



T.C.

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TNF α -DOKSORUBİSİN YÜKLÜ ALTIN
NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE
MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN
İN VİTRO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Marwa Hassan JAWAD JAWAD

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK

AKSARAY, 2024

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 172307801 numaralı Doktora öğrencisi Marwa Hassan JAWAD JAWAD tarafından hazırlanan “**TNF α -DOKSORUBİSİN YÜKLÜ ALTIN NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN İN VİTRO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL

Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Üye: Prof. Dr. Mehmet KARACA

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Üye: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Başkent Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Üye: Prof. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.....

Tez Savunma Tarihi: 10 / 05 / 2024

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduđum bu çalıřmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı dűőecek bir yol ve yardıma bařvurmaksızın yazdıđımı, yararlandıđım eserlerin kaynakçada gűőterilenlerden oluřtuđunu, çalıřmamda kullandıđım verilerin orijinalliđini ve her tűrlű intihalden uzak olduđunu beyan ederim.

Enstitű tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tűm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

MARWA HASSAN JAWAD JAWAD

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK'e teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Ayrıca doktora eğitimim boyunca bana yardımcı olan sürekli desteği, motivasyonu ve tavsiyelerinin yanı sıra düşünceli yorumları ve değerli önerileri için Prof. Dr. Majid Sakhi JABİR'e en içten şükranlarımı sunmak isterim.

Aksaray Üniversitesi'nin gerçekleştirdiği faaliyetler ve projelerle ilgili bilgilendirme yapan bölümümüz çalışanlarına teşekkür ederim.

Teşekkürlerin az kalacağı diğer üniversite hocalarımın da bana yıllardır üniversite hayatım boyunca kazandırdıkları her şey için ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için hepsine teker teker teşekkürlerimi sunuyorum.

Beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan annemin ve babamın ruhuna sonsuz teşekkür ederim.

MARWA HASSAN JAWAD JAWAD

AKSARAY, 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER V E KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Nanomalzemeler	4
2.2. Altın Nanopartiküller	5
2.3. GNP'lerin sentezi	6
2.4. GNP'lerin fiziksel ve kimyasal özellikleri	8
2.5. Altın Nanopartiküllerin PEGilasyonu	10
2.6. GNP'lerin tedavide kullanılması	11
2.6.1. Nanopartiküllerin tümöre hedeflenmesi	14
2.6.2. GNP'lerin antikanser ilaç taşımada kullanımı	15
2.7. Altın Nanopartiküllerin Sitotoksitesi	17
2.8. Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α)	19
2.8.1. TNF- α sentezi	20
2.8.2. TNF reseptörleri ve sinyal yolağı	21
2.8.3. TNF α 'nın anti kanser etkisi	24
2.8.4. TNF- α 'nın GNP'lerle kullanımı	25
2.9. Kanser	26
2.9.1. Meme kanseri	27
2.9.2. Kanser tedavisi	27
2.9.2.1. Meme kanseri tedavisi	29
2.9.2.2. Doksorubisin (Dox)	29
2.10. Apoptosis (Programlanmış Hücre Ölümü)	31
2.10.1. Apoptosisde biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler	32
2.10.2. Apoptosis sinyal yolları	33
2.10.3. Apoptosisin kanser tedavisinde kullanılması	34
2.11. Otofaji	35
2.11.1. Otofaji türleri ve mekanizması	36
2.11.2. Otofajik hücre ölümü	38
2.11.3. Otofajinin kanserdeki rolü	39
2.11.4. Apoptosis ve otofaji arasındaki ilişki	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM	42
3.1. Kullanılan Kimyasallar	42
3.2. Kullanılan Gold Nanoparticles (GNPs-AuNPs)	42
3.3. Kullanılan Kitler	43
3.4. Kullanılan Hücre Hatları	43
3.5. Hazırlanan solüsyonlar	44
3.5.1. Hücre kültür ortamı	44
3.5.2. Fosfat Tamponu (PBS)	45
3.5.3. Trypsin-EDTA solüsyonu	45
3.5.4. MTT solüsyonu	45
3.5.5. Kristal viyole boyası	45

3.5.6. Antibiyotikler.....	46
3.6. Yöntemler.....	46
3.6.1. GNP-TNF- α komplekslerinin hazırlanması ve optimizasyonu.....	46
3.6.2. GNP-TNF α -Doksorubisin komplekslerinin hazırlanması.....	47
3.6.3. Hazırlanan GNP komplekslerinin karakterizasyonu.....	47
3.6.3.1. Ultraviyole-görünür spektroskopisi.....	47
3.6.3.2. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM).....	47
3.6.3.3. GNP yüzeyine bağlanmış TNF- α 'nın ELISA yöntemi ile kontrolü..	48
3.6.4. Hücre hatlarının çoğaltılması.....	50
3.6.5. Sitotoksitesite testi: MTT test.....	50
3.6.6. Klonojenite test sistemi.....	51
3.6.7. Apoptosis tanısı için AO/EtBr ile boyama.....	52
3.6.8. Otofajinin akışkan hücre sitometresi (flow sytometer) ile saptanması..	53
3.7. İstatistiksel Analiz.....	54
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	55
4.1. Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	55
4.1.1. TNF- α 'nın altın nanopartikül yüzeyine bağlanması	55
4.1.2. Doksorubisinin GNP-TNF α üzerine yüklenmesi.....	56
4.2. Hazırlanan Nanaopartiküllerin Karakterizasyonu	57
4.2.1. Nanopartiküllerin UV-VIS spektrofotometre ile analizi.....	57
4.2.2. Nanopartiküllerin transmisyon elektron miroskop (TEM) analizi.....	60
4.2.3. TNF α 'nın GNP yüzeyine bağlandığının ELISA yöntemiyle.....	61
doğrulanması.....	61
4.3. Test Bileşiklerin Sitotoksitesitesi.....	63
4.3.1. Test bileşiklerin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesitesi.....	63
4.3.2. Test bileşiklerin AMJ-13 hücrelerindeki sitotoksitesitesi.....	65
4.3.3. Test bileşiklerin REF hücrelerindeki sitotoksitesitesi.....	65
4.3.4. Test bileşiklerin koloni oluşumuna etkisi (Klonojenite test).....	68
4.4. Test Bileşiklerinin Apoptosisi İndüklemeye Potansiyeli.....	69
4.5. Test Bileşiklerinin Otofajiyi İndüklemeye Potansiyeli.....	72
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	75
6. KAYNAKLAR	81
7. ÖZGEÇMİŞ	98

DOKTORA TEZİ

TNF α -DOKSORUBİSİN YÜKLÜ ALTIN NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN İN VİTRO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI

MARWA HASSAN JAWAD JAWAD

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. KAMİLE ÖZTÜRK

ÖZET

Bu çalışmada, meme kanseri tedavisinde inovatif bir yaklaşım olarak kullanılabilecek nanoteknolojik bir ilaç taşıyıcı geliştirildi. Altın nanopartiküller (GNP), tümör hücrelerini spesifik olarak hedeflemek amacıyla tümör nekroz faktör- α (TNF) ile modifiye edildi ve ardından doksorubisin (Dox) ile yüklenerek bir terapötik molekül oluşturuldu. Geliştirilen bu yeni ilaç taşıyıcı nanopartikülün anti-kanser etkisi, MCF-7 ve AMJ-13 meme kanseri hücre hatları ile sağlıklı hücre hattı olan REF hücrelerinde test edildi.

Oluşturulan ilaç taşıyıcı nanopartikülün karakterizasyonu, ultraviyole-görünür spektroskopisi (UV-Vis spektroskopisi), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve ELISA teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi. MTT test ve klonojenite testi kullanılarak, TNF α , GNP, Dox, GNP-TNF α ve GNP-TNF α -Dox test bileşiklerinin meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkisi saptanarak IC50 dozları saptandı. Test bileşiklerinin MCF-7, AMJ-13 ve REF hücrelerinde apoptosisi indüklemeye potansiyeli AO/EtBr ile boyama sonrası floresans mikroskopta nükleer morfolojinin gözlemlenmesiyle araştırıldı. Ayrıca test bileşiklerini otofajiyi indüklemeye potansiyeli LC3 protein seviyesinin akışkan hücre sitometrisinde ölçülmesiyle değerlendirildi.

Yapılan çalışmalar sonucunda, hazırlanan nanopartiküllerden GNP-TNF α -Dox kompleksinin diğer nanopartiküllere göre, özellikle bugün klinikte kullanılan Dox tedavisine göre daha etkin bir sitotoksositeye ve antikanser etkiye sahip olduğu bulundu. Ayrıca GNP-TNF α -Dox komplekslerinin meme kanseri hücre hatlarında, kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde hücre çoğalmasını baskıladığı, bunu hem apoptosise hem de otofaji indüksiyonunu sağlayarak gerçekleştirdiği saptandı. Bu sonuçlar tezin en önemli amaçlarından birisi olan hedefe özgü kanser tedavisi yaklaşımının GNP-TNF α -Dox kompleksleri ile sağlanabileceğini ve etkin bir anikanser tedavisi oluşturabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Altın Nanopartiküller, TNF α , Doksorubisin, Meme Kanseri, Apoptosis, Otofaji

Mayıs, 2024; 99 sayfa

PH.D. THESIS

INVESTIGATION OF THE SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND USABILITY OF TNF α -DOXORUBICIN LOADED GOLD NANOPARTICLES IN CANCER TREATMENT UNDER IN VITRO CONDITIONS

MARWA HASSAN JAWAD JAWAD

**Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK

ABSTRACT

In this study, a nanotechnological drug carrier was developed, which could be utilized as an innovative approach in the treatment of breast cancer. Gold nanoparticles (GNP) were modified with tumor necrosis factor-alpha (TNF) to specifically target tumor cells, and then loaded with doxorubicin (Dox) to create a therapeutic molecule. The anti-cancer effect of this newly developed drug carrier nanoparticle was tested on MCF-7 and AMJ-13 breast cancer cell lines, as well as the healthy cell line REF.

Firstly, the characterization of the created drug carrier nanoparticle was conducted using ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis spectroscopy), transmission electron microscopy (TEM), and ELISA techniques. Subsequently, the cytotoxic effect of TNF α , GNP, Dox, GNP-TNF α , and GNP-TNF α -Dox test compounds on breast cancer cells was evaluated using MTT and clonogenicity tests. The IC₅₀ doses of each test compound were determined. The potential of inducing apoptosis in MCF-7, AMJ-13, and REF cells by the test compounds was investigated by observing nuclear morphology under a fluorescence microscope using the AO and EtBr double staining technique. Additionally, the potential of inducing autophagy in breast cancer cells by each test compound was measured by flow cytometry using the LC3 protein level.

As a result, it was found that the GNP-TNF α -Dox complex from the prepared nanoparticles exhibited a more effective cytotoxicity and anticancer effect, particularly compared to the Dox treatment currently used in clinics. Furthermore, it was observed that GNP-TNF α -Dox complexes were significantly cytotoxic to breast cancer cell lines in comparison to the control group, accomplishing this through both apoptosis and autophagy induction. These results demonstrated that GNP-TNF α -Dox complexes could constitute an effective anticancer treatment for the targeted cancer therapy approach, which is one of the main objectives of the thesis

Keywords: Gold Nanoparticles, TNF α , Doxorubicin, Breast Cancer, Apoptosis, Autophagy.

January, 2024; 99 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Nanomalzemelerin biyolojik yapılara göre boyutu	4
Şekil 2.2.	Altın nanopartiküllerin önemli gelişmelerini ve uygulamalarını gösteren zaman çizelgesi	6
Şekil 2.3.	Altın nanopartiküllerin sentezi ve biyomedikal kullanım alanları	7
Şekil 2.4.	GNP'lerin şekli	8
Şekil 2.5.	GNP'lerin farklı moleküllere bağlanması	9
Şekil 2.6.	GNP'lerin hedef hücreye taşınması	12
Şekil 2.7.	PEG ve TNF- α kaplı GNP'lerin tümöre hedeflenmesi	15
Şekil 2.8.	TNF- α 'nın yapısı	20
Şekil 2.9.	TNF- α formları ve sinyal iletimi.....	21
Şekil 2.10.	TNFR1 ve TNFR2 aracılığı ile TNF- α sinyal yolağı.....	23
Şekil 2.11.	Apoptosisde intrinsik ve ekstrinsik yolak.....	33
Şekil 2.12.	Otofaji mekanizmasının aşamaları.....	37
Şekil 2.13.	Apoptosis ve otofaji arasındaki etkileşim.....	40
Şekil 3.1.	Kullanılan GNP'lerin kimyasal yapısı	42
Şekil 3.2.	ELISA yönteminde uygulanan basamaklar	49
Şekil 4.1.	Doksorubisinin kimyasal yapısı	56
Şekil 4.2.	GNP, GNP-TNF α ve doksorubisin yüklü GNP-TNF α komplekslerinin absorpsiyon spektrumları	59
Şekil 4.3.	GNP, TNF α yüklenmiş GNP ve GNP-TNF α -Dox partiküllerinin TEM görüntüleri	61
Şekil 4.4.	TNF α için standart grafik (A); GNP yüzeyine bağlanan ve bağlanmayan TNF α konsantrasyonları (B)	63
Şekil 4.5.	Test bileşiklerinin MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki sitotoksitesi ve IC50 değerleri	64
Şekil 4.6.	Test bileşiklerinin AMJ-13 meme kanseri hücrelerindeki sitotoksitesi ve IC50 değerleri	66
Şekil 4.7.	Test bileşiklerinin REF hücrelerindeki sitotoksitesi ve IC50 değerleri	67
Şekil 4.8.	Test bileşiklerinin koloni oluşumuna etkisi	69
Şekil 4.9.	AO/EtBr ile boyanmış MCF-7, AMJ-13 ve REF hücre hatlarının floresan mikroskop görüntüsü (10 μ m)	70
Şekil 4.10.	AO/EtBr ile boyanmış MCF-7, AMJ-13 ve REF hücre hatlarının floresan mikroskop görüntüsü (50 μ m)	71
Şekil 4.11.	Test bileşiklerinin LC3 düzeyini gösteren histogram grafik	73
Şekil 4.12.	Test bileşiklerinin MCF7 ve AMJ-13 hücrelerindeki LC3 düzeyine etkisi	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. GNP ile taşınan anti kanser ilaçlar	16
Çizelge 3.1. Kullanılan GNP'lerin fiziksel ve kimyasal özellikleri	43
Çizelge 4.1. Test bileşiklerinin hücre hatlarındaki IC50 değerleri	68



SİMGELER VE KISALTMALAR

AMJ-13	Ahmed-Murtadha-Jabria 2013
AO	Akridin turuncusu
CFU	Koloni oluşturma birimi
DD	Ölüm domaini
DISC	Ölümle indüklenen sinyal kompleksi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Ölüm reseptörü
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent test
EPR	Artan geçirgenlik ve tutma
ER	Östrojen reseptörü
GNP	Altın nanopartikül
HRP	Yaban turpu peroksidazı
MCF-7	Michigan Cancer Foundation – 7 hücre hattı
MTT	Thiazol mavisi tetrazolium bromid
NF-κB	Nüklear faktör kappa-B
NPs	Nanopartikül
OD	Optik yoğunluk
PBS	Fosfat tamponu
PEG	Polietilen glikol
PR	Progesteron reseptörü
RES	Retiküloendotelial sistem
RME	Reseptör-aracılı endositoz
RPMI	Roswell park Memorial Media
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskop
TNFR	TNF reseptörü
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-α
UV-VIS	Ultraviyole-görünür
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Kanser kontrolsüz hücre bölünmesi ile karakterize edilen, özellikle çevresel etmenler ve genetik faktörlerle vücudun herhangi bir yerinde başlayan, ancak sonrasında tüm vücuda yayılan sistemik bir hastalıktır. Dünyada görülen ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Dünya Sağlık Örgütü kanser nedeniyle ölüm vakalarının yıldan yıla arttığını bildirerek, 2018 yılı içinde 9,6 milyon kişinin kanserden öldüğünü rapor etmiştir (Akhtar vd., 2022). Tıp alanındaki tüm ilerlemelere rağmen kanser vakalarının bir çoğunda halen etkin bir tedavi protokolü geliştirilememiştir. Bu nedenle kanser tanısı, takibi ve tedavisine katkı sağlayacak tüm ilerlemeler insanlık için hayati öneme sahiptir.

Klinikte kullanılmakta olan kanser tedavi yöntemleri; cerrahi operasyonlar, kemoterapi, radyoterapi ve son yıllara özgü ancak kullanım alanı halen kısıtlı olan immunoterapidir. Bu tedavi stratejilerinin hepsinin yan etki ve dezavantajları vardır. Örneğin cerrahi operasyonla her türlü tümörü çıkarmak ya da çıkarılan tümörü tamamen temizlemek mümkün olmamakta, kemoterapi ve radyoterapi gibi günümüzde neredeyse her kanser türü için kullanılan tedavilerde ise kullanılan ilaç ya da ışın, sağlıklı hücre ile kanser hücresini birbirinden ayıramadığı için kansere özgü hedef tedavi yapılamamaktadır. Bu durumda ise hastada ağır bir yan etki tablosu gelişmekte ve daha da önemlisi hastanın kendi bağışıklık sistemi zayıflamakta hatta çökmektedir (Lee vd., 2020; Basova vd., 2021). Sonuç olarak klinikte mevcut olan bu tedavi stratejileri ile hastalığın tedavi edilemediği Dünya Sağlık Örgütü verileri ile ortadayken, acilen kanseri tedavi edebilen yeni tedavi stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda, mevcut kanser tedavilerindeki en ciddi sorun olan hedefe yönelik tedavi eksikliğinin, nano boyutlarda (1-100 nm) malzemelerin kullanıldığı nanoteknoloji araştırmalarıyla giderilebileceği gösterilmiştir. Özellikle altın nanopartiküller (GNP), - kolay hazırlanmaları, - şekil ve boyuta göre yüzeysel, elektriksel ve optik özelliklerinin değiştirilebilmesi, - nispeten kararlı ve toksik olmamaları, - geleneksel kemoterapötik ilaçlara göre daha iyi penetrasyon yeteneğine sahip olmaları, - iyi bir ilaç taşıyıcısı olmaları ve ilaç salınımının kontrol edilebilir olması gibi avantajlarından dolayı özellikle kanser tanı ve tedavisinde kullanılan nano malzemelerdir (Basova vd., 2021; Roy vd., 2022). Buna ek olarak son yıllarda yapılan çalışmalar, GNP yüzeyinde

yapılan modifikasyonlar sayesinde kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden ayırt edilebildiğini ve kanser dokusunun seçici olarak hedeflenebildiğini göstermiştir (Cai vd., 2008). Kanserli hücreleri hedefleme pasif ve aktif olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Pasif hedefleme; nanopartiküllerin (NP) geliştirilmiş geçirgenlik ve tutma yeteneklerine bağlı olarak tümör içinde birikmesi esasına dayanır. Aktif hedefleme; kanser hücresinde bulunan reseptöre özgü ligandın NP yüzeyine immobilize edilmesi esasına dayanmaktadır (Dekker vd., 2020; Lim vd., 2011).

Aktif hedefleme yapmak için kullanılan moleküllerden birisi Tümör Nekrozis Faktör- α 'dır (TNF- α). TNF- α ilk defa transplante tümörlerin endotoksin kaynaklı hemorajik nekrozunda görev alan bir bileşik olarak saptanmıştır (Moreno-Alcántar vd., 2023). Sonrasında bazı patolojilerle ilişkili çeşitli hücreler ve immünolojik özellikleri olan pleotropik bir sitokin olarak tanımlanmıştır (Siddique ve Chow, 2020). Yapılan çalışmalar, rekombinant insan TNF- α (rhTNF)'nın damar hasarına neden olması ve immün sistemi uyarması nedeniyle solid tümörlerin hacmini küçülttüğünü göstermiştir. Ancak bir antitümör ilaç olarak TNF- α 'nın klinikte kullanımı, sistemik toksisiteye neden olduğu için sınırlandırılmıştır (Jain vd., 2012; Akter vd., 2023). Bu durum, TNF- α 'nın seçici olarak tümöre verilmesini sağlayacak taşıyıcı bir sistemin gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Klinik araştırmalarda, TNF- α 'nın sistemik toksisitesini azaltacak birçok farklı yaklaşım denenmiştir. Bunlar içerisinde en başarılı yaklaşım kemoterapi ile birlikte TNF- α 'nın lokal olarak tümör içine enjeksiyonu olmuştur (Bansal vd., 2020). Ancak bu uygulamanın her tümör tipi için yapılması mümkün olmadığı için alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaç için geliştirilen en uygun yöntem, GNP üzerine TNF- α 'nın immobilize edildiği taşıyıcı sistemlerdir. Örneğin, TNF α -GNP kompleksinden oluşan (CYT-6091) nano materyallerin ileri seviyedeki kanser hastalarında kullanılabilirliği Faz I deneyleri ile gösterilmiş, Faz II çalışmaları ise halen devam etmektedir (Sadiq vd., 2022; Singh vd., 2018; Mikhailova vd., 2021). Bu çalışma ışığında TNF α -GNP kompleksine bir kemoterapötik ilacın immobilize edildiği üçlü komplekslerin yapımı gündeme gelmiştir (Sani vd., 2021). Böylece kemoterapötik bir ilacın, geleneksele göre daha düşük dozda kullanıldığı, ilacının biyo-yararlanımının arttığı ve sistemik toksisiteye neden olmadan seçici olarak sadece tümör hücresi içine giren nano taşıyıcıların dizaynı yapılmaya başlanmıştır.

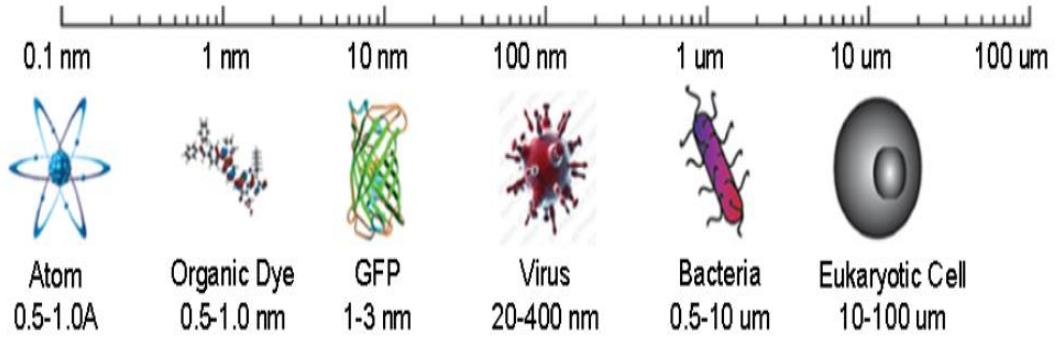
Sunulan bu tez çalışmasının amaçlarından birisi; $TNF\alpha$ -GNP-Doksorubisin içeren yeni bir ilaç sistemi hazırlamaktır. Burada doksorubisinin seçilmesinin nedeni, kadınlarda en sık rastlanan meme kanserinin tedavisinde halen kullanılmakta olan kemoterapötik bir ajan olmasındandır. Tez çalışmasının ikinci amacı; sentezlenen ve karakterizasyonu yapılan $TNF\alpha$ -GNP-Doksorubisin ilaç kompleksinin in vitro koşullarda meme kanseri hücre hatlarındaki sitotoksitesini belirlemek, apoptosis ve otofajiyi indükleme potansiyelini saptamaktır. Bu amaç için, MCF-7 ve AMJ-13 meme kanseri hücre hatları ile kontrol grubu olarak REF hücreleri kullanılmıştır. Kanser terapide amaç kanser hücrelerini apoptosis veya otofaji mekanizması ile ölüme teşvik etmektir. Bu nedenle $TNF\alpha$ -GNP-Doksorubisin kompleksine ait her bir birimin tek tek ve kombine formlarının meme kanseri hücre hatlarında apoptosis ve otofajiyi indükleme potansiyelleri sitolojik ve moleküler teknikler kullanılarak saptanarak kanser terapide kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Nanomalzemeler

Nanoteknoloji, nanometre ölçeğinde malzeme oluşturma amacıyla mühendislik, kimya, fizik, biyoloji ve tıp gibi farklı alanları birleştiren bir bilim dalıdır. Özellikle modern tıp alanında nanoparçacıkların kullanılması ile tanı ve tedavi yöntemlerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

Nanomalzemeler, 1 ila 100 nm arasında boyutlara sahip yapılar olarak tanımlanır. Nanopartiküller, boyutlarından dolayı karaciğerde makrofajlar tarafından yakalanmaktan ve böbrek tarafından süzülmekten kaçabilme kapasitesine sahiptir. Nanomalzemeler vücut içinde bir organdan diğerine hızla göç edebilir ve başarılı bir şekilde hedeflenen dokulara girebilir. Nanomalzemenin boyutu, geliştirilmiş geçirgenlik ve retansiyon (EPR) etkisinin kullanıldığı pasif ilaç taşıma sistemlerinde önemli bir rol oynar (Sakthi Devi vd., 2022). Nanomalzemelerin boyutunu biyolojik yapılarla karşılaştıran bir uzunluk ölçeği Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Nanomalzemelerin biyolojik yapılara göre boyutu (Jain vd., 2012).

Nanomalzemeler; inorganik metaller (e.g. gold, silver, carbon), metal oksitler (e.g. titanium oxide, iron oxide), metalloidler (e.g. crystalline silica, amorphous silica), organik (e.g. lipid, polysaccharide, polymeric matrix) ve inorganik biyoyumlu polimerik (e.g. polystyrene) yapılardan oluşabilir (Ahmad vd., 2017). Nanotıp alanında liposomlar gibi organik nanomateryallerin (Chaudhari vd., 2016) ve hücre dışı veziküllerin (Campanella vd., 2019) yanı sıra altın ve gümüş gibi inorganik nanomateryallerin (Anselmo vd., 2015; Mir vd., 2017) kullanımı oldukça yaygındır.

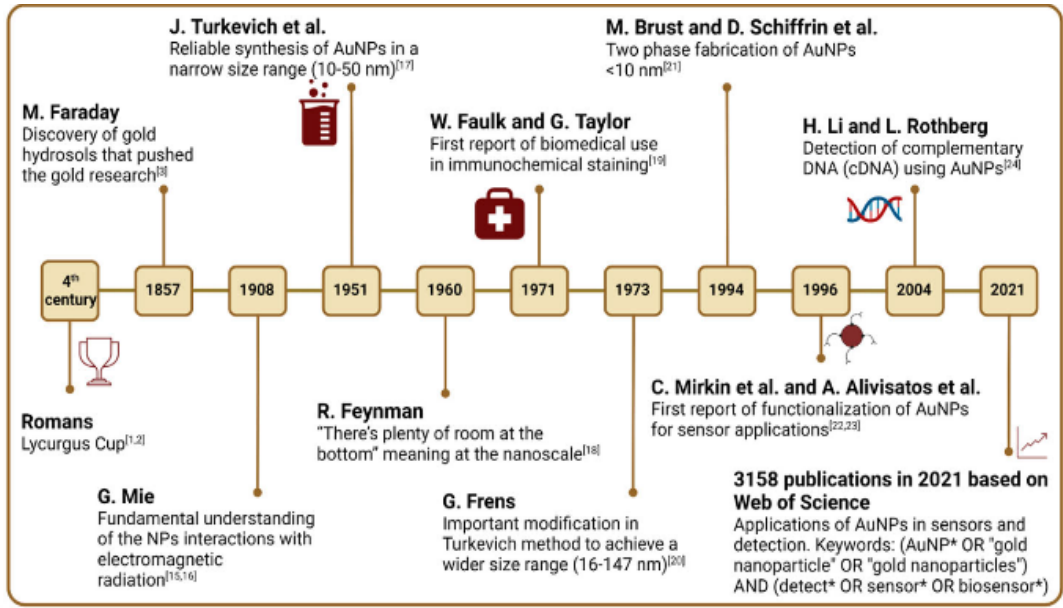
Altının, diğer nanomateriyallere kıyasla sentezinin kolaylığı (Kumar vd., 2013; Majdalawieh vd., 2014), ayarlanabilir boyutu ve şekli (Creran vd., 2012; Li vd., 2012; Grzelczak vd., 2008) biyolojik uyumluluğu, düşük toksisitesi (Dykman vd., 2011) ve yüzey modifiye edilebilirliği gibi birçok avantajı vardır (Wilton-Ely, 2008).

2.2. Altın Nanopartiküller (GNP)

Tıbbi taşıma sistemlerinde sıkça kullanılan nanopartiküllerden biri altın nanopartikülleridir (AuNPs-GNP). Altın, periyodik tablonun 11. grubunda bulunan 79 atom numarasına sahip bir elementtir. Altın standartının atom ağırlığı yaklaşık 197 g/mol'dür, yüksek elektriksel iletkenliğe, kimyasal stabiliteye ve yüksek yoğunluğa sahiptir ve çoğu koşulda inerttir. Altının erime noktası 1064.63 °C ve kaynama noktası 2807 °C'dir.

Altının nanopartiküller şeklinde kullanımı tarih boyunca, Romalıların dördüncü yüzyılda altın-yakut camları oluşturmak için kullanmaya başladıkları tarihten bu yana, tarihsel bir geçmişe sahiptir. GNP'lerin renkleri ile boyutları arasındaki ilişkiyi inceleyen Michael Faraday'ın 1850'lerdeki çalışmaları, günümüzde GNP'lerin bilimsel incelemesinin başlangıcını işaretler. Şekil 2.2'de de görüldüğü gibi 20. yüzyıl boyunca farklı özelliklere sahip GNP'leri sentezlemek için güvenilir ve etkili tekniklerin geliştirilmesini, 21. yüzyılın başlarında yayın ve uygulamalarda artış takip etmiştir (Sadiq vd., 2022).

Modern nanoteknoloji alanında, altın nanopartiküller (GNP'ler) biyoloji ve tıptan fizik ve kimyaya kadar farklı alanlarda incelenmiştir. GNP'lerin ideal boyutu, yüksek yüzey hacim oranı, basit sentez, yüksek stabilite, benzersiz optik, katalitik, elektriksel özellikler, biyo uyumluluk, yüksek kimyasal ve fiziksel stabilite, yüksek ilaç taşıma kapasitesi, uzatılmış dolaşım süreleri, düşük toksisite, çeşitli modifikasyon seçenekleri, biyodistribütör olma ve ilaç bozulmasını önleme yetenekleri gibi çoklu özellikleri nedeniyle özellikle tıpta tanı, tedavi ve görüntüleme alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Żelechowska-Matysiak vd., 2023; Aftab vd., 2018; Sadiq vd., 2022).



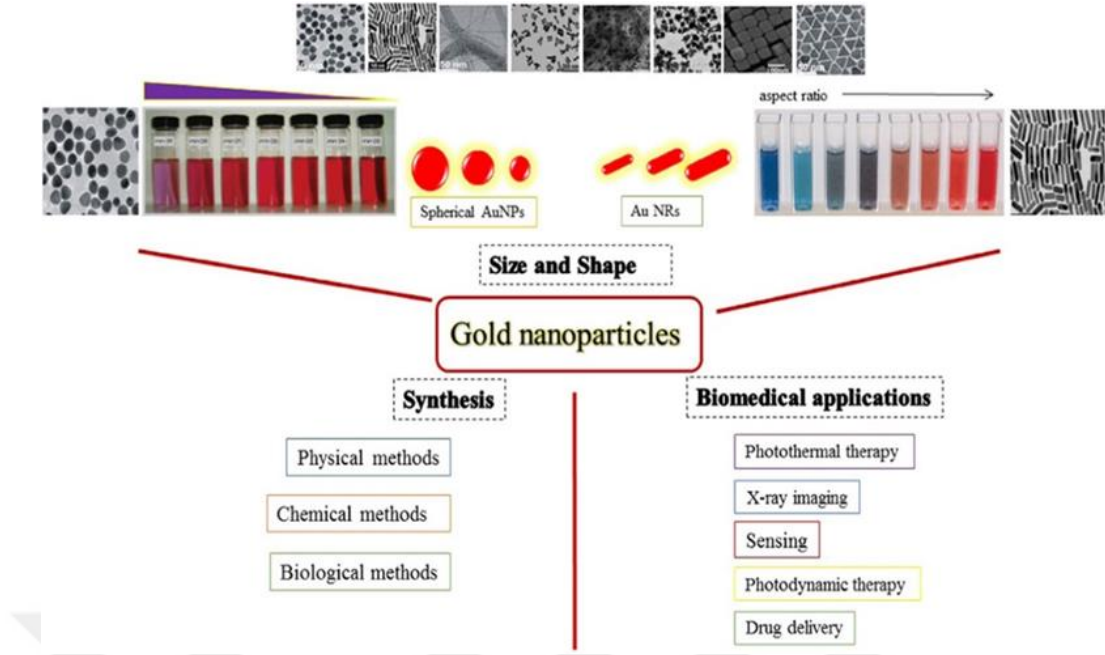
Şekil 2.2. Altın nanopartiküllerin önemli gelişmelerini ve uygulamalarını gösteren zaman çizelgesi (Sadiq vd., 2022).

Altın nanopartiküller ayrıca antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiparaziter, antiplatelet, anti-inflamatuar ve antitümör etkiler gösteren özel biyolojik özelliklere sahiptir (Sakthi Devi vd., 2022).

2.3 GNP'lerin sentezi

GNP'lerin sentezi, "yukarıdan aşağı" ve "aşağıdan yukarı" yaklaşımlar olmak üzere iki temel stratejiye göre yapılmaktadır. Yukarıdan aşağı yöntemler, bir kütleden başlayarak GNP'lerin daha küçük parçacıklara parçalanmasıyla sentezlenmesini içerir. Aşağıdan yukarı yaklaşım, molekül veya atom düzeyinden başlayarak nanoparçacıkların sentezini içerir. Nanoparçacıkların sentezi ayrıca fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle sentezlenebilir (Milan vd., 2022).

Monodispers ve boyutu kontrol edilebilen altın nanoparçacıklarının üretimi büyük öneme sahiptir. GNP'ler genellikle bir kolloidal yöntem kullanılarak sentezlenir. Bu yöntemde, bir metal öncüsü gibi indirgeyici ajanların kullanımıyla, altın iyonları altın nanoparçacıklara indirgenir ve uygun stabilizasyon ajanlarının varlığında, parçacıkların agregasyonu önlenir. Böylece bu nano yapının boyutu, şekli hatta optik özelliklerinin kolayca ayarlanması sağlanır (Şekil 2.3).



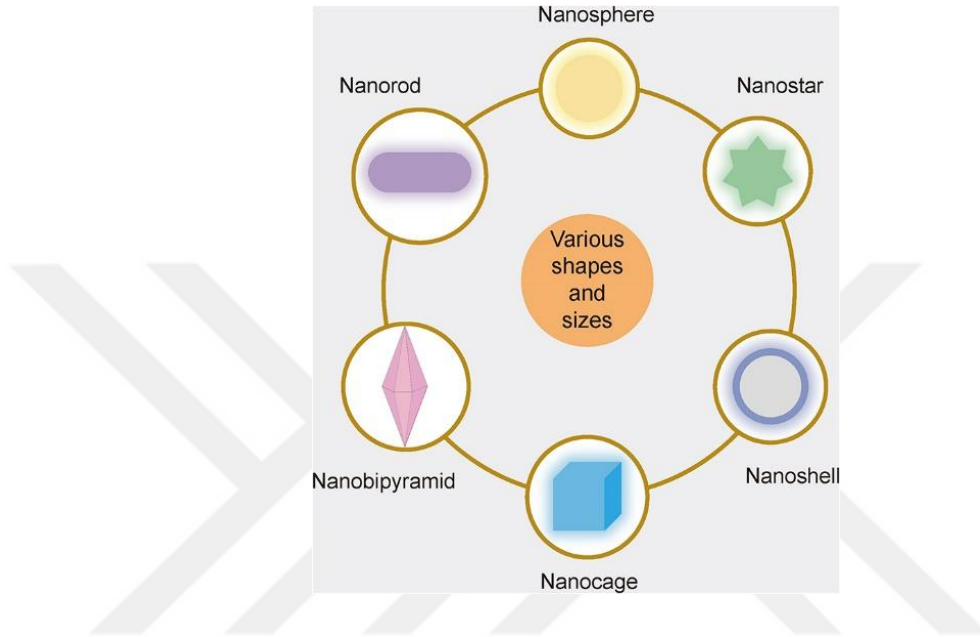
Şekil 2.3. Altın nanopartiküllerin sentezi ve biyomedikal kullanım alanları.

