

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***VİTİS VINİFERA* EKSTRAKTI (ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ) İLE
SENTEZLENEN ALTIN NANOPARTİKÜLLERİNİN İN VİTRO
ANTİKANSER ETKİLERİNİN VE KOLON KANSERİ
HÜCRELERİNE KARŞI GEMSİTABİN İLE BİRLİKTE
KULLANIMLARININ ARAŞTIRILMASI**

Selim GENÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAĞLIK VE BİYOMEDİKAL BİLİMLER (DİSİPLİNLERARASI)

ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Şükriye YEŞİLOT

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0595-YL-19 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2020

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez dönemim süresince her konuda destek veren, yardım ve tavsiyelerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlanmaktan büyük onur duyduğum değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şükriye YEŞİLOT' a,

Tez çalışmam süresince laboratuvarını bize açan ve yardımlarını esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesinden değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Suray PEHLİVANOĞLU'na ,

Bu süreç boyunca bilgi ve tecrübeleriyle her daim yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem AYDIN ACAR' a,

Yine bu süreç boyunca bilgi ve tecrübeleriyle her daim yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Soner DÖNMEZ' e

Hayatımın her anında olduğu gibi yüksek lisans öğrenimim boyunca her zaman yanımda olan, desteklerini esirgemeyen, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan değerli aileme,

Çocukluğumdan bu yana karşılaştığımın her türlü zorlukta desteğini hep yanımda hissettiğim değerli arkadaşım Hüseyin BÜYÜKKELEŞ' e,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Vitis vinifera</i> (Üzüm Çekirdeği) Ekstraktı Genel Özellikleri	3
2.2. Nanopartiküller	4
2.2.1. Nanopartiküllerin Sentezi	6
2.2.1.1. Kimyasal Sentez	6
2.2.1.2. Biyolojik Sentezi	7
2.3. Altın Nanopartikülü	8
2.3.1. Altın Nanopartiküllerin Kimyasal ve Mekanik Özellikleri	10
2.3.2. Altın Nanopartiküllerinin Sentezi	11
2.3.2.1. Altın Nanopartiküllerinin Yeşil Sentezi	12
2.3.3. Altın Nanopartiküllerin Kullanım Alanları	13
2.4. Kanser	13
2.4.1. Hücre Döngüsü ve Karsinogenez	14
2.4.2. Kanser Oluşumuna Neden Olan Etkenler	15
2.5. Kolon Kanseri	16
2.5.2. Epidemiyolojisi	17
2.5.4. HT29 Kolon Kanseri Hattı	18
2.6. Gemsitabin	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Gereç	20
3.2. Yöntem	20
3.2.1. <i>Vitis vinifera</i> (Üzüm Çekirdeği) Ekstraktının Hazırlanması	20
3.2.2. Altın Nanopartiküllerin (Vv-AuNP) Sentezi	21
3.2.3. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	21
3.2.4. Hücre Kültürü	21
3.2.4.1. Hücrelerin Ekimi ve FBS İle Muamelesi	22
3.2.5. BrdU Hücre Proliferasyon Deneyi	22
3.2.6. Western Blot Deneyi	23
4. BULGULAR	26
4.1. Altın Nanopartiküllerin (AuNP) Biyosentezi	26
4.2. UV-VIS Spektrofotometre ile Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	26
4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	27

4.4. HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinde Altın Nanopartiküllerin (Vv-AuNP) ve Gemsitabinle Birlikte Kullanımının Doza Bağımlı Sitotoksik Etkisi	28
4.5. HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinde Altın Nanopartiküllerin (Vv-AuNP) ve Gemsitabinle Birlikte Kullanımının Apoptotik Etkisi	30
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	47



ŞEKİLLER

Şekil 4.1.	Üzüm çekirdeği (<i>Vitis vinifera</i>) ekstraktı kullanılarak altın nanopartiküllerin biyosentezi; (A) <i>Vitis vinifera</i> (Vv) ekstraktı, (B) H ₂ AuCl ₄ çözeltisi, (C) H ₂ AuCl ₄ / <i>Vitis vinifera</i> ekstraktı, (D) Altın nanopartiküllerin ilk görüntüsü (Vv-AuNP-I), (E) Altın nanopartiküllerin son görüntüsü (Vv-AuNP-II)	26
Şekil 4.2.	Altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) UV-vis spektrumu	27
Şekil 4.3.	<i>Vitis vinifera</i> ile sentezlenmiş altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) SEM görüntüsü	28
Şekil 4.4.	HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin hücre canlılığı üzerine altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) doza bağımlı sitotoksik etkisi.	29
Şekil 4.5.	HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin hücre canlılığı üzerine altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) Gempitabin ile birlikte kullanımının doza bağımlı sitotoksik etkisi.	29
Şekil 4.6.	HT-29 kolon kanseri hücrelerinde altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) tek başına ve Gempitabin ile kombibe uygulamalarının hücre canlılığı üzerine etkilerinin karşılaştırılması	30
Şekil 4.7.	Western blotla tespit edilmiş β -aktin ve kaspaz-3 bantlarına ait görüntüler	31
Şekil 4.8.	Vv-AuNP'in Kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi	31
Şekil 4.9.	Vv-AuNP ve Gempitabinin birlikte kullanımının Kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi	32

SİMGELER ve KISALTMALAR

AuNP	Altın Nanopartikül
PEG	Polietilen Glikol
HAuCl₄	Kloroaurik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribo Nükleik asit
UV-vis	UV-Visible Spectrophotometer (UV-Görünür Spektrofotometre)
SEM	Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskobu)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	Fetal Bovin Serum
GRAS	Generally Recognized As Safe
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
TMB	Tetramethylbenzidine
BSA	Bovin Serum Albumin
PVDF	Polivinilidin Florür
LDH	Laktat Dehidrogenaz
NIST	National Institute of Standards and Technology
Vv-AuNP	<i>Vitis vinifera</i> ekstraktından sentezlenmiş Altın Nanopartikül

ÖZET

***Vitis vinifera* Ekstraktı (Üzüm Çekirdeği) ile Sentezlenen Altın Nanopartiküllerinin in Vitro Antikanser Etkilerinin ve Kolon Kanseri Hücrelerine Karşı Gemsitabin ile Birlikte Kullanımlarının Araştırılması**

