılmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdellatif, A. A. H., Abdelfattah, A., Bouazzaoui A., Osman, S. K., Al-Moraya, I. S., Showail, A. M. S., Alsharidah, M., Aboeela, A., Al Rugaie, O., Faris, T. M., Tawfeek, H. M. 2022. Silver nanoparticles stabilized by poly (vinyl pyrrolidone) with potential anticancer activity towards prostate cancer. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2022, 12.
- Abdelgalil, A. A., Alkahtani, H. M., Al-Jenoobi, F. I. 2019. Sorafenib. *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, 44, 239–266.
- Aliustaoğlu, M. 2009. Temel kanser fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim*, 22(3), 46-49.
- Alqahtani, M. A., Al Othman, M. R., Mohammed, A. E. 2020. Bio fabrication of silver nanoparticles with antibacterial and cytotoxic abilities using lichens. *Scientific Reports*, 10(1), 16781.
- Alt, V., Bechert, T., Steinrücke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., Scheddin, D., Domann, E., Schnettler, R. 2004. Nanopartikuläres Silber: Ein neues antimikrobielles Agens für Knochenzement. *Orthopade*, 33(8), 885–892.
- Anonymous, 2012. Web Sitesi: <https://www.teresewinslow.com/head-and-neck>, Erişim Tarihi: 30.09.2022.
- Anonymous, 2020. Web Sitesi: <https://gco.iarc.fr/today/>, Erişim Tarihi: 23.09.2022.
- Anonymous, 2021a. Web Sitesi: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, Erişim Tarihi: 28.09.2022.
- Anonymous, 2021b. Web Sitesi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65915/>, Erişim Tarihi: 12.11.2022.
- Anonymous, 2022a. Web Sitesi: <https://www.nano.gov/about-nanotechnology>, Erişim Tarihi: 30.09.2022.
- Anonymous, 2022b. Web Sitesi: <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>, Erişim Tarihi: 21.10.2022.
- Anonymous, 2022c. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sorafenib>, Erişim Tarihi: 10.10.2022.
- Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D., Ferris, R. L. 2008. Head and neck cancer. *Lancet (London, England)*, 371(9625), 1695–1709.
- Avinçsal, M. O., Shinomiya, H., Teshima, M., Kubo, M., Otsuki, N., Kyota, N., Sasaki, R., Zen, Y., Nibu, K. I. 2018. Impact of alcohol dehydrogenase-aldehyde dehydrogenase polymorphism on clinical outcome in patients with hypopharyngeal cancer. *Head & Neck*, 40(4), 770–777.

- Bapat, R. A., Chaubal, T. V., Joshi, C. P., Bapat, P. R., Choudhury, H., Pandey, M., Gorain, B., Kesharwani P. 2018. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Materials Science and Engineering C*, 91(5), 881–898.
- Bayğu, G. 2020. Cimin üzüm yaprağı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle elde edilen gümüş nanopartikülünün genotoksik etkisinin kanat benek testi ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 97, Erzincan.
- Beizaei, K., Gleißner, L., Hoffer, K., Bußmann, L., Vu, A. T., Steinmeister, L., Laban, S., Möckelmann, N., Münscher, A., Petersen, C., Rothkamm, K., Krieger, M. 2019. Receptor tyrosine kinase MET as potential target of multi-kinase inhibitor and radiosensitizer sorafenib in HNSCC. *Head & Neck*, 41(1), 208–215.
- Blume-Jensen, P., Hunter, T. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411(6835), 355–365.
- Booth, L. A., Roberts, J. L., Dent, P. 2020. The role of cell signaling in the crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of tumor cell survival in response to sorafenib and neratinib. *Seminars in Cancer Biology*, 66, 129–139.
- Bozgeyik, E. 2020. *Kanserin Moleküler Biyolojisi ve İmmünolojisi*. Akademisyen kitabevi, 347, Ankara.
- Brady, M. J., Lisay, C. M., Yurkovetskiy, A. V., Sawan, S. P. 2003. Persistent silver disinfectant for the environmental control of pathogenic bacteria. *American Journal of Infection Control*, 31(4), 208–214.
- Cerquetti, L., Bucci, B., Raffa, S., Amendola, D., Maggio, R., Lardo, P., Petrangeli, E., Torrisi, M. R., Toscano, V., Pugliese, G., Stigliano, A. 2021. Effects of sorafenib, a tyrosin kinase inhibitor, on adrenocortical cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 667798.
- Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, A. M. 2010. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 28(11), 580–588.
- Chen, B., Zhang, Y., Yang, Y., Chen, S., Xu, A., Wu, L., Xu, S. 2018. Involvement of telomerase activity inhibition and telomere dysfunction in silver nanoparticles anticancer effects. *Nanomedicine (London, England)*, 13(16), 2067–2082.
- Desai, K., McManus, J. M., Sharifi, N. 2021. Hormonal therapy for prostate cancer. *Endocrine Reviews*, 42(3), 354–373.
- Devanesan, S., Jayamala, M., AlSalhi, M. S., Umamaheshwari, S., Ranjitsingh, A. J. A. 2021. Antimicrobial and anticancer properties of *Carica papaya* leaves derived dimethyl flubendazole mediated silver nanoparticles. *Journal of Infection and Public Health*, 14(5), 577–587.