GNP sentezinde en eski ve en ünlü yöntem 1951’de Turkevich vd. tarafından tanımlanan kimyasal sentez yöntemidir. Bu yöntemde kloroaurik asidin sodyum sitrat ile indirgenmesiyle 10 ila 50 nm arasında monodispers küresel GNP’lerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde, Brust ve Schiffrin tarafından 1994’de yayınlanan bir çalışmada, organik çözücülerde sodyum borohidrür kullanılarak GNP’ler oluşturulmuştur. HAuCl_4 için kullanılan diğer indirgeyici ajanlar arasında hidrokinonlar, asetilasetonatlar ve hatta *Bacillus licheniformis* bakterileri gibi biyolojik ajanlar bulunmaktadır. 1980’lerden itibaren GNP’ler, ultrason ve elektrokimyanın birleşimi olan sonoliz yöntemiyle de sentezlenmiştir. Fotokimya (UV ışık kullanımı) ve mikrodalga destekli bozunma gibi diğer teknikler de yaygın olarak kullanılmıştır (Sadiq vd., 2022).

GNP’lerin sentezinde diğer bir yaklaşım, mantar ve bakteri özütleri (hücre içi veya hücre dışı), mikroorganizmalar, bitki özütleri veya biyomoleküllerin kullanıldığı yeşil sentez yöntemidir. Metal nanoparçacıkların bu yeşil biyosentezi, basit, hızlı, kolayca yeniden üretilebilir, çevre dostu, ekolojik ve maliyeti düşük bir yöntem olması nedeniyle giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Milan vd., 2022).

2.4. GNP'lerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

GNP'ler basit sentetik yaklaşımlarla farklı geometrik şekil ve boyutlarda sentezlenebilir. GNP'ler nanosferler, nano-kabuklar, nano-çubuklar, nano-kafesler, nano-yıldızlar ve nano-dendritler gibi çeşitli şekillerde olabilir (Şekil 2. 4).

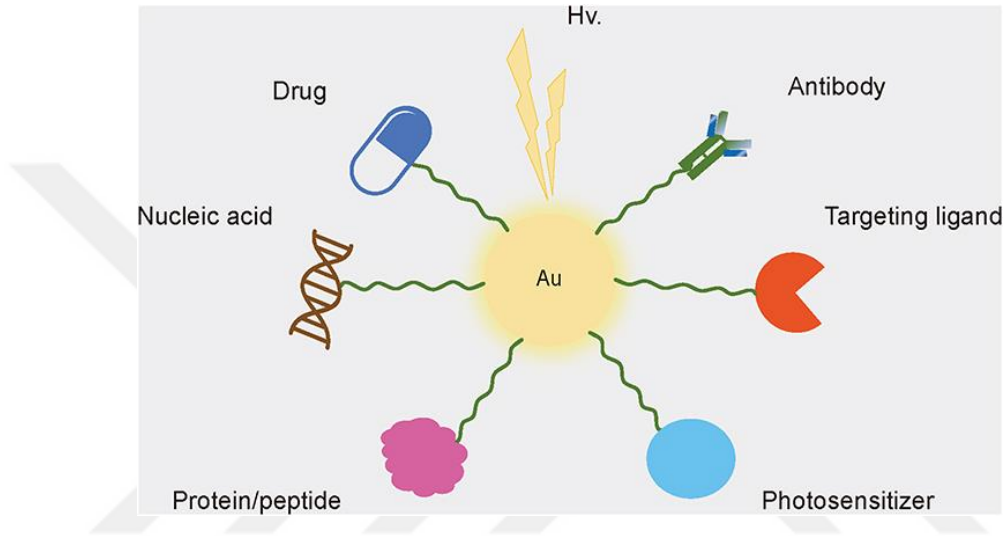


Şekil 2.4. GNP'lerin şekli

GNP'lerin katalitik aktivite, erime noktası, elektrik iletkenliği ve renk gibi bir çok fiziksel ve kimyasal özelliği, şekil, boyut ve çevresel ortam değişiklikleriyle kontrol edilebilmektedir (Yang vd., 2022; Tiwari vd., 2015). Bu tasarım esnekliği, özellikle belirli uygulamalar için ideal performans sağlamak açısından diğer organik nanoparçacıklarda zor elde edilir. Bununla birlikte, GNP'lerin serbest elektronların koherent salınımına bağlı olarak benzersiz boyut ve şekil bağımlı optik özellikleri bulunmaktadır, bu fenomen yüzey plazma rezonansı (SPR) etkisi olarak adlandırılır (Baeza ve Vallet-Regí, 2019). GNP'ler, boyutlarına bağlı olarak optik özellikleri değiştiği için farklı renklere sahip olabilir. Optik özellikleri sayesinde, GNP'ler tıbbi tanı, görüntüleme ve tedavi için ideal nanomalzemeler olarak geliştirilmiştir, ki bu diğer inorganik nanomateryaller için nadir bir özelliktir. Yüzey plazmonlarını üretme eğilimleri nedeniyle, altın nanopartiküller gelen ışığı yüksek oranda emer, bu da onları

termoterapi ve fototermal terapi gibi kanser tanı ve tedavisi için benzersiz bir alternatif yapar (Kalashgrani ve Javanmardi, 2022).

Ayrıca, GNP'lerin büyük yüzey alanı ve yüksek yüzey aktivitesine sahip olması, onların doğrudan veya dolaylı olarak ilaçlar, nükleik asitler (DNA veya RNA), proteinler, peptidler, antikorlar, hedefe yönlendirme ligandları ve diğer moleküllerle etkileşime girebilmelerini sağlar (Şekil 2.5).



Şekil.2.5. GNP'lerin farklı moleküllere bağlanması

Bu etkileşim olasılığı ve çeşitliliği, GNP'lerin biyolojik aktivitelerini büyük ölçüde artırır ve potansiyel antikanser uygulamalarının yelpazesini genişletir. Özellikle ilaç taşıma sistemi olarak kanser tedavisinde kullanımı bu yolla gerçekleşir. Son olarak, GNP'lerin fizyolojik ortamda nispeten stabil olduğu ve metalik altının inert doğası nedeniyle biyouyumluluğu gözlemlenmiştir. Tüm bu özellikler, GNP'leri onkolojide giderek popüler hale getirmiştir.

Altın nanopartiküller, sınırlı çözünürlüğe ve kötü farmakokinetiğe sahip ilaçları ve görüntüleme ajanlarını taşımak için kullanılabilir. Bugün özellikle kanser terapide yaşanan en büyük sorunlardan birisi olan, kemoterapötik ilacın seçici olarak kanser hücrelerine taşınamaması sorununu ortadan kaldırmak için kullanılabilir. Tümör hücrelerine özgü tümör antijenine karşı geliştirilen antibadinin ya da tümör hücrelerine özgü reseptörlerin GNP üzerine immobilize edilmesi ile seçici bir ilaç taşıyıcı sistem

olarak kullanılabilirler. Ayrıca sistemik toksisiteye sahip ilaçların seçici olarak tümör hücrelerine taşınmasına imkan sağlayabilirler.

Tümöre hedeflenmiş nanoparçacık taşınması bugün kanser tedavisinde en çok çalışılan konulardan birisidir. Bu konunun iki önemli amacı bulunmaktadır: hedefte parçacık konsantrasyonunu artırmak ve diğer organlarda, özellikle karaciğer ve dalakta GNP birikiminden kaynaklanan yan etkileri azaltmak. Bunun için genellikle iki taşıma stratejisi bulunmaktadır. Birincisi, GNP'lerin polietilen glikol (PEG) ile konjugasyonuna dayanır; diğeri ise, tümör hücrelerinin belirli işaretleyici proteinlerine karşı geliştirilen antikorlarla konjugasyona dayanır.

2.5. Altın Nanopartiküllerin PEGilasyonu

Altın nanoyapıların yüzeyleri, proteinlerin spesifik olmayan adsorpsiyonunu önlemeye, dolaşımdaki Au nanoyapılarının retiküloendotel system (RES) tarafından alımını en aza indirmeye böylece kan dolaşımında daha uzun süre dolaşımına ve dolayısıyla hedef dokuya daha fazla birikmesine yardımcı olabilecek biyouyumlu polimer katmanları sağlamak için sıklıkla poli etilen glikol (PEG) ile kaplanır.

PEG, doğrusal bir etilen glikol polieter (etan-1,2-diol) polimeridir. Hem suda hem de organik çözücülerde çözünebilen bu sentetik polimer, bir metoksit iyonunun epoksit 3 halkası üzerindeki nükleofilik saldırısıyla başlatılan etilen oksidin anyonik polimerizasyonu ile üretilir.

Polietilen glikol (PEG), GNP yüzeylerine çeşitli ligandları bağlamak için ideal bir ilaç taşıma platformlarından biridir. GNP'ler negatif yüzeyleri ve çeşitli fonksiyonel gruplarla yüksek afiniteye sahip olmaları nedeniyle, diğer moleküllerle kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler oluşturma kapasitesine sahiptir (Louis, 2017).

Kovalent bağlama, görüntüleme uygulamaları için konjugatların stabilitesini artırırken, aynı zaman da moleküller elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler dahil olmak üzere çeşitli zayıf bağlar aracılığıyla GNP's'ye kovalent olmayan şekillerde

bağlanabilir. Bu zayıf etkileşimler, ilacın hedefli salınımını kolaylaştırmak için ideal bir yöntem oluşturabilir.

Altın ile kükürt içeren bileşikler arasındaki reaksiyon (Au-S), kovalent bir yaklaşımın yaygın örneğidir. Bu bağlanma tiyoller, disülfidler ve sistin grupları gibi kükürt içeren bileşiklerle gerçekleşebilir. Bu güçlü GNP-S bağı, GNPs'nin sensör, kataliz ve hedefli ilaç taşıma uygulamalarındaki başarısının temelini oluşturur (Vigderman ve Zubarev, 2013). Tiyol içeren ligandlar arasında en yaygın olanı modifiye olmuş bir ucunda kükürt olan polietilen glikol'dür (PEG).

PEG'ün tiyol veya disülfid grubu altına bağlanırken diğer uzak ucundaki fonksiyonel grubu değiştirerek, biyolojik bir sistem içinde etkileşime girecek veya atıl kalacak şekilde özel olarak tasarlanmış sağlam, iyi tanımlanmış arayüzleri kolayca oluşturulabilir. PEG kaplı GNP'ler, sterik nedenlerden dolayı birbirlerini reddettikleri için kolloidal stabilite artar (Harzand, 2022). PEG ile kaplama GNP'lerin dolaşımdaki proteinlere yapışması önler ve dolaşım sürelerini artırır (Bansal vd., 2020). PEG'in, ilaçların taşıma sistemi içindeki stabilitesini artırdığı, GNP'nin tek başına neden olduğu toksisiteyi azalttığı ve taşıma aracının vücutta dolaşım süresini uzattığı gösterilmiştir (Yang vd., 2015; Mishra vd., 2016; Mozar vd., 2018). Ayrıca, PEG immün yanıt oluşturmadağı için biyouyumludur, ki bu çeşitli tıbbi uygulamalarda kullanım için tercih edilen bir durum yaratır.

Sonuç olarak, PEG bazlı nanomateryaller, yüksek antikanser ilaç yükü, uzun dolaşım yarı ömrü, işlevselleştirme kolaylığı ve spesifik ligandlarla etkileşimi nedeniyle tümör tedavilerini hedeflemek için önemli bir adaydır.

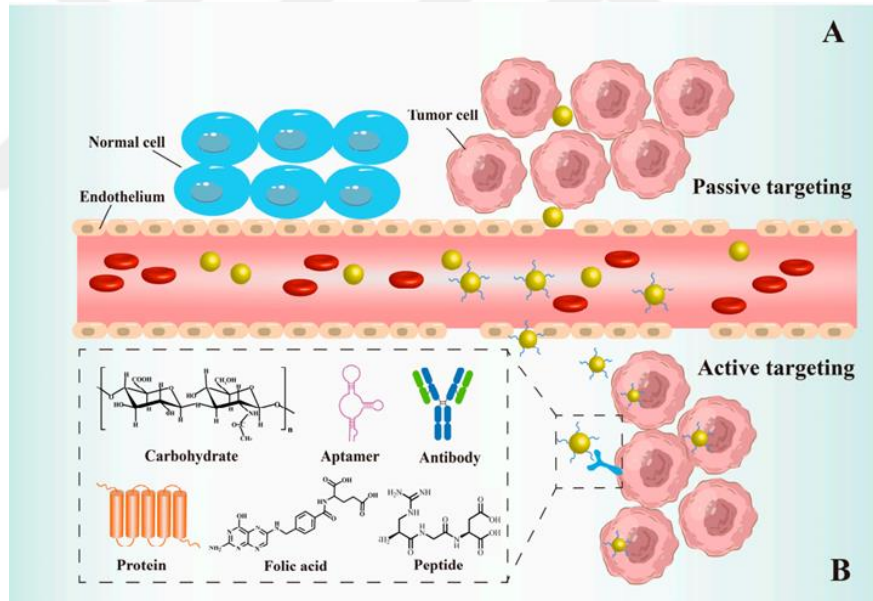
2.6. GNP'lerin tedavide kullanılması

GNP'lerin fiziksel, kimyasal ve optik özellikleri, onları klinik araştırmalarda ideal bir araç haline getirir. GNP'lerin tıpta kullanımı, fototermal terapi ve geniş klinik etkileri ile heyecan verici tedavi potansiyeli olan ilaç hedefleme araştırmalarında önemli bir yer tutar. GNP'lerle yapılan in vitro çalışmalarda ve hayvan modelleriyle yapılan araştırmalarda pozitif olumlu sonuçlar alındığı için, bugün insan klinik araştırmalarında GNP'nin kullanıldığı 20 den fazla Faz I ve Faz II klinik araştırmanın yapılmasına neden olmuştur (Yao vd., 2023). Bu çalışmaların özellikle ilaç hedefleme,

görüntüleme ve fototermal tedavi odaklı olduğu, araştırmaların tamamında GNP'lerin kullanımı ile ilgili büyük bir güvenlik sorunu olmadığı, ancak deneme sayısının azlığı ve hasta sayısının az olması gibi sınırlamalardan dolayı daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmıştır (Yao vd., 2023).

GNP'ler intravasküler, topikal veya oral olarak uygulama kolaylığına sahiptir. GNP'ler retikulo endothelial sistemin organları tarafından alınabilir ve vücuttan atılabilir. Ancak PEG'le modifikasyon dolaşımdaki süreyi uzattığı gibi makrofajlar tarafından alınmasını da engeller (Manson vd., 2011).

GNP'lerin hücrelere giriş şekli hakkında önemli tartışmalar olmuştur. En muhtemel mekanizmalar spesifik olmayan reseptör aracılı endositoz (RME), pasif taşıma veya GNP yüzeyine spesifik bir reseptör bağlandığında aktif taşıma şeklinde olabilir (Chithrani vd., 2006, Huang vd., 2023). (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. GNP'lerin hedef hücreye taşınması. (A) Pasif hedefleme; GNP'lerin yüklü terapötik ajanları EPR etkisi ile tümöre pasif olarak iletmesi (B) Aktif hedefleme; hedef ligandları taşıyan GNP'lerin tümör hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere spesifik olarak bağlanmasını ifade eder (Huang vd., 2023).

Nanopartiküllerin tümör hücrelerine ulaştırılmasına yönelik araştırmaların temeli ilk kez 1986 yılında Matsumura ve Maeda tarafından yapılan araştırmalara dayanır. Bu araştırmacılar belirli bir moleküler ağırlığına sahip makromoleküllerin, arttırılmış geçirgenlik ve tutma (enhanced permeability and retention, EPR) etkisi olarak adlandırılan benzersiz bir mekanizma ile katı tümörlere öncelikli olarak biriktiğini göstermişlerdir. Bu da makromoleküler ilaçların veya nanopartiküllerin tümör dokusuna hedefli teslimatında önemli bir aydınlanmaya neden olmuştur.

İn vivo olarak yapılan birçok çalışmada GNP yüzeyinde her hangi bir işlevselleştirme ya da modifikasyon yapılmasa bile, GNP'lerin normal olgun kan damarlarından daha geniş penetrasyona sahip, sızıntılı olgunlaşmamış damar yapısına sahip tümör bölgelerinde pasif olarak biriktiği rapor edilmiştir (Maeda vd., 2001) Bu mekanizma, arttırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi olarak bilinir.

Tümörlerin en çarpıcı özelliklerinden biri, hızlı ve kontrolsüz büyümeleridir, bu da oksijen ve besinlere acil bir ihtiyaç doğurur. Katı tümörler 1-2 mm çapında büyüdüğünde, çevrede bulunan normal kan damarları artık bunların daha fazla çoğalmasını desteklemek için yeterli değildir, bu nedenle bu tümörler için intratumoral anjiyogenez zorunludur. Yeni oluşan tümör kapillerleri ve kan damarları yapısal ve işlevsel olarak anormaldir, kesintili epitel ve hatalı bazal membran içerirler. Sonuçta, endotel hücrelerinin çatlakları makromoleküllerin ve nanoparçacıkların tümör dokularına geçişini sağlar. Bu durum, EPR etkisinin "arttırılmış geçirgenlik" kısmını temsil eder. Normal dokularda, lenfatik sistem sürekli olarak interstisyel sıvıyı dolaşıma geri döndüren ve yeniden işleyen bir sistemdir, bu sıvı, ekstrasvaze olmuş su, çözeltiler ve kolloidler içerir. Ancak, katı tümörlerde, lenfatik drenaj yetersizdir ve interstisyum sıvısının dinamik taşınması genellikle bozulur. Küçük moleküller serbestçe dolaşıma geri difüzyon yapabilirken, tümör interstisyumuna sızan makromoleküller veya nanoparçacıklar uzun süre orada tutulur. Bu fenomen, EPR etkisinin "retansiyon" kısmını gösterir.

EPR etkisi genellikle PEGilasyon ile elde edilen daha uzun dolaşım süreleriyle birleştiğinde, serbest ilaç kullanımına kıyasla tümörlerdeki ilaç konsantrasyonlarını 10 ila 100 kat artırabildiği rapor edilmiştir (Kaul vd., 2002). PEGilasyon, retiküler endotelial system (RES) alımını azaltmanın en yaygın yöntemidir ve fagositlerin

bağlanmasına sterik engel oluşturan hidratlı bir bariyer oluşturur (Fang vd., 2011). Böylece etkin bir ilaç hefleme mümkün hale gelir.

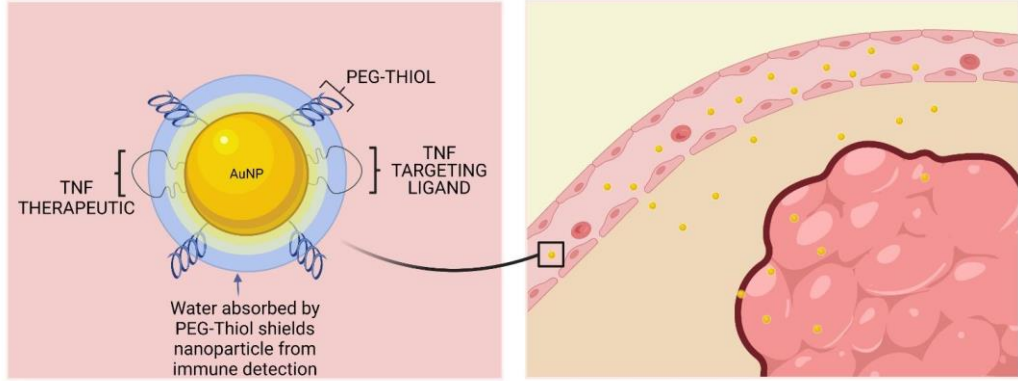
Daha ileri tümör hedeflemesi, epidermal büyüme faktörü (EGF), transferrin, folik asit, monoklonal antikorlar ve tümör nekrozis faktör (TNF α) gibi tümöre özgü tanıma moleküllerinin nanopartiküllere aktif olarak bağlanmasıyla gerçekleştirilebilir. (Eghtedari vd., 2009).

2.6.1. Nanpartiküllerin tümöre hedeflenmesi

GNP'ler dikkatli yüzey modifikasyon basamakları ile hedef hücreye aktif hedefleme yoluyla iletilebilir. Örneğin kanser hücrelerinin hedeflenmesi için, kanser hücresinin yüzeyinde aşırı ifade edilen spesifik bir reseptöre, güçlü bir şekilde bağlanabilen antikorlar, peptitler ve folat gibi moleküller GNP yüzeyine konjuge edilerek hedefleme yapılabilir. Hedefleme kısmı doğrudan çıplak altın yüzeyine immobilize edilebildiği gibi PEG gibi uygun bir linker üzerine de takılabilir. GNP yüzeyine takılan proteinler, GNP'lerin yüzey özelliklerini ve dolayısıyla hücre alım dahil biyolojik sistemle etkileşimlerini önemli ölçüde değiştirebilir.

GNP'leri tümöre hedeflemek için yapılan ilk çalışma PEG kaplı GNP üzerine TNF α 'nın takıldığı çalışmadır (Paciotti vd., 2004). Bu çalışmada altın nanopartiküller TNF α yı taşıyan bir vektör gibi dizayn edilmiştir. TNF α burada tümör hücrelerini apoptosise götürecek bir ilaç gibi düşünülebilir. Aynı zamanda tümör hücreleri TNF reseptörlerini aşırı ifade ettikleri için GNP'lerin tümöre seçici olarak taşınmasını sağlayan bir hedef olarak da düşünülebilir. Bu çalışmada PEG ve TNF α ile konjuge edilmiş kolloidal altının, fare kolon tümörlerinde (MC-38) serbest TNF'den daha çok biriktiği, serbest TNF α 'ya göre daha düşük dozda bile tümör hacmini azaltmada daha etkili oldu ve aynı zamanda minimum sistemik toksisiteye neden oldu rapor edilmiştir (Paciotti vd., 2004, Paciotti vd., 2006). Bu sonuç bir çok in vitro çalışma ile tekrarlandıktan sonra, PEG ve rekombinant insan TNF α ile konjuge edilmiş GNP'lerin (CYT-6091) Aurimune olarak adlandırılan ilaç formu klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Faz 1 çalışmaları, ilerlemiş kanser hastalarının Aurimune'u iyi tolere ettiğini göstermiştir. Ayrıca, EPR etkisi yoluyla tümör kitlelerinde ilaç birikiminin gerçekleştiği (Şekil 2.7), PEG katmanı sayesinde de mononükleer fagositler tarafından alımının azaldığı rapor edilmiştir (Faz I-II ekle). CYT-6091 ile

elde edilen bu pozitif sonuçlardan sonra GNP'lerin ilaç taşıma aracı olarak kullanımı derinlemesine araştırılmıştır.



Şekil 2.7. PEG ve TNF α kaplı GNP'lerin tümöre hedeflenmesi

2.6.2. GNP'lerin antikanser ilaç taşımada kullanımı

Kemoterapötik ilaçlar için geleneksel ilaç dağıtım yaklaşımları, yani oral veya damar içi uygulama, ilacın tüm vücuda yayılmasıyla sonuçlanır ve ilacın sadece bir kısmı tümör bölgesine ulaşır (Singh vd., 2018). Bugün kanser tedavisinde karşılaşılan en önemli sorun, oldukça yüksek toksisiteye sahip olan kemoterapötik ajanın sadece kanser hücresi değil sağlıklı hücreyi de öldürmesidir. Bunun için acil seçici bir hedef tedaviye ihtiyaç vardır.

Aktif hedefleme, hedef hücreye özgü reseptöre bağlanabilen bir ligandın GNP yüzeyine bağlanması ile gerçekleştirilir. Bu yöntem sayesinde hedef doku veya hücreye ikincil hasar veya istenmeyen yan etki riski olmadan daha yüksek ilaç konsantrasyonu verilebilir. Bu nedenlerle, GNP'ler şu anda genetik düzenleme ve çeşitli hastalıkların ilaç tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, GNP'ler antibiyotik ve antiviral ajanları dağıtmak için de kullanılmış ve çeşitli suşlara karşı büyük potansiyel göstermiştir (Kalashgrani ve Javanmardi, 2022).

Son yıllarda, çoğunlukla GNP'lerin kanser hastalarında tümör hücrelerine karşı etkili bir ilaç dağıtım aracı olarak kullanılmasına odaklanılmıştır (Siddique ve Chow, 2020; Singh vd., 2018; Harzand, 2022; Yetisgin vd., 2020). GNP'ler artan geçirgenlik ve tutma (EPR), artan stabilite, biyouyumluluk ve hassas hedefleme ile karakterize edilen mükemmel ilaç dağıtım sistemleridir.

Antitümör moleküllerinin kanser hücrelerinde sitotoksik veya düzenleyici etkileri vardır ancak düşük çözünürlük, kısa yarı ömür, ilaç direncinin gelişimi ve zayıf tümör seçiciliği gibi bazı dezavantajlar, bu ilaçların pratik uygulamalarını sınırlamaktadır. Etkili yaklaşımlardan biri, özellikle sert bir çekirdeğe sahip GNP'lerle antikanser molekülleri konjuge etmekten geçmektedir.

Günümüzde GNP'lerin sentetik bileşikler (Chinnaiyan vd., 2019) fitokimyasallar (Raghavan vd., 2015; Jabir vd., 2018) terapötik peptidler (Medina vd., 2018; Banerjee vd., 2019) ve koordinasyon bileşikler (Fernandes vd., 2017; Pedrosa vd., 2019) dahil olmak üzere çeşitli antitümör molekülleri teslim etme yeteneği olduğu rapor edilmiştir. GNP'ler ile çeşitli antikanser ilaçların taşınmasına ait örnekler Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. GNP ile taşınan anti kanser ilaçlar (Yang vd., 2022)

Antikanser İlacı	Molekülün modifikasyonu	Nanokompleks Adı	Hücre hattı	Ana Sonuç
DOX	PEC	DOX-PECAuNP	HepG2	Daha güçlü sitotoksikite serbest DOX a göre
5-FU	PEG and FA	AuNPs-PEG5-FU-FA	M139 ve M213	Daha güçlü sitotoksikite serbest 5-FU a göre
DTX	HA and GFLGC	TX@HA-clAuNPs	HeLa ve MCF-7	Daha yüksek sitotoksikite
LIN	CALNN and GSH	LIN -AuNPs CALNN	MCF-7 cells	Daha yüksek antioksidan aktivite ve antikanser aktivite
K Kaempferol		K-AuNPs	MCF-7 cells	Daha yüksek hücre apoptozu, antiproliferatif yetenek ve anjiyogenezin inhibisyonu
P1		P1-AuNPs	HT-29 and MDA-MB231 cells	Daha yüksek DNA parçalanması ve hücre apoptozu

2.7. Altın Nanopartiküllerin Sitotoksitesisi

GNP'lerin sitotoksitesisi, doz, boyut, şekil, yüzey yükü, yüzey kaplam türü ve biyosistemler arasındaki etkileşim gibi faktörlere bağlıdır.

GNP'lerin boyutu, hücreler tarafından alınımı ve sitotoksikliklerini önemli ölçüde etkiler. Altın nanoparçacıkları öncelikle klatrin aracılı endositoz yoluyla hücrelere nüfuz eder ve eksositoz yoluyla hücrelerden çıkar. Küçük partiküllerin hücreye geçişinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum, büyük partiküllere kıyasla daha az hücre yüzey reseptörüyle etkileşime girmeleri gerektiği varsayımıyla açıklanabilir ve bu da toksisiteyi etkileyebilir. Bunun aksine, daha büyük partiküller için, hücre yüzeyinde yetersiz reseptör olabilir ve bu da hücre içine girişi sınırlayabilir. Genel olarak, nanoparçacıkların boyutu ne kadar küçük olursa, sitotoksik etkisi o kadar yüksektir. 10 ila 60 nm arasında boyuta sahip partiküller, hücre şeklinde değişiklik, hücre çoğalmasının inhibisyonu veya DNA'da mutasyon gibi olumsuz etkilere sahiptir, oysa 5 ila 30 nm boyutları arasındakilerde toksisite gözlenmemiştir. Küçük boyutlu altın nanoparçacıklarının toksisitesini açıklayabilecek hipotezlerden biri, hacimlerine göre yüksek bir yüzey alanının varlığından kaynaklanabileceğidir. Bu, genişletilmiş bir emilim kapasitesine yol açar ve biyomoleküllerle etkileşim olasılığını artırabilir (Mihai vd., 2021).

Nanoparçacık şekli, sitotoksisiyi etkileyen diğer bir yapısal bir özelliktir. Bunun için farklı şekillere (küresel, çubuklar, üçgen, yıldız, oktahedron, levha ve prizma şekiller) sahip altın nanoparçacıklar sentezlenmiş ve sitotoksitesileri için değerlendirilmiştir. İnsan fetal osteoblast ve pankreas kanalı hücre hatları üzerinde çubuk, yıldız ve küresel altın nanoparçacıklarının sitotoksitesisi araştırıldığında, altın nano çubuklarının insan hücreleri üzerinde en toksik olduğu, küresel nanoparçacıkların ise en güvenli olduğu gözlenmiştir (Steckiewicz vd., 2019). Ayrıca altıgen altın nanoparçacıkların çubuklara kıyasla yüksek derecede toksik olduğu rapor edilmiştir (Wang vd., 2008). Bu çalışmalar GNP'lerin sitotoksitesinin şekle bağlı olarak değiştiğini gösterirken, farklı şekillere göre, altın nanoparçacıklarındaki yüzey atomlarının dağılımının değişmiş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Küre geometrisinin yıldızlar veya çubuklarla ilişkisi düşünüldüğünde bazı açıklamalar sunulabilir. Kenar ve köşelerde daha fazla atom, biyomoleküllerle daha güçlü etkileşimlere neden olabilir. Bu nedenle, kenarlara ve

köşelere daha fazla sahip olan çubuklar ve yıldızlar (dairesele nanoparçacıklar için sıklıkla gözlenmeyen) toksisite göstermiştir (Mihai vd., 2021).

Altın nanoparçacıkları, biyolojik sıvılarda agregasyonlarını önlemek, hücresele alımı kolaylaştırmak veya özgüllüklerini artırmak için farklı moleküllerle fonksiyonelleştirilebilir. Peptidler, antikorlar, PEG, sitrik asit, setrimonium bromür (CTAB), nükleik asitler ve ilaçlar gibi çeşitli ligandlar, uygun ve özgül özelliklere sahip Altın nanoparçacıklarını tasarlamak için kullanılmıştır. Ayrıca, bu ligandlar kullanarak Altın nanoparçacıklarının sitotoksitesini ayarlanabilir (Bhamidipati vd., 2017).

Altın nanoparçacıklarının yüzey kimyasının sitotoksitesinde çok güçlü bir etkisi olduğu belirtilmiştir. PEG ve serumla kaplanmış GNP'lere kıyasla CTAB ile kaplanmış GNP'lerin insan dermal fibroblastları için çok toksik olduğu rapor edilmiştir (Bhamidipati vd., 2017). Ligandların GNP'lerin özelliklerini şekillendirmek ve tanımlamak için önemli bir rol oynadığını ve bunun da GNP'lerin hücrelerle etkileşimini etkilediği bildirilmiştir (Arvizo vd., 2010; Mihai vd., 2021). Ligandların nanoparçacıkların alımını ve sitotoksitesini etkilemesini açıklamak için "hücre görüşü" adlı bir kavram önerilmiştir. Bu kavram öncelikle manyetik nanoparçacıklar için tanıtılmış daha sonra diğer nanoparçacıkları da içerecek şekilde genişletilmiştir. Bu görüşe göre; hücre sitoplazmik zarları, özel yüzey molekülleriyle karakterizedir ve çeşitli proteinler, şekerler ve fosfolipitlerden oluşur. Nanoparçacıklar ile bu özel yapılar arasındaki etkileşimler, hücre tipine bağlıdır ve bir hücre tipinin bu nanoparçacıkları nasıl algıladığını yansıtır. Dolayısıyla, nanoparçacıklar ile hücre yüzeyi arasındaki özel etkileşimler, farklı hücre tepkilerine yol açar ve GNP'lerin sitotoksitesini önemli ölçüde etkiler (Laurent vd., 2012).

Yüzey yükü, nanoparçacıkların hücre zarları veya proteinlerle etkileşimlerini ve biyolojik sıvılardaki kararlılıklarını önemli ölçüde etkileyen bir başka parametredir. Goodman ve arkadaşları (2004), aynı konsantrasyonda katyonik GNP'lerin orta derecede toksisiteye neden olurken, anyonik GNP'lerin eritrositler için toksik olmadığını rapor etmiştir. Nötr nanoparçacıklar olumsuz etkilere neden olmazken, negatif yüklü nanoparçacıklar larval davranışlarında anormalliklere neden olmuştur. Genellikle, katyonik yüzey yükü, plazma proteinlerini bağlayarak "protein koronası" denilen protein kaplı yapıların oluşmasını sağlar, bu da ardından makrofajlar

tarafından alınır. Bu nedenle, katyonik GNP'ler, anyonik veya nötr NP'lere göre bağışıklık yanıtı oluşturmada çok daha etkilidir (Goodman vd., 2004; Guerrini vd., 2018; Ray vd., 2021).

Yukarıda belirtilen özelliklerin yanı sıra, agregasyon durumu, doz ve fizyolojik ortamlarla etkileşim, GNP'lerin sitotoksitesini etkileyebilir. Örneğin, agregatlaşmış katyonik GNP'lerin, agregatlaşmamış partiküllere kıyasla insan dermal fibroblast hücreleri için dört kat daha toksik olduğu bildirilmiştir (Yang vd., 2007). Lipidler, polimerler ve proteinler gibi birçok kaplama ajanı, GNP'lerin agregasyonunu önleyerek koruyucu bir tabaka oluşturur.

Ancak, biyolojik ortamlardaki bazı proteinler, örneğin, sığır serum albümini (BSA), sitokrom c, fibrinojen ve ubiquitin, GNP'lerin yüzeyine kolayca adsorbe olabilir ve bir protein koronası oluşturabilir. Bu etkileşim, Apoptosis, lizozomal geçirgenliğin artması ve inflamatuvar yanıtlar gibi farklı fizyolojik ve patolojik değişikliklere neden olabilir (Wang vd., 2015; Salvati vd., 2013).