Kolon kanseri, dünyada kadın ve erkeklerde gözlenen en yaygın kanser türlerinden biri olup, önlenmesi ve tedavisi ile ilgili çözüm arayışları halen devam etmektedir. Mevcut kanser tedavilerinde karşılaşılan problemleri çözmek adına yenilikçi teknolojilerden biri olan nanoteknoloji, istenen özellikleri elde etmek için çok çeşitli organik ve inorganik malzemeler kullanarak nanoparçacıkların tasarlanmasını ve karakterize edilmesini mümkün kılmaktadır. Bu çalışmada, *Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği) ekstraktı kullanılarak altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) biyosentezi ve HT-29 insan kolon kanseri hücreleri üzerine tek başına ve Gemsitabin ile birlikte kullanımının in vitro sitotoksik ve apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. *Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği) sulu ekstraktı kullanılarak sentezlenen altın nanopartiküllerin karakterizasyonu UV-görünür spektrofotometre (UV-vis) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HT-29 hücreleri farklı konsantrasyonlarda (0-400µg/mL) hazırlanmış Vv-AuNP'lerle ve 200 µg/ml sabit dozda Gemsitabin ile birlikte 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Sentezlenen Vv-AuNP'lerin ve Gemsitabinle kombinasyonunun HT-29 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri BrdU hücre proliferasyon testi ile apoptoz ilişkili Kaspaz-3 protein seviyeleri ise Western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak Vv-AuNP'lerin kontrol grubuna kıyasla kolon kanseri hücrelerinde hücre ölümünü arttırdığı gözlenmiştir. Vv-AuNP'lerin 200 µg/ml ve üzeri dozda kullanıldığında hücre canlılığında %50'den fazla azalma olduğu, Gemsitabin ile birlikte kullanımında ise daha düşük Vv-AuNP dozunda kombine etkide artış olduğu görülmüştür. Artan Vv-AuNP dozlarında Kaspaz-3 aktivasyonunun arttığı kombine kullanımda bu apoptotik etkinin daha belirgin olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada üzüm çekirdeği ekstraktı ile sentezlenmiş Vv-AuNP'lerin Gemsitabin ile birlikte kullanımının sinerjistik bir etki oluşturduğu ve kolon kanseri tedavisi için alternatif bir terapötik ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Altın Nanopartikül, Gemsitabin, HT-29, Kolon Kanseri, *Vitis Vinifera*

ABSTRACT

Investigation of In Vitro Anticancer Effects of Gold Nanoparticles Synthesized with *Vitis vinifera* Extract (Grape Seed) and Their Combined Use with Gemcitabine Against Colon Cancer Cells

Colon cancer is one of the most common types of cancer observed in men and women in the world, research to improve prevention and treatments remains ongoing. Nanotechnology, one of the innovative technologies to solve the problems encountered in current cancer treatments, makes it possible to design and characterize nanoparticles using a wide variety of organic and inorganic materials to obtain the desired properties. In this study, it was aimed to perform biosynthesis of gold nanoparticles using *Vitis vinifera* (grape seed) extract and to evaluate cytotoxic and apoptotic effects of gold nanoparticles (Vv-AuNP) Gemcitabine co-administration on HT-29 human colon cancer cells in vitro. The characterization of gold nanoparticles synthesized using the aqueous extract of *Vitis vinifera* (grape seed) was performed using UV-visible spectrophotometer (UV-vis) and scanning electron microscope (SEM). HT-29 cells were treated with increasing concentrations of Vv-AuNPs (0-400µg/ml) and combination with at a fixed dose of 200 µg/ml Gemcitabine for 72 hours. The cytotoxic effects of synthesized Vv-AuNPs and their combination with Gemcitabine on HT-29 cells were determined by BrdU cell proliferation test and Caspase-3 protein levels associated with apoptosis were determined by Western blot. . It was observed that Vv-AuNPs induced a significant increase of cell death in colon cancer cells compared to control group in dose dependent manner. It was observed that the use of Vv-AuNPs at a dose of 200 µg/ml and above decreased cell viability by more than 50%, and increased combined effect when Gemcitabine co-administration at lower Vv-AuNP dose. It was found that Caspase-3 activation was increased at increasing Vv-AuNP doses, and this apoptotic effect was more pronounced when Gemcitabine co-administration. In this study, it has been shown that the use of Vv-AuNPs synthesized with grape seed extract together with Gemcitabine has a synergistic effect and can be used as an alternative therapeutic agent for colon cancer treatment.

Keywords: Colon Cancer, Gemcitabine, Gold Nanoparticle, HT-29, *Vitis Vinifera*

1. GİRİŞ

Kanser; meydana gelişi, gelişimi ve oluşturduğu etki bakımından her bir hasta için oldukça fazla çeşitlilik gösteren, karmaşık bir yapıya sahip hastalık olarak tanımlanabilir. Kanser hücrelerde, köklü metabolik ve davranışsal farklılaşmalar meydana getiren çok aşamalı bir süreci kapsar. Kanser hücrelerinin çoğalması çok hızlı bir şekilde ve zamansız olur. Kanser hücrelerinin hızla çoğalıp, yayılması sonucunda, kanserin meydana geldiği bölgeden daha uzaktaki dokular bile etkilenebilir (Merlo ve ark., 2006).

Kanser çeşitleri arasında bilhassa kolon kanseri, hem kadın hem de erkeklerde görülebilen en yaygın kanser türlerinden biridir. Birçok ülkede yapılan araştırmalarda, ölüme neden olan hastalıklar sıralamasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sıra da yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmalarda, yılda yaklaşık 150.000 yeni vaka tespit edildiği ve hastaların yaklaşık üçte birinin kansere bağlı nedenlerden öldüğü belirtilmektedir. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı istatistiklerine göre kolon kanseri tüm kanserler içinde %6.2 görülme sıklığı ile dördüncü sırayı almaktadır. Kanser tedavisinde ölüm oranını azaltmak ve sağkalımı artırmak için cerrahi yöntemler, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve yeni tedavi yöntemlerinden immünoterapi, gen tedavisi, anjiyogenez inhibitörleri ve sinyal ileti sistemi inhibitörleri kullanılmaktadır (Tanrıverdi, 2015).

Kanser tedavilerinde sıklıkla karşılaşılan bazı sorunlar bulunmaktadır. Bunlar; tümör karşıtı ajanlarının nonspesifik sistemik dağılımı, kanserli bölgeye ulaşan düşük ilaç konsantrasyonları, tolere edilemeyen sitotoksitite, terapötik yanıtları görüntülemeadaki güçlükler ve çoklu ilaç direnci gelişimi olarak sıralanabilir. Belirttiğimiz bu sorunlara çözüm üretecek yenilikçi teknolojilerin gelişimi acil ve önemli bir ihtiyaç haline gelmiştir (Misra ve ark., 2010)

Nanoteknoloji, 1-100 nm büyüklüğündeki nanopartikülerin üretimi, karakterizasyonu ve kullanımını kapsayan bir teknolojidir. Birçok teknolojik gelişme, istenen özellikleri elde etmek için çok çeşitli organik ve inorganik

malzemeler kullanarak nanoparçacıkların tasarlanması ve karakterize edilmesini mümkün kılmaktadır (Albrecht ve ark., 2006). Nanopartikülleri bitkiler kullanarak sentezlemek yeşil sentez olarak bilinir ve son zamanlardaki gelişmelere konu olmuştur. Altın nanopartiküller yüksek biyoyumluluk sergiler ve bu nedenle görüntüleme, ilaç dağıtımı, gen dağıtımı dahil olmak üzere çok çeşitli tıbbi uygulamalara sahiptir. Tıbbi kullanım için yeterli optik özelliklere sahip altın nanopartiküllerin sentezlenmesine yönelik mevcut yöntemler, sulu ve organik ortamlarda üretimi içerir (Khademi-Azandehi ve Moghaddam, 2015).