- Eckel, H. E., Bradley, P. J. 2019. Treatment options for hypopharyngeal cancer. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*, 83, 47–53.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- Fageria, L., Bambroo, V., Mathew, A., Mukherjee, S., Chowdhury, R., Pande, S. 2019. Functional autophagic flux regulates AgNP uptake and the internalized nanoparticles determine tumor cell fate by temporally regulating flux. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 9063–9076.
- Foldbjerg, R., Dang, D. A., Autrup, H. 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology*, 85(7), 743–750.
- Gao, X., Jiang, P., Zhang, Q., Liu, Q., Jiang, S., Liu, L., Guo, M., Cheng, Q., Zheng, J., Yao, H. 2019. Peglated-H1/pHGFK1 nanoparticles enhance anti-tumor effects of sorafenib by inhibition of drug-induced autophagy and stemness in renal cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 362.
- Garneau, J. C., Bakst, R. L., Miles, B. A. 2018. Hypopharyngeal cancer: A state of the art review. *Oral Oncology*, 86, 244–250.
- Grandis, J. R., Tweardy, D. J. 1993. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Research*, 53(15), 3579–3584.
- Grignon, D. J. 2004. Unusual subtypes of prostate cancer. *Modern Pathology*, 17(3), 316–327.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Eppakayala, V., Jeyaraj, M., Kim, J. H. 2013. Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *BioMed Research International*, 2013, 535796.
- Güney Eskiler, G., Deveci, A. O., Bilir, C., Kaleli, S. 2019. Synergistic effects of nobiletin and sorafenib combination on metastatic prostate cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 71(8), 1299–1312.
- Hammamchi H. 2019. Biyolojik yollar ile sentezlenen organik/inorganik nanopartiküllerin biyoaktivitelerinin belirlenmesi ve tedavi amaçlı kullanımları. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 199, Ankara.
- Hu, B., Sun, D., Sun, C., Sun, Y. F., Sun, H. X., Zhu, Q. F., Yang, X. R., Gao, Y. B., Tang, W. G., Fan, J., Maitra, A., Anders, R. A., Xu, Y. 2015. A polymeric nanoparticle formulation of curcumin in combination with sorafenib synergistically inhibits tumor growth and metastasis in an orthotopic model of human hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(4), 525–532.

- Hu, C. D., Choo, R., Huang, J. 2015. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: A mechanism of radioresistance and treatment failure. *Frontiers in Oncology*, 5, 90.
- Inamoto, T., Azuma, H., Tatsugami, K., Oya, M., Adachi, M., Okayama, Y., Sunaya, T., Akaza, H. 2020. Real-world use of sorafenib for advanced renal cell carcinoma patients with cardiovascular disease: Nationwide survey in Japan. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 20(7), 615–623.
- Ishihara, S., Onoda, N., Noda, S., Asano, Y., Tauchi, Y., Morisaki, T., Kashiwagi, S., Takashima, T., Ohira, M. 2019. Sorafenib inhibits vascular endothelial cell proliferation stimulated by anaplastic thyroid cancer cells regardless of BRAF mutation status. *International Journal of Oncology*, 55(5), 1069–1076.
- Jones, C. M., Hoek, E. M. V. 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1531–1551.
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., Jones, L. W. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology*, 17(1), 16–23.
- Kamran, S. C., D'Amico, A. V. 2020. Radiation therapy for prostate cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 34(1), 45–69.
- Khan, I., Saeed, K., Khan, I. 2019. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931.
- Khan, M. S., Alomari, A., Tabrez, S., Hassan, I., Wahab, R., Bhat, S. A., Alafaleq, N. O., Altwaijry, N., Shaik, G. M., Zaidi, S. K., Nouh, W., Alokail, M. S., Ismael, M. A. 2021. Anticancer potential of biogenic silver nanoparticles: A mechanistic study. *Pharmaceutics*, 13(5), 707.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A. 2011. Genetik Kavramlar. Öner, C., Sümer, S., Öner, R., Ögüş, A., Açıık, L. (eds.), Palme Yayıncılık, 752, Ankara.
- Krause, D. S., van Etten, R. A. 2005. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *The New England Journal of Medicine*, 353, 172-187.
- Kroemer, G., Galluzi, L., Brenner C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilisation in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99–163.
- Kwak, E. L., Sordella, R., Bell, D. W., Godin-Heymann, N., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Driscoll, D. R., Fidias, P., Lynch, T. J., Rabindran, S. K., McGinnis, J. P., Wissner, A., Sharma, S. V., Isselbacher, K. J., Settleman, J., Haber, D. A. 2005. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7665–7670.