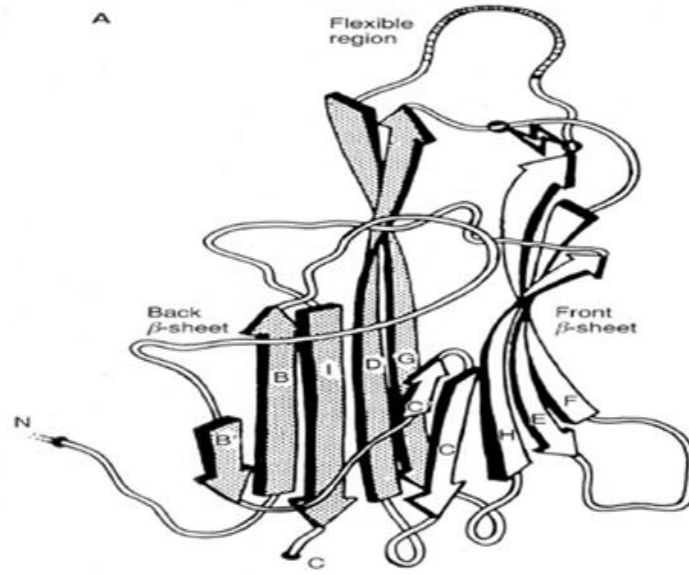
Ayrıca, bir model organizmaya uygulanan GNP'lerin dozu da toksisiteyi etkileyebilir. GNP'lerin toksisitesinin doza bağlı olduğunu ortaya koyan bir çok çalışma vardır (Coradeghini vd., 2013; Moore vd., 2015; Lee vd., 2020; Mihai vd., 2021). Alım sonrası, GNP'ler çeşitli biyolojik bileşenlerle etkileşime girebilir ki bu durumda GNP'lerin fizikokimyasal özellikleri, agregasyon durumu ve yüzey yükü değişebilir (Mihai vd., 2021).

2.8. Tümör Nekrozis Faktör

Tümör Nekrozis Faktör, 1975 yılında Carswell Old ve arkadaşları tarafından endotoksinle uyarılan faktör olarak keşfedilmiş ve ana işlevinin kanser hücrelerini ve tümörleri yok etmek olduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2022).

TNF- α , hücre çoğalması, farklılaşması, hayatta kalması ve ölümüyle ilgili bir düzine yolu düzenleyen TNF süper ailesi adı verilen büyük bir sitokin ailesine bir üyesidir (Sharif vd., 2020). Şu anda, TNF ailesinin 19 üyesi ve karakterize edilmiş 29 reseptörü bulunmaktadır (Josephs vd., 2018).

TNF- α trimerik yapıda, her alt birimi 157 amino asitten oluşan yüksekliği 5.5 nm, maksimum genişliği 3.5 nm olan bir proteindir (Şekil 2.8). TNF- α esas olarak aktive makrofajlar, T-lenfositler ve doğal öldürücü hücreler tarafından salgılanan bir protein olarak kabul edilir ve hücre çoğalması, farklılaşması, apoptotik hücre ölümü, inflamasyon, tümörögenез, viral replikasyon, lipid metabolizması ve pıhtılaşma dahil olmak üzere birçok hücresel yanıtı indükleyebilir ve dikkate değer antitümör etkilere sahiptir (Lin vd., 2008).



Şekil 2.8. TNF- α 'nın yapısı

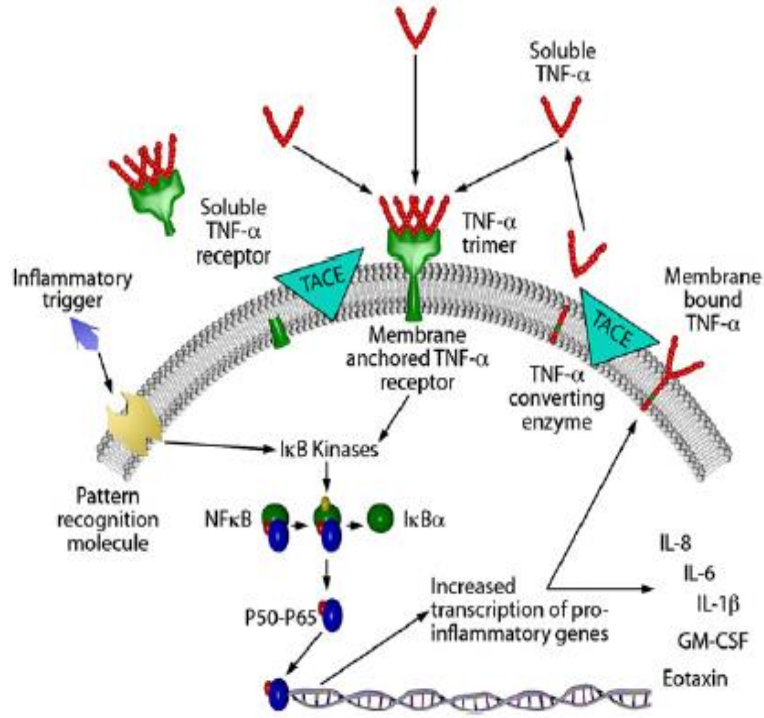
2.8.1. TNF- α sentezi

TNF- α geni, majör histokompabilite kompleks III (MHC III) gen bölgesi içinde, kromozom 6 (6p21.33) üzerinde bulunur. Esas olarak aktive edilmiş monosit/makrofajlar tarafından üretilir. Ancak B ve T hücresi lenfositleri, dendritik hücreler, granülositler, fibroblastlar ve epitel hücreleri de bunu üretebilir (Spriggs vd., 1992).

TNF- α sentezi, UV ışığı, ozmotik stres, mitojenler, kimyasal maddeler, özellikle forbol esterler ve virüsler dahil olmak üzere birçok faktör tarafından uyarılır. Ayrıca fibrin, makrofajlarda TNF- α sentezini indükleyebilir (Szaba vd., 2002). TNF- α sentezi, Toll benzeri reseptörler, T hücresi reseptörleri vb. dahil olmak üzere çeşitli

reseptörler aracılığıyla indüklenebilir. TNF- α mRNA sentezi nükleer faktör kappa B (NF- κ B), c-Jun ve fos dahil birkaç transkripsiyonel faktörle düzenlenir (Falvo vd., 2010).

TNF- α , çözünür (sTNF- α) veya membrana bağlı (tmTNF- α) formlarda bulunur. TNF- α 'nın çözünür plazma formu, bir metalloproteinaz olan TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) tarafından membrana bağlı formdan kırılarak oluşur (Black vd., 1997; Kriegler vd., 1988). Çözünür TNF- α , reseptör aktivasyonu için homotrimer yapıda olup 157 amino asitlik her polipeptitidin birbirine bağlanması ile piramit şeklinde bir yapı oluşturur (Şekil 2.9, Şekil 2.10). Reseptör bağlanma bölgeleri bu piramitin alt kısmında bulunur (Sharif vd., 2020).



Şekil 2.9. TNF- α formları ve sinyal iletimi (Duseja vd., 2015).

2.8.2. TNF reseptörleri ve sinyal yolağı

TNF- α , TNF-Receptor-1 (TNFR-1) (p55 veya CD120a) ve TNFR-2 (p75 veya CD120b) olmak üzere iki farklı reseptöre yüksek afinite ile bağlanır.

TNFR1, tüm insan dokularında ifade edilir ve TNF- α için ana sinyalleşme reseptörüdür. TNFR2 genellikle bağışıklık hücrelerinde ifade edilir ve sınırlı sayıda biyolojik yanıtları gerçekleştirir. Genel olarak, TNF- α , TNFR1 veya TNFR2 reseptörlerine bağlanır ve ardından inflamasyon ve hücre ölümü gibi biyolojik işlevler için moleküler sinyaller iletilir.

TNFR1, hem çözünür (sTNF- α) hem de membrane bağlı (tmTNF- α) TNF- α tarafından aktive edilir ve TNFR1'e bağlı, ölüm alanı (DD) olarak adlandırılan bir bölgeye sahiptir ve bu alan TNFR1'e bağlı ölüm alanı (TRADD) adaptör proteini ile etkileşir. TNFR1'in aktivasyonu, farklı sinyal komplekslerinin oluşumunu tetikleyebilir. Bunlar farklı hücrel yanıtı başlatan Kompleks I, Kompleks IIa, Kompleks IIb ve Kompleks IIc olarak adlandırılır (Şekil 2.10)

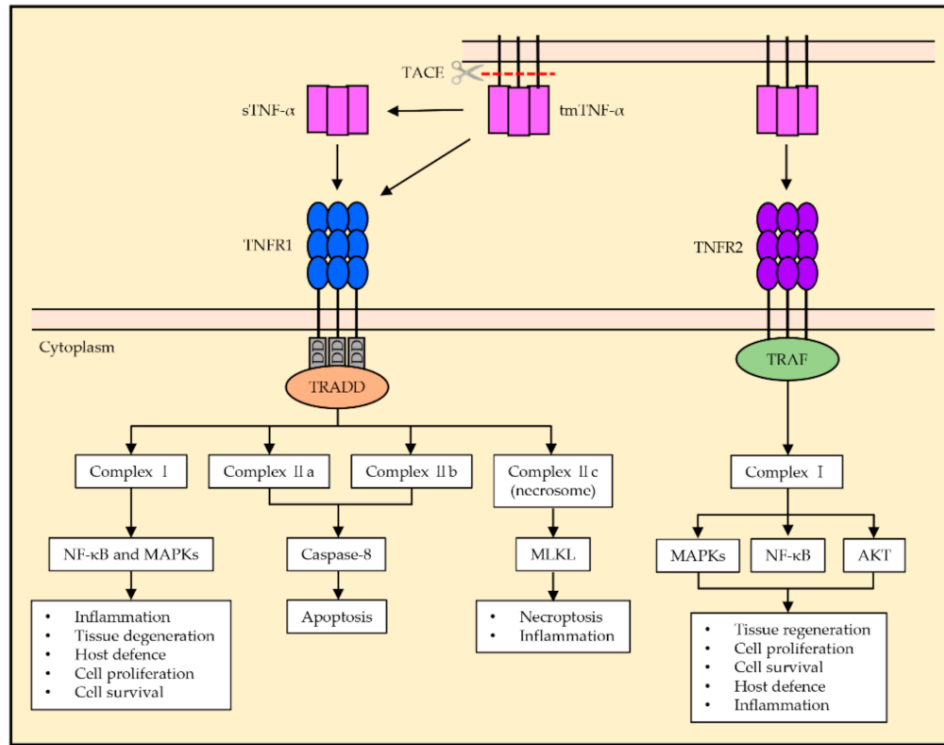
Kompleks I'in oluşumu sırasında, aktive edilmiş TNFR1 ilk olarak TRADD'ye bağlanır, ardından RIPK1, TNFR'ye bağlı faktör 2 veya 5 (TRAF2/5), hücrel apoptosis inhibitör proteini 1 veya 2 (cIAP1/2) ve doğrusal ubiquitin zinciri bağlama kompleksi (LUBAC) gibi diğer adaptor proteinlere bağlanarak sinyal iletimi gerçekleşir. Bu sinyal yolları nükleer faktör-kB (NF-kB) ve mitojen-aktive edici protein kinazlarının (MAPK'lar) aktivasyonuna neden olur. Kompleks I sinyalinin işlevsel sonucu, inflamasyonun indüksiyonu, hücrelerin hayatta kalması ve çoğalması ve patojenlere karşı bağışıklık savunmasıdır (Holbrook vd., 2019).

Kompleks I plazma membranında oluşurken, Kompleks IIa, IIb ve IIc sitoplazmada oluşur. Kompleks IIa, TRADD, RIPK1, TRAF2, cIAP1/2, pro-Kaspaz-8 ve ölüm domain ile ilişkili Fas proteini (FADD) gibi adaptor proteinlerinden oluşur. Kompleks IIb, Kompleks IIa'nın üzerine RIPK3'ün eklenmesiyle oluşur. Kompleks IIa ve IIb'nin oluşması (aynı zamanda apoptozom olarak da bilinir) Kaspaz-8'i etkinleştirir ve apoptosise neden olur. Kompleks IIc (nekrozom olarak bilinir) RIPK1 ve RIPK3 tarafından oluşturulur ve bunlar kesilmemiş kaldıklarında kompleksi oluşturmak için birbirine bağlanır. Kompleks IIc, RIPK3 aracılı fosforilasyon yoluyla MLKL (mixed lineage kinase domain like protein) proteinini aktive eder, bu da nekroptoz ve inflamasyonu indükler (Jang vd., 2021).

TNFR2'nin membrana bağlı TNF- α tarafından aktive olduğu ileri sürülür. TNFR1'in aksine, TNFR2 bir ölüm bölgesine sahip değildir ve dolayısıyla doğrudan

programlanmış hücre ölümünü indükleyemez. TNFR2 aktivasyonunda; TNFR2 TRAF1, cIAP1 ve cIAP2 ile birleşir ve bu kompleks, NF- κ B, MAPK ve protein kinaz B'nin (AKT) aktivasyonunu sağlar. TNFR2 sinyal iletimi, özellikle doku yenilenmesi, hücre çoğalması ve hücrenin hayatta kalması gibi homeostatik biyolojik faaliyetlerden sorumludur. Bununla birlikte, bu yolun inflamatuvar yanıtları tetiklediği ve patojenlere karşı konak savunmasını başlattığı da bilinmektedir (Jang vd., 2021).

Genel olarak, TNFR1, sitotoksik ve proinflamatuvar TNF- α yanıtlarını tetiklemek için esastır. TNFR2 ise büyük ölçüde hücre aktivasyonuna, göçüne veya çoğalmasına aracı olur.



Şekil 2.10. TNFR1 ve TNFR2 aracılığı ile TNF- α sinyal yolu (Jang vd., 2021).

Fizyolojik olarak TNF- α normal bağışıklık tepkisi için çok önemli bir bileşendir. TNF- α bağışıklık sistemini düzenlemek için aktive edilir, ancak TNF- α 'nin uygunsuz veya aşırı üretimi zararlı olabilir ve hastalığa yol açabilir. TNF- α üretimi ve TNF reseptör sinyali, romatoid artrit, Crohn hastalığı, ateroskleroz, sedef hastalığı, sepsis, diyabet ve obezite dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. TNF- α 'nın birçok inflamatuvar hastalıkta sitokin kaskadının düzenlenmesinde önemli

bir rol oynadığı gösterilmiştir ve inflamatuvar sitokin üretiminin "ana düzenleyicisi" rolü nedeniyle, bir dizi hastalık için terapötik bir hedef olarak önerilmiştir (Choy ve Panayi , 2001; Adegbola vd., 2018; Sands vd., 2017; Levin vd., 2016; Perdomo-Celis vd., 2019).

2.8.3. TNF α 'nın anti kanser etkisi

TNF- α 'nın apoptosisi indüklemeye özelliği onun kanser tedavisinde kullanılabilirliğini gündeme getirmiştir. TNFR1'in kanser hücrelerinde ve tümör endotel hücrelerinde ifade edildiği (Huang vd., 2012), TRF2'in ise çeşitli immün sistem hücrelerinde ve bazı kanser hücrelerinde ifade edildiği rapor edilmiştir (Chopra vd., 2018; Cui vd., 2008).

Yaklaşık olarak kanserlerin %28'i, çözünür TNF- α aracılığıyla doğrudan hücre ölümüne duyarlıdır (Joseph vd., 2018). TNF- α 'nın antikanser etkisi iyi anlaşılmış olup, çeşitli mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşir. Bunlar; 1) Tümör hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak hücre apoptosisi, 2) immün sistem hücrelerinin aktivasyonunu bozarak immün sistemi baskılamak, 3) endotel hücre modülasyonu ve neoanjiogenezin bozulmasını sağlayarak tümör damar yapısının bozulmasıdır (Nie vd., 2013; Valencia vd., 2006; Hoving vd., 2006; Mackay ve Imhof, 1993).

TNF- α , bir antitümör ajan olarak çeşitli uygulama yollarıyla araştırılmıştır. TNF- α 'nın deri altı ve kas içi uygulamaları denenmiş ancak enjeksiyon bölgesindeki lokal toksisite nedeniyle terk edilmiştir. TNF- α 'nın sistemik uygulamasının geniş kapsamlı klinik denemeleri, çeşitli kanser türlerinde yapılmıştır. İleri evre katı tümörleri olan hastalarda Faz I ve Faz II denemeleri, sistemik TNF- α 'nın doz sınırlayıcı toksisitesinin vasküler çöküntüye bağlı olduğunu göstermiştir. Diğer toksisiteler arasında ateş ve titreme gibi semptomlar, geçici lökopeni ve karaciğer fonksiyon testlerinde yükselmeler bulunmaktadır. Bu verilere rağmen, çalışmalar TNF- α 'nın intratümoral enjeksiyonu ile tümörün gerilediğini göstermiştir (Powell vd., 2010).

Sonuç olarak bir antitümör ilaç olarak TNF- α kullanımı sistemik olarak toksiktir, bu nedenle TNF- α 'nın klinik olarak kullanımı sınırlandırılmıştır. Sistemik toksisite nedeniyle, seçici tümör iletimine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla 2004 yılında ilk

defa Paciotti ve arkadaşları PEG kaplı GNP yüzeyine TNF- α immobilize ederek bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmişlerdir.

2.8.4. TNF- α 'nın GNP'lerle kullanımı

TNF- α 'nın altın nanopartiküllere yüklenmesi, tedavi aktivitesini ve ilaç sistemlerindeki teslimat etkinliğini artırmak amacıyla büyük ilgi görmüştür. Nanopartiküllerin kullanımı birçok avantaja sahiptir. Küçük boyutları nedeniyle diğer ilaç teslim sistemlerinin erişemediği intrasellüler ve ekstrasellüler bölgelere nüfuz edebilirler. Nanopartiküllerin kullanımının başlıca avantajlarından biri, bir ilacı bozulmaya karşı korumak ve ilaç kullanımının yan etkilerini azaltma yeteneğidir.

TNF- α yüklenmiş PEG kaplı altın nanopartiküller ile yapılan, bir çok farklı insan kanser hücre hattının kullanıldığı farklı çalışmaların hepsinde, sistemik toksisiteye neden olan TNF- α dozundan çok daha az miktarda kullanılmış, en önemlisi kanser hücreleri için seçici bir antikanser etki oluşturulduğu rapor edilmiştir (Paciotti vd., 2004, 2006; Visaria vd., 2006; Powell vd., 2010; Pedro vd., 2010).

TNF- α yüklü GNP ile kombine halde ısı tedavisi uygulanan in vivo ve in vitro tümör hücrelerinin hayatta kalması karşılaştırıldığında, ısı tedavisi ile kombine uygulanan GNP- TNF- α tedavisinin tümör büyümesinde daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma GNP'lerin ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmasının yanı sıra termal tedavi ile birlikte antikanser tedavide kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır (Lim vd., 2011).

Sonuç olarak, GNP yüzeyine TNF- α gibi terapötik biyomoleküllerin bağlanması daha yüksek stabilite ve çok daha etkili hedef tedavilerin yapılmasına imkan sağlamaktadır. Bu özellikler, PEG modifikasyonu ile sağlanan daha uzun dolaşım süreleri ile birleştiğinde, terapötik dozları azaltmaya ve yan etkileri bastırmaya yardımcı olabilecek gelişmiş terapötik etkilere sahip nanoyapıların oluşturulmasını sağlamaktadır (Zhang vd., 2023).

Ayrıca bu komplekse kemoterapötik bir ilacın eklenmesi (TNF- α -GNP- İlaç), ilaç yükünü spesifik organ veya hücreye taşımak, ilaç biyoyararlanımını iyileştirmek ve optimum yanıt için gerekli olan yüksek dozlarla ilişkili toksisiteyi azaltmak için çok etkili bir yol olarak sunulmuştur (Jain vd., 2012).

2.9. Kanser

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması ile karakterize edilen genetik bir hastalıktır. Kanser, kardiyovasküler hastalıkların ardında dünya genelindeki ölümlerin ikinci başlıca sebebi olup, günümüzde insan sağlığını tehdit eden en ciddi hastalıklardan biridir. Küresel çapta kanserden kaynaklanan ölümlerin 2030 yılına kadar 12 milyona çıkması tahmin edilmektedir (Lim vd., 2011; Yang vd., 2022).

Tümörögenез, normal hücrelerin genetik değişikliklerle neoplastik hücrelere dönüştüğü çok aşamalı bir süreçtir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Kanser gelişimi genellikle protoonkogeneler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım mekanizması genlerinde oluşan mutasyonlar sonucu oluşur.

Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümü, DNA hasarına neden olan endojen ajanlar, replikasyon hataları gibi kendiliğinden ya da iyonize radyasyon, UV radyasyon ve kimyasal ajanlar gibi çevresel faktörlerden kaynaklanabilir. Hücreler, DNA hasarlarını onarmak için yollar geliştirmiş olsalar da, çeşitli nedenlerle hatalar olabilir ve genomda kalıcı mutasyonlar oluşabilir. Kanserlerin sadece % 5-10'unun kalıtsal özelliklerden kaynaklandığı ve kalan % 90-95'inin çevresel faktörlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Bertram, 2000).

Kanser patogenezi, tümörlerinin çok aşamalı gelişimi sırasında birden çok özelliği içerir. Tüm kanser türleri için geçerli olan bu karakteristik özellikler; otonom büyüme sinyallerine sahip olmak, büyümeyi engelleyen sinyallere karşı duyarsızlık, apoptosise direnç, sınırsız replikasyon, anjiyogenez, invazyonu ve metastaz, hücresel enerji metabolizmasında değişiklik ve bağışıklık yanıtından kaçınmadır. Ayrıca, tümörü destekleyen inflamasyon ve genomik kararsızlığın kanserlerin karakterisitik özellikleri olduğu bildirilmiştir (Hanahan ve Weinberg, 2000; 2011).

2.9.1. Meme kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanserlerden birisidir. Dünya genelinde jinekolojik kanserlerden sonra en sık görülen ikinci kanser tipi olup, kadınları etkileyen kanser ölümlerinin beşinci en yaygın nedenidir. Meme kanseri diğer kanserlere göre oldukça düşük bir vaka-mortalite oranına sahiptir (Iacopetta vd.,

2023). 2020 yılında 2.3 milyon yeni vakadan 685,000'i ölümlle sonuçlanmıştır. 2040 yılına kadar sadece nüfus artışı ve yaşlanma nedeniyle meme kanserinde her yıl 3 milyon yeni vaka ve 1 milyon ölüm beklenmektedir (Arnold vd., 2022).

Meme kanseri riskini azaltmada cinsiyet, yaş, genetik faktörler, hormonal faktörler, çevresel faktörler ve yaşam tarzı gibi farklı faktörler önemli roller oynar. Ayrıca doğumlar, laktasyon, üreme, obezite, alkol tüketimi ve fiziksel aktivite gibi birçok faktör de etkilidir (Momenimovahed ve Salehiniya, 2019).

Meme kanserleri, genellikle köken aldıkları hücre veya organdan ve en çok benzeyen hücre tipine göre sınıflandırılır. Lobüllerden köken alan kansere lobüler karsinom denirken, meme kanallarının hücrelerinden kaynaklanan kansere duktal karsinom denir. Kanser, köken aldığı yerden diğer dokulara yayıldığında invaziv karsinom olarak adlandırılır (Viale, 2012). Histopatolojik varyantlar arasında en sık teşhis edilen meme kanseri türü, teşhislerin %80'ini oluşturan invaziv duktal karsinom (IDC) dur. Bu kanser, meme lobüler kanallarında başlar ve diğer vücut bölgelerine, çevresindeki lenf nodlarına ve diğer dokulara metastaz yapabilir (Dalgın vd., 2007).

Meme kanseri çoğunlukla kadınlarda görülse de, erkeklerde de nadir vakalar bulunmaktadır. Amerikan Kanser Derneği'ne göre, 2015 yılında erkekler arasında meme kanserinden kaynaklanan yaklaşık 2000 yeni vaka ve 400 ölüm olmuştur.

2.9.2. Kanser tedavisi

Kanser tedavisi için genellikle cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel stratejiler kullanılmaktadır (Yang vd., 2022).

Cerrahi müdahale, kanser tedavisi için en eski yöntemdir. Cerrahi müdahale, özellikle vücudun diğer bölgelerine henüz yayılmamış olan primer tümörlerde oldukça etkilidir. Ancak ileri evre kanserlerde etkili değildir. Bu nedenle, metastaz yapmış kanser hücreleri yalnızca kemoterapi ile kontrol altına alınabilir (Kalashgrani ve Javanmardi, 2022).

Radyasyon, kansere karşı ikinci bir silahtır. Radyasyon, yüksek enerjili parçacıklar, X ışınları, gama ışınları veya elektromanyetik dalgalar kullanarak kanser hücrelerine

moleküler düzeyde hasar vererek tedavi etmeyi içerir. Bu genellikle postoperatif kanser hücrelerini uzaklaştırmaya yönelik bir yaklaşım olarak kullanılır. Radyasyon, kanser hücrelerinin yakınındaki veya radyasyon yolunda bulunan sağlıklı dokulara zarar verebilir. X ışınları, birincil ve ikincil elektronların uyarılmasına neden olur, bu da vücutta DNA'ya ve vücudun proteinlerine ve biyolojik moleküllerine zarar veren serbest radikalleri üretir (Kalashgrani ve Javanmardi, 2022).

Kemoterapi, kanser hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını veya vücudun diğer bölgelerine yayılmasını yavaşlatarak veya durdurarak çalışan güçlü ilaçları kullanır. Kemoterapi bir ilaç veya birkaç ilacın bir araya getirilmesiyle, cerrahi veya radyoterapi gibi diğer tedavilerle birleştirilebilir. Kemoterapi ilaçları sistemik olarak dolaşıma verilir ve bu nedenle vücudun tüm bölgelerine ulaşır. Kemoterapi ilaçları oldukça toksiktir ve kanser hücrelerini yok etme yeteneğine sahiptir ancak seçici olmadıkları için sağlıklı hücrelere de zarar verir ve önemli yan etkilere neden olurlar (Hirsch, 2006).

Kemoterapi, yüksek etkinliği nedeniyle günümüzde en yaygın anti-kanser tedavilerinden biridir. Bununla birlikte, tümör hücrelerine yönelik seçiciliğinin olmaması ve tümör bölgesine etkili ilaç dağıtımındaki zorluklar, pratik sınırlamalara yol açmıştır. Ayrıca çoklu ilaç direnci başarılı kemoterapinin önünde başka bir engel oluşturmaktadır. Kemoterapötik ilaçlara direnç, metastatik kanserli hastaların %90'ından fazlasında tedavi başarısızlığına neden olmaktadır (Longley ve Johnston, 2005). Ayrıca tümör mikro ortamının karmaşıklığı ve bireysel farklılıklar, etkili tedavi seçenekleri geliştirmenin zorluğunu daha da artırır. Bu sorunların üstesinden gelmek için yeni ilaç dağıtım stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Christowitz vd., 2019).

2.9.2.1. Meme kanseri tedavisi

Erken evre meme kanserinde cerrahi yöntem tek başına hastayı tedavi edebilir, daha sonra mikrometastatik evreleri tedavi etmek için adjuvan kemoterapötik ajanlar planlanır (Cianfrocca ve Goldstein, 2004). Metastatik meme kanseri ve tekrarlayan vakalara, hastalıktan etkilenen bölgeleri hedeflemek için sistemik olarak yaklaşılr. Hormonal tedavi ve kemoterapi ana sistemik müdahalelerdir. Hormonal tedavi, yaşamı

tehdit eden metastazı olmayan östrojen ve/veya progesteron pozitif hastalar içindir. Hormonal tedaviye direnç gelişen hastalar sitotoksik kemoterapiye aday olurlar (Rivera vd., 2002).

Metastatik meme kanseri tedavisindeki terapötik amaç, iyi bir yaşam kalitesini korurken hayatta kalma süresini uzatmaktır. Kemoterapi genellikle monoterapi olarak başlatılır, ancak daha yüksek yanıt oranlarına sahip olması ve klinik faydaların erken başlaması nedeniyle kombinasyon tedavisi tercih edilir (Pagani vd., 2010). Meme kanseri tedavisinde kullanılan en yaygın kemoterapik ajan doksorubisinidir.

2.9.2.2. Doksorubisin (Dox)

Doksorubisin (Dox), 1970'lerde çeşitli Streptomyces suşlarından izole edilen antrasiklin yapısında bir antibiyotiktir. Solid tümörler, lenfomalar ve lösemilerin kemoterapisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Meme kanseri tedavisinde kullanılan en etkili kematerapötik ajandır (Yang vd., 2022).

Genel olarak Dox'in sitotoksitesinin iki farklı mekanizmayla gerçekleştiği bilinmektedir. Bunlar klasik topoizomerez II inhibisyonu ve kromatin hasarıdır (Tewey vd., 1984).

Topoizomerez II, DNA çift sarmalının açılmasını gerektiren replikasyon, transkripsiyon ve rekombinasyon basamaklarında DNA'da oluşan topolojik stresi ortadan kaldırmak için DNA'da geçici çift sarmal kırıkları oluşturan bir enzimdir (Dong vd., 2007; Nitiss vd., 2009). Doksorubisin sikloheksan ve şeker kısımları aracılığıyla topoizomerez II enzimiyle kompleks oluşturur. Bu durum DNA hasarına neden olduğu için p53 aracılı hücre döngüsü durur. Ayrıca DNA-topoizomerez II kompleksi hücrede replikasyonun, transkripyonun ve rekombinasyonun durmasına neden olduğu için hücre ölümüne yol açar (Perego vd., 2001).

Kromatin hasarı ile ilgili olarak, Dox'in şeker kısmı DNA'ya göç ederek histon alanını işgal eder ve nükleozomun çökmesine neden olur (Pang vd., 2013; Yang vd., 2013), bu da hücre ölümüne yol açar (Gorovsky ve Keevert, 1975).

Ayrıca Dox reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olarak, hücrel redoks dengesinin bozulmasına, DNA ve membranlarda hasar meydana gelmesine neden olur ki bu da hücre ölümüyle sonuçlanabilir (Zhang vd., 2011).

Bu etki mekanizmalarından dolayı Dox günümüzde meme kanseri başta olmak üzere lösemi, lenfoma ve diğer solid tümörlerin tedavisinde kullanılan bir kemoterapötik bir ajandır. Ancak kanser tedavisinde doksorubisin kullanımı hastalarda kusma, ishal gibi geçici semptomlarının dışında daha önemli yan etkilere neden olur. Bunlar Dox'e karşı gelişen ilaç direnci ve kardiyotoksitesidir. Gözlemlenen kardiyotoksite türü, kardiyomiyositlerin Apoptosis una neden olan potansiyel olarak ölümcül bir kardiyomiyopatidir ve Dox'in klinik kullanımında önemli bir sınırlayıcı faktördür (Zhang vd., 2011).

Diğer önemli sınırlayıcı faktör Dox'e karşı gelişen ilaç dirençliliğidir. Kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen direnç, tüm metastatik kanserli hastaların %90'ından fazlasında tedavi başarısızlığının nedenidir (Bukowski vd., 2020). Dox direnci bir kaç farklı mekanizmayla gelişebilir. Bunlar; P-glikoprotein gibi çoklu ilaç direnci (MDR) taşıyıcılarının, meme kanseri direnç proteininin (BCRP) ve MDR ile ilişkili proteinlerin (MRP) ifadesinin artmış olması, ayrıca ksenobiyotik metabolizmasının artması, DNA onarım kapasitesinin artması ve büyüme faktörlerinin ifadesinin artması ile gerçekleşebilir (Bukowski vd., 2020; Lage vd., 2003).

Dox direnci kanser hastalarının tedavisinde hala çözülmemiş önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Dox'in antikanser etkisini artırmak ve toksisitesini azaltmaya yönelik bir kaç yaklaşım olabilir. Bunlar Dox'in diğer kemoterapötik ajanlarla kombine halde kullanılması olabilir ki bu durum Dox dozunun azlamasına imkan sağlayacaktır. Diğer Dox'in yapısını ve uygulama formunu değiştirmek (PEG kaplı liposom formu) olabilir ki bu formlar klinikte Mycet ve Doxil olarak kullanılmaktadır. Başka bir yaklaşım Dox'in sadece tümör hücrelerine hedeflenmesi ile sağlanabilir (Du vd., 2018).

Son yıllarda Dox'in sadece tümör hücrelerine hedeflenmesi için altın nanopartiküllerin kullanıldığı ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda Dox'in PEG kaplı GNP üzerine immobilize edilerek anti kanser etkisi in vivo ve in vitro olarak araştırılmıştır (Guan vd., 2013; Kumar vd., 2013; Khandekar vd., 2014; Alexander vd.,

2014; Zhang vd., 2015; Spadavecchia vd., 2016; Swiech vd., 2016; Asadishad vd., 2010; Cheng vd., 2013; Gu vd., 2012; Aryal vd., 2019; Prabakaran vd., 2009; Zhang vd., 2011; Gautier vd., 2013). Tüm bu çalışmalarda Dox yüklü GNP'lerin serbest Dox'e göre daha etkili ve seçici bir tedavi oluşturduğu rapor edilmiştir. Ayrıca GNP'lerin, kanser dokusunda bozulmuş damar yapısı ve lenfatik drenajın hatalı olması nedeniyle biriktiği, artan geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi ile seçici olarak tümör dokusunu küçülttüğü bildirilmiştir. Ayrıca Dox'e dirençli hücre hatlarında çok küçük boyuttaki (2.7 nm) GNP sayesinde tümör dokuya daha hızlı geçen GNP-Dox'in tek başına Dox'e göre 10 kata daha fazla alındığı ve direncin kırıldığı rapor edilmiştir (Zhang vd., 2011).

Dox tedavisinde ve diğer tüm kemoterapötik ajanlarda beklenen, kemoterapi sonrası kanser hücrelerinin apoptosis veya otofaji mekanizmasıyla ölmesidir.

2.10. Apoptosis (Programlanmış Hücre Ölümü)

Apoptosis, programlı hücre ölümü (PHÖ) olarak adlandırılan hücre ölüm türlerinden biridir ve tüm çok hücreli organizmalar için hücre çoğalmasını kontrol etmek, doku homeostazını sürdürmek ve organizmada zararlı veya gereksiz hücreleri ortadan kaldırmak açısından kritik bir öneme sahiptir. Apoptosis mekanizmasındaki bozukluklar, kanser gelişimi de dahil olmak üzere bir dizi hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Goldar vd., 2015).

Apoptosis mekanizması DNA hasarı, hipoksi, büyüme faktörlerinin eksikliği, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, onkogen aktivasyonu gibi hücresel stress koşullarına karşı oluşan normal bir yanıttır. Bu yanıt uyarının hücre içinden (intrinsik sinyal yolağı) veya hücre dışından (ekstrinsik sinyal yolağı) gelmesine bağlı olarak iki farklı şekilde gerçekleşir. Sinyal iletimi sonunda apoptosise özgü bir dizi biyokimyasal değişikliklerle hücresel proteinlerin ve DNA'nın parçalanması ile hücre ölümü meydana gerçekleşir (Giansanti vd., 2011; Cavalcante vd., 2019).

2.10.1. Apoptosisde biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler

Genel olarak, apoptosisde üç ana biyokimyasal değişiklik tespit edilir. Bu değişiklikler kaspazların aktivasyonu, DNA ve protein parçalanması, membran değişiklikleri ve fagositoz yoluyla hücre veya hücre parçacıklarının tanınarak ortadan kaldırılmasıdır.

Apoptosisin özelliklerinden biri, kaspaz ailesine ait bir grup enzimin aktivasyonudur. Kaspazlar hedef proteinleri aspartik asit kalıntılarından kesen sistein proteaz ailesidir. Aktive edilen kaspazlar birçok hücreyel hayati proteinin kesilmesini ve nükleer iskelet ile sitoskeletonun parçalanmasını gerçekleştirirler. Ayrıca DNA'yı parçalayan DNAaz enzimini aktive ederler, bu da apoptosise özgü nükleer DNA'nın 180 ila 200 baz çiftinin katları halinde parçalanmasını sağlar (Saraste ve Pulkki, 2000; Pfeffer ve Singh, 2018). Apoptosisin erken evrelerinde, fosfatidilserin translokasyonu gerçekleşir. Bu durum, ölü hücrelerin makrofajlar tarafından erken tanınmasına olanak tanır ve proinflatuar sitokinler salınmadan fagositozun olmasını sağlar.