Altın nanopartiküllerin, özellikle kanser tedavisi ve görüntülemesinde kullanılabilirliklerinin araştırılması son zamanlarda gündemde önemli bir yer edinmiştir. Bu tercih edilmenin önemli nedeni altının kimyasal yapısı olarak bir soy metal olması ve toksik olmayan karakteristiğe sahip olmasıdır (Tan ve ark., 2012).

Yapmış olduğumuz çalışmanın amacı; *Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği) ekstraktı kullanarak hazırlanan altın nanopartiküllerin tek başına ve Gempitabin ile kombine kullanımının HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Vitis vinifera* (Üzüm Çekirdeği) Ekstraktı Genel Özellikleri

Üzüm, tarihçesi MÖ 5000’li yıllara kadar uzanan yeryüzünde kültürü yapılan en eski türlerden olup, asmagiller (Vitaceae) ailesinin Vitis cinsinden, sarılgan bir yapıya sahip bir bitki türüdür. Üzümün ilk olarak doğduğu coğrafya, Anadolu’nun da içinde bulunduğu, Küçük Asya ve Kafkasya’yı da içine alıp kapsayan bölgedir. Üzümün yaklaşık 15000 den fazla çeşidi olduğu düşünülmekte olup, bunların 1200 den fazla çeşidi Anadolu da yetişebilmektedir, bu da diğer meyve türleri ile kıyaslandığında, üzümün diğer meyvelere oranla oldukça yüksek bir çeşitliliğe sahip olduğunu gösterir. Mısırlılar 6000 yıldan fazla süredir beslenme amacıyla üzümü tüketmişler ve eski antik yunan filozofları üzümün farklı kısımlarının, insan sağlığını iyileştirme de pozitif yönde etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Bunu da üzümün hemen hemen bütün kısımlarında bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler gösterdiğini baz alarak öne sürmüşlerdir (IsmailE ve ark., 2014).

Üzüm çekirdeği ekstraktının, kimyasal maddeler sebebiyle karaciğer ve böbrekte meydana gelen toksisiteye karşı koruma sağladığı, karaciğer dokusunda bcl-x ekspresyonunu yükselttiğini ve hem nekrotik hem de apoptotik karaciğer hücrelerinin ölümünü antagonize ettiği belirtilmiştir (Ray ve ark., 2001; Ray ve ark., 2001; Ray ve ark., 2000).

Üzüm çekirdeğinin yapısında, yapılarında fenol halkası bulunan ve en basit fenolik bileşik olan fenolden oluşan ikincil metabolitlerden olan, fenolik bileşenler biyolojik etkin madde olarak bulunur. Temeli bitkisel kaynaklara dayanan çalışmalara bakıldığında, fenolik bileşikler genel olarak iki grupta sınıflandırılabilir. Bunlar fenolik asitler ve flavonoidlerdir. Fenolik asitler ise kendi içinde hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Flavonoidler difenilpropandan meydana gelmişlerdir ve bitkisel fenoliklerin en önemli grubudur. Flavonoidlerin biyolojik sistemdeki yararlı etkileri serbest radikaldeki elektronları transfer etmelerine, metal katalizörleri şelatlamalarına ve oksidazları inhibe etmelerine bağlıdır (Cos ve ark., 1998; Ferrali ve ark., 1997).

Üzüm çekirdeğinin yapısında bulunan fenolik bileşikler, tanenler, kateşin, kumarinler ve gallik asit esterlerinin antimikrobiyal etkiye sahiptirler. Fenolik bileşikler bitkilere, böcek ve organizmalara karşı antimikrobiyal madde olarak koruma sağlamaktadır. Tanenler, basit fenoller ve fenolik asitler de antimikrobik etkiye sahiptir. Tanenlerin mikrobiyal enzimler ve hücre proteinleri ile oluşturdukları komplekslerden dolayı antimikrobiyal etkileri meydana çıkmaktadır (Cowan, 1999).

Yapılan araştırmalarda yara iyileşmesinde üzüm çekirdeği ekstraktının pozitif yönde önemli bir katkısının olduğu gözlemlenmiştir. Üzüm çekirdeği serbest radikallerin artmasına etki etmesi sebebiyle, yara çevresindeki patojen bakterilerin temizlenmesine katkı sağlayıp, zarar gören damarların yenilenmesine yardımcı olarak yara iyileşmesine pozitif katkısı olduğu belirtilmiştir (Khanna ve ark., 2002).

Uzun yıllardan bu yana Avrupa ve Amerika'da besin takviyesi olarak kullanılmakta olan üzüm çekirdeği U.S. Food and Drug Administration (FDA) tarafından GRAS kategorisinde yer almaktadır. Üzüm çekirdeğinin ideal doz olarak alınması gereken günlük miktarı 100 mg ile 300 mg arasında değişmekte olup, günümüze kadar yapılan in vivo çalışmalarda üzüm çekirdeğinin insan sağlığı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olduğu görülmemiştir. Bayanlarda özellikle hamilelik döneminde ve doğum sonrası çocuğun anne sütü ile beslendiği dönemlerde üzüm çekirdeğinin kullanılmasının kontrendike olduğu belirtilmiştir (Kar ve ark., 2006).

2.2. Nanopartiküller

Metal, yarı iletken, seramik, organik moleküler topluluk, kompozit ya da polimerik malzemeler nanopartiküllerin meydana gelmesinde rol oynayan malzemelerdir.

İlerleyen dönemlerde teknolojinin gelişmesiyle ortaya çıkacak yeniliklerle birlikte; atom, molekül ve nano küme boyutlarında, nano yapıların organize edilmesi, aygıtlara dönüştürülmesi, malzemenin ve yüzeylerin tasarlanması ve işlenmesi üzerine ilerlemelerin olacağı ve yeni buluşların ortaya çıkacağı ön görülmektedir.

Nanopartiküller boyutlarındaki farklılıklar sebebiyle, elektronik, mekanik, manyetik, yapısal ve optik özelliklerinde farklılık gösterirler. Farklılık göstermelerinin nedenleri; yüksek yüzey-hacim oranları ve nano boyutlu yapılarda meydana gelen kuantum alan etkileridir. Bir maddenin, nanopartiküllerin sahip oldukları bu özellikleri gösterebilmesi için genellikle 100 nm ya da daha küçük boyutta bir yapıya sahip olması gerekmektedir (Biçer, 2008).