- Lee, K. J., Nallathamby, P. D., Browning, L. M., Osgood, C. J., Xu, X. H. 2007. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano*, 1(2), 133–143.
- Lemmon, M. A., Schlessinger, J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134.
- Liu, L., Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., McNabola, A., Wilkie, D., Wilhelm, S., Lynch, M., Carter, C. 2006. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Research*, 66(24), 11851–11858.
- Mehrotra, R., Yadav, S. 2006. Oral squamous cell carcinoma: Etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian Journal of Cancer*, 43(2), 60–66.
- Morais, M., Machado, V., Dias, F., Palmeira, C., Martins, G., Fonseca, M., Martins, C. S. M., Teixeira, A. L., Prior, J. A. V., Medeiros, R. 2021. Starch-capped AgNPs' as potential cytotoxic agents against prostate cancer cells. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 11(2), 256.
- Morley, K.S., Webb, P. B., Tokareva, N.V., Krasnov, A.P., Popov, V., Zhang, J., Roberts, C., Howdle, S. 2007. Synthesis and characterisation of advanced UHMWPE/silver nanocomposites for biomedical applications. *European Polymer Journal*, 43, 307-314.
- Mousa, A. B. 2008. Sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Saudi Journal of Gastroenterology*, 14(1), 40–42.
- Möckelmann, N., Rieckmann, T., Busch, C. J., Becker, B., Gleißner, L., Hoffer, K., Omniczynski, M., Steinmeister, L., Laban, S., Grénman, R., Petersen, C., Rothkamm, K., Dikomey, E., Knecht, R., Kriegs, M. 2016. Effect of sorafenib on cisplatin-based chemoradiation in head and neck cancer cells. *Oncotarget*, 7(17), 23542–23551.
- Nabil, A., Elshemy, M. M., Asem, M., Abdel-Motaal, M., Gomaa, H. F., Zahran, F., Uto, K., Ebara, M. 2020. Zinc oxide nanoparticle synergizes sorafenib anticancer efficacy with minimizing its cytotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1362104.
- O'Brien, M. A., Kirby, R. 2008. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6), 572–585.
- Othman, A. M., Elsayed, M. A., Al-Balakocy, N. G., Hassan, M. M., Elshafei, A. M. 2019. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles induced by fungal proteins and its application in different biological activities. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 17(1), 8.
- Papandreou, C. N., Daliani, D. D., Thall, P. F., Tu, S. M., Wang, X., Reyes, A., Troncoso, P., Logothetis, C. J. 2002. Results of a phase II study with doxorubicin, etoposide,