Biyokimyasal değişiklikler, apoptotik sürecin karakteristik morfolojisini ortaya çıkarır. Bunlar membran blebbing, hücre büzülmesi, kromatin kondensasyonu, DNA parçalanması, fosfatidilserin translokasyonu ve apoptotik cisimlerin oluşmasıdır. Oluşan apoptotik cisimler sonradan makrofajlar tarafından fagositoz yoluyla temizlenir. Apoptosis sürecinde gözlenen tüm bu biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler apoptosis tanısı için kullanılabilir (Cavalcante vd., 2019).

2.10.2. Apoptosis sinyal yolları

Genellikle apoptosis mekanizmasında sinyalin gelmesi ile başlayan ve son hücreyel parçalanmaya kadar geçen süre birkaç saati bulabilir. Ancak, bu süre hücre tipine, uyarana ve sinyal yolağına bağlı olarak değişir.

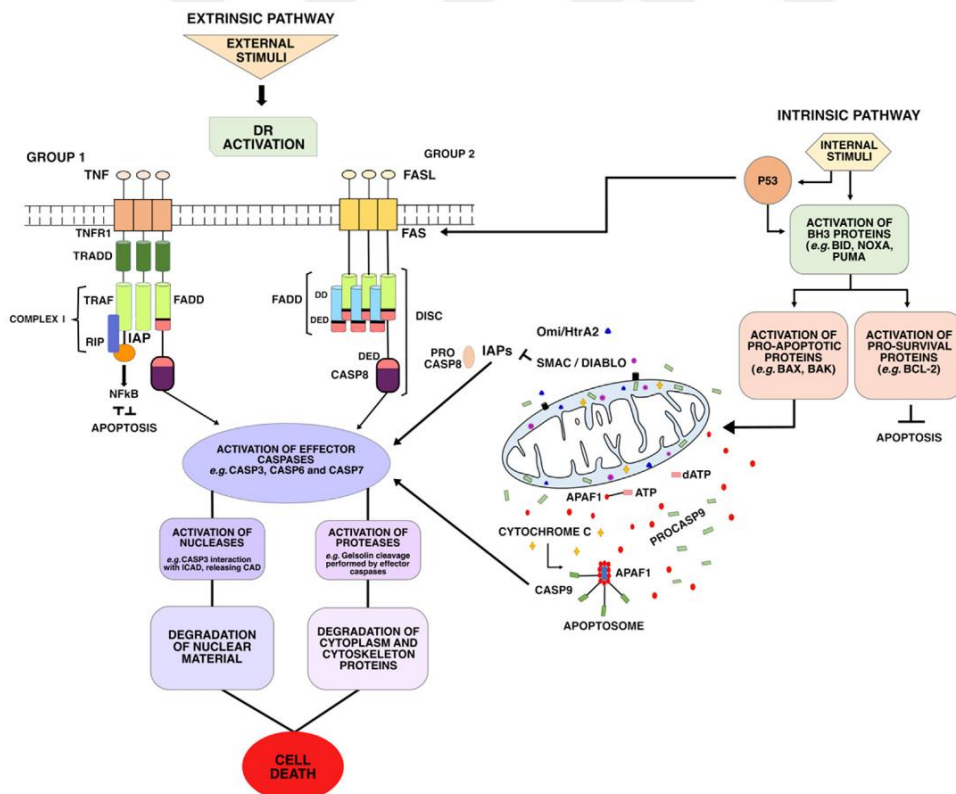
Apoptosis mekanizmasında kritik süreç kaspaz aktivasyonu ile başlar. Kaspaz aktivasyonu iki farklı yolla aktive olabilir. Bunlar, hücre içinden gelen ölüm sinyallerine yanıt veren intrinsik (mitokondriyal) yol ve hücre yüzey membranlarında yer alan tümör nekrozis faktör (TNF) ailesinin reseptörlerinin aktivasyonu tarafından düzenlenen ekstrinsik yoldur (Şekil 2.11). Her iki yol da bir kaspaz kaskadının

aktivasyonu ve nihayet çeşitli sitoplazmik ve nükleer substratların parçalanmasıyla sonuçlanır (Wong, 2011).

Kaspazlar, apoptotik sinyal kaskatlarındaki konumlarına bağlı olarak başlatıcı (kaspaz-8 ve -9) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olarak sınıflandırılır. Kaspazlar, nükleus içindeki DNA'yı kesen endonükleaz gibi farklı yıkım enzimlerini de aktive edebilirler (Hu vd., 2013).

Apoptosis mekanizmalarının, mekanizmada rol alan proteinlerinin ve genlerin tanımlanması, kanser hücrelerinin apoptosise duyarlılığını artırabilen yeni antikanser ajanlar keşfetme ve geliştirme fırsatı sunmuştur (Goldar vd., 2015).

Kanser terapide amaç kanser hücrelerinde apoptosisi indüklemektir. Günümüzde, apoptosisi hedef alan antikanser ilaçlarının geliştirilmesi, apoptosis tarafından indüklenen hücre ölümünün inflamasyona neden olmaması nedeniyle tercih edilen bir durumdur (Vitto vd., 2022).



Şekil.2.11. Apoptosisde intrinsik ve ekstrinsik yolak (Cavalcante vd., 2019).

2.10.3. Apoptosisin kanser tedavisinde kullanılması

Apoptosis, DNA hasarı, hipoksi ve onkogen aktivasyonu gibi hücre streslerine karşı oluşan bir yanıttır. Bu tür stresler, tümörün vasküler bir ağ geliştirmeden önceki erken evrelerinde kanser hücrelerinin karşılaştığı yaygın bir durumdur. Bu erken tümör hücrelerinin apoptosise direnme yeteneği ve bu sayede büyümeye devam etmeleri, kanserin karakteristik bir özelliğidir (Hanahan ve Weinberg, 2000).

Kanserde apoptosise direnç, pro-apoptotik moleküllerin fonksiyon kaybı veya azalan ifadesi ayrıca anti-apoptotik moleküllerin artmış ifadesi veya fonksiyon kazanmış mutasyonları gibi çeşitli yöntemlerle sağlanabilir. Örneğin, mitokondriyal membran geçirgenliğini artıran, pro-apoptotik bcl-2 protein ailesi üyesi olan BAX proteini, kolon ve mide kanserlerinin yarısından fazlasında bir çerçeve kayma mutasyonu tarafından inaktive edilmiştir, bu da tümörün ilerlemesine katkıda bulunan bir mutasyondur. Benzer şekilde, anti-apoptotik Bcl-2 proteini, bazı meme kanserlerinde aşırı miktarda ifade edilmekte ve hastalığın metastatik potansiyeline katkıda bulunmaktadır.

Bcl-2 protein ailesi, 30'dan fazla anti ve pro-apoptotik molekül içerir ve Bcl-2 aile üyelerinin kemoterapiye karşı gelişen dirence katkıda bulunduğunu destekleyen kanıtlar vardır. Aşırı yüksek Bcl-2 ifadesinin, bir çok kemoterapötik ajanın apoptotik etkisini baskıladığı gözlenmiştir (Vitto vd.,2022). Apoptosis inhibitörü olan Bcl-2 protein ailesi üyelerinin aynı zamanda otofajiyi düzenleme işlevleri de vardır. Otofaji mekanizması, pro-apoptotik faktörlerin inaktivasyonu veya anti-apoptotik faktörlerin aktivasyonu yoluyla apoptosis inhibitörü olabilir. Bu durumda, ilaç direncini aşmak için otofaji indüksiyonu kullanılmaktadır. Uzun süreli otofaji, otofajik hücre ölümünü (tip II hücre ölümü) teşvik eder ve bu, apoptosisten (tip I hücre ölümü) veya nekrozdan (tip III hücre ölümü) bağımsızdır. Tümör hücreleri apoptosise direndiğinde, otofajik hücre ölümünün indüklenmesi, sonradan kazanılmış ilaç direncini tetiklemek için de bir yaklaşım olabilir (Gharoonpour vd., 2023).

Apoptosis gibi otofaji de hücrel homeostazın sağlanmasında kritik bir yoldur. Bu nedenle, farklı aktivasyon mekanizmaları ve farklı moleküler kimliğe sahip olmalarına rağmen, birkaç proteinin hem apoptosis hem de otofajiyi kontrol etmek için işbirliği yapması şaşırtıcı değildir (Vitto vd., 2022).

2.11. Otofaji

Otofaji, organellerin hasar görmesi, anormal proteinlerin varlığı ve besin eksikliği gibi birkaç stresli koşul altında meydana gelen hücresel bir parçalama sürecidir. Otofaji, "kendini yeme" anlamına gelir ve iki merkezi ve esas hücresel parçalama sürecinden biridir; diğeri yüksek derecede özelleşmiş ve özgün proteazomal parçalama yolu olan ubiquitin-proteazom sistemidir (Ohsumi, 2014).

Otofaji, uzun ömürlü, hasar görmüş, işlevsel olmayan proteinlerin, protein agregatlarının, oligomerlerin, organellerin parçalanması ve bu sitoplazmik bileşenlerin yenilenmesinden sorumludur. Bu süreç, hücresel homeostazın korunmasına yardımcı olur ve bu materyallerin toksik birikimini önlemek açısından esastır (Tonkin-Reeves vd., 2023). 1980'lerin sonlarına kadar otofaji ile ilgili çalışmalar morfolojik analizlere dayanmaktaydı. 1990'lardan itibaren "moleküler çağ" başladı ve 2016'da Yoshinori Ohsumi, otofajinin genetik temelini aydınlatmada yaptığı katkılar nedeniyle Nobel Tıp Ödülü'ne layık görüldü. Bu yıllar boyunca bir dizi araştırma grubu, otofaji yollarının mayadan insanlara kadar olan hücrelerdeki önemli rolünü araştırmaya katkıda bulundu. Bugün otofaji hücre yaşamı, çoğalması, metabolizması ve gelişimini düzenleyen birincil bir hücresel süreç olarak kabul edilmektedir (Patergnani vd., 2021).

Otofaji, organellerin hasar gördüğü, anormal proteinlerin bulunduğu, besinlerin geri dönüştürüldüğü, stres yanıtlarının ve gelişimin olduğu stresli koşullarda artan önemli bir katabolik süreçtir. Dahası, otofajideki işlev bozukluğu, kanser ve Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörodejeneratif bozukluklar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilidir (Beilankouhi vd., 2023). Otofaji, hücresel homeostazı korumaya katkıda bulunur ve hücrelere stresli koşullara uyum sağlama ve hücre hasar ile hücre ölümünü önleme yeteneği sağlar (Patergnani vd., 2021).

2.11.1. Otofaji türleri ve mekanizması

Normal hücreler, hayatta kalmalarını sağlamak için çeşitli streslere ve saldırılara karşı otofajiyi kullanır (Tonkin-Reeves vd., 2023). Otofaji, hücre içi bir bozulma sürecidir ve mekanizmalarına bağlı olarak üç yaygın türü vardır: makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji.

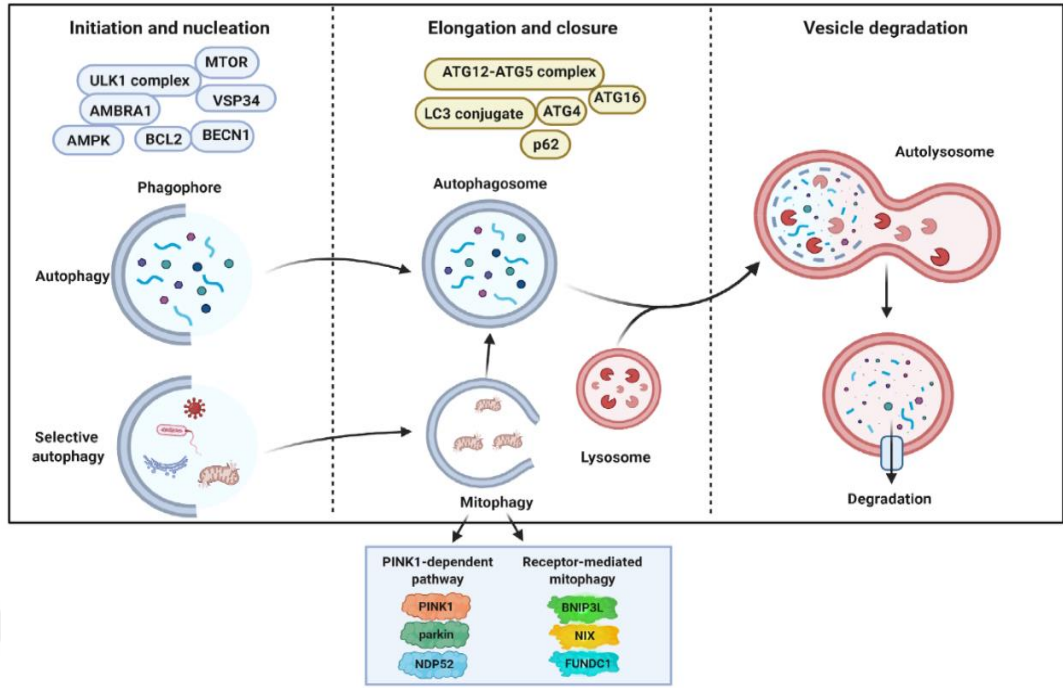
Mikrotofaji, hücre içi bir vakum tarafından yutulmuş küçük sitoplazma parçalarının ve içeriğinin lizozomlara doğru yutulmasına atıfta bulunur. Mikrotofaji terimi, otofaji keşfinden kısa bir süre sonra tanımlanmış olmasına rağmen, moleküler mekanizması ve memelilerdeki hastalıklarla ilişkisi hala belirsizdir.

Makrotofaji sitoplazmik uzun ömürlü proteinlerin ve organellerin lizozomlarca yutulması yoluyla gerçekleşir ve bu mekanizma otofagozom denilen sitoplazmik çift membranlı boşlukların oluşmasıyla gerçekleşir (Mizushima vd., 2008; Ravikumar vd., 2010; Mizushima ve Komatsu, 2011). Ayrıca otofagozom oluşturma süreci, sitoplazmada görünen ve kademeli olarak büyüyerek kapanana kadar, açık uçlu fincan şeklinde bir çift membranlı yapı olan fagoforun ortaya çıkmasını içerir (Şekil 2.14). Fagoforun spesifik proteinlerin etkisiyle kapanması sonucu oluşan otofagozom daha sonra bir lizozomla birleşir ve otolizozom oluşur. Otolizozom oluşumu doğrudan olabilir veya otofagozom başlangıçta geç endozomlarla birleşerek amfizom denilen bir ara yapı formu içerebilir ve ardından amfizomun lizozomlarla birleşmesi gerçekleşir. Lizozomla birleşme sonrası sitoplazmik içerik ve iç otofagozom membranı lizozomal hidrolazlar tarafından bozular (Birgisdottir vd., 2013).

Uzun ömürlü proteinler ve organeller öncelikle özelleşmiş çift membranlı veziküller olan otofagozomlarda yutulur ve ardından bunlar lizozomlara gönderilir ve ardından bozular. Otofagozomların lizozomlara olan sürekli akışı bir dizi protein tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir.

Otofaji, otofagosomların oluşturulması ve bunların lizozomlarla birleşerek füzyona geçmesi süreçlerinde karmaşık adımlar içerir. Bu süreç, başlatma, uzama, lizozomal füzyon ve bozunma aşamalarını içerir (Şekil 2.12).

Otofaji aktivasyonu, yaklaşık 40'tan fazla otofaji ile ilgili (ATG) proteininin varlığını gerektirir ve bunların yaklaşık 19'u otofagozom oluşturmakta görev alır (Vitto vd., 2022). Bu proteinlerden biri olan LC3, başlangıçta sitoplazmada çözünebilir bir formda bulunur (LC3-I) ve daha sonra bir lipidleşmiş forma (LC3-II) dönüştürülür, otofagozom membran ile birleşir ve nihayetinde, LC3 ve onun dönüşümü hücrelerdeki otofaji hızı ve hacmi için bir ölçü olarak kullanılır (Eng vd., 2010; Yang vd., 2009).



Şekil 2.12. Otofaji mekanizmasının aşamaları (Patergnani vd., 2021).

Şaperon aracılı otofaji (CMA), bir kargo proteininin lizozomal membran boyunca bireysel translokasyonuna dayanan bir otofaji türüdür. CMA'da diğer iki otofaji mekanizmasının aksine, lizozomal yollarda vezikül oluşumu gerçekleşmez. Substrat proteinleri doğrudan lizozom membranını geçerek lizozomal lümene girerler. Bu otofajik yolla parçalanmış proteinler, KFERQ benzeri bir tanıma motifine dayalı olarak seçilir (Assaye ve Gizaw., 2022).

2.11.2. Otofajik hücre ölümü

Otofajiye bağlı hücre ölümü tanımı, otofaji tarafından neden olunan, artan otofajik akışa sahip ancak artan apoptosis veya nekroptoza sahip olmayan ve otofaji inhibisyonunun hücre ölümünü baskıladığı bir hücre ölüm türünü tanımlamak için ortaya konmuştur (Marino vd., 2014). Otofaji, tip II programlanmış hücre ölümü olarak kabul edilir ve ATG proteinlerinin fonksiyonunu gerektirir.

Otofaji, apoptosis yokluğunda gerçekleşen bir hücre ölüm mekanizması olarak işlev görebilirken, birçok çalışma tedavi sonrasında otofaji ve diğer hücre ölüm mekanizmalarının eşzamanlı olarak aktive olduğunu göstermektedir (Rebecca ve Amaravadi, 2015).

Programlanmış hücre ölümü (PHÖ), apoptosis, otofaji ve programlanmış nekrozla ilgili olarak, bir hücrenin herhangi bir patolojik durumda bir hücre programı aracılığı ile ölümüdür. Bu PHÖ'nün üç biçimi, kanser neoplazm hücrelerinin kaderini ortaklaşa belirleyebilir; apoptosis ve programlanmış nekroz hücre ölümüne her zaman katkıda bulunurken, otofaji pro-hayatta kalma veya pro-ölüm rolleri oynayabilir (Ouyang vd., 2012).

Apoptosis yokluğunda otofaji, apoptosisten farklı bir türde programlanmış hücre ölümüne katılabilir (Levine ve Yuan, 2005). Aslında otofaji, normal ve kanser hücrelerinde ölüm veya hayatta kalma rolü olan çok karmaşık bir süreçtir ve bazen zıt etkilere sahiptir. Bu nedenle, otofajinin kanser oluşumu ve kanser tedavisindeki etkisini tam olarak tanımlamak zordur. Ayrıca, otofaji düzenleyicileri ile pro-hayatta kalma/ölüm faktörleri arasındaki etkileşim, hücrenin nihai kaderini belirlemek için birbirleriyle etkileşime giren bir dizi sinyale yol açar, bu da apoptosis/otofaji paradoksu olarak adlandırılır (Giansanti vd., 2011).

2.11.3. Otofajinin kanserdeki rolü

Otofaji, hücre sel besinleri yeniden üretir, metabolitleri geri dönüştürür ve çok basamaklı sinyalleşme yolları ile lizozomal bozunma mekanizmalarını kullanarak homeostazı sürdürür. Tümör hücrelerinde otofajinin hem tümör baskılayıcı hem de tümör teşvik edici olarak iki yönlü bir rol oynadığı gösterilmiştir, bu da kanser tedavisi için yeni terapötik stratejilerin keşfine yol açmıştır. Bu nedenle, kanser ilerlemesi sırasında otofajinin düzenlenmesi esastır (Gharoonpour vd., 2023).

Otofajinin çift rolünü göz önüne aldığımızda, kanserin farklı evrelerinde hem aktivatörlerin hem de inhibitörlerin kanser karşıtı bileşikler olarak etkili olabileceği şaşırtıcı değildir (Patergnani vd., 2021). Ancak bu çift rolleri, otofajiyi kanser tedavisi için modüle etmekte büyük bir zorluk oluşturmuştur.

Fizyolojik olarak otofaji, metabolik stres yanıtı olarak indüklenir ve bu nedenle açlıkla birlikte ER stres indükleyicileri de otofajiyi teşvik edebilir. Otofajinin tümör teşvik etme etkisine karşılık olarak, otofaji inhibitörleri tümör büyümesini azaltmıştır. Otofaji modulatorlerinin farklı terapötik ajanlarla kombinasyonunun tümör büyümesini sinerjik olarak baskıladığı ve kanser tedavisine hastanın yanıtını artırdığı bulunmuştur.

Teorik olarak, yüksek otofaji aktivitesine veya otofaji bağımlılığına sahip tümörlerin, otofaji inhibisyonuna daha duyarlı olması muhtemeldir. Dahası, bazı otofaji ile ilgili proteinlerin otofaji bağımsız rolleri vardır ve bu nedenle, otofaji modülasyonu diğer biyolojik fonksiyonları etkileyebilir (Lim vd., 2011).

Otofaji, ileri evre kanserlerde organel ve proteinleri parçalayarak kanser hücrelerinin çoğalması ve hayatta kalmasını destekler. Preklinik çalışmalar, mevcut bir tümör içinde tümör hücresi otofajisinin ve ev sahibi hücre otofajisinin bir araya gelerek tümör büyümesini desteklediğini belirlenmiştir. Giderek artan bir kanıt, otofajinin inhibe edilmesinin kemoterapi, hedefli tedavi veya immünoterapi etkinliğini artırabileceğini göstermektedir (Jain vd., 2023). Otofajiyi inhibe edebilen birkaç ilaç olmasına rağmen, bu ilaçların çoğu özgüllük ve antitümör aktivite eksikliğine sahiptir (Yang vd., 2011).

Apoptosis gibi, otofaji hedefleme kanser tedavisinde dikkat çeken bir konu olmuştur. Ancak otofajinin tümörlerde hem hücrelerin hayatta kalması hem de hücre ölümüne neden olan fonksiyonlara sahip olması, mekanizmanın ve mekanizmada rol alan hedeflerin daha fazla açıklığa kavuşturulmasını gerektirmektedir (Debnath vd., 2023).

2.11.4. Apoptosis ve otofaji arasındaki ilişki

İki programlanmış hücre ölüm yolu olan apoptosis ve otofaji, gelişim ve homeostaz için iki temel türdür. Birçok durumda, otofaji ve apoptosisın sıralı veya eş zamanlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu iki yol arasında üç farklı ilişki tanımlanmıştır: Otofaji, apoptosis ile işbirliği yaparak ölümü teşvik edebilir, apoptosise karşı çıkarak hayatta kalmayı destekleyebilir, apoptosisın bir veya daha fazla aşamasına katılarak apoptosise imkan sağlayabilir (Eisenberg-Lerner vd., 2009; Giansanti vd., 2011; Beilankouhi vd., 2023).

Otofaji ve apoptosis arasındaki etkileşim, malign hücrelerin hayatta kalması veya ölümünü nasıl etkilediği, kanser tedavisinin karşılaştığı zorluklar arasında temel bir öneme sahiptir. Bir hücrenin Apoptosis, otofaji veya nekroptozu gitme kararı, enerji/ATP seviyeleri, hasarın veya stresin derecesi ve belirli yolların inhibitörlerinin varlığı (örneğin, kaspaz inhibitörleri) gibi çeşitli faktörler tarafından düzenlenir. Örneğin ATP tükenmesi otofajiyi aktive eder (Su vd., 2015).

Otofaji için gerekli Atg5 proteini, parçalanabilir ve apoptozu indüklemek üzere işlev görebilir. Benzer şekilde, apoptosis inhibitörleri olan Bcl-2 ailesi proteinleri ve apoptosisi aktive eden p53 proteini, aynı zamanda otofajiyi düzenleyen işlevlere sahiptir (Tasdemir vd., 2008). Apoptotik yolun diğer bileşenlerinin de otofajinin düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Örneğin, tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptosis indükleyici ligand (TRAIL) (Mills vd., 2004), Fas ile ilişkili ölüm domaini (FADD) (Thorburn vd., 2005), ölüm ile ilişkili protein kinazı (DAPk) ve DAPk ile ilişkili protein kinaz (DRP-1) (Inbal vd., 2002).

Son çalışmalar, ayrıca diğer ATG proteinlerinin apoptotik yolun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini göstermiştir. Özellikle, ATG12–ATG3 kompleksinin, otofajiden bağımsız bir şekilde apoptosisi düzenleyebileceği rapor edilmiştir (Vitto vd., 2022).

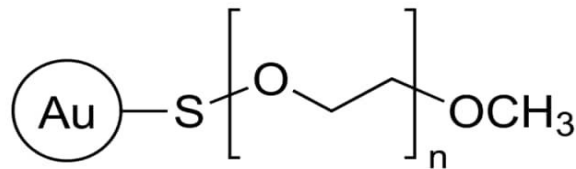
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Absolute ethanol (BDH, England), acridine orange, ethidium bromide (Sigma-Aldrich, USA), ampicillin and streptomycin (TROGE, Germany), crystal violet (Sigma Aldrich, USA), DMSO (Sigma Aldrich, USA), formalin (10%) (BDH, England), methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich, USA), phosphate buffer saline (PBS) (BDH, England), Rosswell Park Memorial Media -1640 (RPMI) (Usbiological, USA), sodium bicarbonate (Fluka, Switzerland), trypan blue (Pharmacia Fine Chemical, Sweden), trypsin-EDTA (Biological, USA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), fetal calf serum (FCS) ve doxorubicin (Sigma-Aldrich, USA)'den temin edildi.

3.2. Kullanılan Gold Nanoparticles (GNPs-AuNPs)

Bu çalışmada kullanılan altın nanopartiküller (AuNPs) Sigma-Aldrich (USA) firmasından polietilen glikol (PEG) kaplı olarak satın alındı. Nanopartiküllerin polietilen glikol (PEG) ile kaplanması, protein adsorpsiyonunu azaltan, hücrelerle spesifik olmayan etkileşimleri en aza indiren ve nanopartiküllerin (NP'ler) agregasyonunu önleyerek parmakokinetik özelliklerini arttıran özellikler sağladığı için, kullanılan altın nanopartiküller PEG kaplı olarak temin edildi. Ayrıca PEG-5000 ile kaplanmış AuNP'lerin maksimum koloidal stabilite göstererek mükemmel bir biyoyumluluk gösterdiği bildirilmişti (Chen vd., 2022). Bu nedenle AuNP'ler 1 mL'lik cam kaptaki paketlenmiş su içinde dağıtılmış şekilde PEG-5000 kaplı olarak temin edildi. Kullanılan AuNP'lerin kimyasal yapısı Şekil 3.1'de gösterildi. Kullanılan GNP'lere ait daha ayrıntılı bilgi Çizelge 3.1'de gösterildi.



Şekil 3.1. Kullanılan GNP'lerin kimyasal yapısı.

Çizelge 3.1. Kullanılan GNP’lerin fiziksel ve kimyasal özellikleri.

NO	Test	Özellik
1	Görünüm (Renk)	Koyu kırmızı
2	Görünüm (Form)	Sıvı
3	Kaplama materyali	Polyethylene Glycol (5000)
4	Absorbans	$\lambda_{\max}$ 525 nm
5	Çap	10nm
6	Fonksiyonel grup	Methoxy
7	Formül	Au
8	Saklama sıcaklığı	2-8 °C
10	pH	8

3.3. Kullanılan Kitler

TNF- α düzeyini saptamak için kullanılan, TNF α -ELISA kiti Elabscience (E-EL-H0109, USA) firmasından, apoptosisi saptamak için kullanılan Human Apoptosis Signaling Pathway kiti Raybiotech (AAH-APOSIG-1-2, USA) firmasından temin edildi. Kitler temin edildikten sonra, kit içeriğindeki bazı solüsyonlar (antibadiler ve referans örnekler gibi) firmanın önerdiği şekilde -20°C’de, yıkama ve durdurma solüsyonları gibi bazı numuneler ise kullanılabilecek kadar +4°C’de saklandı.

3.4. Kullanılan Hücre Hatları

Bu tez çalışmasında, insan meme kanseri hücre hattı olarak MCF-7 (Michigan Cancer Foundation – 7) ve AMJ13 (Ahmed Majeed 13) hücreleri, kontrol grubu olarak sağlıklı hücre hattı REF (rat embriyo fibroblast cell line) hücreleri kullanıldı. Her üç hücre hattı da Al- Mustansiriyah Üniversitesi Hücre Bankası, Irak’dan (Resource Bank of ICCMGR, University of Al-Mustansiriyah, Baghdad, Iraq) temin edildi.

MCF-7, dünya genelinde en yaygın kullanılan meme kanseri hücre hattıdır. İlk kez 1970 yılında malign meme kanseri olan 69 yaşındaki bir kadından izole edilmiştir. (Soule vd., 1973). MCF-7 hücre hattı, östrojen reseptörü (ER) pozitif, progesteron

reseptörü pozitif ve HER2 negatif özelliklere sahip olup, kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir model görevi görür.

AMJ-13 meme kanseri hücre hattı ilk olarak 2013 yılında Irak Kanser ve Tıbbi Genetik Araştırma Merkezi'nde Ahmed Majeed AL-Shammari tarafından elde edildi. Bu hücre hattı, 70 yaşındaki Iraklı bir kadının duktal karsinom tümöründen izole edildi. AMJ-13 hücreleri, çok kutuplu epitel benzeri morfolojiye sahip olup, östrojen reseptörü ve progesteron reseptörünün ifadesinden yoksundur (Al-Shammari vd., 2015).

REF (Sıçan Embriyonik Fibroblastları) hücre hattı, 14. gün sıçan embriyolarından izole edilmiştir. REF hücreleri, in vitro kültürlendiğinde, fibroblastların tipik bir özelliği olan iç şeklini gösterir. İnsan dokularının aksine çoğu fare dokusunda aktif telomeraz bulunur. Telomeraz aktivitesi erken embriyolarda mevcuttur ancak seviyesi farklı gelişim aşamalarına göre değişir. Bu dokularda telomerazın varlığı, birincil fare hücrelerinin kültürdeki insan hücrelerine göre ölümsüzleştirilmesinin kolaylığını sağlar (Supp vd., 2022).

3.5. Hazırlanan solüsyonlar

3.5.1. Hücre kültür ortamı

MCF7, AMJ13 ve REF hücre hatları, RPMI-1640 ortamında kültüre alındı. Hücre kültür ortamı, yaklaşık 600 mL, üç kez damıtılmış suda (TDS) 16.4 g RPMI-1640 çözülerek hazırlandı. Ortamın pH değerı hidroksietil piperazin etan sülfonik asit (HEPES) tamponu kullanılarak pH 7.4'e ayarlandı.

Ortama, 100 ml Fetal Calf Serum (FCS), 2.2 g sodyum bikarbonat , 1 mL L-glutamin, 100 mg/mL streptomisin ve 100 mg/mL ampicilin eklendi. Son hacmi TDS ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan besiyeri, steril bir ortamda 0.2 µm Nalgene filtre ünitesi kullanılarak sterilize edildi. Hazırlanan besiyeri, kontaminasyon riskini kontrol etmek amacıyla 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli bir inkübatörde 3 gün boyunca inkübe edildi ve sonraki kullanımlar için 4°C'de saklandı (Freshney vd, 2015; Wen vd, 2023).

3.5.2. Fosfat tamponu (PBS)

1 litre Fosfat Tamponu (PBS) hazırlamak için, 10.8 g PBS tozu 1000 mL TDSu içinde çözüldü. Tamponun pH değeri 7.2'ye ayarlandı. Çözelti, 0.22 µm gözenek boyutuna sahip Nalgene filtre üniteleri kullanılarak süzüldü ve sterilize edilmiş şişelere aktarıldı. Şişeler, kullanıma kadar 4°C' deki buzdolabında saklandı ve kullanımdan önce pH 7.2 olarak doğrulandı.

3.5.3. Trypsin-EDTA solüsyonu

Trypsin/EDTA, yapışık hücreleri bir kültür yüzeyinden ayırmak için kullanıldı. Hücreler flask yüzeyini %80 kapladığında Trypsin-EDTA ile yüzeyden kaldırıldı ve 1/2 veya 1/3 oranında pasajlanarak çoğaltıldı. Trypsin-EDTA çözeltisi hazırlamak için, 10 g tripsin-EDTA tozu 1000 mL PBS tamponunda (pH 7.2) çözüldü. Daha sonra çözelti, 0.22 µm gözenek boyutuna sahip Nalgene filtre üniteleri ile süzülerek streil edildi ve aseptik koşullarda steril şişelere aktarıldı. Kullanıma hazır olana kadar -20°C'de saklandı (Supp vd., 2022).

3.5.4. MTT solüsyonu

MTT, suda çözünebilen sarı bir tetrazolium tuzudur. MTT çözeltisi, hücre sitotoksitesini belirlemek için kullanıldı. MTT (Methyl Thiazolyl Tetrazolium) boyası (Sigma-Aldrich, USA), 5 mg/ml konsantrasyonda PBS tamponunda hazırlandı. Hazırlanan çözelti, 0.22 µm gözenek boyutlu Millipore filtre ile süzülerek steril edildi ve temiz bir tüpe aktarıldı. Çözeltiyi doğrudan ışıktan korumak için tüp alüminyum folyo ile sarıldı ve 4 °C'de kullanıma kadar saklandı. MTT çözeltisi her deney için taze hazırlandı (Freshney vd., 2015).

3.5.5. Kristal viyole boyası

Kristal viyole ile boyama, koloni oluşumunu gözleyerek sitotoksiteyi saptamak için kullanıldı. Kristal viyole boyası hazırlamak için, 5 g kristal viyole boyası 200 mL metanol içinde çözüldü. Çözelti daha sonra bir No.1 Whatman filtre kağıdı kullanılarak süzüldü. Ardından, çözeltiye 50 mL %37 formaldehit eklenerek, karışımın nihai hacmi TDSu eklenerek 1000 mL'ye tamamlandı. Elde edilen karışım bir kez daha No.1 Whatman filtre kağıdı ile süzüldü (Confortin vd., 2010).

3.5.6. Antibiyotikler

1 g streptomisin 5 mL TDSu içinde çözüldü, ve 1 g ampisilin 5 mL TDSu içinde çözüldü. Daha sonra, her bir antibiyotik çözeltisinden 0.5 mL 1L kültür ortamına eklendi (Freshney vd, 2015).

3.6. Yöntemler

3.6.1. GNP-TNF- α komplekslerinin hazırlanması ve optimizasyonu

PEG kaplı altın nanopartiküller ve TNF- α , Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edildi. Bu aşamada, ilk olarak % 0.45'lik NaCl içerisinde 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konsantrasyonda stok TNF- α çözeltisi hazırlandı. Ardından, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konsantrasyonda stok GNP çözeltisi hazırlandı.

TNF- α 'nın GNP yüzeyine bağlanmasında zamanın ve konsantrasyonun etkisini belirlemek için 2 farklı konsantrasyon (1/5 ve 1/10) ile 24 ve 48 saatlik iki zaman aralığı çalışıldı. Bunun için 10 ng/mL TNF- α çözeltisinden 1 ml ve 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GNP çözeltisinden 4 ml alınarak, 1/5 oranında bir karışım ile 10 ng/mL TNF- α çözeltisinden 1 ml ve 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GNP çözeltisinden 9 ml alınarak 1/10 oranında başka bir karışım hazırlandı. Yapılan çalışmalarda, TNF- α 'nın GNP yüzeyine sistein kalıntılarındaki sülfidril gruplarından kovalent olarak bağlandığı ve bu bağlanmanın pH 8 olan ortamda daha kolay ve verimli olduğu rapor edildiği için (Paciotti vd, 2004; Paciotti vd, 2006), biz de çalışmamızda TNF- α -GNP karışımlarının pH'sını 8'e ayarladık ve örnekleri 24 ve 48 saat inkübe ettik.