Canlı organizmalar, sıklıkla 10 µm çapına sahip hücrelerden meydana gelirler. Aynı zamanda, hücre parçaları hücrelere göre çok daha küçük yapıdadır. Hücre parçaları genellikle mikron altı boyutundadır. Hücre parçalarından daha küçük yapıda olanı ise, tipik boyutu sadece 5 µm olan, en küçük insan yapımı nanopartiküllerin boyutları ile kıyaslanabilen proteinlerdir. Boyutun bu basit şekilde kıyaslanması nanoparçacıkları, çok fazla parazit oluşturmada hücresel makinede casusluk yapmamızı sağlayacak çok küçük problemler olarak kullanma düşüncesini ortaya çıkartır (Taton, 2002).

Nanoparçacıklar büyük çoğunlukla nano-biyomateryalin çekirdeğini meydana getirir. Aynı zamanda moleküler montaj için uygun bir yüzey olarak kullanılabilir. Nanoparçacıklar, polimerik ya da inorganik malzemelerden oluşabilir. Aynı zamanda, bir tabaka veya bir zar ile kaplı nano-vezikül şeklinde de bulunabilirler. Nanoparçacıkların şekli genellikle küreseldir ancak silindirik şekilde ya da plakaya benzer şekilde veya diğer şekiller de görülebilir. Boyut ve boyut dağılımı, bazı durumlarda önem arz edebilir. Örneğin hücresel bir zarın bir gözenek yapısından geçilmesi gerektiğinde. Malzeme özelliklerinin kontrolünü sağlamak için kuantum boyutlu etki mekanizmaları kullanıldığında, boyut ve boyut dağılımı son derece kritik bir önem taşıyabiliyor. Ortalama bir parçacık boyutunun sıkı bir kontrolü ve dar bir boyut dağılımı, çok geniş bir dalga boyu aralığında dar ışık yayan çok etkili flüoresan problemleri meydana getirmesini sağlar. Bu durum, çok sayıda ve iyi düzeyde ayırt edici renklere sahip biyobelirteçlerin oluşturulmasına olanak sağlar (Tunca, 2015).

Akciğerler, nanopartiküllerin insan vücudundaki en önemli giriş ve hedef organıdır. İnhalasyon yapılması ile akciğerlere alınan partiküller, pariyetal plevraya

kadar ulaşır. Kısa boyutlu ya da sarmal yapıya sahip olanlar makrofajlar tarafından çevrelenerek yok edilir. Ancak yüksek boy-en oranına sahip nanotübler asbest lifleri gibi stomalar çevresinde toplanarak birikirler. Makrofajlar, bu lifsi yapıları nedeniyle nanotübleri fagosite edemez ve ortama mezotel hücreleri tarafından proinflamatuvar, genotoksik, mitojenik mediatörler salınır (Donaldson ve ark., 2010).

Bu sürecin meydana gelmesinde özellikle partikül boyutları önem taşımaktadır. Partikül boyutu 100 nm’ den daha küçük olan nanopartiküllerin hava ve sıvıda daha fazla biriktikleri, epitel hücreleri, lenfatikler, kan, sinir sistemi ve sekonder hedef organlara daha fazla geçtikleri, büyük partiküllerin ise karaciğerin eliminasyonu nedeniyle hedef organlara ulaşamadığı yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Oberdörster, 2010).

2.2.1. Nanopartiküllerin Sentezi

2.2.1.1. Kimyasal Sentez

Nanopartikül sentezlenmesinde kullanılan yöntemler; aşağıdan yukarıya olarak isimlendirilen “Bottom up” ve yukarıdan aşağıya olarak isimlendirilen “Top Down” olarak belirtilmiştir. Top down olarak adlandırılan yöntemde, dışarıdan uygulanan kimyasal yada mekaniksel işlemler ile enerji verilen malzeme nano boyuta parçalanmaktadır. Bu parçalanma işlemi bu yöntemlerin temelini oluşturur. Bottom up olarak adlandırılan yöntemlerinde ise, aşındırma yada mekanik öğütme gibi fiziksel işlemler esas alınmaktadır. Bu teknikler aynı zamanda yüksek enerjili öğütme veya yüksek hız değirmenleri olarak da tanımlanmaktadır. Çünkü bu yöntemlerde, klasik öğütme işlemlerine oranla çok yüksek miktarda enerji harcanmaktadır. Bottom up yaklaşımına dahil yöntemler de; atomik veya moleküler boyuttaki yapıları kimyasal reaksiyonlar ile büyüterek partikül oluşumunun meydana gelmesi olarak tanımlanmaktadır. Kullanılan polimer baz alındığında, biyoyumluluk, parçalanma davranışı, uygulama yolu, ilacın istenilen salım profili, biyomedikal uygulama tipi polimer seçime bakıldığında, ilk yıllarda monomerlerin çeşitli ortamlarda in situ polimerizasyonuna dayanmaktadır. İlerleyen yıllarda, tam olarak karakterize edilmiş önceden sentezlenmiş polimer veya doğal

makromoleküllerin dispersiyonlarına dayalı yöntemler geliştirilmiştir (Çoşkunçay, 2017).

2.2.1.2. Biyolojik Sentezi

Metal nanopartiküllerin de kullanılan klasik sentez metodları karmaşık bir yapıda ve maliyet olarak da yüksek olmaktadır. Bununla birlikte, nanopartiküllerin sentezlenmesi ve stabilize edilmesinde kullanılan kimyasal ayırıcılar toksik bir yapıdadır bu yüzden oluşan atıklar doğanın kirlenmesine sebep olmaktadır. Biyosentez ise klasik sentez yöntemlerine kıyasla daha basit ve daha az maliyetli olmakla birlikte zehirli madde kullanımı gerektirmez. Biyomedikal ve farmakolojik uygulamalara daha uygun yapıda, ticari üretime daha yatkındır. Bu sebeplerden dolayı daha sıklıkla biyolojik yaklaşımlar üzerinde çalışılmaktadır.

Biyosentez, biyolojide canlı organizmalardaki kimyasal aşamaları belirten terimdir ve enerji kullanılarak gerçekleştirilen bu süreçler sonucunda basit yapıdaki maddelerden daha kompleks yapıdaki ürünler meydana gelmesini sağlar.

Biyosentezin nanoteknolojideki tanımına baktığımızda ise; bitki ekstraktı, mikroorganizma, mantar, maya, alg, virüs vb. canlı organizmaları kullanarak nanotanecek sentezlemektir. Metal nanotaneceklerde kullanılan klasik sentez yöntemleri; karmaşık bir yapıda ve çok maliyetli olması, zehirli madde kullanımı gerektirmesi, farmakolojik ve biyomedikal uygulamalara uygun olmaması gibi birçok dezavantaj içermektedir. Yeşil kimya olarak da adlandırılan biyosentez yöntemi metal nanopartiküllerin sentezlenmesinde kullanılmaktadır (Yıldız, 2011).

Biyosentez sıklıkla tercih edilen bir yöntem durumuna gelmiştir. Bir tepkimenin ya da bir metaryalin yeşil olarak tanımlanabilmesi için;

- Güvenli olma
- Sadece bir tek tepkime basamağından oluşması
- Tepkime sonucunda atık oluşmaması
- Elde edilmesinde yenilenebilir hammaddelerin kullanılması

- Çevreye zarar vermiyor olması
- Ürün ayrıştırılmasının kolay olması
- %100 verimle tepkimenin gerçekleşmesi koşullarını sağlaması gerekmektedir.