- and cisplatin in patients with fully characterized small-cell carcinoma of the prostate. *Journal of Clinical Oncology*, 20(14), 3072–3080.
- Park, T., Lee, S., Amatya, R., Cheong, H., Moon, C., Kwak, H. D., Min, K. A., Shin, M. C. 2020. ICG-Loaded PEGylated BSA-Silver nanoparticles for effective photothermal cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 5459–5471.
- Paul, M. K., Mukhopadhyay, A. K. 2004. Tyrosine kinase: Role and significance in cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 1(2), 101–115.
- Pérez-Herrero, E., Fernández-Medarde, A. 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 52–79.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D'Orazi, G. 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8(4), 603–619.
- Sandhu, S., Moore, C. M., Chiong, E., Beltran, H., Bristow, R. G., Williams, S. G. 2021. Prostate cancer. *Lancet (London, England)*, 398(10305), 1075–1090.
- Sankar, R., Karthik, A., Prabu, A., Karthik, S., Shivashangari, K. S., Ravikumar, V. 2013. Origanum vulgare mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 80–84.
- Shathviha, P. C., Ezhilarasan, D., Rajeshkumar, S., Selvaraj, J. 2021. β -sitosterol mediated silver nanoparticles induce cytotoxicity in human colon cancer HT-29 cells. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 13(1), 42–46.
- Tang, W., Chen, Z., Zhang, W., Cheng, Y., Zhang, B., Wu, F., Wang, Q., Wang, S., Rong, D., Reiter, F. P., De Toni, E. N., Wang, X. 2020. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 87.
- Terry, S. Y., Abiraj, K., Lok, J., Gerrits, D., Franssen, G. M., Oyen, W. J., Boerman, O. C. 2014. Can ^{111}In -RGD2 monitor response to therapy in head and neck tumor xenografts. *Journal of Nuclear Medicine*, 55(11), 1849–1855.
- Ullén, A., Farnebo, M., Thyrell, L., Mahmoudi, S., Kharaziha, P., Lennartsson, L., Grandér, D., Panaretakis, T., Nilsson, S. 2010. Sorafenib induces apoptosis and autophagy in prostate cancer cells in vitro. *International Journal of Oncology*, 37(1), 15–20.
- Uyanıkgil, E. Ö. Ç., Salmanoğlu, D. S. 2020. Metalik nanopartiküllerin hedeflendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi*, 59 (1), 71-81.

- van Bokhoven, A., Varella-Garcia, M., Korch, C., Johannes, W. U., Smith, E. E., Miller, H. L., Nordeen, S. K., Miller, G. J., Lucia, M. S. 2003. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate*, 57(3), 205–225.
- Vural H., Kurar, E., Avcı, E., Eroğlu, C., Çelen, E., Çınar, İ., Şirin, S., Elagöz, Ş. 2018. KRAS mutations: A possible biomarker for advanced prostate cancer. *Cancer Science & Research*, 1(4), 1-4.
- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., Chen, G. 2015. Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, 20(5), 595–601.
- Wein, A. J., Kolon, T. F. 2021. *Campbell-Walsh-Wein Urology* (12th edition). Partin, A. W., Dmochowski, R. R., Kavoussi, L. R., Peters, C. A. (eds), Elsevier, 4096, Philadelphia.
- Weinberg, R. A. 1991. Tumor suppressor genes. *Science* (New York, N.Y.), 254(5035), 1138–1146.
- Wong, R. S. 2011. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87.
- Wu, C. H., Lin, K. H., Fu, B. S., Hsu, F. T., Tsai, J. J., Weng, M. C., Pan, P. J. 2021. Sorafenib induces apoptosis and inhibits NF- κ B-mediated anti-apoptotic and metastatic potential in osteosarcoma cells. *Anticancer Research*, 41(3), 1251–1259.
- Wu, Q., Yang, Z., Nie, Y., Shi, Y., Fan, D. 2014. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches. *Cancer Letters*, 347(2), 159–166.
- Yao, J. L., Madeb, R., Bourne, P., Lei, J., Yang, X., Tickoo, S., Liu, Z., Tan, D., Cheng, L., Hatem, F., Huang, J., Anthony di Sant'Agnes, P. 2006. Small cell carcinoma of the prostate: An immunohistochemical study. *The American Journal of Surgical Pathology*, 30(6), 705–712.
- Yetişgin, A. A., Güney B. C. 2017. Lisans Projesi. Altın nanopartiküllerin tanı ve tedavide kullanımı. Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, 64, İstanbul.
- Zaborowska, M., Szmit, S., Szczylik, C. 2012. Sorafenib in progressive castrate-resistant prostate cancer. Can we talk about a new therapeutic option. *Archives of Medical Science*, 8(3), 528–532.
- Zhang, J., Yang, P. L., Gray, N. S. 2009. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 9(1), 28–39.
- Zhang, T., Wang, L., Chen, Q., Chen, C. 2014. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Medical Journal*, 55(2), 283–291.

- Zhang, Y., Fujita, N., Tsuruo, T. 1999. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene*, 18(5), 1131–1138.
- Zhou, W., Ma, Y., Yang, H., Ding, Y., Luo, X. 2011. A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 381–386.