İnkübasyondan sonra, fazla TNF- α 'nın kompleksten uzaklaştırılması için karışımlar 15 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi. TNF- α ve GNP'ler arasındaki bağlanma, UV-VIS spektroskopisi, Taramalı transmission mikroskopisi (TEM) ve ELISA yöntemi kullanılarak analiz edildi.

Analizden sonra, en iyi bağlanma süresine (24 saat) ve konsantrasyona (1/5) sahip örnekler, ileri deneyler için seçildi.

3.6.2. GNP-TNF α -Doksorubisin komplekslerinin hazırlanması

1 mg/mL Doksorubisin steril distile su içinde çözülerek stok çözelti olarak hazırlandı. 1 mg/mL Doksorubisin çözeltisinin 1 ml'si, 1:5 oranında TNF α -GNP karışımından 9 ml alınarak (1/10) karıştırıldı ve gece boyunca çalkalanarak inkübe edildi. Ardından bağlanmamış doksorubisini uzaklaştırmak için nanopartiküller 13.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi (Jabir vd., 2019). Pellet daha sonra deiyonize su içinde yeniden süspansiyon haline getirilerek TEM ve UV-Vis spektroskopisi kullanılarak analiz edildi.

3.6.3. Hazırlanan GNP komplekslerinin karakterizasyonu

3.6.3.1. Ultraviyole-görünür spektroskopi

Ultraviyole ve görünür emilim spektroskopisi, elektromanyetik radyasyonun emici bir madde tarafından soğurulmasını ölçmek için kullanılan bir cihazdır. UV-görünür spektroskopi ile her bileşiğin kendine özgü absorpsiyon spektrumu çıkarılarak moleküllerin nicel ve nitel analizi yapılabilir. GNP, GNP-TNF- α ve GNP-TNF- α -Dox çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları 200-1100 nm aralığında UV/Vis spektrofotometre (Meterch SP-8001, Tayvan) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.6.3.2. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM)

Transmisyon elektron mikroskobu, nanopartiküllerin morfolojik özelliklerini incelemek için kullanıldı. TEM, bir örneğin içinden bir elektron demeti ileterek görüntü oluşturan mikroskopi tekniğidir. Bu çalışmada TEM, komplekslerin nanometre ölçeğindeki morfoloji ve yapılarını görüntülemek için, UV analizi ise komplekslerin emilim ve optik özellikleri hakkında bilgi edinmek için kullanıldı.

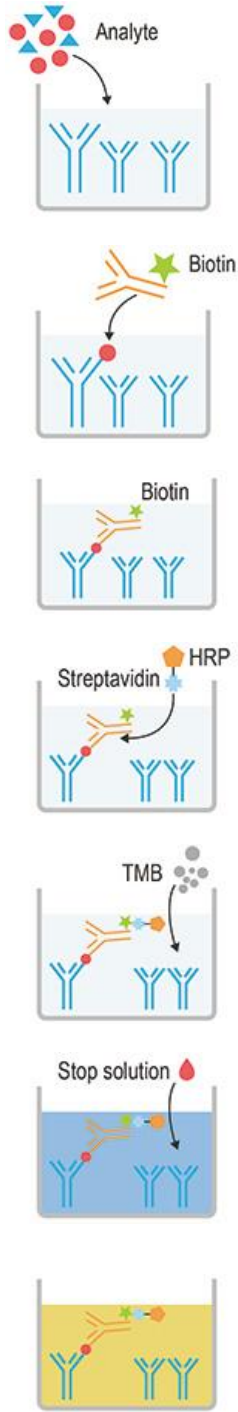
TEM analizi için GNP, GNP-TNF- α ve GNP-TNF- α -Dox çözeltilerinden alınan 10 μ L'lik örnekler, bir bakır ızgaraya damlatılarak hazırlandı (Khashan vd., 2018). Örnekler daha sonra TEM (Philips, ABD) altında görüntülendi.

3.6.3.3. GNP yüzeyine bağlanmış TNF- α 'nın ELISA yöntemi ile kontrolü

GNP yüzeyine bağlı TNF α varlığı ve miktarı rh TNF α antibodisi içeren ELISA kiti (Elabscience, USA) kullanılarak saptandı. Bu yöntem için ilk olarak GNP'ler (10

$\mu\text{g/mL}$), TNF- α (10 ng/mL) ile 5:1 ve 10:1 oranında pH 8 olan ortamda karıştırıldı ve 24 saat inkübe edildi. Örnekler daha sonra 10.000 rpm de 15 dk santrifüj edilerek pellet ve süpernatant ELISA kitinde kullanılmak üzere ayrıldı. ELISA yönteminde ilk olarak kitin içerisinde çıkan standart ve test bileşiklerinden 100 μL 'lik örnekler kuyucuklara dağıtılarak mikrotipler 37°C'de 90 dakika inkübe edildi. Bu aşamada plak yüzeyine immobilize edilmiş anti- TNF α primer antiserumu ile örneklerdeki serbest TNF α 'nın bağlanması sağlandı. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki ekstra sıvı atıldı ve örnekler üzerine 100 μL biyotinli seconder antiserum eklenerek 37°C'de 60 dk inkübe edildi. Bu bağlanma basamağından sonra yüzeydeki sıvı aspire edildi ve ardından kuyucuklar birkaç kez yıkandı. Sonrasında ortama streptavidin bağlı HRP konjugatından 100 μL eklenerek mikrotipler 37°C'de 40 dk inkübe edildi ve kuyucuklar beş kez yıkandı. Ardından ortama 90 μL substrat eklenerek renk oluşması için 15 dk beklendi. Sonuçta oluşan renk 450 nm ELISA okuyucusunda (Organon Teknika, Austria) okunarak GNP yüzeyine bağlı ve bağlı olmayan TNF α miktarı saptandı.

Yöntemin uygulanmasına ait tüm basamaklar Şekil 3.2'de şematize edildi ve aşağıda sırasıyla açıklandı.



1. Kuyucuklara 100µL standart ve örnekler eklenerek 37°C’de 90 dk inkübe edildi.
2. Üst sıvı atıldı ve ardından 100µL Biotinli sekonder antibadi eklendi. 37’de 60 dk inkübe edildi.
3. Aspirasyon ve ardından 3 kez yıkama yapıldı.
4. 100µL HRP konjugatı eklendi ve 37°C’de 30 dk beklendi. Ardından kuyucuklar 5 kez yıkandı.
5. 90µL Substrat reaktifi eklendi. 37oC’de 15 dk inkübe edildi.
6. 50µL Durdurma solüsyonu eklendi.
7. 450nm’de okuma yapıldı

Şekil.3.2. ELISA yönteminde uygulanan basamaklar.

3.6.4. Hücre hatlarının çoğaltılması

İnsan meme kanseri hücre hatları MCF7, AMJ-13 ve REF hücreleri, Irak, Bağdat'taki ICCMGR Kaynak Bankası'ndan temin edilmiştir. Hücreler, 37°C su banyosunda hızlı çözme ile geri kazanılmış ve ardından 10 dakika boyunca 800 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra hücreler, 5 mL RPMI-1640 kültür ortamında süspansiyon haline getirilmiş ve T25 doku kültürü flasklarına aktarılmıştır. Daha sonra flasklar, 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Tüm hücre hatları, %1 L-Glutamin, 25 mM HEPES tamponu, 100 µg/mL streptomisin/ampisilin ve %10 FBS içeren RPMI-1640 ortamında, %5 CO₂ ve %95 nem varlığında 37°C'de kültüre edilmiştir.

Hücreler flask yüzeyini yaklaşık % 80 kapladığında 1/2 veya 1/3 oranında pasajlanarak çoğaltılmıştır. Bunun için ilk olarak eski ortam flasktan alınmış ve yapışan hücreler fosfat tamponlu (PBS) ile iki kez yıkanmıştır. Hücreler daha sonra trypsin-EDTA çözeltisi kullanılarak flask yüzeyinden kaldırılmıştır. Trypsin aktivitesi, süspansiyon sonrası FBS içeren besi yeri eklenerek durdurulmuş ve hücreler yeni flasklara dağıtılmıştır. Hücre hatlarının üstel büyümesini sürdürebilmek adına kültürler her üç günde bir alt kültüre alınmıştır.

3.6.5. Sitotoksitesite testi: MTT test

MTT testi, hücresel metabolik aktivitenin bir göstergesi olarak hücre canlılığını, çoğalmasını ve sitotoksitesitesini belirlemede kullanılan bir yöntemdir. (MTT), sarı renkli, suda çözünen bir tetrazolyum tuzudur. MTT testi, nikotinamide adenine dinükleotit fosfat (NADPH) bağımlı hücresel oksidoreduktaz enzimlerinin tetrazolyum boyası MTT'yi suda çözünmeyen mor formazan kristallerine indirgeme yeteneğine dayanır. Toplamda, üretilen formazan miktarı kültürdeki canlı hücre sayısı ile doğrudan orantılıdır. Bu nedenle, MTT testi, hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılan standart bir yöntem haline gelmiştir (Lim vd, 2015).

Bu çalışmada, GNP, TNF α , Dox, TNF- α yüklenmiş GNPs ve GNP-TNF α -Dox'in sitotoksitesitesi MTT testi ile ölçüldü. İlk olarak, hücreler 96 kuyucuklu plakalara 1x10⁴ hücre/100 µL konsantrasyonunda ekildi ve bir gece boyunca inkübe edildi. Daha

sonra, test bileşiklerinin (GNP, TNF α , Dox, TNF- α yüklenmiş GNPs ve GNP-TNF α -Dox) farklı konsantrasyonları kültür ortamına eklenerek ve her kuyucuktaki son hacim besi yeri ile 200 μ L'ye tamamlandı. Hücreler % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren ortamda 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyucuklar PBS ile yıkandı. Daha sonra, her bir kuyucuğa 5 mg/mL MTT çözeltisinden 20 μ L eklenerek hücreler 3 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, tüm kuyucukların içeriği aspire edildi. Ardından, her bir kuyucuğa 100 μ L dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek formazan kristallerinin çözülmesi için 15 dakika inkübe edildi (Al-Ziaydi vd., 2020). Her kuyucuğun absorpsiyonu, bir mikropilaka okuyucu (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak 492 nm'de ölçüldü.

Elde edilen absorpsiyon değerleri, hücre canlılığını veya sitotoksisiteyi hesaplamak için kullanıldı. Sitotoksisite yüzdesini belirlemek için kullanılan denklem aşağıda gösterildi.

$$\text{Sitotoksisite \%} = \frac{A-B}{A} \quad (3.1)$$

Burada A, kontrolün absorpsiyonu, B ise test edilen örneklerin absorpsiyonunu temsil eder (Jabir vd, 2019).

Hücre büyümesini %50 inhibe eden madde konsantrasyonu olan IC₅₀ değeri, çalışılan her bir konsantrasyonun logaritmasına karşılık % canlılık değerlerini kullanarak GraphPad 9 yazılım programı ile hesaplandı. MTT testlerinde her deney 3 tekrar, her konsantrasyon ise 5 tekrar olacak şekilde çalışıldı.

3.6.6. Klonojenite test sistemi

Klonojenite test flask yüzeyine yapışarak üreyen hücrelerin, üreme ve koloni oluşturma kapasitelerinin saptandığı bir sitotoksisite testidir. Bu testte, öncelikle MCF-7, AMJ-13 ve REF hücreleri, 24 kuyucuklu plaklara 10⁴ hücre/mL yoğunluğunda ekildi. 24 saat bekledikten sonra hücrelere GNP, TNF α , GNP-TNF α , Dox, GNP-TNF α -Dox bileşenlerinin IC₅₀ konsantrasyonları eklendi ve ardından 48 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler, PBS ile üç kez yıkandı. Hücre kolonileri mutlak etanol kullanılarak sabitlendi. Ardından, plaklar 50 μ L kristal viole boyası

(Sigma–Aldrich, ABD) ile boyandı ve 37°C’de 10-15 dakika inkübe edildi. Sonrasında hücreler aşırı boyayı çıkarmak için distile su ile yıkandı ve inverted mikroskop altında görüntülendi (Franken vd., 2006).

3.6.7. Apoptosis tanısı için AO/EtBr ile boyama

Acridine orange (AO) ve ethidium bromide (EtBr) AO/EtBr boyaması, Apoptosis u değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. AO/EtBr boyaması, çekirdek morfolojisindeki ve DNA bütünlüğündeki değişikliklere dayanarak canlı, apoptotik ve nekrotik hücreleri ayırt eder. Apoptosise girmemiş hücreler yeşil renkteyken, apoptotik hücreler turuncu veya kırmızı renkte olur (Taates vd., 2008).

Acridine orange, hem canlı hem de ölü hücrelere nüfuz edebilen floresan bir boyadır. AO, hücreye girdiğinde DNA ile etkileşebilme yeteneğinden dolayı çekirdeği yeşil renkte boyar. Canlı hücrelerde, yeşil floresans çekirdek boyunca eşit olarak dağılmıştır. Öte yandan, ethidium bromür, sağlam plazma membranına nüfuz edemeyen ancak hasar görmüş membranlara sahip hücrelere girebilen bir floresan boyadır.

AO/EtBr boyamasında erken apoptotik hücreler yeşile boyanır ve kromatin kondansasyonu ve nükleer fragmentasyondan dolayı nükleusta parlak yeşil noktalar görünür. Geç apoptotik hücrelerde EtBr hücreye girdiği için turuncu veya kırmızı görünür. Nekrotik hücrelerin aksine geç apoptotik evrede sıklıkla nükleer fragmentasyon ve kondensasyon oluşur. Nekrotik hücreler turuncuya boyanır fakat nükleer morfoloji canlı hücrelere benzer (Kasibhatla vd., 2006; Taates vd., 2008).

GNP’lerin ve GNP komplekslerinin MCF-7, AMJ-13 ve REF hücrelerinde apoptosisi u tetikleme potansiyeli, AO/EtBr çift boyama yaklaşımı kullanılarak değerlendirildi (Kasibhatla vd., 2006). Bu yöntemde öncelikle MCF-7, AMJ-13 ve REF hücreleri, 10⁴ hücre/kuyucuk yoğunluğunda 96 kuyucuklu bir plakaya ekildi. 24 saatlik inkübasyon süresini takiben hücrelere GNP, TNF- α , Dox, GNP-TNF- α ve GNP-TNF- α -Dox bileşenlerinin IC50 konsantrasyonları uygulandı ve ardından 24 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler, 1 μ g/ml AO/EtBr ile 2 dakika boyunca 37°C’de boyandı ve floresan mikroskop (Olympus, Japon) altında gözlemlendi.

3.6.8. Otofajinin akışkan hücre sitometresi (flow sytometer) ile saptanması

Otofajinin saptanması hücre içi LC3-II protein seviyesinin belirlenmesini temel alır. LC3-II otofaji mekanizması için elzem olan otofagozom biyogonezinde görev alan bir proteindir. Bu nedenle LC3-II seviyesi belirli bir uyarana indüksiyonda oluşan otofagozomların miktarını temsil eder. LC3 proteinine özgü primer ve sekonder antibadiler kullanarak floresans işaretleme tekniği ile hücre içi LC3 düzeyini akışkan hücre sitometresi (flow sitometre) kullanarak saptadık. Bunun için sırasıyla;

1. MCF7 ve AMJ13 meme kanseri hücre hatları 6 kuyucuklu plaklara ekildi ve her bir test grubunun (GNPs, TNF- α , Dox, GNPs-TNF- α , GNPs-TNF α -Dox) daha önce hücreye özgü saptadığımız IC50 dozları ile 48 saat inkübe edildi.
2. Hücreler üzerine % 0.25'lik Tripsin-EDTA solüsyonundan 1 ml eklenerek 1-2 dk içinde hücrelerin kuyucuk yüzeyinden kalkması sağlandı. Sonrasında hücrelerin üzerine %1 bovine serum albumin (BSA) içeren pH 7.4 Fosfat tamponundan (PBS/BSA) 2 ml eklenerek hücreler toplandı ve yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerlerine 5 ml PBS/BSA tamponu eklenerek yıkama işlemi yapıldı. Hücreler 300 x g'de 5 dk santrifüj edildi ve hücre peleti elde edildi.
3. PBS/BSA ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.
4. Hücre peletleri üzerine her 1×10^6 hücre için %4 formaldehitten 100 μ L eklendi. Fiksasyon için hücreler 37°C'de 10 dk ikübe edildi.
5. Tüplere 2 mL yıkama tamponu eklendi ve 300 x g'de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve hücre peleti alındı.
6. Her 1×10^6 hücre için % 0.1 saponin çözeltisinden 100 μ L ilave edilerek hücreler süspanse edildi ve 15 dk oda ısısında inkübe edildi. Böylece hücrelerde permeabilizasyon sağlandı.
7. Antikorların Fc reseptörlerine spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için 1 μ g/ml sıçan anti-fare CD16/CD32 antikoruna (BD Biosciences Cat. No. 553141, ABD) kullanıldı. Bloklama işlemi 15 dk süreyle oda ısısında gerçekleştirildi.
8. Sonrasında tüplere 2 ml yıkama tamponu eklendi ve 300 x g'de 5dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
9. Hücre içi LC3-II proteinini boyamak için hücre peleti üzerine 1 ml inkübasyon tamponu eklendikten sonra tavşan poliklonal anti-LC3-II (Novus biyolojik.

Cat.No.NB100-2220, UK) (primer antibadi) solüsyonundan 2µg/ml olacak şekilde eklendi.

10. Hücreler ışık görmeyecek şekilde oda ısısında 30 dk inkübe edildi.
11. Ardından tüplere 2 ml yıkama tamponu eklendi ve 300 x g'de 5dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
12. Yıkanan hücreler 1 µg/ml Alexa Fluor 488-konjuge keçi anti-tavşan IgG (sekonder antibadi) (Invitrogen. Cat.No.A11034, ABD) içeren 1 ml inkübasyon tamponu içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
13. Hücreler 2 ml yıkama tamponu ile yıkandı ve 300 x g'de 5dk santrifüj edildi.
14. Hücre peletleri üzerine 3ml % 0.1 saponin çözeltisi ve % 0.5'lik paraformaldehit çözeltisinden 200 µL eklenerek flow sitometrede örnekler analiz edildi. Hücrelerin floresan yoğunluğu, bir akış sitometresi ve Flowjo Yazılımı (Tree Star Inc.) ile ölçüldü.

3.7. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar en az üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak verildi. İstatistiksel analizleri gerçekleştirmek için Graph Pad Prism 9.0 yazılımı kullanıldı ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Ortalamalar arasındaki fark LSD ile analiz edildi ve $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Nanopartiküllerin Hazırlanması.

4.1.1. TNF- α 'nın altın nanopartikül yüzeyine bağlanması

Polietilen glikol (PEG) ile kaplanmış altın nanopartiküllerin (GNP'lerin), serbest ucu üzerinde metoksi uç (-OCH₃) bulunur ki bu inerttir ve proteinlere bağlanmaz. Önceki çalışmalar, tiol-uçlu polietilen glikol kullanarak PEGilasyonun, altın nanopartiküllerin yüzey yükünü negatiften pozitive değiştirdiğini bildirmiştir (Takeuchi vd., 2018). Başka bir deyişle, PEG'in tiol grubu, altın nanopartikülün yüzeyini kolayca kaplar ve bir monokatman oluşturur. Bir ucu tiol grubuna sahip olarak modifiye edilen PEG (metoksi-PEG-tiol veya mPEG-SH), toksisitesiz olması, protein adsorpsiyonuna direnç göstermesi ve altın yüzeylerinde monokatman oluşturmanın kolaylığı nedeniyle yüzey modifikasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. PEG, çeşitli farmasötik etkin bileşiklerin yarı ömrünü olumsuz toksik etkiler olmadan artırmak için ilaç formülasyonlarında yaygın olarak kullanılmıştır (Larson vd., 2012).

Yapılan çalışmalarda, TNF- α 'nın GNP'lere kovalent olarak bağlandığı bildirilmiştir. TNF- α 157 amino asitten oluşur ve sistin kalıntıları üzerinde bulunan sülfhidril grupları aracılığıyla GNPlerin yüzeyine kovalent bağlar oluşturarak bağlanabilir (Paciotti vd., 2006).

PEG-TIOL ve TNF- α 'nın birbirine bağlanmadığı (yani pegile TNF oluşturmadığı) belirtilmelidir. Bunun yerine, bu moleküllerden her biri ayrı ayrı kolloidal altın yüzeyine bağlanır, bu da TNF- α 'nın çıplak GNP'lere bağlı olduğu anlamına gelir. İlaçların her bir bileşeni, tümöre özgü ilaç teslimini başarmak için belirli bir işlevi yerine getirir. PEG-TIOL, nanopartikülleri hidrate etmek suretiyle nanopartikül ilacını Reticuloendothelial sistem (RES) tarafından tespit edilmesinden ve temizlenmesinden korur. PEG-TIOL içermeyen kolloidal altın vektörleri hızla karaciğer ve dalak tarafından alınır ve bu organlarda siyah çökelti oluşturur. Bunun aksine, PEG-TIOL içeren vektörler bağışıklık tespitinden kaçınır ve karaciğer ve dalak tarafından alınmaz. İlacın ikinci bileşeni olan TNF ise, sadece antitümör etkiler için terapötik bir ajan olarak görev yapmakla kalmaz, aynı zamanda nanopartikül ilacını özel olarak katı

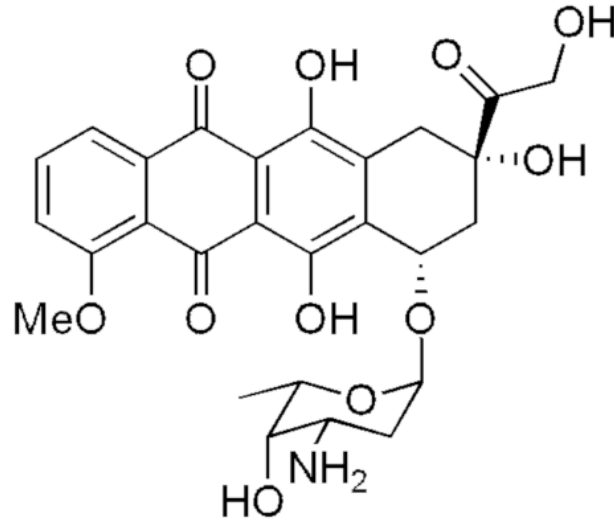
bir tümöre yönlendiren bir ligand olarak görev yapar (Paciotti vd., 2004; Paciotti vd., 2006).

TNF- α 'nın PEG kaplı GNP yüzeyine bağlandığını, UV-Vis spektroskopi ile absorpsiyon spektrumları çıkararak, TEM ile parçacık boyutları ve yüzey morfolojilerini görüntüleyerek ve ELISA testiyle TNF- α miktarının belirleyerek doğruladık.

4.1.2. Doksorubisin GNP-TNF α üzerine yüklenmesi

Doksorubisin ($C_{27}H_{29}NO_{11}$) antrasiklin yapıda antitumor aktiviteye sahip bir antibiyotiktir. Doksorubisinin moleküler yapısı Şekil 4.1'de görüldüğü gibi üç ana bileşenden oluşur. Bunlar;

- Antrasiklin Halkası: Bu, molekülün çekirdek yapısıdır ve bir kinon grubu ile birbirine bağlı dört halkadan oluşur.
- Amino şeker: Antrasiklin halkasına bağlı daunozamin adı verilen bir amino şekerdir.
- Alifatik yan zincir.



Şekil 4.1. Doksorubisinin kimyasal yapısı

Doksorubisin düzlemsel yapıya sahip bir interkalatördür. Tüm interkalatörler gibi, doksorubisin de yüksek yük delokalizasyonu ve iyi bir elektron alıcısı olan polar bir moleküldür (Sikora vd., 2023). Molekülde 6 tane hidrojen bağı donörü, 12 tane H-bağı alıcısı vardır. Bu yapı molekülün antikanser aktivitesi için gerekli DNA'ya bağlanmasını sağladığı gibi aynı zamanda proteine bağlanmasını da sağlar. Bu nedenle GNP üzerine bağlı TNF- α 'ya doksorubisinin kovalent olmayan zayıf bağlarla bağlanması mümkündür.

Dox'in TNF- α üzerine zayıf bağlarla bağlanması aynı zamanda pH değiştiği zaman Dox'in TNF- α yüzeyinden kolaylıkla ayrılabilirliğini de gösterir ki bu bilgi Dox salınımının pH bağımlı olarak hedef hücreye geçişine imkan sağlayan araştırmaların yapılmasına da neden olmuştur. Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelere göre daha asidik olduğu (yaklaşık pH 6.5-5.3) düşünüldüğünde Dox yüklü GNP'lerin hedef tedavi olarak kullanılabilirliğini artırmaktadır (Larson vd., 2012; Sikora vd., 2022).

Biz de bu çalışmada, 1mg/mL Dox çözeltisini GNP- TNF- α karışımı ile 1/10 oranında karıştırarak pH 7'de gece boyu çalkalamalı olarak inkübe ederek, doksorubisinin kendiliğinden TNF- α üzerine yüklenmesini sağladık.

Dox yüklemesini NP'lerin absorpsiyon spektrumlarını karşılaştırarak doğruladık. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi Dox yüklemesi ile daha önce TNF- α ya özgü pikin daha da arttığını gözlemledik. Ayrıca Şekil 4.3.'de gösterilen TEM analizi ile Dox yüklemesi sonrası NP'ün morfolojisinin değiştiğini ve boyutunun arttığını görüntüledik.

4.2. Hazırlanan Nanaopartiküllerin Karakterizasyonu

4.2.1 Nanopartiküllerin UV-VIS spektrofotometre ile analizi

GNP, GNP-TNF α ve GNP- TNF α -Dox bileşiklerinin absorpsiyon spektrumları 200-1100 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometrede (Metertech SP-8001, Taiwan) okuma yapılarak elde edilmiştir. Şekil 4.2 de bileşiklere ait absorpsiyon spektrumları görülmektedir.

GNP'ler, yüzey plazmon rezonansı (SPR) nedeniyle belirli bir ışık bandını absorbe etme yeteneğine sahiptir (maksimum dalga boyu yaklaşık 520 nm ile 538 nm

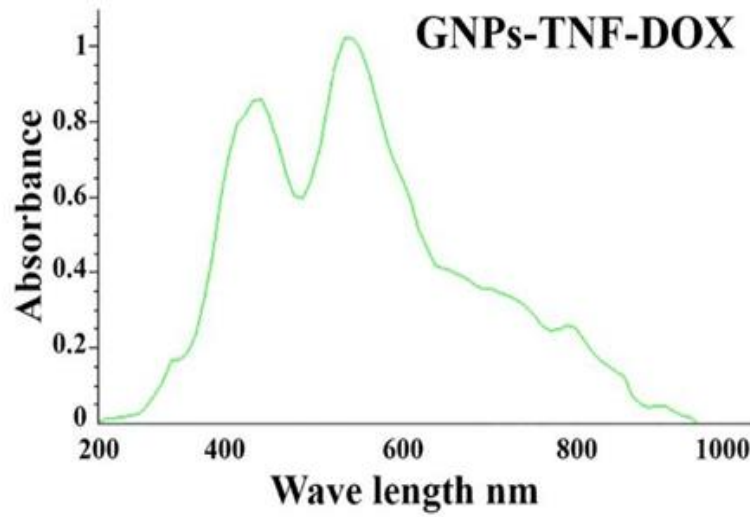
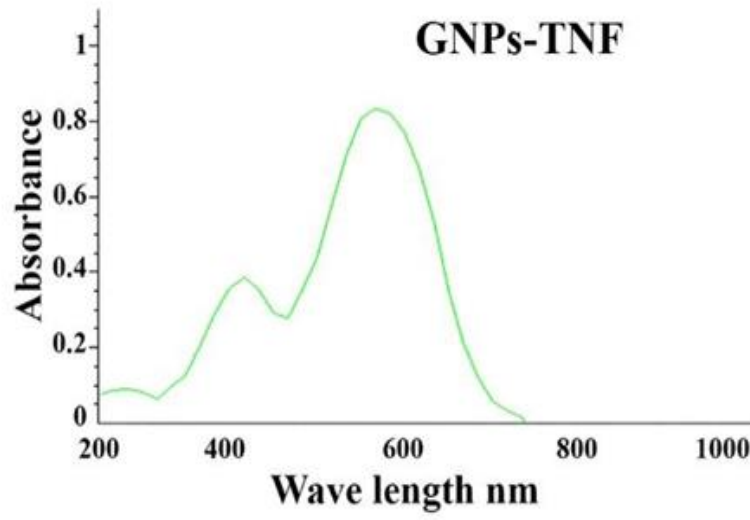
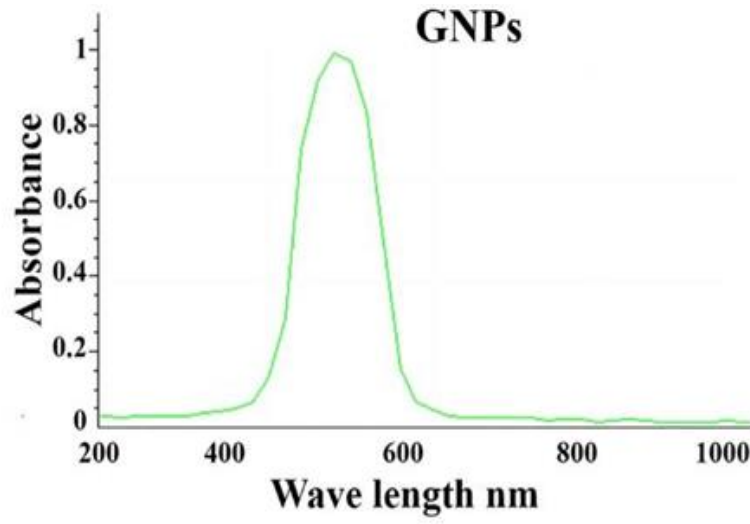
civarında). Emilim bandının genişliği ve maksimum emilimin tepe konumu, partiküllerin morfolojisine (boyut, şekil ve homojenlik), partiküller arasındaki koagülasyona ve dielektrik ortama bağlıdır (Aryal vd., 2019).

Bizim kullandığımız 10 nm boyutunda PEG kaplı GNP'lerin, satın alınan firmanın da (Sigma-Aldrich) belirttiği gibi 530 nm'de maksimum pik verdiği görüldü (Şekil 4.2). Bu sonuç, aynı boyutlarda GNP'lerin 520-550 nm arasında maksimum bir pik verdiğini gösteren çalışmalar ile uyumlu bulundu (El Domany vd., 2018).

Ayrıca PEG kaplı GNP'lere TNF α 'nın bağlandığı absorpsiyon spectrum grafiği ile doğrulandı. Şekil 4. 2 de görüldüğü gibi 530 nmdeki pikin TNF α bağlanmasından sonra 570 nm'ye kaydığı ve genişlediği gözlemlendi. Bu pikin pozisyonu ve genişliği parçaçık yüzey modifikasyonu ve partikül boyutundaki artış ile ilgili olarak yorumlandı (Aryal vd., 2019). Ayrıca yaklaşık 420 nm'de daha küçük ikinci bir pik gözlemlendi. Bu pikin TNF α 'ya özgü bir pik olduğu düşünüldü.

Şekil 4.2'deki absorpsiyon spektrumları ayrıca Dox'in GNP yüzeyindeki TNF α 'ya bağlandığını da doğruladı. Doksorubisin polar ve yüklü grupları ile TNF α üzerine kolaylıkla zayıf bağlarla bağlanabileceği için, Dox bağlanması sonucunda TNF α 'ya özgü 420 nm'deki pikin çok az kayarak 435 nm'de daha yüksek bir pik oluşmasına neden olduğu gözlemlendi. Serbest Dox'in 496 nm tek bir pik verdiği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Sikora vd., 2022). Ancak GNP üzerine doksorubisin yükleyerek UV-Vis spectrum ile karakterizasyon yapıldığında, Dox özgü 480 nm'de ikinci bir pikin gözlemlendiği çalışmalarda rapor edilmiştir (Aryal vd., 2019; Spadavecchia vd., 2016). Bu çalışmalar TNF α içermemesine karşın, Dox'in serbest ve GNP üzerine bağlandığında pikin kayabileceğini gösterdiği için bizim datalarımızın doğrulunu destekler niteliktedir.

Şekil 4.2'de GNP-TNF α -Dox kompleksine ait grafikte TNF α için görülen pikin şiddetinin artmış olması, doksorubisinin TNF α üzerine bağlandığını doğrular niteliktedir. Ayrıca aynı grafikte spektrum genişliğinin artmış olması, altın partiküllerin hem TNF α hem de doksorubisin bağlanması ile yüzeyinin modifiye edildiğini ve boyutunun arttığı şeklinde yorumlandı.



Şekil 4.2. GNP, GNP-TNF α ve dokсорubisin yüklü GNP-TNF α komplekslerinin absorpsiyon spektrumları.

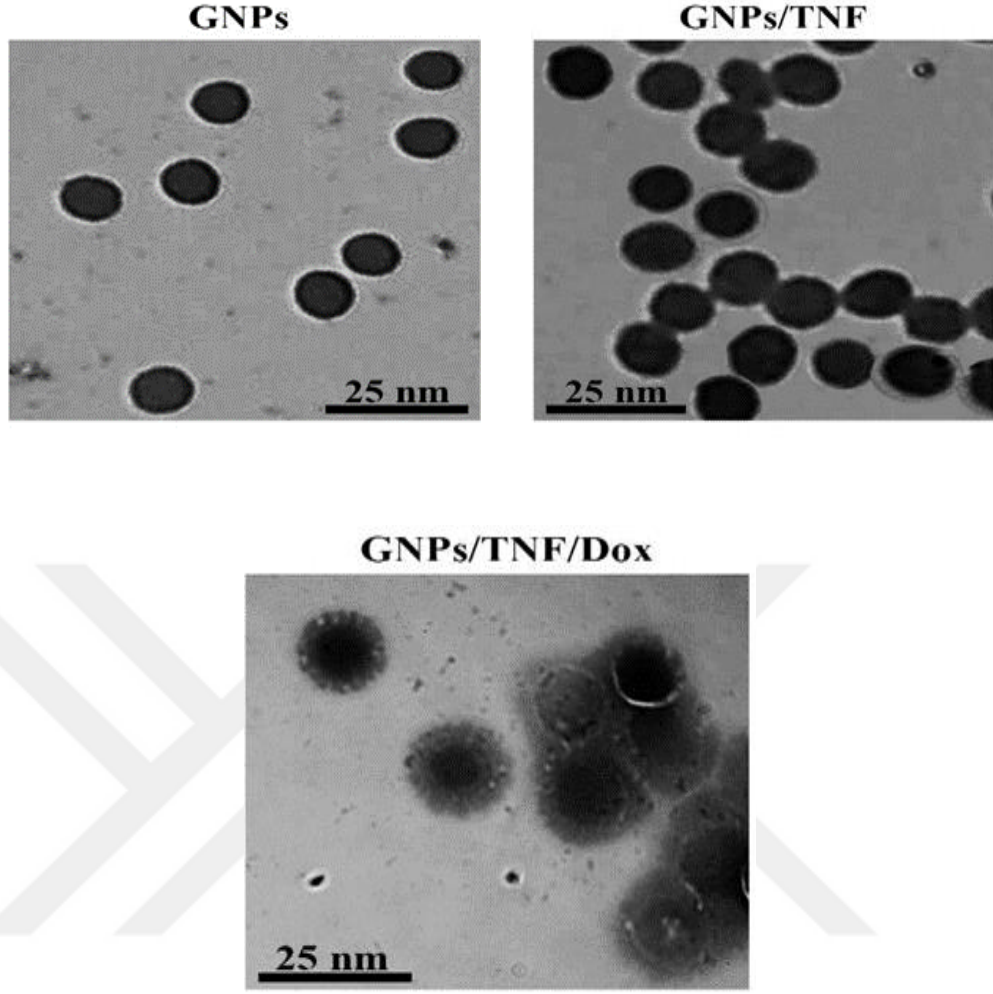
4.2.2. Nanopartiküllerin transmisyon elektron mikroskop (TEM) analizi

PEG kaplı GNP yüzeyine TNF α ve Dox bağlanması partikül boyutu ve morfolojisinin görüntülenmesine imkan veren Transmission Electron Mikroskobu (TEM) ile de analiz edildi.