Tepkimelerin birçoğunda bu koşulların tümünü sağlamak oldukça zordur.

Bitkilerin yapısında zehirli kimyasallar bulunmadığı ve doğal sınırlama maddeleri bitkiler tarafından direkt olarak sentezlenebildiği için nanopartikül sentezde bitkilerin kullanılması iyi bir seçenektir. Altın ve gümüş nanopartiküller bitki özütlerinin sentezi ile elde edilmektedir. Bitkinin yanı sıra mantar, maya ve bakteri gibi canlılardan da nanopartiküller sentezlenmektedir. Çok hücreli ve çoklu kültürel organizmalar hücre içi ve hücre dışı inorganik nanopartiküller üretebilirler (Mohanpuria ve ark., 2008; Vithiya, 2011).

2.3. Altın Nanopartikülü

Krizoterapi adı verilen altın ve altın tuzlarının hastalıkların tedavisinde kullanımının geçmişi antik çağlara kadar uzanmaktadır. Altını antik kültürlerde çiçek hastalığı, sifiliz, deri ülseri, kızamık gibi hastalıkların tedavisinde kullanmışlardır. Günümüze tıp alanında ortaya çıkan umut verici gelişmelerle birlikte; tümör oluşumunu engelleyen, anti-mikrobiyal, anti-malaryal ve anti-HIV özelliklerine sahip çeşitli organogold kompleksleri ortaya konulmuştur (Tan ve ark., 2012).

Son yirmi yılda nanoboyutlardaki materyaller kullanılarak yapılan çalışmalar bilim insanları tarafından fazlaca tercih edilmeye başlanmıştır. Altın nanopartiküllerin (AuNP) kendilerine has kimyasal ve fiziksel yapıları bulunduğundan, yapılan çalışmalarda en yaygın olarak tercih edilen nanomatemeryallerden biridir. Altın nanopartiküllerinin bu özellikleri son yıllarda AuNP üzerine yapılan çalışmaların ve akademik yayınların hızlı bir şekilde artmasından da anlaşılmaktadır. (Lu ve ark., 2012).

Altın nanopartiküllerin, özellikle kanser tedavisi ve görüntülemesinde kullanılabilirliklerinin araştırılması son zamanlarda gündemde önemli bir yer

edinmiştir. Bu tercih edilmenin önemli nedeni altının kimyasal yapısı olarak bir soy metal olması ve toksik olmayan karakteristiğe sahip olmasıdır (Tan ve ark., 2012).

Altının kimyasal yapısı olarak soy metal olması ve non-toksik özellik göstermesi sebebiyle, ilaç hedefleme ve kontrollü salım alanlarında, diğer nanoteknolojik yapılara kıyasla altın nanopartiküller çok özel bir yer kaplamaktadır (Conner ve ark., 2005).

Altın nanopartiküllerin (AuNP) yapısının kolay sentezlenebilir olması ve yüzey modifikasyonları, ayarlanabilir çekirdek boyutu ve şekli, optik özellikleri sebebiyle görüntüleme ajanları, ilaç taşıyıcılar ve teranostik ajanları olarak bilim adamları tarafından ilgi merkezi olmuştur (Kim ve Jon, 2012). Altın nanopartiküllerinin günümüzde ki en büyük odak noktası koruyucu ve işlevsel ligandlar üzerindedir. Bunun sebebi nanopartiküllerin yüzey işlevselliğinin potansiyel uygulamalar için oldukça fazla önem taşımaktadır. Çok sayıda durumda, AuNP'lerinin aktiviteleri zarar görmeden yüzeylerine tamamlayıcı DNA zincirleri, antikorlar, enzimler ve bazı polimerler kolay bir şekilde konjuge edilebilir (Lu ve ark., 2012).

AuNP konjugeleri, yükseltilmiş bağlanma ilgisi ve sistematikçe belirli hücre ve dokulara taşındığında seçici hedefleme gibi kendine has özelliklere sahiptirler. Bununla birlikte, AuNP'lerle konjuge ilaçların taşınımı, tümör odaklarını hedef alırken yüksek serpilme yüzdesine sahiptir. Bu sebepten dolayı, tedavi için ihtiyaç olan tümör engelleyici ilaç dozajını azaltma ve sağlıklı dokulardaki toksisite seviyesini azaltarak daha düşük yan etkisi oluşmasını sağlamaktadır (Ajnai ve ark., 2014).

Altın nanopartikülleri çok düşük oranda sitotoksik etki göstermeleri sebebiyle, hücre içine yönlendirildiklerinde sağlıklı hücrelere zarar vermezler (Lasagna-Reeves ve ark., 2010; Suhukla ve ark., 2005). Altın nanopartiküller, kaplama ajanlarının hiçbirisiyle etkileşim göstermemesi sebebiyle, tek katmanda hidrofobite ve yük gibi yüzey özelliklerinin ayarlanmasına imkan tanımaktadır (Ghosh ve ark., 2008).

AuNP'leri, oligonükleotit biyomoleküllerine basitçe bağlanan tiyol (-SH) grubu ile etkileşim göstererek çekirdeksel hedefleme olarak adlandırılan; gen taşınması, antisens terapi gibi uygulamalarda seçici özellik göstermektedir. Hedeflenen nanopartiküller taşıdıkları ilaç yüklerini hücre içi etkileşimle (pH, glutasyon) veya dışarıdan verilen uyarımlarla (ışık) hedef doku ve hücrelere aktarmaktadır (Han ve ark., 2006; Hong ve ark., 2006; Polizzi ve ark., 2007).

Altın nanopartikülleri, antikanser ajanlar başta olmak üzere birçok ilaç, ligand ve terapötik özellik gösteren biyomoleküllerle rahatlıkla etkileşime girip bağlanabilme özelliklerine sahiptirler. Altın nanopartiküllerin meydana getirdiği biyomoleküler, yüzey modifikasyonları sayesinde yapıların in vivo farmakokinetik, biyodağılım ve sirkülasyon sürelerini yükseltebilmektedir (Pissuwan ve ark., 2011).

Nanopartikül yüzeyine iliştirilen ligandlar, membran reseptörleriyle etkileşim göstererek nanopartiküllerin hücre zarından geçerek stoplazmaya doğru ilerlemesini sağlar. Bu sebeple partiküllerin hücre zarından geçişinde bir nanopartikül yüzeyindeki ligand sayısı çok önemli bir yer sağlar. Normal şartlarda 2 nm çapında kabul edilen AuNP yüzeyine 100 molekül ligand bağlanabilmektedir (Ghosh ve ark., 2008).

Zubarev ve ark. yapmış oldukları çalışmada, sentezledikleri 2 nm çapındaki altın nanopartiküllerinin yüzeyine 70 çift paklitaksel antikanser ilaç molekülü bağlanmıştır (Gibson ve ark., 2007).

2.3.1. Altın Nanopartiküllerin Kimyasal ve Mekanik Özellikleri

Altın nanopartikülleri çok iyi düzeyde bir kimyasal ve mekanik stabilite gösterirler. Ayrıca altın nanopartiküllerin 4°C' de karanlık bir ortamda saklanması kararlı kalma süresini artırdığı tespit edilmiştir. Kimyasal indirgeme işlemi sırasında reaksiyon karışımına ilave edilen iyonik olmayan fluorosurfaktant ile, 2 ile 11 pH aralığındaki bir seviyede 30 gün süresince dayanabilen daha kararlı AuNP'lerin elde edilmesine imkan sağlanmaktadır (Li ve ark., 2012). Altın nanopartiküllerin tek tabakalı PEG gibi bağlayıcılar kullanılarak işlevselleştirilmesiyle, kararlılık daha da

basitleştirilebilir. Altın nanopartikülleri büyük yüzey alanlarına sahip olması sebebiyle, kararlılığa ilave olarak, kanser hedefleme gruplarının yada ilaçların kendisine bağlanmasını sağlayacak, çok sayıda bağlayıcı barındırma özelliğine sahiptir (Yetişgin ve Güney, 2017).

2.3.2. Altın Nanopartiküllerinin Sentezi

Altın nanopartiküllerin sentezi için günümüze kadar çok sayıda değişik yöntem geliştirilmiş ve birçok farklı yöntem üstüne çalışılmaktadır. Altın nanopartiküllerinin sentezlenmesinde farklı kimyasal ve fiziksel metodlarda kullanılabilir fakat bu metodlar maddi olarak daha yüksek maliyetli hem de doğa için daha tehlikeli kimyasalların kullanımını gerektireceği için çevre dostu değildir. Bitkiler, alg, bakteri ve fungi gibi canlıların kullanılmasıyla elde edilen altın nanopartiküller ve buna benzer biyolojik metotlardan faydalanılarak yapılan sentez işlemi daha az maliyetli, toksik olmayan ve çevre dostu yöntemlerdir (Srinath ve Rai, 2015).

AuNP sentezinde ilk kullanılan metot 1951 yılında Turkevich ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Lu ve ark., 2012). Turkevich metodu ismiyle bilinen bu sistemde, altın nanopartiküller HAuCl_4 bileşiğinin kaynar su içerisinde sodyum sitrat ile indirgenmesiyle hazırlanmaktadır (Lu ve ark., 2012). Turkevich metodun da, sitrat hem anyonik dengeleyici hem de indirgeyici ajan olarak kullanılır. Altın-sitrat oranının ayarlanması ile partikül çapı birkaç nm ile birkaç yüz nm arasında değiştirilebilir. Genellikle, ortama daha az sodyum sitrat eklenerek daha büyük boyutta partiküller üretilmesi sağlanır. Düşük verimliliğe sahip olmasını ve suyu çözücü olarak kullanmasını bu yöntemin en büyük dezavantajları olarak gösterebiliriz (Tan ve ark., 2012).

AuNP sentezinde kullanılan bir diğer yaygın yöntem ise 1857 yılında Faraday'ın iki fazlı sisteminden esinlenilerek Brust ve ark. (1994), tarafından geliştirilmiştir. AuCl_4 , iki fazlı sistemde alkan tiyollerinin varlığında sodyum borhidrür (NaBH_4) tarafından indirgenmesiyle gerçekleşir. Bu altın nanopartiküller alkan tiyoller ile kapaklandığında oldukça kararlıdır. Bununla birlikte, tamamen

kurutulabilir ve organik çözücüler içinde yeniden dağınık hale gelebilir (Lu ve ark., 2012). Bu metot ile sentezlenen partiküllerin çekirdek boyutu 1.5 nm ve 5 nm arasında farklılık gösterir. Bu boyut değişikliği altın-tiyol oranının değiştirilmesi ile kontrol edilebilir (Tan ve ark., 2012).

2.3.2.1. Altın Nanopartikülerinin Yeşil Sentezi

Nanoteknoloji alanı, modern malzeme bilimlerinde en aktif araştırma alanlarından biridir. Nanoteknoloji, günden güne gelişim gösteren, insan yaşamının tüm alanlarında etki yaratan ve yaşam bilimlerinde, özellikle biyomedikal cihazlarda ve biyoteknolojide artan heyecan duygusu yaratan bir alandır. Son zamanlarda, kimyasal süreçlerin ve ürünlerin tasarımında, geliştirilmesinde ve uygulanmasında insan sağlığı ve çevre için tehlikeli maddeleri azaltmayı veya ortadan kaldırmayı amaçlayan yeşil kimya gittikçe önem kazanmaktadır. Yeşil kimyanın 12 ilkesine uymak için, birçok araştırma geleneksel toksik kimyasallar yerine doğal malzemeler kullanarak, zararlı kimyasalların ve çözücülerin kullanımından kaçınmaya veya kullanım miktarlarını azaltmaya çalışmıştır (Parida ve ark., 2011).

Altın nanopartiküller yüksek biyoyumluluk sergiler ve bu nedenle görüntüleme, ilaç dağıtımı, gen dağıtımı dahil olmak üzere çok çeşitli tıbbi uygulamalara sahiptir. Tıbbi kullanım için yeterli optik özelliklere sahip altın nanopartiküllerin sentezlenmesine yönelik mevcut yöntemler, sulu ve organik ortamlarda üretimi içerir. Her altın nanoparçacık her tıbbi uygulamada kullanılamaz. Örneğin, görüntüleme için uygun büyüklükteki nanoparçacıklar fototermal terapi ile uyumsuzdur.

Geleneksel sentez yöntemleri farklı boyutlarda altın nanoparçacıkları üretir, ancak zararlı yüzey türlerinin bulunmadığı ve fizyolojik koşullar altında kümelenmeye neden olan tıbbi olarak kabul edilemez nanopartiküller üretir (pH 7.4). Nanopartikülleri bitkiler kullanarak sentezlemek yeşil sentez olarak bilinir ve son zamanlardaki gelişmelere konu olmuştur (Khademi-Azandehi ve Moghaddam, 2015).

2.3.3. Altın Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Organik olmayan nanopartiküller ve bunların organik bileşenlerle olan hibritleri, kendilerine daha büyük boyutlu partikül ve materyallerden ayıran spesifik optik, fiziksel, kimyasal ve elektronik özellikler içerirler (Kim ve Jon, 2012). Özellikle AuNP'leri bu nanopartiküller içerisinde; toksisitesinin düşüklüğü, biyouyumluluğu, boyutunu belirleyebilmesi ve yüzey modifikasyonları gibi özellikleri sebebiyle biyoteknoloji ve tıp alanında sıklıkla tercih sebebi olmuştur. Bilhassa kanser tedavisinde altın nanopartikülleri ilaç taşıyıcı olarak kullanılmakta ve geliştirilmesi yönünde çalışılmaktadır. Bununla birlikte dolaşımda uzun yarılanma ömrü bulunması sebebiyle biyosensör ve görüntüleme ajanları olarak kullanımı da giderek yaygınlaşmaktadır. Au nanopartikülleri göz hastalıklarının tedavisinde, tedavi edici maddelerin retina altındaki kısımlara taşınmalarında etkin rol oynadığı için özellikle etkin kullanılmaktadır. AuNP'leri, özellikle kanser tedavi ilaçlarının taşınmasında tümörlü hücreleri hedef almaktadır. Bu sayede, kemoterapinin yan etkileri gibi normal hücrelerde oluşan olumsuz etkiler bu yöntemle oluşmamaktadır (Ajnai ve ark., 2014; Tan ve ark., 2012).