Şekil 4.3’de görüldüğü gibi, TEM analizinde PEG kaplı GNP’ler 10 nm boyutunda temiz ve küresel partiküller halinde görüntülendi. TNF α bağlı GNP’lerin boyutu ise ortalama 15 nm olduğu gözlemlendi. TNF α yüklemesi ile nanopartikül boyutunda 4.6-5.5 nm’lik bir artışın olduğunu gösteren Tsai ve arkadaşlarının çalışmaları ile uyumlu bulundu (Tsai vd., 2012). Ayrıca GNP yüzeyine bağlı TNF α molekülleri arasında muhtemelen elektrostatik çekim kuvvetinden kaynaklanan kümelenmeler gözlemlendi ki bu durum TNF α ’nın bağlandığını doğrularken UV-Vis spektroskopi sonuçlarını ile de uyumlu bulundu. Burada ilginç olarak partikül boyutundaki artışın tüm partiküllerde aynı olduğunu gözlemledik, bu durum TNF α ’nın GNP yüzeyini homojen bir şekilde kapladığını düşündürdü. Tüm partiküllerde aynı oranda boyut artışı gözlemlendi.

Doksorubisin bağlanması sonrası nanopartikül boyutunun yaklaşık 20 nm olduğu gözlemlendi. Ayrıca partikül yüzeyinde altın koruma üzerinde muhtemelen kovalent olmayan doxorubin yüklemesinden kaynaklanan tipik bir partikül morfolojisi gözlemlendi. Buna ek olarak TNF α bağlı GNP’lerde olduğu gibi muhtemelen muhtemelen TNF α ve doksorubisinin polar ve yüklü gruplarının birbirlerini çekmesinden kaynaklanan kümelenmeler gözlemlendi.

Sonuç olarak, TEM analizinde partikül boyutlarının artması, kümelenmelerin gözlenmesi ve partikül morfolojisindeki değişiklikler TNF α ve Doksorubisinin PEG kaplı GNP yüzeyine bağlandığını doğruladı.



Şekil 4.3. GNP, GNP-TNF α ve GNP-TNF α -Dox partiküllerinin TEM görüntüleri.

4.2.3. TNF α 'nın GNP yüzeyine bağlandığının ELISA yöntemiyle doğrulanması

TNF α 'nın GNP yüzeyine bağlandığı insan TNF α 'ya özgü ELISA kiti (human TNF α detection ELISA kit) kullanılarak saptandı. Bunun için ilk olarak kitin içerisinden çıkan TNF α standartı ile Şekil 4.4A'da görülen standart grafik hazırlandı. Standart grafik 450 nm'de okunan absorbanslara karşılık gelen TNF α konsantrasyonu bulmak için kullanıldı.

10 ng/mL TNF α 'nın 1/5 ve 1/10 oranında GNP solüsyonu (10 μ g/ml) ile karıştırılması ve pH 8 olan ortamda 24 saat inkübe edilmesi sonrası elde edilen GNP- TNF α bileşiğinin 10.000 rpm de 15 dk santrifüj edilmesi ile elde edilen süpernatant ve pelet örnekleri ELISA testinde kullanıldı. Şekil 4.4B' de 1/5 ve 1/10 oranında hazırlanan

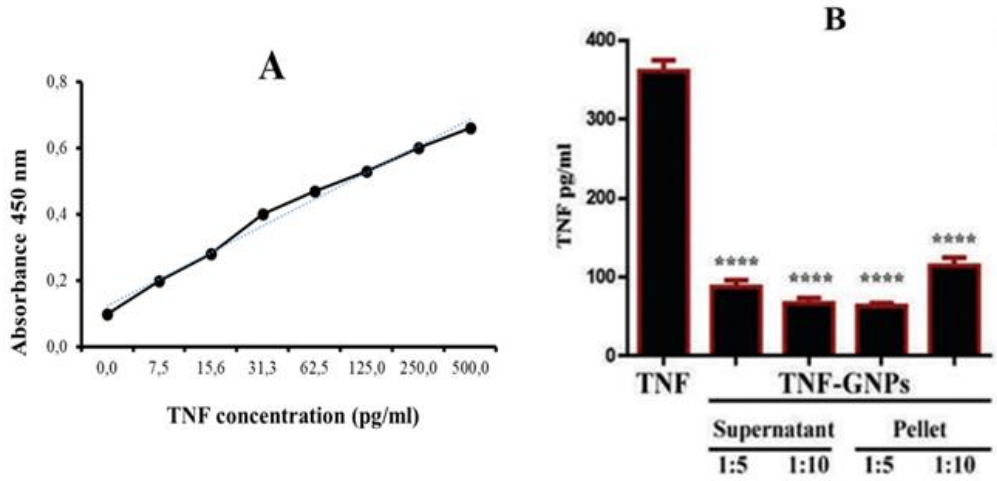
TNF α -GNP karışımının hem pelet hem de süpernatant örneklerindeki absorpsanlarına karşılık gelen konsantrasyonları gösterildi.

Şekil 4.4B’de TNF α ’nın GNP’lere bağlanmadan önce oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Ancak hem pelet hem de süpernatant örneklerinde saptanan serbest TNF α miktarı oldukça düşük bulunmuştur. Bu sonuç, anti- TNF α antiserumunun serbest TNF α ’ya kolaylıkla bağlanabilirken, GNP yüzeyine bağlı TNF α ’ya muhtemelen sterik engellemelerden dolayı bağlanamadığı şeklinde açıklanabilir.

Süpernatant ve pelet örneklerinde saptanan TNF α miktarları kontrole göre (bağlanmadan önceki miktar) istatistiksel olarak ($p<0.05$) anlamlı düşük bulundu (Şekil 4.4B).

Süpernatanda saptanan TNF α miktarı bağlanmadan atılan miktarı gösterir. Anti-TNF α antiserumunun PEG kaplı GNP üzerine non spesifik bağlanmadığı daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Tsai vd., 2012). Bu nedenle pelette saptanan TNF α miktarı partikül arasına sıkışmış ya da partiküle bağlı fakat bağlanma bölgeleri açıkta kalan TNF α miktarı olarak açıklanabilir.

1/5 oranında hazırlanan TNF α -GNP karışımında; yaklaşık 90 pg/ml süpernatanda ve 70 pg/ml pelette, totalde 160 pg/ml hesaplandığı için yaklaşık 190 pg/ml (350-160) TNF α ’nın GNP yüzeyine bağlandığını düşünebiliriz. 1/10 oranında hazırlanan TNF α -GNP karışımında; yaklaşık 80 pg/ml süpernatanda ve 110 pg/ml pelette, totalde 190 pg/ml hesaplandığı için yaklaşık 160 pg/ml (350-190) TNF α ’nın GNP yüzeyine bağlandığını düşünebiliriz. Bu sonuçlar aynı zamanda 1/5 ve 1/10 oranında hazırlanan karışımında 1/5 oranında hazırlanan GNP- TNF α karışımının daha iyi sonuç verdiğini gösterdiği için, çalışmalarımızın bundan sonraki aşamalarında 1/5 oranında 24 saat inkübe edilerek hazırlanan GNP- TNF α karışımları kullanılmıştır. Genel olarak bu sonuçlar UV-VIS spektrofotometresi ve TEM ile elde edilen verilerle tutarlıdır.



Şekil 4.4. TNF α için standart grafik (A); GNP yüzeyine bağlanan ve bağlanmayan TNF α konsantrasyonları (B).

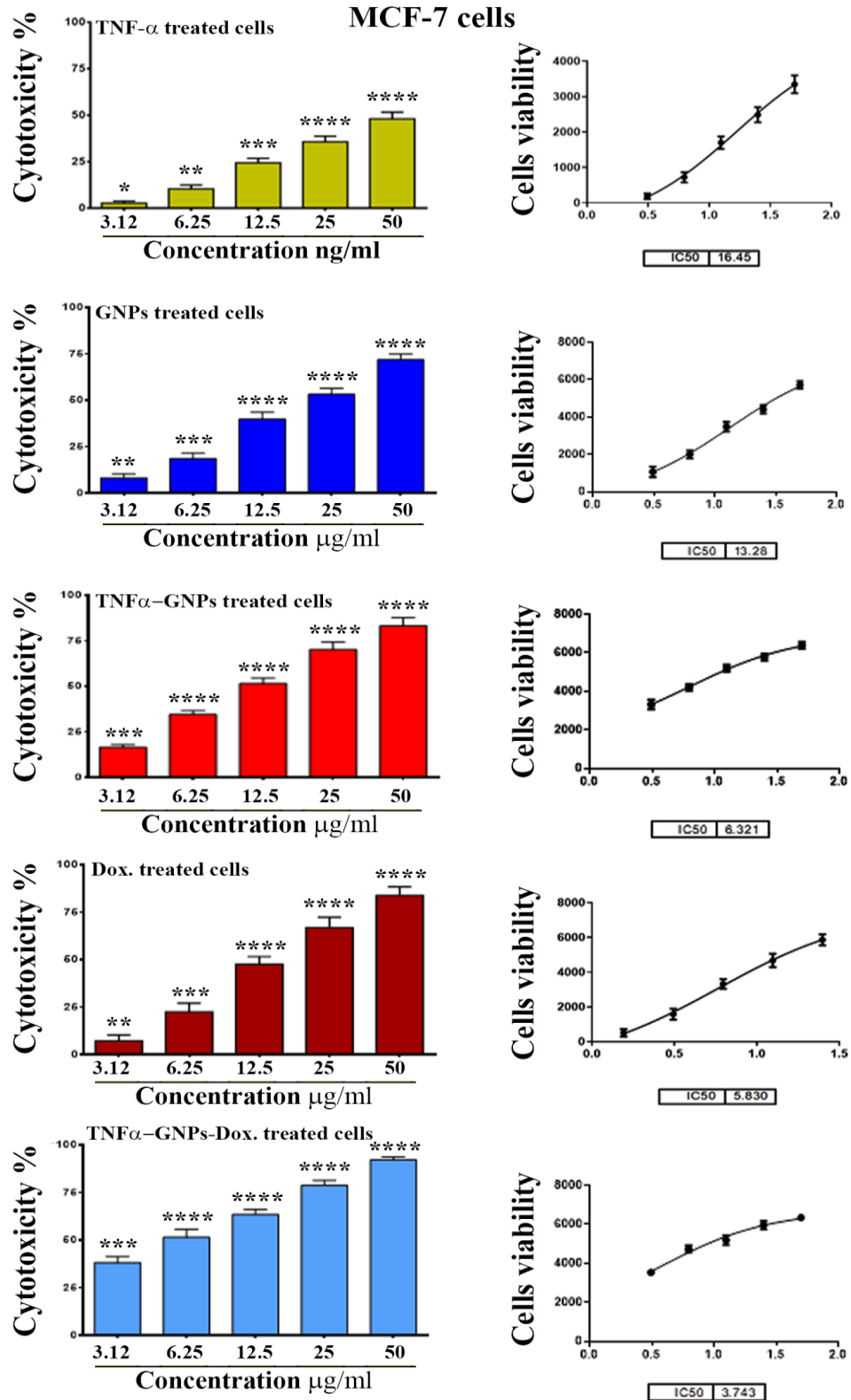
4.3. Test Bileşiklerin Sitotoksitesi

4.3.1. Test bileşiklerin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesi

TNF α , Dox, GNP, GNPs-TNF α ve GNPs-TNF α -Dox test bileşiklerinin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesi, çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan bileşiklerin hücrelerle 48 saat muamele edilemesi sonrası MTT test ile saptandı ve her bir bileşiğin hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyonu (IC₅₀) hesaplandı.

TNF- α ; 3.1, 6.25, 12.5, 25 ve 50 ng/mL aralığında, Dox, GNP, GNPs-TNF α ve GNPs-TNF α -Dox ise 3.1, 6.25, 12.5, 25 ve 50 μ g/mL aralığında çalışıldı. Şekil 4.5.'de test bileşiklerinin MCF-7 hücrelerindeki % sitotoksite değerleri gösterildi. Ayrıca tüm test bileşiklerinin çalışılan konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık % canlılık değerleri grafiklenerek GraphPad 9 programı ile IC₅₀ değerleri hesaplandı ve Şekil.4.5'in sağ tarafında gösterildi.

Sonuçta TNF α , GNP, Dox, GNP-TNF α ve GNP-TNF α -Dox bileşiklerinin her birisinin doza bağlı olarak hücre canlılığını baskıladığı gözlemlendi. MCF-7 hücrelerinde TNF α için IC₅₀ değeri 16.45 ng/mL, GNP için 13.28 μ g/mL, Dox için 5.28 μ g/mL, GNP-TNF α için 6.32 μ g/mL, GNP-TNF α -Dox için 3.74 μ g/mL olarak bulundu.



Şekil 4.5. Test bileşiklerinin MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki sitotoksitesitesi ve IC50 değerleri. Veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ SD'sı olarak verildi. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.3.2. Test bileşiklerin AMJ-13 hücrelerindeki sitotoksitesi

TNF α , Dox, GNP, GNPs-TNF α ve GNPs-TNF α -Dox test bileşiklerinin AMJ-13 hücrelerindeki sitotoksitesi, çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan bileşiklerin hücrelerle 48 saat muamele edilemesi sonrası MTT test ile ölçüldü ve her bir bileşiğin hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyonu (IC50) hesaplandı.

TNF α ; 3.1, 6.25, 12.5, 25 ve 50 ng/mL aralığında, Dox, GNP, GNPs-TNF α ve GNPs-TNF α -Dox ise 3.1, 6.25, 12.5, 25 ve 50 μ g/mL aralığında çalışıldı. Şekil 4.6.'da test bileşiklerinin AMJ-13 hücrelerindeki hücre canlılığına etkisi ve sitotoksite yüzdesi gösterildi. Tüm test bileşiklerinin çalışılan konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık % canlılık değerleri grafiklenerek GraphPad 9 programı ile IC50 değerleri hesaplandı ve Şekil.4.6'nın sağ tarafında gösterildi.

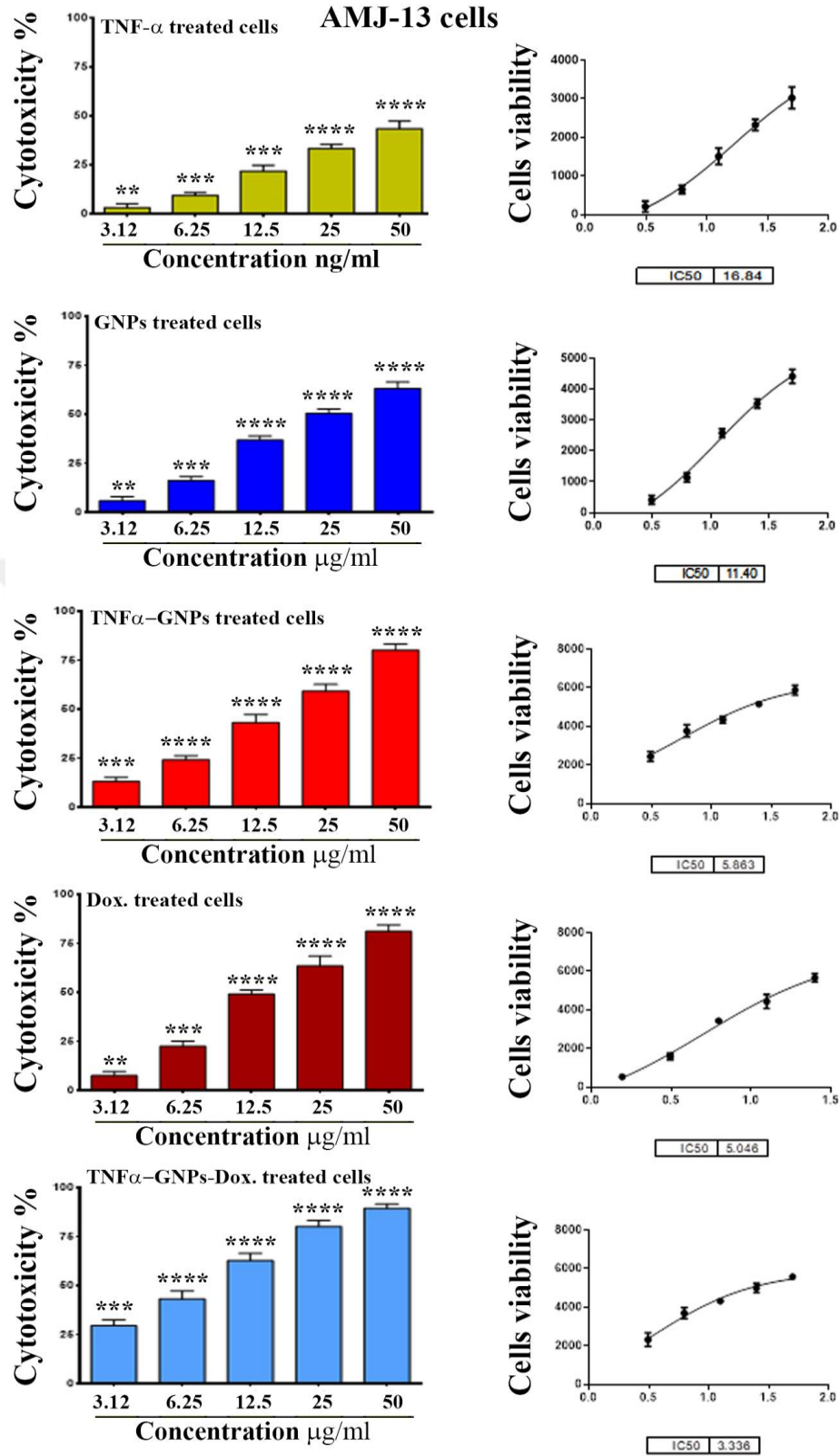
Sonuçta TNF α , GNP, Dox, GNP-TNF α ve GNP-TNF α -Dox bileşiklerinin her birisinin doza bağlı olarak hücre canlılığını baskıladığı gözlemlendi. AMJ-13 hücrelerinde TNF- α için IC50 değeri 16.84 ng/mL, GNP için 11.40 μ g/mL, Dox için 5.04 μ g/mL, GNP-TNF α için 5.86 μ g/mL, GNP-TNF α -Dox için 3.33 olarak bulundu.

4.3.3. Test bileşiklerin REF hücrelerindeki sitotoksitesi

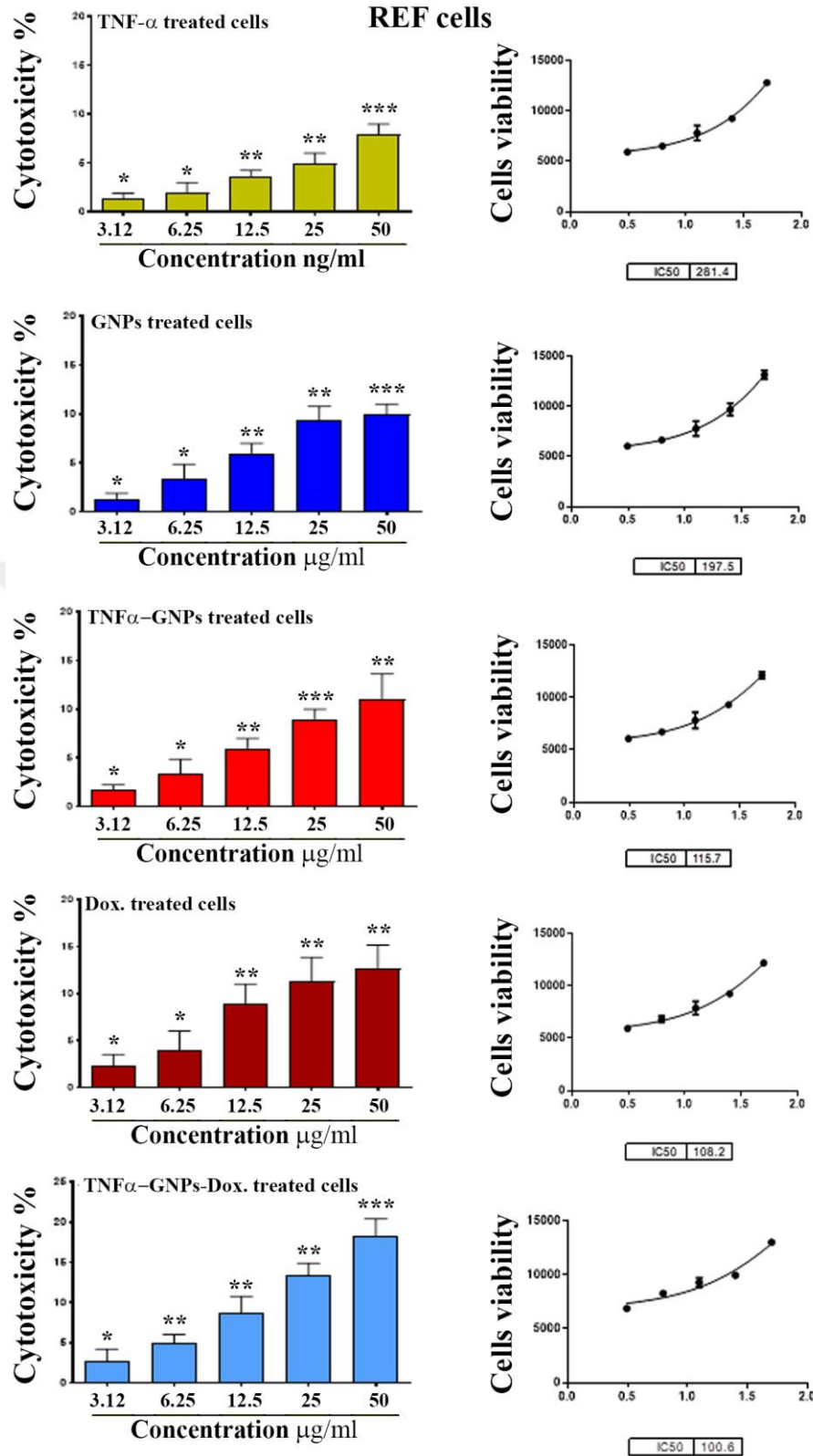
Test bileşiklerinin sağlıklı kontrol grubu olarak kullanılan REF hücrelerindeki sitotoksitesi, çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan bileşiklerin hücrelerle 48 saat muamele edilemesi sonrası MTT test ile ölçüldü ve her bir bileşiğin hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyonu (IC50) saptandı.

Şekil 4.7' de test bileşiklerinin REF hücrelerindeki hücre canlılığına etkisi gösterildi ve sitotoksite yüzdesi ölçüldü. Tüm test bileşiklerinin çalışılan konsantrasyonlarının logaritmasına karşılık % canlılık değerleri grafiklenerek GraphPad 9 programı ile IC50 değerleri hesaplandı ve Şekil.4.7'nin sağ tarafında gösterildi.

Sonuçta test bileşiklerinin sağlıklı REF hücrelerinde oldukça yüksek konsantrasyonlarda çok az sitotoksiteye neden olduğu gözlemlendi. REF hücrelerinde TNF α için IC50 değeri 281.4 ng/mL, GNP için 197.5 μ g/mL, Dox için 108.2 μ g/mL, GNP-TNF α için 115.7 μ g/mL, GNP-TNF α -Dox için 100.6 μ g/mL olarak bulundu.



Şekil 4.6. Test bileşiklerinin AMJ-13 meme kanseri hücrelerindeki sitotoksitesiti ve IC50 değerleri. Veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ SD'sı olarak verildi. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.7. Test bileşiklerinin REF hücrelerindeki sitotoksitesitesi ve IC50 değerleri.

Veriler, üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ SD'sı olarak verildi. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

MTT test ile elde edilen sitotoksikite çalışmalarında sonuç olarak, tüm test bileşiklerinin doza bağlı olarak hücre canlılığını baskıladığını gözlemledik. Hem MCF-7 hem de AMJ-13 meme kanseri hücre hatlarında en güçlü sitotoksik etkiyi üçlü kombinasyonla GNP-TNF α -Dox kompleksinde gözlemledik.

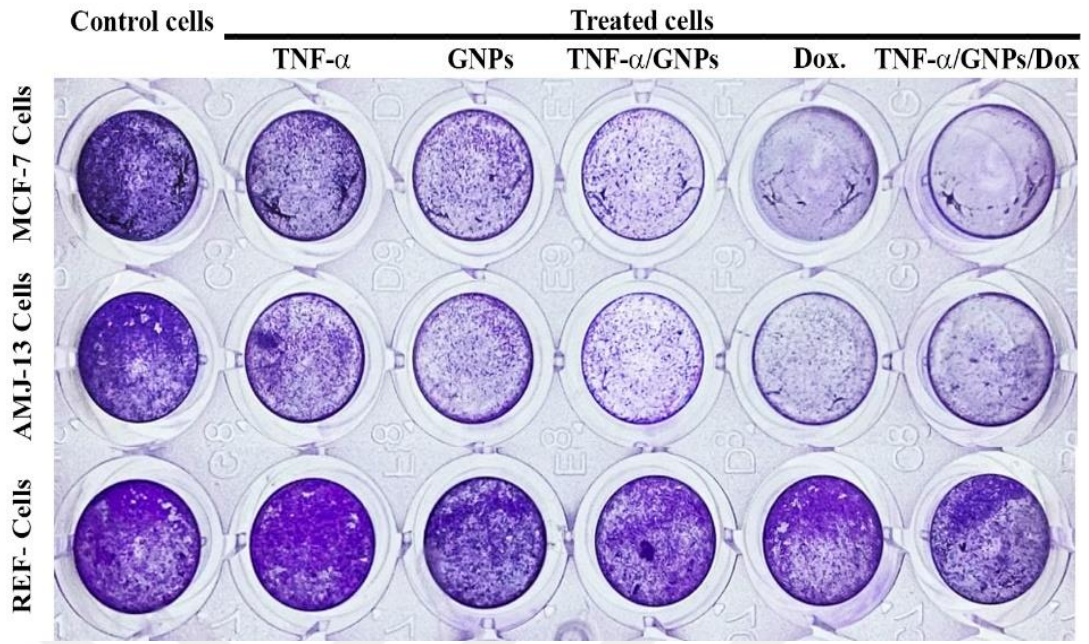
Çizelge 4.1.'de çalışılan test bileşiklerinin MCF-7 ve AMJ-13 meme kanseri hücreleri ile sağlıklı REF hücrelerindeki IC50 değerleri gösterildi. Kanser hücre hatlarında gözlediğimiz sitotoksik etkinin REF hücrelerinde olmaması ise hazırladığımız yeni nano ilaç taşıyıcıların seçici olarak anti kanser terapide kullanılabileceğini gösterdi.

Çizelge 4.1. Test bileşiklerinin hücre hatlarındaki IC50 değerleri

Test bileşikleri	MCF-7	AMJ-13	REF
	IC50	IC50	IC50
TNF α (ng/mL)	16.45	16.84	281.4
GNPs (μ g/mL)	13.28	11.40	197.5
Dox (μ g/mL)	5.83	5.06	108.2
GNP-TNF α (μ g/mL)	6.32	5.86	115.7
GNP-TNF α -Dox(μ g/mL)	3.74	3.33	100.6

4.3.4. Test bileşiklerin koloni oluşumuna etkisi (Klonojenite test)

TNF α , GNP, Dox, GNP-TNF α ve GNP-TNF-Dox bileşiklerinin MCF-7, AMJ-13 ve REF hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini doğrulamak ve hücre yoğunluğunu görmek için klonojenite testi yapıldı. Hücrelerin, test bileşiklerinin IC50 dozları ile 24 saat inkübe edilmesi ve ardından kristal viyole ile boyanması sonrası koloniler mikroskop altında görüntülendi. Şekil 4.8'de test bileşiklerinin koloni oluşumuna etkisi görülmektedir. Şekil 4.8'de en güçlü sitotoksik etkinin GNP- TNF α -Dox kompleksinde MCF-7 ve AMJ-13 hücrelerinde olduğu görülmektedir. Ayrıca MTT test sonuçları ile uyumlu bir şekilde REF hücrelerinde test bileşiklerinin çok az sitotoksik olduğu gözlenmiştir.



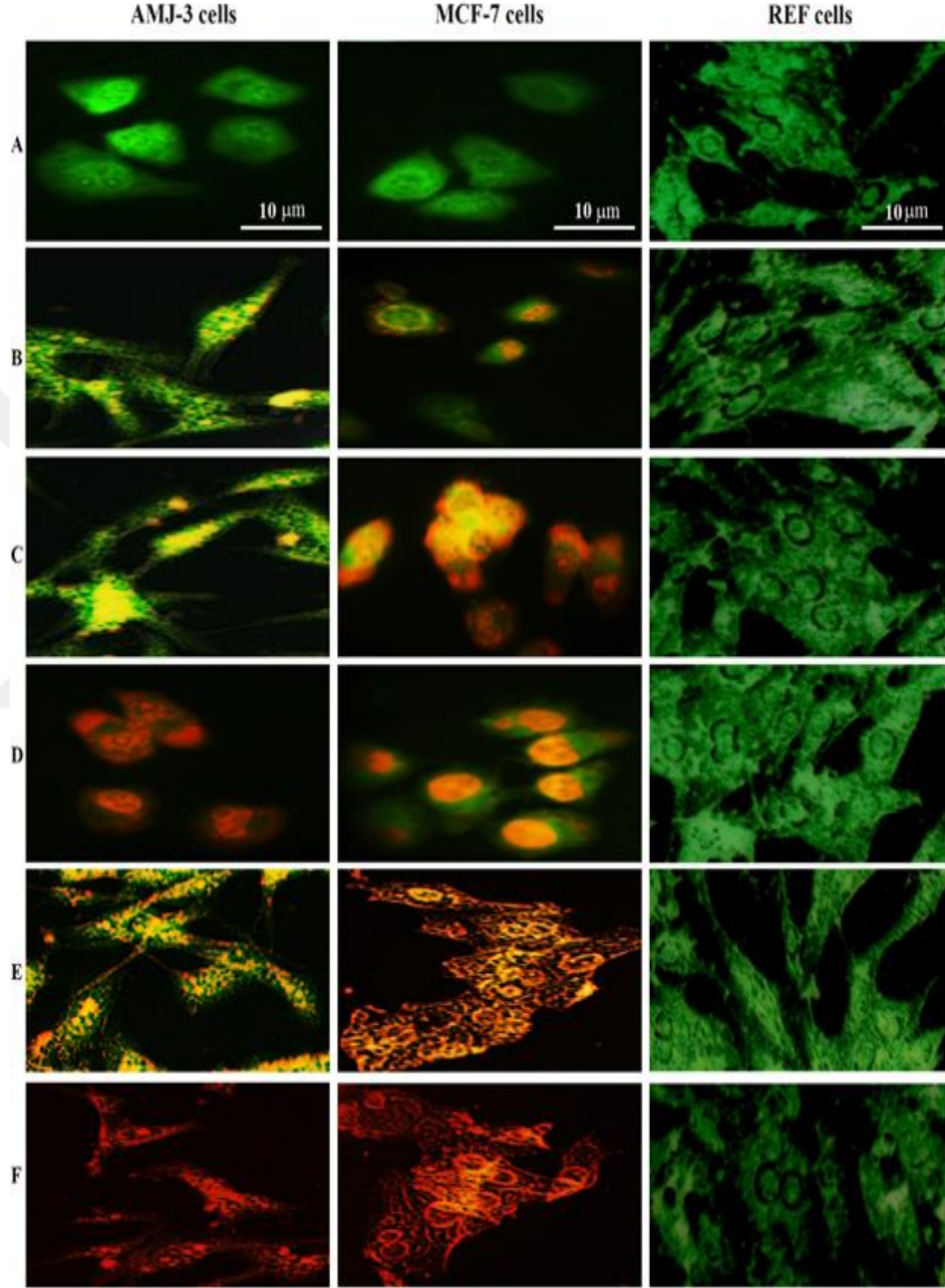
Şekil 4.8. Test bileşiklerinin koloni oluşumuna etkisi.

4.4. Test Bileşiklerin Apoptosisi İndükleme Potansiyeli

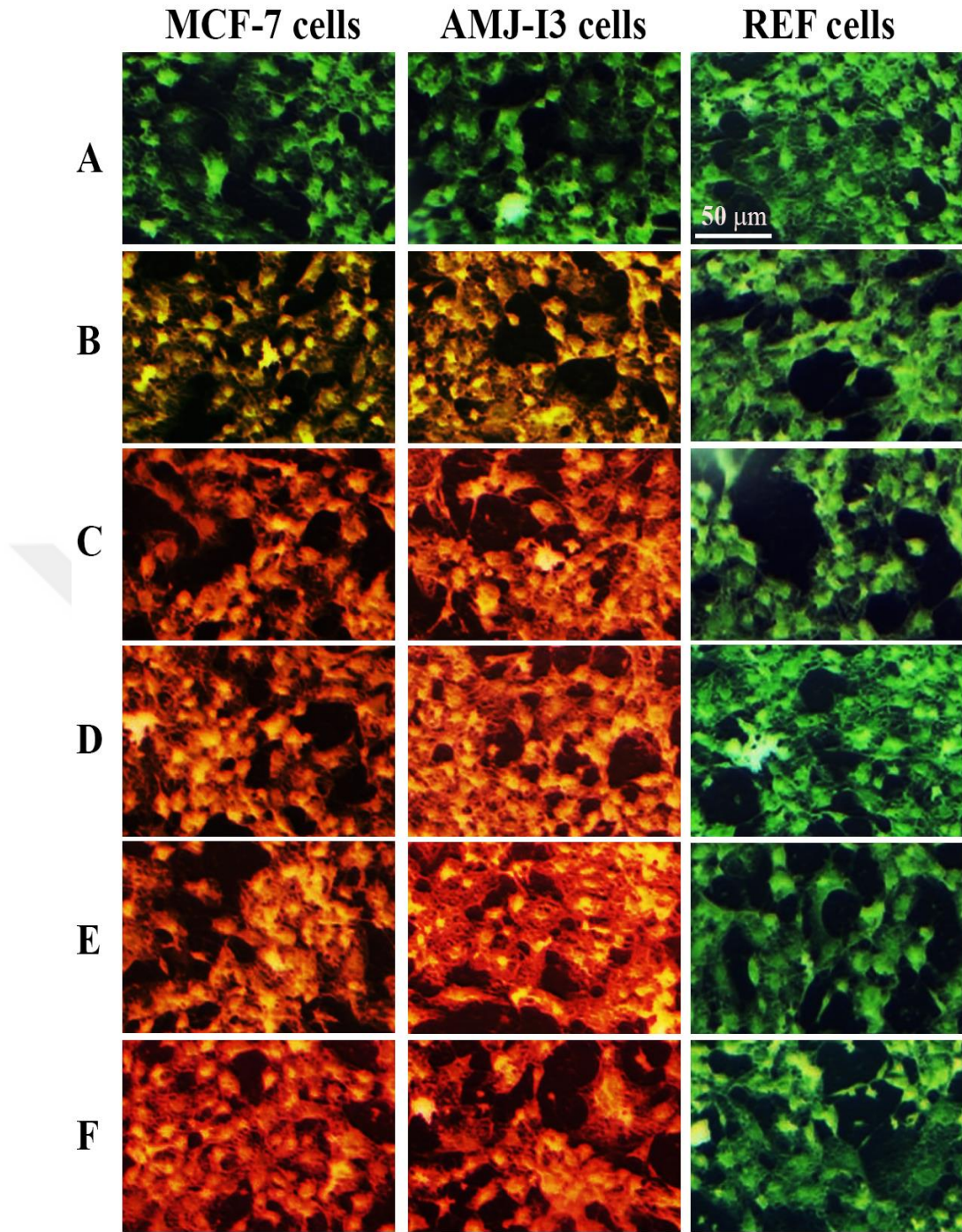
TNF α , GNP, Dox, GNP- TNF α ve GNP-TNF α -Dox bileşiklerinin, MCF-7, AMJ13 kanser hücre hatları ve REF normal hücre hatlarında apoptosisi indükleme potansiyeli Akridin orange (AO)–Ethidium Bromide (EtBr) ikili boyama tekniği ile test edilmiştir. AO/EtBr boyaması kromozom yoğunlaşması ve DNA hasarı gibi apoptosisi özgü nükleer değişiklikleri saptamak için kullanıldı ve boyanan hücreler floresan mikroskop altında görüntülendi.