2.4. Kanser

Kanser; oluşumu, gelişimi ve meydana getirdiği etki bakımından her bir hasta için oldukça fazla farklılıklar gösteren, yapısı karmaşık bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Kanser hastalığı hücrelerde, köklü metabolik ve davranışsal değişiklikler meydana getiren çok aşamalı bir süreçtir. Kanser hücrelerinin çoğalması çok hızlı bir şekilde ve zamansız olur ve bu çoğalmanın sonucunda olduğu bölgeden daha uzaktaki dokulara bile etki ederler (Merlo ve ark., 2006).

Kanser, hücrenin büyümesi ve hücre mitozunu kontrol eden hücre genlerinin mutasyonu veya normal olmayan aktivasyonu sonucunda meydana gelmektedir (Guyton ve Hall, 2001).

Kanser, ciddi bir ölüm sebebi olmakla birlikte, yılda yaklaşık on milyondan fazla kişiye tanının konduğu ciddi bir hastalıktır. Kanser başlangıçta belirli bir

bölgede başlayıp, vücuttaki diğer bölgelere hızla yayılma eğilimi gösterir böylece kanseri tedavi edilemez bir duruma gelir. Kanser hastalığında bazı tedavi yöntemleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlar; kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahale olarak sıralanabilir. Günümüzde kullanılan kanser tedavilerinde oldukça fazla karşılaşılan problemler; anti-tümör ajanlarının nonspesifik sistemik dağılımı, tümör bölgesine ulaşan yetersiz ilaç konsantrasyonları, tolere edilemeyen sitotoksitite, terapötik yanıtları görüntülemedeki güçlükler ve çoklu ilaç direnci gelişimidir. Bu karşılaşılan problemleri ortadan kaldırmak için yenilikçi teknolojilerin gelişmesi acil ve önemli bir gereksinimdir (Misra ve ark., 2010).

Bütün kanser hücrelerinde ortak iki özellik bulunur;

- Normal olmayan hücre çoğalmasını tanımlayan; hücre büyümesi ve bölünmesi,
- Kanserli hücrelerin vücudun sağlıklı bölümlerine yayılması ve istilasını (metastazi) engelleyen normal sınırlamalardaki anormallikler (Klug ve ark., 2011).

Kanserli hücre ile normal hücre arasında ciddi farklılıklar bulunmaktadır. Kanserli hücre, olması gereken hücre büyüme sınırına uygun hareket etmez. Böyle olmasının sebebi normal hücrelerin büyümesi için gerekli büyüme faktörlerine kanserli hücrelerin ihtiyacının olmamasıdır. Kanser hücreleri, normal hücrelere kıyasla birbirlerine daha az bağlanırlar. Bu nedenden dolayı kanserli hücrelerin dokular arasında dolaşmaya yatkınlığı bulunur. Kanserli hücreler kan dolaşımına katılarak vücudun her yerine dağılabilirler, böylelikle sayılamayacak kadar yeni kanser odakları meydana getirebilirler. Bazı kanser hücreleri tarafından anjiyogenik faktörleri üretilir. Bu faktörler kanser içinde büyüyüp gelişen çok sayıda damar oluşturarak, kanserin büyümesi için gerekli olan besin maddelerini temin ederler (Guyton ve Hall, 2001).

2.4.1. Hücre Döngüsü ve Karsinogenez

Hücre homeostazının sağlanması; hücre çoğalmasının gerçekleşmesi,

büyümenin sona ermesi ve apoptoz ile gerçekleşir (Cabadak, 2008). Hücre döngüsü; bir hücrenin bölünmeye başlamasıyla, bu bölünmeyi izleyen bir sonraki hücre bölünmesine kadar geçen sürede, hücrede meydana gelen geçici morfolojik değişikliklerin ve biyokimyasal aktivitelerin görüldüğü sürece denilmektedir (Canpolat, 2016). Bölünmenin meydana geldiği evre hücre döngüsünde oldukça kısa bir evredir. İki bölünme arasında kalan aralık yani döngünün geri kalan kısmı interfaz evresi olarak adlandırılır. Hücrenin aktif olduğu interfaz evresi DNA'nın replike edildiği (S), sentez fazından önceki (G₁) ve sonrasındaki faz (G₂) olmak üzere 3 fazı meydana getirir. G₁ fazında aktif olarak büyüme gerçekleştikten sonra S evresinde gerekli enzimler sentezlenir ve DNA replikasyonundan sonra G₂ fazında bölünme için gerekli hazırlıklar yapılarak bölünme evresinin sonunda (M) hücre siklusu tamamlanmış olur (Kasap ve ark., 2010). Bu siklusta hücrenin uyarılması ve büyüme gerçekleşir ve mitozdan sonra hücre döngüden çıkarak dinlenme fazı olan G fazında bekler. Hücre döngüsünde çeşitli kontrol noktalarında siklusun devam edip etmeyeceğine karar verilir. Bu kontrol geçişleri G₁-S geçişinde, G₂-M geçişinde ve metafaz- anafaz geçişinde bulunur. Döngü içindeki olayları kontrol altında tutan çok sayıda ve kompleks etkileşimler bulunur. Hücre bölünmesinin kontrolünün bozulmasına, bu siklusun düzenlenmesinde meydana gelen hatalar neden olur. Bu kontrol yerlerinde meydana gelen değişimler kanserin meydana gelmesine neden olabilir (Cabadak, 2008).

Karsinogenez; bir vücut hücresinin genetik ve epigenetik değişimler sonucunda meydana gelen kanser hücresine dönüşüm aşamalarının bütünü olarak tanımlanmaktadır. Karsinogenezi çevresel toksik maddeler, beslenme bozuklukları, iyonize radyasyon, immün sistem anomalileri gibi faktörler başlatabilmektedir (Genç ve Hacivekiroğlu, 2017).