AO/EtBr ile boyandıktan sonra apoptosise uğramayan hücreler yeşile boyanırken, apoptotik hücreler turuncu veya kırmızıya boyanır. Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da test bileşiklerinin IC50 dozları ile 24 saat muamele edildikten sonra AO/EtBr ile boyanmış hücrelerin farklı büyütme skalalarında çekilmiş forografları gösterildi. Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da görüldüğü gibi, GNP-TNF α -Dox kompleksinin diğer test bileşiklerine göre en yüksek apoptotik aktiviteye neden olduğu gözlenmiştir. Test bileşikleri MCF-7 ve AMJ-13 hücrelerinde en düşük apoptotik aktiviteden en yüksek apoptotik aktiviteye doğru sırasıyla TNF α , GNP, GNP- TNF α , Dox, GNP- TNF α -Dox şeklinde sıralandı (Şekil 4.9- Şekil 4.10). Bu sonuç MTT test ve klonojenite test sonuçları ile

bire bir uyumlu bulundu. Ayrıca test bileşiklerinin hiç birisinin REF hücrelerinde apoptosise neden olmadığı hücrelerin tamamen yeşile boyanmasıyla gözlemlendi. Bu sonuç hazırladığımız yeni nano ilaç taşıyıcı partiküllerin seçici olarak meme kanserinde apoptosisi uyatarak anti kanser terapide kullanılabileceğini gösterdi.



Şekil 4.9. AO/EtBr ile çift boyanmış MCF-7, AMJ-13 ve REF hücre hatlarının floresan mikroskop görüntüsü (10 µm). Kontrol grubu (A), TNFα ile (B) GNP'ler ile (C), Dox ile (D), GNP-TNFα ile (E) , GNP-TNFα-Dox ile (F) mamele edilmiş hücreler.



Şekil 4.10. AO/EtBr ile çift boyanmış MCF-7, AMJ-13 ve REF hücre hatlarının floresan mikroskop görüntüsü (50 μ m). (A) Kontrol grubu (A), TNF α ile (B), GNP ile (C), GNP- TNF α ile (D), Dokсорubisin ile (E), GNP- TNF α -Dox ile (F) muamele edilmiş hücreler.

4.5. Test Bileşiklerin Otofajiyi İndüklenme Potansiyeli

MCF-7 ve AMJ-13 meme kanser hücre hatlarının TNF α , Dox, GNP, GNPs-TNF α ve GNPs-TNF α -Dox test bileşikleriyle ayrı ayrı muamele edilmesi sonrasında otofaji belirteci olan hücre içi LC3 protein düzeyi indirekt immunfluoresans yöntemi kullanılarak akışkan hücre sitometresinde analiz edildi.

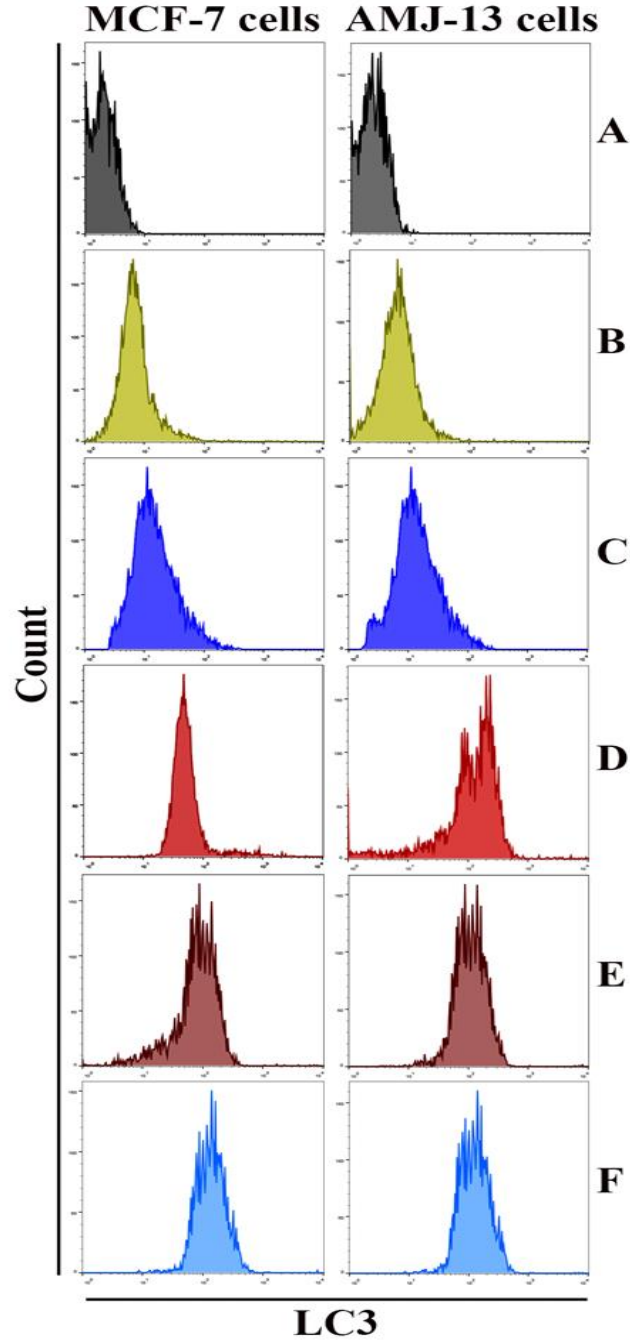
Bunun için ilk olarak hücreler her bir bileşik için daha önce saptanmış olan IC50 dozları ile 48 saat muamele edildi. Ardından otofaji indikatörü LC3 proteinine özgü primer ve sekonder antitadiler kullanılarak, hücre içi LC3 proteinini flow sitometrede nicel ve nitel olarak saptandı. Şekil 4.11’de test bileşiklerinin MCF-7 ve AMJ-13 hücrelerindeki LC3 protein düzeyi nitel olarak gösterildi. Şekil 4.11’de gösterildiği gibi, test edilen bileşikler ile muamele edilen hücrelerde gözlenen pikin tepe noktasının kontrol grubuna göre sağa doğru kayması LC3 protein düzeyinin arttığını göstermektedir.

Şekil 4.12’de ise test bileşiklerinin MCF-7 ve AMJ-13 hücrelerinde LC3 düzeyine etkisi kantitatif olarak gösterilmiştir. LC3 düzeyinin floresans işaretli antitadi ile işaretlenmesi sonrası flow sitometrede okunan floresans ışık miktarı MCF-7 hücrelerinde (A)-kontrol grubu için 411.7 ± 22.11 ; (B)- TNF α ile muamele edilmiş hücreler için 930.9 ± 22.11 ; (C) GNP ile muamele edilmiş hücreler için 1245 ± 64.13 ; (D) GNP- TNF α ile muamele edilmiş hücreler için 2031 ± 91.68 ; (E) Doksorubisin ile muamele edilmiş hücreler için 1618 ± 40.71 ; (F) GNP- TNF α -Dox ile muamele edilmiş hücreler için ise 2673 ± 371.0 olarak ölçüldü.

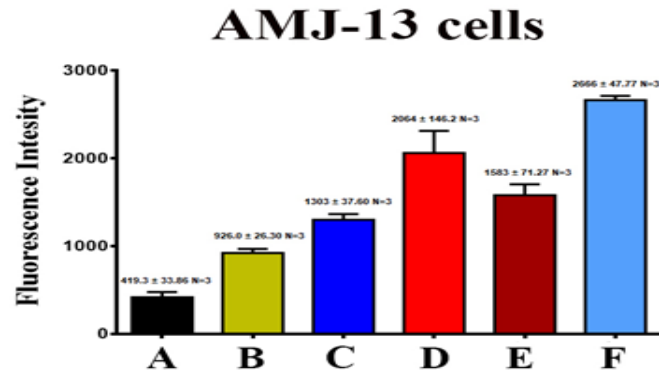
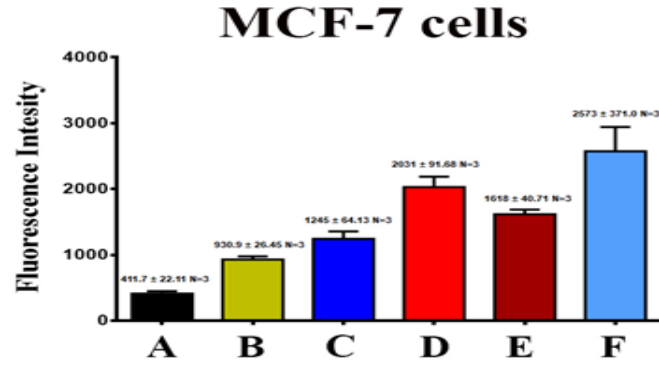
LC3 düzeyini gösteren floresans ışık miktarı AMJ-13 hücrelerinde hücrelerinde (A)-kontrol grubu için 419.3 ± 33.06 ; (B)- TNF α ile muamele edilmiş hücreler için 926.0 ± 26.30 ; (C) GNP ile muamele edilmiş hücreler için 1303 ± 37.60 ; (D) GNP- TNF α ile muamele edilmiş hücreler için 2064 ± 146.2 ; (E) Doksorubisin ile muamele edilmiş hücreler için 1583 ± 71.27 ; (F) GNP- TNF α -Dox ile muamele edilmiş hücreler için ise 2666 ± 47.77 olarak ölçüldü (Şekil 4.12).

Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de görüldüğü gibi hiçbir ilaç ve nanopartikül ile etkileşime girmemiş kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda LC3 protein düzeyinin artan birikimi gözlemlendi. En yüksek LC3 düzeyi ise GNP- TNF α -Dox kompleksi tarafından

indüklendi. Bu sonuçlar, hazırlanan GNP- TNF α -Dox ilaç taşıyıcı nanopartikülün meme kanseri hücrelerinde kontrole göre anlamlı bir otofagosom oluşumuna ve otofaji indüksiyonuna neden olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.11. Test bileşiklerinin LC3 düzeyini gösteren histogram grafik. (A) Kontrol grubu, (B) TNF α ile muamele edilmiş, (C) GNP ile muamele edilmiş, (D) GNP- TNF α ile muamele edilmiş, (E) Doksorubisin ile muamele edilmiş, (F) GNP- TNF α -Dox ile muamele edilmiş hücreler.



Şekil 4.12. Test bileşiklerinin MCF7 ve AMJ-13 hücrelerindeki LC3 düzeyine etkisi. (A) Kontrol grubu hücreler, (B) $\text{TNF}\alpha$ ile muamele edilmiş hücreler, (C) GNP ile muamele edilmiş hücreler, (D) GNP- $\text{TNF}\alpha$ ile muamele edilmiş hücreler, (E) Doksorubisin ile muamele edilmiş hücreler, (F) GNP- $\text{TNF}\alpha$ -Dox ile muamele edilmiş hücreler. Sonuçlar 3 bağımsız deneyden elde edilen ortalama $\pm$ SD olarak verildi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada, meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek yeni bir nanoteknolojik ilaç taşıyıcının geliştirilmesi ve bu yeni ilacın antikanser etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için PEG kaplı GNP'ler ilk olarak tümör hücrelerini spesifik olarak hedeflemek amacıyla tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ile modifiye edilmiş ve ardından doksorubisin (Dox) ile yüklenerek terapotik bir terapotik molekül oluşturulmuştur. Geliştirilen bu yeni ilaç taşıyıcı nanopartikülün anti-kanser etkisi, MCF-7 ve AMJ-13 meme kanseri hücre hatları ile sağlıklı hücre hattı olan REF hücrelerinde test edilmiştir.

Geliştirdiğimiz ilaç taşıma sisteminin çekirdeğini oluşturan altın nanopartikülü seçmemizin çeşitli nedenleri vardır. GNP'ler ideal boyutu, yüksek yüzey hacim oranı, basit sentez, yüksek stabilite, benzersiz optik, katalitik, elektriksel özellikler, biyo uyumluluk, yüksek kimyasal ve fiziksel stabilite, yüksek ilaç taşıma kapasitesi, uzatılmış dolaşım süreleri, düşük toksisite, çeşitli modifikasyon seçenekleri, biyodistribütör olma ve ilaç bozulmasını önleme yetenekleri gibi çoklu özellikleri nedeniyle özellikle seçilmiştir (Żelechowska-Matysiak vd., 2023; Aftab vd., 2018; Sadiq vd., 2022).

Altın nanopartiküllerin yüzeyi, proteinlerin spesifik olmayan adsorpsiyonunu önlemeye, dolaşımdaki GNP'lerin retiküloendotel system (RES) tarafından alımını en aza indirmeye böylece kan dolaşımında uzun süreli dolaşımına ve dolayısıyla hedef dokuya daha fazla birikmesine yardımcı olabilecek biyoyumlu poli etilen glikol (PEG) ile kaplanır. PEG ile kaplamak GNP'lerin tümör dokuya artan geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi ile geçişini artıran bir özellik olarak rapor edilmiştir (Louis, 2017). Zhang vd., 2011; Huang vd., 2023). Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda ticari olarak satın aldığımız PEG kaplı GNP'leri kullandık. Daha önce yapılan çalışmalarda 10 nm boyutundaki GNP'lerin karaciğer ve böbrekte birikmediği rapor edildiği için (Zhang vd., 2011) biz de çalışmamızda 10 nm boyutundaki küresel GNP'leri kullandık.

TNF- α , hücre çoğalması, farklılaşması, hayatta kalması ve ölümüyle ilgili çeşitli sinyal yollarından sorumlu olan inflamatuvar bir sitokindir (Shao vd., 2013). TNF- α 'nın apoptosisi indükleyerek gerçekleştirdiği seçici anti kanser etki mekanizması çok iyi çalışılmıştır. Ancak anti kanser ilaç olarak kullanımı sistemik toksisiteden ve ölümcül

kardiyomiyopatiden dolayı kısıtlanmıştır (Iyer vd., 2006). Bu nedenle, ilk olarak Paciotti vd., (2004, 2006) tarafından, sistemik toksisiteyi azaltmak ve tümör hücrelerine hedefleme sağlamak için TNF- α PEG kaplı GNP'lere immobilize edilmiştir. Bizde çalışmamızda aynı yöntemi kullanarak PEG kaplı GNP'lere TNF α 'yi immobilize ettik.

Geliştirilen bu ilaç taşıma sistemi üzerine antikanser etkiyi artırmak için Doksorubisin (Dox) ekledik. Dox meme kanseri tedavisinde halen kullanılan çok toksik bir antibiyotiktir. Ancak tüm kemoterapötik tedavilerde olduğu gibi Dox sadece kanser hücrelerini değil aynı zamanda sağlıklı hücreleri de öldürmektedir. Ayrıca Dox'e karşı gelişen direnç kanser tedavisinde başarısızlığa neden olmaktadır. Bu nedenle Dox'i hedef hücreye seçici olarak taşıyabilecek bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmeyi amaçladık.

TNF- α 'nın PEG kaplı GNP üzerine immobilize olduğunu UV-görünür spektroskopi, TEM görüntüleri ve ELISA yöntemiyle doğruladık.

GNP'ler, yüzey plazmon rezonansı (SPR) nedeniyle belirli bir ışık bandını absorbe etme yeteneğine sahiptir. Emilim bandının genişliği ve maksimum emilimin tepe konumu, partiküllerin morfolojisine (boyut, şekil ve homojenlik), partiküller arasındaki koagülasyona ve dielektrik ortama bağlıdır (Aryal vd., 2019). Bizde UV-görünür spektroskopisi ile elde ettiğimiz absorpsiyon spektrumunda GNP'lerin 530 nm de maksimum pik verdiğini gözlemledik. Bu sonuç, aynı boyutlarda (10 nm) GNP'lerin 520-550 nm arasında maksimum bir pik verdiğini gösteren çalışmalar ile uyumluydu (El Domany vd., 2018).

TNF α bağlandıktan sonra bu pikin 570 nm'ye kaydığı ve genişlediği gözlemlendi. Bu pikin pozisyonu ve genişliği parçaçık yüzey modifikasyonu ve partikül boyutundaki artış ile ilgili olarak yorumlandı (Aryal vd., 2019). Ayrıca yaklaşık 420 nm'de daha küçük ikinci bir pik gözlemlendi. Bu pikin TNF α 'ya özgü bir pik olduğu düşünüldü. Bu görüntü daha önce TNF- α 'nın sistin kalıntıları üzerinde bulunan sülfhidril grupları aracılığıyla PEG kaplı GNPlerin yüzeyine kovalent bağlandığını rapor eden çalışmalarla uyumlu bulundu (Paciotti vd., 2006). Dox bağlanmasının sonucunda TNF α 'ya özgü 420 nm'deki pikin çok az kayarak 435 nm'de daha yüksek bir pik oluşmasına neden olduğu gözlemlendi. Absorpsiyon spektrumu ile elde edilen veriler daha

önceki çalışmalar ile uyumlu bulundu (Aryal vd., 2019; El Domany vd., 2018 Spadavecchia vd., 2016; Sikora vd., 2022).

TNF α ve Dox'ın GNP üzerine bağlandığı ayrıca partikül boyutu ve morfolojisini görüntüleme imkanı sunan TEM analizi ile de doğrulandı. 10 nm boyutundaki GNP'ler TNF α bağlandıktan sonra 15 nm, Dox bağlandıktan sonra ise 20 nm olarak ölçüldü. Ayrıca partikül morfolojiside bu bağlanmayı doğrular şekilde değişti.

Ayrıca GNP ve TNF- α arasındaki bağlantıyı doğrulamak için ELISA tekniği kullandık. ELISA sonuçlarına bakıldığında, TNF- α konsantrasyonunun, GNP ile bağlandıktan sonra belirgin bir şekilde düştüğü görüldü. Bu sonuç TNF α 'nın GNP üzerine bağlandığını doğruladı. Sonuç olarak UV-VIS spektrofotometresi, TEM ve ELISA sonuçları bir biriyle uyumlu bulundu.

Bağlama adımları ve karakterizasyonun ardından GNP, TNF α , Dox, GNP-TNF ve GNP-TNF-Dox bileşiklerinden oluşan 5 çalışma grubu oluşturuldu. Bu test bileşiklerinin sitotoksitesi insan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 ve AMJ-13 ile sağlıklı hücre hattı olan REF hücrelerinde MTT test kullanılarak araştırıldı ve 48 saatlik IC50 dozları hesaplandı. Sonuç olarak tüm test bileşiklerinin MCF-7 ve AMJ-13 hücrelerinde doza bağlı olarak artan sitotoksitesi gözlemlendi. MCF-7 hücre hattında en yüksek sitotoksite sırasıyla GNP- TNF α -Dox > Dox > GNP-TNF > GNP > TNF şeklinde gözlemlendi. AMJ-13 hücre hattında ise GNP- TNF α -Dox > GNP-TNF > Dox > GNP > TNF şeklinde gözlemlendi. Bu datalar Dox'ın MCF-7 hücrelerinde daha etkin bir sitotoksiteye neden olduğunu gösterdi. Ayrıca GNP- TNF α -Dox kompleksinin MCF-7 hücrelerinde IC50 dozu 3.74 μ g/mL bulunurken AMJ-13 hücrelerinde 3.33 μ g/mL bulundu. İlginç olanı test bileşiklerinin neredeyse hepsi sağlıklı REF hücrelerinde ancak çok yüksek dozlarda sitotoksiteye neden oldu. Bu sonuç nanopartiküllerin kanser hücreleri için seçici bir tedavi oluşturacağını gösterirdi. Bu sonuçlar GNP-Dox kompleksinin anti kanser etkisini kanserli hücreler ve sağlıklı hücrelerde karşılaştıran çalışmalarla uyumlu bulundu (Iyer vd., 2006). Dox'ın sağlıklı hücrelerde sitotoksik olmamasının nedeni ise sağlıklı hücrede hücre proliferasyonun dolayısıyla topoizomerez enzim düzeyinin az olmasından kaynaklandığı şeklinde yorumlandı.

Test bileşiklerinin sitotoksitesi aynı zamanda klonojenite test sistemi ile de doğrulandı. Test bileşiklerinin IC50 dozları ile 24 saat inkübe edilen hücrelerin koloni oluşturması inverted mikroskopta görüntülendi. Sonuçta, her iki kanser hücre hattının apoptosis sonucu hasar gördüğü, komşu hücrelerle temaslarını kaybettiği ve hücre sayısının azaldığı gözlemlendi. Diğer yandan, REF kontrol hücrelerinin uzun ve yapışkan normal morfolojilerini koruduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar MTT testinde elde edilen datalarla uyumlu olup, MCF-7 ve AMJ-13 hücrelerinde koloni oluşumunun sırasıyla GNP- TNF α -Dox < Dox < GNP-TNF < GNP < TNF şeklinde azaldığı gözlemlendi.

Bundan sonraki aşamada test bileşiklerinin apoptosisi indüklemeye potansiyellerini morfolojik olarak araştırdık. Bunun için Acridine orange – Ethidium Bromide (AO/EtBr) çift boyama testi kullandık. AO/EtBr boyaması ile kanser hücrelerindeki nükleer değişimi ve DNA parçalanmasını floresan mikroskop altında inceledik. AO'ın erken, normal ve geç fazda apoptosisi ayırt etmek için etidium bromür (EB) ile birlikte kullanıldığı bilinmektedir (Smith vd., 2012). AO, apoptotik hücreler de dahil olmak üzere tüm hücre tiplerine geçebilirken, EtBr sadece hasarlı membranlara sahip hücrelere girebildiği için, apoptosisin geç aşamasındaki hücrelere ve ölü hücrelere nüfuz eder ve konsantre DNA fragmentleri ve apoptotik cisimlere bağlandığında turuncu veya kırmızı floresans yayar. Bu test sonucunda biz, GNP- TNF α -Dox kompleksinin MCF-7 ve AMJ-13 hücre hatlarında diğer test bileşiklerine göre en yüksek apoptotik aktiviteye sahip olduğunu gözlemledik. REF hücre hattının ise herhangi bir sitotoksik etki olmaksızın normal morfolojisini koruduğunu gözledik.

Ayrıca hazırladığımız test bileşiklerinin apoptotik aktivitesi ekibimiz tarafından yapılan başka bir çalışmayla doğrulandı. Bu çalışmada test bileşiklerinin apoptosisi indüklemeye potansiyelleri mitokondriyal membran potansiyelinin ölçülmesi, apoptotik genlerden Bad, kaspaz 3, kaspaz 7 ve p53 düzeylerinin ölçülmesiyle değerlendirildi. Test bileşiklerinin mitokondriyal membran potansiyelini düşükten yükseğe doğru sırasıyla TNF, GNP, GNP-TNF, Dox ve GNP-TNF-Dox bozduğu, JC-1 protein düzeyinin flow sitometre ile ölçülmesiyle gösterildi. GNP-TNF-Dox kompleksinin MCF-7 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini %72, AMJ-13 hücrelerinde ise %74 oranında bozarak apoptosisi indüklediği gösterildi (Jawad vd., 2023). Ayrıca test bileşiklerinin aynı sırayla Bad ve kaspaz 3 düzeyinde artışa neden olduğu gösterilerek apoptosisi indükledikleri doğrulandı (Jawad vd., 2023).

Son olarak hazırlanan test bileşiklerinin otofajiyi indükleme potansiyeli otofaji markerı olan LC3 protein düzeyinin flow sitometrede ölçülmesiyle analiz edildi. Sonuçta test bileşiklerin MCF-7 ve AMJ-13 hücrelerinde LC3-II düzeyinde artışa neden olarak otofagozom oluşumunu indüklediği bulundu. En yüksek otofaji indüksiyonu GNP-TNF-Dox kompleksinde saptandı. LC3 protein düzeyi en düşükten en yükseğe doğru sırasıyla, TNF, GNP, Dox, GNP-TNF ve GNP-TNF-Dox bileşiklerinde gözlemlendi.

Sonuçta hazırladığımız nanopartiküllerin hem apoptosis hem de otofaji indüksiyonuna neden olduğunu gözlemledik. Bu durum otofajinin kanser hücrelerinin büyümesini teşvik eden bir mekanizma olduğunu ve apoptosisin olmadığı durumda otofajik hücre ölümünün gerçekleştiğini bildiren çalışmalarla çelişkili görünse de (Lim vd., 2011), son yıllarda yapılan bir çok çalışmada otofaji ve apoptosisin sıralı veya eş zamanlı olarak gerçekleşebileceği rapor edilmiştir. Bu çalışmalar ışığında, otofaji ve apoptosis arasında üç farklı ilişki tanımlanmıştır. Otofaji, apoptosis ile işbirliği yaparak ölümü teşvik edebilir, apoptosise karşı çıkarak hayatta kalmayı destekleyebilir, apoptosisin bir veya daha fazla aşamasına katılarak apoptosise imkan sağlayabilir (Park vd., 2007; Colell vd., 2007; Eisenberg-Lerner vd., 2009; Giansanti vd., 2011 Beilankouhi vd., 2023).

Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda, çok güçlü apoptotik etkiye sahip olduğu bilinen TNF α 'nın da ERK-1/2 sinyal yolağı aracılığıyla otofaji indüksiyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Yuan vd., 2018). Buna ek olarak, yine güçlü apoptotik etkisinden dolayı klinikte kullanılan Dox'in otofagosom oluşumunu indüklediği, LC3II protein düzeyinde ve ATG gen ifadelerinde artışa neden olarak otofaji indüksiyonunu sağladığı bir çok farklı çalışmada rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda özellikle Dox'in neden olduğu otofaji indüksiyonunun tümörü baskılayan, apoptosise destek olan bir süreç olduğu belirtilmiştir (Koleini ve Kardami, 2017). Bu sonuçlar, bizim çalışmamızda kullandığımız tüm test bileşiklerinin hem apoptosis hem de otofajiyi indüklemesini doğrular niteliktedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında hazırlanan nanopartiküllerden GNP-TNF α -Dox kompleksinin diğer nanopartiküllere göre, özellikle bugün klinikte kullanılan Dox tedavisine göre daha etkin bir sitotoksositeye ve antikanser etkiye sahip olduğu bulundu. Ayrıca GNP-TNF α -Dox komplekslerinin meme kanseri hücre hatlarında, kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde sitotoksik olduğu, bunu hem apoptosis hem

de otofaji indüksiyonunu sağlayarak gerçekleştirdiği saptandı. Bu sonuçlar tezin en önemli amaçlarından birisi olan hedefe özgü kanser tedavisi yaklaşımı için GNP-TNF α -Dox komplekslerinin etkin bir antikanser tedavisi oluşturabileceğini ve gelecekte meme kanseri tedavisinde kullanılabileceğini gösterdi.



KAYNAKLAR

- Adegbola, S.O., Sahnan, K., Warusavitarne, J., Hart, A.ve Tozer, P., 2018. Anti-TNF therapy in Crohn's disease, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 8, 2244.
- Aftab, S., Shah, A., Nadhman, A., Kurbanoglu, S., Ozkan, S.A., Dionysiou, D.D., Shukla, S.S. ve Aminabhavi, T.M., 2018. Nanomedicine: An effective tool in cancer therapy, *International Journal of Pharmaceutics*, 540, 132-149.
- Ahmad, T., Raza, S.S., Aleem, E., Kamran, M., Manzoor, U., Makhdoom, A., Ahmad, R. ve Mukhtar, S., 2017. Improvement in mechanical and thermal properties of unsaturated polyester-based hybrid composites, *Iranian Polymer Journal*, 26, 305-311.
- Akhtar, S., Asiri, S.M., Khan, F.A., Gunday, S.T., Iqbal, A., Alrushaid, N., Labib, O.A., Deen, G.R. ve Henari, F.Z., 2022. Formulation of gold nanoparticles with hibiscus and curcumin extracts induced anti-cancer activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 15, 2, 103594.
- Akter, Z., Khan F.Z. ve Khan M., 2023. Gold nanoparticles in triple-negative breast cancer therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, 30, 3, 316-334.
- Alexander, C. M., Hamner, K. L., Maye, M. M. ve Dabrowiak, J. C., 2014. Multifunctional DNA-gold nanoparticles for targeted doxorubicin delivery, *Bioconjugate Chemistry*, 25, 1261-1271.
- Al-Shammari, A. M., Allak, W. J. K., Umran, M., Yaseen, N. Y. ve Hussien, A., 2015. Angiogenesis factors associated with new breast cancer cell line AMJ13 cultured in vitro, *Advances in Breast Cancer Research*, 4, 4, 100-108.
- Al-Ziaydi, A.G., Al-Shammari, A.M., Hamzah, M.I., Kadhim, H.S. ve Jabir, M.S., 2020. Hexokinase inhibition using D-Mannoheptulose enhances oncolytic newcastle disease virus-mediated killing of breast cancer cells, *Cancer Cell International*, 20, 1-10.
- Anselmo, A.C. ve Mitragotri, S., 2015. A review of clinical translation of inorganic nanoparticles, *The AAPS Journal*, 17, 1041-1054.
- Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J.R., Cardoso, F., Siesling, S. ve Soerjomataram, I., 2022. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040, *The Breast*, 66, 15-23.
- Arvizo, R., Bhattacharya, R. ve Mukherjee, P., 2010. Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7, 6, 753-763.

- Aryal, S., Park, H., Leary, J.F. ve Key, J., 2019. Top-down fabrication-based nano/microparticles for molecular imaging and drug delivery, *International Journal of Nanomedicine*, 14, 6631-6644.
- Asadishad, B., Vossoughi, M. ve Alemzadeh, I., 2010. Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin using polyethylene glycol-functionalized gold nanoparticles, *Industrial Engineering Chemistry Research*, 49, 1958-1963.
- Assaye, M. A. ve Gizaw, S. T., 2022. Chaperone-mediated autophagy and its implications for neurodegeneration and cancer, *International Journal of General Medicine*, 15, 5635-5649.
- Baeza, A. ve Vallet-Regí, M., 2019. Nanomotors for nucleic acid, protein, pollutant, and cell detection, pp. 533-557, in: Mousa, S., Bawa, R. ve Audette G.F. (Editor). *The Road from Nanomedicine to Precision Medicine*, Jenny Stanford Publishing, Singapore.
- Banerjee, P.P., Bandyopadhyay, A., Mondal, P., Mondal, M.K., Chowdhury, P., Chakraborty, A., Sudarshan, M., Bhattacharya, S. ve Chattopadhyay, A., 2019. Cytotoxic effect of graphene oxide-functionalized gold nanoparticles in human breast cancer cell lines, *The Nucleus*, 62, 243-250.
- Bansal, S.A., Kumar, V., Karimi, J., Singh, A.P. ve Kumar, S., 2020. Role of gold nanoparticles in advanced biomedical applications, *Nanoscale Advances*, 2, 9, 3764-3787.
- Basova, T.V., Vikulova, E.S., Dorovskikh, S.I., Hassan, A. ve Morozova, N.B., 2021. The use of noble metal coatings and nanoparticles for the modification of medical implant materials, *Materials and Design*, 204, 109672.
- Beilankouhi, E.A., Valilo, M., Dastmalchi, N., Teimourian, S. ve Safaralizadeh, R., 2023. The function of autophagy in the initiation, and development of breast cancer, *Current Medicinal Chemistry*, 31, 1-16.
- Bertram, J.S., 2000. The molecular biology of cancer, *Molecular Aspects of Medicine*, 21, 6, 167-223.
- Bhamidipati, M. ve Fabris, L., 2017. Multiparametric assessment of gold nanoparticle cytotoxicity in cancerous and healthy cells: the role of size, shape, and surface chemistry, *Bioconjugate Chemistry*, 28, 2, 449-460.
- Birgisdottir, Å.B., Lamark, T. ve Johansen, T., 2013. The LIR motif—crucial for selective autophagy, *Journal of Cell Science*, 126, 15, 3237-3247.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F. ve Cerretti, D. P., 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells, *Nature*, 385, 729-733.
- Bukowski, K., Kciuk, M. ve Kontek, R., 2020. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 9, 3233.

- Cai, W., Gao, T., Hong, H. ve Sun, J., 2008. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology, *Nanotechnology Science and Applications*, 19, 17-32.
- Campanella, C., Caruso Bavisotto, C., Logozzi, M., Marino Gammazza, A., Mizzoni, D., Cappello, F. ve Fais, S., 2019. On the choice of the extracellular vesicles for therapeutic purposes, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 2, 236.
- Cavalcante, G.C., Schaan, A.P., Cabral, G.F., Santana-da-Silva, M.N., Pinto, P., Vidal, A.F. ve Ribeiro-dos-Santos, A., 2019. A cell's fate: an overview of the molecular biology and genetics of apoptosis, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 17, 4133.
- Chaudhari, M.B., Desai, P.P., Patel, P.A. ve Patravale, V.B., 2016. Solid lipid nanoparticles of amphotericin B (AmbiOnp): in vitro and in vivo assessment towards safe and effective oral treatment module, *Drug Delivery and Translational Research*, 6, 354-364.
- Chen, T.Y., Chen, M.R., Liu, S.W., Lin, J.Y., Yang, Y.T., Huang, H.Y. ve Lin, K.M. C., 2020. Assessment of polyethylene glycol-coated gold nanoparticle toxicity and inflammation in vivo using nf-kb reporter mice, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 21, 8158.
- Cheng, J., Gu, Y.J., Cheng, S.H., ve Wong, W.T., 2013. Surface functionalized gold nanoparticles for drug delivery, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9, 1362-1369.
- Chinnaiyan, S.K., Soloman, A.M., Perumal, R.K., Gopinath, A. ve Balaraman, M., 2019. 5 Fluorouracil-loaded biosynthesised gold nanoparticles for the in vitro treatment of human pancreatic cancer cell, *IET Nanobiotechnology*, 13, 8, 824-828.
- Chithrani, B. D., Ghazani, A. A. ve Chan, W. C., 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano Letters*, 6, 662-68.
- Chopra, A., Nautiyal, A., Kalkanis, A. ve Judson, M.A., 2018. Drug-induced sarcoidosis-like reactions, *Chest Journal*, 154, 3, 664-677.
- Choy, E.H. ve Panayi, G.S., 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis, *New England Journal of Medicine*, 344, 12, 907-916.
- Christowitz, C., Davis, T., Isaacs, A., Van Niekerk, G., Hattingh, S. ve Engelbrecht, A.M., 2019. Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model, *BMC Cancer*, 19, 1-10.
- Cianfrocca, M. ve Goldstein, L.J., 2004. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer, *The Oncologist*, 9, 6, 606-616.

- Colell, A., Ricci, J.E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N.J., Li, C.W. ve Mari, B., 2007. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation, *Cell*, 129, 5, 983-997.
- Confortin, D., Neevel, H., Brustolon, M., Franco, L., Kettelarij, A.J., Williams, R.M. ve van Bommel, M.R., 2010. Crystal violet: study of the photo-fading of an early synthetic dye in aqueous solution and on paper with HPLC-PDA, LC-MS and FORS, in *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing, 231, 1, 012011.
- Coradeghini, R., Gioria, S., García, C.P., Nativo, P., Franchini, F., Gilliland, D., Ponti, J. ve Rossi, F., 2013. Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts, *Toxicology Letters*, 217, 3, 205-216.
- Creran, B., Yan, B., Moyano, D.F., Gilbert, M.M., Vachet, R.W. ve Rotello, V.M., 2012. Laser desorption ionization mass spectrometric imaging of mass barcoded gold nanoparticles for security applications, *Chemical Communications*, 48, 38, 4543-4545.
- Cui, Y., Ying, Y., Van Hasselt, A., Ng, K.M., Yu, J., Zhang, Q., Jin, J., Liu, D., Rhim, J.S., Rha, S.Y. ve Loyo, M., 2008. OPCML is a broad tumor suppressor for multiple carcinomas and lymphomas with frequently epigenetic inactivation, *PloS One*, 3, 8, 2990.
- Dalgin, G.S., Alexe, G., Scanfeld, D., Tamayo, P., Mesirov, J.P., Ganesan, S., DeLisi, C. ve Bhanot, G., 2007. Portraits of breast cancer progression, *BMC Bioinformatics*, 8, 1-16.
- Debnath, J., Gammoh, N. ve Ryan, K.M., 2023. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 1-6.
- Dekker, F., Kool, L., Bunschoten, A., Velders, A.H. ve Saggiomo, V., 2020. Syntheses of gold and silver dichroic nanoparticles; looking at the *Lycurgus cup* colors, *Chemistry Teacher International*, 3, 1, 20190011,
- Dong, K.C. ve Berger, J.M., 2007. Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases, *Nature*, 450, 1201-1205.
- Du, G.J., Song, Z.H., Lin, H.H., Han, X.F., Zhang, S. ve Yang, Y.M., 2008. Luteolin as a glycolysis inhibitor offers superior efficacy and lesser toxicity of doxorubicin in breast cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372, 3, 497-502.
- Duseja, A., Kapil, S., Sharma, B., Singla, B., Chakraborti, A., Das, A., Ray, P., Dhiman, R. ve Chawla, Y., 2015. Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Toll-Like Receptor Signaling in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *Official Journal of the American College of Gastroenterology|ACG*, 110, S883.

- Dykman, L.A. ve Khlebtsov, N.G., 2011. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects, *Acta Naturae*, 3, 29, 34-55.
- Eghtedari, M., Liopo, A.V., Copland, J.A., Oraevsky, A.A. ve Motamedi, M., 2009. Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells, *Nano Letters*, 9, 1, 287-291.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U. ve Kimchi, A.J.C.D., 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them, *Cell Death and Differentiation*, 16, 7, 966-975.
- El Domany, E.B., Essam, T.M., Ahmed, A.E. ve Farghali, A.A., 2018. Biosynthesis physico-chemical optimization of gold nanoparticles as anti-cancer and synergetic antimicrobial activity using *pleurotus ostreatus* fungus, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8, 5, 119-128.
- Eng, K.E., Panas, M.D., Hedestam, G.B.K. ve McInerney, G.M., 2010. A novel quantitative flow cytometry-based assay for autophagy, *Autophagy*, 6, 5, 634-641.
- Falvo, J.V., Tsytsykova, A.V. ve Goldfeld, A.E., 2010. Transcriptional control of the TNF gene, *Curr Dir Autoimmun*, 11, 27-60.
- Fang, X., Ma, H., Xiao, S., Shen, M., Guo, R., Cao, X. ve Shi, X., 2011. Facile immobilization of gold nanoparticles into electrospun polyethyleneimine/polyvinyl alcohol nanofibers for catalytic applications, *Journal of Materials Chemistry*, 21, 12, 4493-4501.
- Fernandes, A.R., Jesus, J., Martins, P., Figueiredo, S., Rosa, D., Martins, L.M., Corvo, M.L., Carvalheiro, M.C., Costa, P.M. ve Baptista, P.V., 2017. Multifunctional gold-nanoparticles: A nanovectorization tool for the targeted delivery of novel chemotherapeutic agents, *Journal of Controlled Release*, 245, 52-61.
- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J. ve Van Bree, C., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro, *Nature Protocols*, 15, 2315-2319.
- Freshney, R.I., 2015. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications, 8. Edition, John Wiley and Sons.
- Gautier, J., Allard-Vannier, E., Munnier, E., Soucé, M. ve Chourpa, I., 2013. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 169, 48-61.
- Gharoonpour, A., Simiyari, D., Yousefzadeh, A., Badragheh, F. ve Rahmati, M., 2023. Autophagy modulation in breast cancer utilizing nanomaterials and nanoparticles, *Frontiers in Oncology*, 13, 1150492.
- Giansanti, V., Torriglia, A. ve Scovassi, A.I., 2011. Conversation between apoptosis and autophagy: Is it your turn or mine?, *Apoptosis*, 16, 4, 321-333.

- Goldar, S., Khaniani, M.S., Derakhshan, S.M. ve Baradaran, B., 2015. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 6, 2129-2144.
- Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T. ve Rotello, V.M., 2004. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains, *Bioconjugate Chemistry*, 15, 4, 897-900.
- Gorovsky, M.A. ve Keevert, J.B., 1975. Subunit structure of a naturally occurring chromatin lacking histones F1 and F3, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72, 9, 3536-3540.
- Grzelczak, M., Pérez-Juste, J., Mulvaney, P. ve Liz-Marzán L.M., 2008, Shape control in gold nanoparticles synthesis, *Chemical Society Reviews*, 37, 9, 1783-1791.
- Gu, Y.-J., Cheng, J., Man, C. W.-Y., Wong, W.-T., ve Cheng, S. H. 2012. Gold-doxorubicin nanoconjugates for overcoming multidrug resistance, *Nanomedicine*, 8, 2, 204-211.
- Guan, X., Li, Y., Jiao, Z., Chen, J., Guo, Z., Tian, H. ve Chen, X., 2013. A pH-sensitive charge-conversion system for doxorubicin delivery, *Acta Biomaterialia*, 9, 8, 7672-7678.
- Guerrini, L., Alvarez-Puebla, R.A. ve Pazos-Perez, N., 2018. Surface modifications of nanoparticles for stability in biological fluids, *Materials*, 11, 7, 1154.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer, *Cell*, 100, 1, 57-70.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144, 5, 646-674.
- Harzand, F.V., 2022. Synthesis of advanced gold nanoparticles for biomedical applications, *Advances in Applied NanoBio-Technologies*, 3, 4, 13-19.
- Hirsch, F.R., Varella-Garcia, M., Bunn Jr, P.A., Franklin, W.A., Dziadziuszko, R., Thatcher, N., Chang, A., Parikh, P., Pereira, J.R., Ciuleanu, T. ve Von Pawel, J., 2006. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 24, 31, 5034-5042.
- Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H. ve McDermott, M.F., 2019. Tumour necrosis factor signalling in health and disease, *F1000 Research*, 8, 1-12.
- Hoving, S., Seynhaeve, A.L., van Tiel, S.T., Aan de Wiel-Ambagtsheer, G., de Bruijn, E.A., Eggermont, A.M. ve ten Hagen, T.L., 2006. Early destruction of tumor vasculature in tumor necrosis factor- α -based isolated limb perfusion is responsible for tumor response, *Anticancer Drugs*, 17, 8, 949-959.

- Hu, Q., Wu, D., Chen, W., Yan, Z. ve Shi, Y., 2013. Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of caspase-9, *Journal of Biological Chemistry*, 288, 21, 15142-15147.
- Huang, H., Liu, R., Yang, J., Dai, J., Fan, S., Pi, J. ve Guo, X., 2023. Gold nanoparticles: construction for drug delivery and application in cancer immunotherapy, *Pharmaceutics*, 15, 7, 1868.
- Huang, Y., Yan, L., Rong, S., Haller, H. ve Kirch, T., 2012. TNF- α induces endothelial dysfunction via PKC- ζ -dependent NADPH oxidase activation, *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 32, 642-647.
- Iacopetta, D., Ceramella, J., Baldino, N., Sinicropi, M.S. ve Catalano, A., 2023. Targeting breast cancer: An overlook on current strategies, *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 4, 3643.
- Inbal, B., Bialik, S., Sabanay, I., Shani, G. ve Kimchi, A., 2002. DAP kinase and DRP1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death, *The Journal of Cell Biology*, 157, 3, 455-468.
- Iyer, A.K., Khaled, G., Fang, J., ve Maeda, H. 2006. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting, *Drug Discovery Today*, 11, 812-818.
- Jabir, M.S., Taha, A.A. ve Sahib, U.I., 2018. Antioxidant activity of Linalool, *Engineering and Technology Journal*, 36, 1, 64-67.
- Jabir, M.S., Taha, A.A., Sahib, U.I., Taqi, Z.J., Al-Shammari, A.M. ve Salman, A.S., 2019. Novel of nano delivery system for Linalool loaded on gold nanoparticles conjugated with CALNN peptide for application in drug uptake and induction of cell death on breast cancer cell line, *Materials Science and Engineering: C*, 94, 949-964.
- Jain, S., Hirst, D.G. ve O'Sullivan, J., 2012. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy, *The British Journal of Radiology*, 85, 1010, 101-113.
- Jain, V., Singh, M.P. ve Amaravadi, R.K., 2023. Recent advances in targeting autophagy in cancer, *Trends in Pharmacological Sciences*, 44, 5, 290-302.
- Jang, D.I., Lee, A.H., Shin, H.Y., Song, H.R., Park, J.H., Kang, T.B. ve Yang, S.H., 2021. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics, *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 5, 2719.
- Jawad, M.H., Jabir, M.S., Ozturk, K., Sulaiman, G.M., Abomughaid, M.M., Albukhaty, S., Al-kuraishy, H.M., Al-Gareeb, A.I., Al-Azzawi, W.K., Najm, M.A. ve Jawad, S.F., 2023. Induction of apoptosis and autophagy via regulation of AKT and JNK mitogen-activated protein kinase pathways in breast cancer cell lines exposed to gold nanoparticles loaded with TNF- α and combined with doxorubicin, *Nanotechnology Reviews*, 12, 1, 20230148.

- Josephs, S.F., Ichim, T.E., Prince, S.M., Kesari, S., Marincola, F.M., Escobedo, A.R. ve Jafri, A., 2018. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic, *Journal of Translational Medicine*, 16, 1-8.
- Kalashgrani, M.Y. ve Javanmardi, N., 2022. Multifunctional Gold nanoparticle: As novel agents for cancer treatment, *Advances in Applied NanoBio-Technologies*, 20, 1-6.
- Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G.P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E. ve Green, D.R., 2006. Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006, 3, 4493.
- Kaul, G. ve Amiji, M., 2002. Long-circulating poly (ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles for intracellular delivery, *Pharmaceutical Research*, 19, 1061-1067.
- Khandekar, S. V., Kulkarni, M. G., ve Devarajan, P. V., 2014. Polyaspartic acid functionalized gold nanoparticles for tumor targeted doxorubicin delivery, *Journal Biomed. Nanotechnol*, 10, 143-153.
- Khashan, K.S., Jabir, M.S. ve Abdulameer, F.A., 2018. Preparation and characterization of copper oxide nanoparticles decorated carbon nanoparticles using laser ablation in liquid, in *Journal of Physics: Conference Series*, 1003, 012100.
- Koleni, N. ve Kardemi, E. 2017. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity, *Oncotarget* 8, 28, 46663-46680.
- Kumar, D., Saini, N., Jain, N., Sareen, R. ve Pandit, V., 2013. Gold nanoparticles: an era in bionanotechnology, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10, 3, 397-409.
- Lage, H., 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 3, 188-199.
- Larson, T.A., Joshi, P.P. ve Sokolov, K., 2012. Preventing protein adsorption ve macrophage uptake of gold nanoparticles via a hydrophobic shield, *ACS Nano*, 6, 10, 9182-9190.
- Laurent, S., Burtea, C., Thirifays, C., Häfeli, U.O. ve Mahmoudi, M., 2012. Crucial ignored parameters on nanotoxicology: the importance of toxicity assay modifications and cell vision, *PloS One*, 7, 1, e29997.
- Lee, K.X., Shameli, K., Yew, Y.P., Teow, S.Y., Jahangirian, H., Rafiee-Moghaddam, R. ve Webster, T.J., 2020. Recent developments in the facile bio-synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and their biomedical applications, *International Journal of Nanomedicine*, 16, 275-300.

- Levin, A.D., Wildenberg, M.E. ve van den Brink, G.R., 2016. Mechanism of action of anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease, *Journal of Crohn's and Colitis*, 10, 8, 989-997.
- Levine, B. ve Yuan, J., 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict?, *The Journal of Clinical Investigation*, 115, 10, 2679-2688.
- Li, Z., Niu, T., Zhang, Z., Feng, G. ve Bi, S., 2012. Effect of monovalent cations (Li^+ , Na^+ , K^+ , Cs^+) on self-assembly of thiol-modified double-stranded and single-stranded DNA on gold electrode, *Analyst*, 137, 7, 1680-1691.
- Lim, Z.Z., Li, J.E., Ng, C.T., Yung, L.Y. ve Bay, B.H. 2011. Gold nanoparticles in cancer therapy, *Acta Pharmacologica Sinica*, 32, 8, 983-990.
- Lin, J., Ziring, D., Desai, S., Kim, S., Wong, M., Korin, Y., Braun, J., Reed, E., Gjertson, D. ve Singh, R.R., 2008. TNF α blockade in human diseases: an overview of efficacy and safety, *Clinical Immunology*, 126, 1, 13-30.
- Longley, D.B. ve Johnston, P.G., 2005. Molecular mechanisms of drug resistance, *The Journal of Pathology*, 205, 2, 275-292.
- Louis, C., ve Pluchery, O., 2017. Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology. Second edition, World Scientific Book, France.
- Mackay, C.R. ve Imhof, B.A., 1993. Cell adhesion in the immune system, *Immunology Today*, 14, 3, 99-102.
- Maeda, Y., Tabata, H. ve Kawai, T., 2001. Two-dimensional assembly of gold nanoparticles with a DNA network template, *Applied Physics Letters*, 79, 8, 1181-1183.
- Majdalawieh, A., Kanan, M.C., El-Kadri, O. ve Kanan, S.M., 2014. Recent advances in gold and silver nanoparticles: synthesis and applications, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14, 7, 4757-4780.
- Manson, J., Kumar, D., Meenan, B.J. ve Dixon, D., 2011. Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: the influence of capping density on stability in various media, *Gold Bulletin*, 44, 99-105.
- Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H. ve Kroemer, G., 2014. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 2, 81-94.
- Medina, M., 2018. An overview on the clinical development of tau-based therapeutics, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 4, 1160.
- Mihai, M.M., Ion, A., Giurcăneanu, C., Nițipir, C., Popa, A.M., Chifiriuc, M.C., Popa, M.I., Řičař, J., Popa, L.G., Sârbu, I. ve Lazăr, V., 2021. The impact of long-term antibiotic therapy of cutaneous adverse reactions to EGFR inhibitors in colorectal cancer patients, *Journal of Clinical Medicine*, 10, 15, 3219.

- Mikhailova, E.O., 2021. Gold nanoparticles: biosynthesis ve potential of biomedical application, *Journal of Functional Biomaterials*, 12, 4, 70.
- Milan, J., Niemczyk, K. ve Kus-Liśkiewicz, M., 2022. Treasure on the Earth—gold nanoparticles and their biomedical applications, *Materials*, 15, 9, 3355.
- Mills, K.R., Reginato, M., Debnath, J., Queenan, B. ve Brugge, J.S., 2004. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 10, 3438-3443.
- Mir, M., Ishtiaq, S., Rabia, S., Khatoon, M., Zeb, A., Khan, G.M., ur Rehman, A. ve ud Din, F., 2017. Nanotechnology: from in vivo imaging system to controlled drug delivery, *Nanoscale Research Letters*, 12, 1-16.
- Mishra, P., Ray, S., Sinha, S., Das, B., Khan, M.I., Behera, S.K., Yun, S.I., Tripathy, S.K. ve Mishra, A., 2016. Facile bio-synthesis of gold nanoparticles by using extract of *Hibiscus sabdariffa* and evaluation of its cytotoxicity against U87 glioblastoma cells under hyperglycemic condition, *Biochemical Engineering Journal*, 105, 264-272.
- Mizushima, N. ve Komatsu, M., 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues, *Cell*, 147, 4, 728-741.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. ve Klionsky, D.J., 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion, *Nature*, 451, 7182, 1069-1075.
- Momenimovahed, Z. ve Salehiniya, H., 2019. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world, *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 10, 151-64.
- Moore, K., 2015. Hot topics: chemical burns in the emergency department, *Journal of Emergency Nursing*, 41, 4, 364-365.
- Moreno-Alcántar, G., Picchetti, P.ve Casini, A.2023. Gold complexes in anticancer therapy: from new design principles to particle-based delivery systems, *Angewandte Chemie*, 135, 22, e202218000.
- Mozar, F.S. ve Chowdhury, E.H., 2018. Impact of PEGylated nanoparticles on tumor targeted drug delivery, *Current Pharmaceutical Design*, 24, 28, 3283-3296.
- Nie, H., Zheng, Y., Li, R., Guo, T.B., He, D., Fang, L., Liu, X., Xiao, L., Chen, X., Wan, B. ve Chin, Y.E., 2013. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis, *Nature medicine*, 19, 3, 322-328.
- Nitiss, J.L., 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy, *Nature Reviews Cancer*, 9, 5, 338-350.

- Ohsumi, Y., 2014. Historical landmarks of autophagy research, *Cell Research*, 24, 1, 9-23.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B. ve Bao, J.K., 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Proliferation*, 45, 6, 487-98.
- Paciotti, G.F., Kingston, D.G. ve Tamarkin, L., 2006. Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors, *Drug Development Research*, 67, 1, 47-54.
- Paciotti, G.F., Myer, L., Weinreich, D., Goia, D., Pavel, N., McLaughlin, R.E. ve Tamarkin, L., 2004. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery, *Drug Delivery*, 11, 3, 169-183.
- Pagani, O., Senkus, E., Wood, W., Colleoni, M., Cufer, T., Kyriakides, S., Costa, A., Winer, E.P. ve Cardoso, F., 2010. International guidelines for management of metastatic breast cancer: can metastatic breast cancer be cured?, *Journal of the National Cancer Institute*, 102, 7, 456-463.
- Pang, B., Qiao, X., Janssen, L., Velds, A., Groothuis, T., Kerkhoven, R., Nieuwland, M., Ova, H., Rottenberg, S., Van Telling, O. ve Janssen, J., 2013. Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin, *Nature Communications*, 4, 1, 1908.
- Park, K.J., Lee, S.H., Kim, T.I., Lee, H.W., Lee, C.H., Kim, E.H., Jang, J.Y., Choi, K.S., Kwon, M.H. ve Kim, Y.S., 2007. A human scFv antibody against TRAIL receptor 2 induces autophagic cell death in both TRAIL-sensitive and TRAIL-resistant cancer cells, *Cancer Research*, 67, 15, 7327-7334.
- Patergnani, S., Missiroli, S., Morciano, G., Perrone, M., Mantovani, C.M., Anania, G., Fiorica, F., Pinton, P. ve Giorgi, C., 2021. Understanding the role of autophagy in cancer formation and progression is a real opportunity to treat and cure human cancers, *Cancers*, 13, 22, 5622.
- Pedro, R.N., Thekke-Adiyat, T., Goel, R., Shenoi, M., Slaton, J., Schmechel, S., Bischof, J. ve Anderson, J.K., 2010. Use of tumor necrosis factor- α -coated gold nanoparticles to enhance radiofrequency ablation in a translational model of renal tumors, *Urology*, 76, 2, 494-498.
- Pedrosa, P., Corvo, M.L., Ferreira-Silva, M., Martins, P., Carvalheiro, M.C., Costa, P.M., Martins, C., Martins, L.M.D.R.S., Baptista, P.V. ve Fernandes, A.R., 2019. Targeting cancer resistance via multifunctional gold nanoparticles, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 21, 5510.
- Perdomo-Celis, F., Salgado, D.M. ve Narváez, C.F., 2017. Levels of circulating tumor necrosis factor- α in children with symptomatic dengue evaluated by ELISA and bead-based assays, *Viral Immunology*, 30, 1, 45-53.

- Perego, P., Corna, E., Cesare, M.D., Gatti, L., Polizzi, D., Pratesi, G., Supino, R. ve Zunino, F., 2001. Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracyclines, *Current Medicinal Chemistry*, 8, 1, 31-37.
- Pfeffer, C.M.ve Singh, A.T., 2018. Apoptosis: a target for anticancer therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2, 448.
- Powell, A.C., Paciotti, G.F. ve Libutti, S.K., 2010. Colloidal gold: a novel nanoparticle for targeted cancer therapeutics, *Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols*, 375-384.
- Prabaharan, M., Grailer, J.J., Pilla, S., Steeber, D.A., Gong, S., 2009. Gold nanoparticles with a monolayer of doxorubicin-conjugated amphiphilic block copolymer for tumor-targeted drug delivery, *Biomaterials*, 30, 30, 6065-6075.
- Raghavan, R.N., Vignesh, G., Kumar, B.S., Selvaraj, R. ve Dare, B.J., 2015. Phytochemicals: do they hold the future in stem cell differentiation, *Int J Res. Ayurveda Pharma*, 6, 3, 379-81.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S. ve Massey, D.C., 2010. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology, *Physiological Reviews*, 90, 4, 1383-1435.
- Ray, L., Karthik, R., Srivastava, V., Singh, S.P., Pant, A.B., Goyal, N. ve Gupta, K.C., 2021. Efficient antileishmanial activity of amphotericin B and piperine entrapped in enteric coated guar gum nanoparticles, *Drug Delivery and Translational Research*, 11, 118-130.
- Rebecca, V.W. ve Amaravadi, R.K., 2016. Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer, *Oncogene*, 35, 1, 1-11.
- Rivera, E., Valero, V., Esteva, F.J., Syrewicz, L., Cristofanilli, M., Rahman, Z., Booser, D.J. ve Hortobagyi, G.N., 2002. Lack of activity of stealth liposomal doxorubicin in the treatment of patients with anthracycline-resistant breast cancer, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 49, 299-302.
- Roy, A., Pveit, C., Gacem, A., Alqahtani, M.S., Bilal, M., Islam, S., Hossain, M.J., Jameel, M., 2022. Biologically derived gold nanoparticles and their applications, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2022, 1-13.
- Sadiq, Z., Safiabadi Tali, S.H., Hajimiri, H., Al-Kassawneh, M. ve Jahanshahi-Anbuhi, S., 2022. Gold Nanoparticles-based colorimetric assays for environmental monitoring and food safety evaluation, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 26, 1-36.
- Sakthi Devi, R., Girigoswami, A., Siddharth, M. ve Girigoswami, K., 2022. Applications of gold and silver nanoparticles in theranostics, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194, 9, 4187-219.

- Salvati, A., Pitek, A.S., Monopoli, M.P., Prapainop, K., Bombelli, F.B., Hristov, D.R., Kelly, P.M., Åberg, C., Mahon, E. ve Dawson, K.A., 2013. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface, *Nature Nanotechnology*, 8, 2, 137-143.
- Sands, B.E., Sandborn, W.J., Van Assche, G., Lukas, M., Xu, J., James, A., Abhyankar, B. ve Lasch, K., 2017. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease in patients naïve to or who have failed tumor necrosis factor antagonist therapy, *Inflammatory Bowel Diseases*, 23, 1, 97-106.
- Sani, A., Cao, C., Cui, D., 2021. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 100991.
- Saraste, A., ve Pulkki, K., 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovascular Research*, 45, 3, 528-537.
- Shao, J., Griffin, R.J., Galanzha, E.I., Kim, J.W., Koonce, N., Webber, J., Mustafa, T., Biris, A.S., Nedosekin, D.A. ve Zharov, V.P., 2013. Photothermal nanodrugs: potential of TNF-gold nanospheres for cancer theranostics, *Scientific Reports*, 3, 1, 1293.
- Sharif, P.M., Jabbari, P., Razi, S., Keshavarz-Fathi, M. ve Rezaei, N., 2020. Importance of TNF-alpha and its alterations in the development of cancers, *Cytokine*, 130, 155066.
- Siddique, S., ve Chow, J.C., 2020. Gold nanoparticles for drug delivery and cancer therapy, *Applied Sciences*, 10, 11, 3824.
- Sikora, M., Wojcieszak, D., Chudzyńska, A. ve Zięba, A., 2023. Improved methodology of cross-sectional SEM analysis of thin-film multilayers prepared by magnetron sputtering, *Coatings*, 13, 2, 316.
- Sikora, R., 2022. Geological and geomorphological conditions of landslide development in the Wisła source area of the Silesian Beskid mountains, *Geological Quarterly*, 66, 2, 66-19.
- Singh, P., Pandit, S., Mokkapati, V.R., Garg, A., Ravikumar, V.ve Mijakovic, I., 2018. Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 7, 1979.
- Smith, S.M., Ribble, D., Goldstein, N.B., Norris, D.A., Shellman, Y.G., 2012. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates, *Methods in Cell Biology*, 112, 361-368.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S.ve Brennan, M., 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma, *Journal of National Cancer Institute*, 51, 1409-1416.

- Spadavecchia, J., Perumal, R., Casale, S., Krafft, J.M., Methivier, C. ve Pradier, C.M., 2016. Polyethylene glycol gold-nanoparticles: Facile nanostructuration of doxorubicin and its complex with DNA molecules for SERS detection, *Chemical Physics Letters*, 648, 182-188.
- Spriggs, D.R. ve Yates, S.W., 1992. Clinical studies of tumor necrosis factor in the USA, pp: 275-284, in: Osawa, T. ve Bonavida, B. (Editor), *Tumor necrosis factor: structure-function relationship and clinical application*, Library of Congress Cataloging, Chiba-shi, Japon.
- Steckiewicz, K.P., Barcinska, E., Malankowska, A., Zauszkiewicz-Pawlak, A., Nowaczyk, G., Zaleska-Medynska, A. ve Inkielewicz-Stepniak, I., 2019. Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in in vitro model. Evaluation of the safety of use and anti-cancer potential, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30, 1-15.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y. ve Yu, Q., 2015. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis, *Molecular Cancer*, 14, 1-4.
- Supp, D.M., Hahn, J.M., Combs, K.A., McFarland, K.L. ve Powell, H.M., 2022. Isolation and feeder-free primary culture of four cell types from a single human skin sample, *STAR Protocols*, 3, 1, 101172.
- Swiech, O.A., Opuchlik, L.J., Wojciuk, G., Stepkowski, T.M., Kruszewski, M. ve Bilewicz, R., 2016. Doxorubicin carriers based on Au nanoparticles—effect of shape and gold-drug linker on the carrier toxicity and therapeutic performance, *RSC Advances*, 6, 38, 31960-31967.
- Szaba, F.M. ve Smiley, S.T., 2002. Roles for thrombin and fibrin (ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo, *Blood*, The Journal of the American Society of Hematology, 99, 3, 1053-1059.
- Taatjes, D.J., Sobel, B.E. ve Budd, R.C., 2008. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis, *Histochemistry and Cell Biology*, 129, 33-43.
- Takeuchi, I., Onaka, H. ve Makino, K., 2018. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous injection: Effects of PEGylation at the same particle size, *Biomedical Materials and Engineering*, 29, 2, 205-215.
- Tasdemir, E., Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Criollo, A., Vitale, I., Hangen, E., Modjtahedi, N. ve Kroemer, G., 2008. Methods for assessing autophagy and autophagic cell death, *Methods Mol Biol*, 445, 29-76.
- Tewey, K.M., Rowe, T.C., Yang, L., Halligan, B.D. and Liu, L.F., 1984. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II, *Science*, 226, 4673, 466-468.

- Thorburn, J., Moore, F., Rao, A., Barclay, W.W., Thomas, L.R., Grant, K.W., Cramer, S.D. ve Thorburn, A., 2005. Selective inactivation of a Fas-associated death domain protein (FADD)-dependent apoptosis and autophagy pathway in immortal epithelial cells, *Molecular Biology of The Cell*, 16, 3, 1189-1199.
- Tiwari, P.M., Bawage, S.S. and Singh, S.R., 2015. Gold nanoparticles and their applications in photomedicine, diagnosis and therapy, pp: 249-266, in: Hamblin, M.R. ve Avci, P. (Editor), *Applications of Nanoscience in Photomedicine*, Elsevier.
- Tonkin-Reeves, A., Giuliani, C.M.ve Price, J.T., 2023. Inhibition of autophagy; an opportunity for the treatment of cancer resistance, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1177440.
- Tsai, D.H., Elzey, S., DelRio, F.W., Keene, A.M., Tyner, K.M., Clogston, J.D., MacCuspie, R.I., Guha, S., Zachariah, M.R. and Hackley, V.A., 2012. Tumor necrosis factor interaction with gold nanoparticles, *Nanoscale*, 4, 10, 3208-3217.
- Turkevich, J., Stevenson, P.C.ve Hillier, J., 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75.
- Valencia, X., Stephens, G., Goldbach-Mansky, R., Wilson, M., Shevach, E.M. and Lipsky, P.E., 2006. TNF downmodulates the function of human CD4⁺ CD25^{hi} T-regulatory cells, *Blood*, 108, 1, 253-261.
- Viale, G., 2012. The current state of breast cancer classification, *Annals of Oncology*, 23, 207-210.
- Vigderman, L., ve Zubarev, E. R., 2013. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 5, 663-676.
- Visaria, R.K., Griffin, R.J., Williams, B.W., Ebbini, E.S., Paciotti, G.F., Song, C.W., Bischof, J.C., 2006. Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor- α delivery, *Molecular Cancer Therapeutics*, 5, 4, 1014-20.
- Vitto, V.A., Bianchin, S., Zolondick, A.A., Pelliello, G., Rimessi, A., Chianese, D., Yang, H., Carbone, M., Pinton, P., Giorgi, C.ve Patergnani, S., 2022. Molecular mechanisms of autophagy in cancer development, progression, and therapy, *Biomedicines*, 10, 7, 1596.
- Wang, H., Wang, Y., Jin, J. ve Yang, R., 2008. Gold nanoparticle-based colorimetric and “turn-on” fluorescent probe for mercury (II) ions in aqueous solution, *Analytical Chemistry*, 80, 23, 9021-9028.
- Wang, X. ve Gerdes, H.H., 2015. Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells, *Cell Death and Differentiation*, 22, 7, 1181-1191.

- Wang, X., Yang, C., Körner, H., ve Ge, C., 2022. Tumor Necrosis Factor: What Is in a Name?, *Cancers*, 14, 21, 5270.
- Wilton-Ely, J.D., 2008. The surface functionalisation of gold nanoparticles with metal complexes, *Dalton Transactions*, 1, 25-29.
- Wong, R. S., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30, 1, 1-14.
- Yang, H., Duan, G., Zhu, J., Zhang, W., Xi, Y. ve Fan, Q., 2013. Prevalence and characterisation of plasmid-mediated quinolone resistance and mutations in the gyrase and topoisomerase IV genes among *Shigella* isolates from Henan, China, between 2001 and 2008, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42, 2, 173-177.
- Yang, L.Y., Wu, K.H., Chiu, W.T., Wang, S.H. ve Shih, C.M., 2009. The cadmium-induced death of mesangial cells results in nephrotoxicity, *Autophagy*, 5, 4, 571-572.
- Yang, X., Yang, M., Pang, B., Vara, M. ve Xia, Y., 2015. Gold nanomaterials at work in biomedicine, *Chemical Reviews*, 115, 19, 10410-10488.
- Yang, Y., Matsubara, S., Nogami, M. ve Shi, J., 2007. Controlling the aggregation behavior of gold nanoparticles, *Materials Science and Engineering: B*, 140, 3, 172-176.
- Yang, Y., Zheng, X., Chen, L., Gong, X., Yang, H., Duan, X. ve Zhu, Y., 2022. Multifunctional gold nanoparticles in cancer diagnosis and treatment, *International Journal of Nanomedicine*, 17, 2041-2067.
- Yao, L., Bojic, D. ve Liu, M., 2023. Applications and safety of gold nanoparticles as therapeutic devices in clinical trials, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 13, 960-967.
- Yetisgin, A.A., Cetinel, S., Zuvun, M., Kosar, A. ve Kutlu, O., 2020. Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications, *Molecules*, 25, 9, 2193.
- Yuan, Y., Ding, D., Zhang, N., Xia, Z., Wang, J., Yang, H., Guo, F. ve Bing, L.B., 2018. TNF- α induces autophagy through ERK1/2 pathway to regulate apoptosis in neonatal necrotizing enterocolitis model cells IEC-6, *Cell Cycle* 17, 11, 1390-1402.
- Żelechowska-Matysiak, K., Wawrowicz, K., Wierzbicki, M., Budlewski, T., Bilewicz, A. ve Majkowska-Pilip, A., 2023. Doxorubicin-and trastuzumab-modified gold nanoparticles as potential multimodal agents for targeted therapy of HER2+ cancers, *Molecules*, 28, 6, 2451.

- Zhang, L., Zhang, X., Che, D., Zeng, L., Zhang, Y., Nan, K., Zhang, X., Zhang, H. ve Guo, Z., 2023. 6-Methoxydihydrosanguinarine induces apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells by accumulating ROS to suppress the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, *Phytotherapy Research*, 37, 1, 124-39.
- Zhang, X., Chibli, H., Mielke, R. ve Nadeau, J., 2011. Ultrasmall gold– doxorubicin conjugates rapidly kill apoptosis-resistant cancer cells, *Bioconjugate Chemistry*, 22, 2, 235-243.
- Zhang, Z.M., Gao, P.C., Wang, Z.F., Sun, B.W., ve Jiang, Y., 2015. DNA-caged gold nanoparticles for controlled release of doxorubicin triggered by a DNA enzyme and pH, *Chem. Commun*, 51, 12996-12299.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Marwa Hassan JAWAD JAWAD

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Kerbala Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Irak, 2008.

Yüksek Lisans : Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2017.

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. **Marwa H.Jawad**, Majid S.Jabir, Kamile Ozturk, Ghassan M.Sulaiman, Mosleh M.Abomughaid, Salim Albukhaty, Hayder M.Al-kuraishy, Ali I.Al-Gareeb, Waleed K.Al-Azzawi, Mazin A.A.Najm and Sabrean F.Jawad. Induction of apoptosis and autophagy *via* regulation of AKT and JNK mitogen-activated protein kinase pathways in breast cancer cell lines exposed to gold nanoparticles loaded with TNF- α and combined with doxorubicin. Nanotechnology Reviews 2023; 12: 20230148. **(SCI-Exp) Q1)**
2. Majid S. Jabir, Noor A. Abood, **Marwa H. Jawad**, Kamile Öztürk, Haider Kadhim, Salim Albukhaty, Ahmed Al-Shammari, Faizah A. AlMalki, Jawaher Albaqami & Ghassan M. Sulaiman. Gold nanoparticles loaded TNF- α and CALNN peptide as a drug delivery system and promising therapeutic agent for breast cancer cells. Materials Technology 2022: 37 (14): 3152-3166. **(SCI-Exp) Q2**
3. **Marwa Jawad**, Kamile Öztürk, Majid S. Jabir. TNF- α loaded on gold nanoparticles as promising drug delivery system against proliferation of breast cancer cells. Materials Today: Proceedings 2021:42(5):3057-3061.

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. **Marwa H. Jawad**, Kamile Öztürk, Majid S. Jabir. TNF- α loaded on gold nanoparticles as promising drug delivery system against proliferation of breast

cancer cells. 3rd International Conference on Materials Engineering and Science (IConMEAS 2020), 28-30 December, Kuala Lumpur, Malaysia.