2.4.2. Kanser Oluşumuna Neden Olan Etkenler

Kanser hücrelerinde genler ya mutasyona uğrar ya da uygun olmayan şekilde ifade edilir. Genlerin mutasyona uğrama olasılığı belli bazı kimyasal maddelerle, fiziksel ve biyolojik faktörlerin etkisiyle birkaç kat daha artmaktadır. Bu faktörlerden

bazıları;

- X-ışınları, gama ışınları ve ultraviyole ışınlar kanser oluşumuna zemin hazırlar. Bu ışınların etkisi altındaki doku hücrelerinde meydana gelen iyonlar yüksek derecede reaktif olduklarından, DNA zincirini kopararak birçok mutasyonun oluşmasına sebep olurlar.
- Bazı belirli tipteki kimyasal maddelerin mutasyon meydana getirmeye büyük yatkınlığı vardır. Farklı türdeki anilin boya türevlerinin kansere neden oldukları çok uzun süre önce keşfedilmiştir.
- Fiziksel olarak dokuları tahriş edici maddeler de kanseri meydana getirebilmektedir. Tahriş edici maddeye temas ile dokuda oluşan harabiyet hızlı bir mitotik çoğalma meydana getirerek zamanla kanserli doku oluşturabilmektedir.
- Birçok ailede kansere yakalanma kalıtsal olarak meydana gelmektedir. Kanser kalıtsal olarak yatkın olan ailelerin genomlarında mutasyona uğramış gen bulunmaktadır. Bu sebepten kalıtsal yatkınlığı bulunan kişilerde, kanser gelişmeye başlamadan önce diğer kişilere oranla çok daha az sayıda ilave mutasyon meydana gelmesi kanseri oluşturmak için yeterli olmaktadır.
- Laboratuvar hayvanlarında yapılan araştırmalarda bazı kanser tiplerinin meydana gelmesine belirli virüs tiplerinin sebep olduğu anlaşılmıştır. Bunu iki farklı şekilde açıklamak mümkündür: DNA virüsleri örneğinde, virüse ait olan DNA zinciri direkt olarak kromozomlardan birine yerleşir. Böylece mutasyon oluşturarak kanser oluşmasını sağlar. RNA virüsleri örneğinde ise bu virüslerin bazıları bünyelerinde ters transkriptaz enzimi bulundurlar. Bu enzim DNA'nın RNA'dan kopyalama yapmasına neden olur. Daha sonra kopyalanan gen hayvan hücre genomuna kendini yerleştirerek kanserin oluşmasına sebep olur (Guyton ve Hall, 2001).

2.5. Kolon Kanseri

Sindirim sistemi vücuda alınan besin maddelerinin işlenerek sindirilmesini ve oluşan atık maddelerin vücut dışına atılmasında görev alır. Kolon sindirim sisteminin

önemli bir parçasıdır. Kolon veya rektumda yani kalın bağırsağın kısımlarında gelişen kanser tipi kolorektal kanser (aynı zamanda kolon kanseri, rektal kanser, bağırsak kanseri olarak da bilinmektedir) olarak adlandırılır. Kolon kanseri; kolonun içini döşeyen hücrelerde bir mutasyon meydana geldiği zaman ortaya çıkar. Mutasyonlar, bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesine sebep olurlar. Bu mutasyonla kontrolsüz şekilde büyüyen hücreler daha sonra kalın bağırsak içindeki sağlıklı dokuyu ve vücudun diğer bölgelerindeki hücreleri etkileyerek kanserin yayılmasına sebep olurlar. Kolon kanserinin pek çok çeşidi olmasına rağmen (örn; leiomyosarkom, lenfoma, melanoma, nöroendokrin tümörler) en yaygın olanı adenokarsinomlardır. Kolon kanseri, kolonun iç tabakasında bulunan glandüler yapıların hücrelerinde başlar. Tedavi edilmez ise potansiyel olarak ilk önce kolon duvarlarına ondan sonra ise lenf sistemi ve diğer organlara yayılır (Usta, 2014).

2.5.2. Epidemiyolojisi

Kolon kanseri dünyada yılda yaklaşık bir milyondan fazla kişiye tanının bulunduğu yaygın ve ciddi bir hastalıktır. Görülme sıklığı olarak kadınlarda ikinci sırada, erkeklerde ise üçüncü sıklıkta görülen kanser çeşitidir. Kolon kanseri görülen kişilerin büyük kısmı sporadiktir ve nesilden gelen kalıtsal bir genetik değişim tanımlanamamıştır. Patogenezi bakıldığında ise adenom oluşumundan itibaren gelişim gösteren bir dizi genetik değişiminin kanser oluşumuna sebep olduğu görüşü kabul edilen bir görüştür. Tümör hücreleri fibroblastlar, endotel hücreleri ve immün hücrelerden oluşan karmaşık bir yapının içinde hayatlarını sürdürürler. Bu mikro çevrede kendine yer bulmak ve immün ataklardan uzak kalabilmek için sürekli savaş halindedirler. Bu durumdayken, inflamatuvar ve stromal hücrelerden salınan büyüme faktörlerini kendi gelişimini sağlamak için kullanırlar. Kolon kanseri vakalarında, inflamatuvar mikro çevreye, tümörün içinde bulunduğu stromaya, tümöre infiltre immün hücrelerin tiplerine ve yoğunluğuna bakılarak, hastalığın hareketi hakkında bilgi edinilebilmektedir (Dranoff, 2004; McLean ve ark., 2011; Smyth ve ark., 2004).

Kolon kanser mortalitesi batı ülkelerinde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada bulunmaktadır. Batı ülkeleri ile doğu ülkeleri arasında kolon kanseri

mortalitesi bakımından bir kıyaslama yapıldığında, doğu ülkelerine kıyasla batı ülkelerinde yüksek mortalite görülmesi, doğu ile batının beslenme alışkanlıklarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle beslenmede aşırı kırmızı et, işlenmiş et tüketimi ve düşük meyve-sebze tüketimi kolon kanseri için risk faktörünü artırıcı etki olarak kabul edilmektedir (Arab ve Il'ysaova, 2003).

2.5.4. HT29 Kolon Kanseri Hattı

HT-29 hücre dizisi 1964 yılında, kolorektal adenokarsinoması olan 44 yaşındaki beyaz bir kadının primer tümöründen elde edilmiştir. HT-29, epitelyum morfolojisi ile insan kolorektal adenokarsinoma hücre dizisidir. Kolorektal kanser için ksenograft tümör modeli olmaya ek olarak, HT-29 hücre dizisi, bağırsak hücreleri tarafından emilim, transport ve sekresyonu çalışmak için in vitro model olarak da kullanılır. Standart kültür koşulları altında, bu hücreler polarize olmamış, farklılaştırılmamış çoklu tabaka olarak büyürler. Kültür koşullarının değiştirilmesi veya hücrelerin çeşitli indükleyici ile muamelesi, farklılaşmış ve polarize olmuş morfoloji ile sonuçlanır (Yılmaz, 2014).

2.6. Gemsitabin

Gemsitabin fazla sayıda murin ve insan tümör hücrelerini içeren çeşitli kültürlerde belirgin sitotoksik etki gösterir. Gemsitabinin in vitro sitotoksik etkisini hem zaman hem de kullanılan gemsitabin yoğunluğu etkilemektedir (Kayaalp, 1998).

Bir deoksisitidin analogu olan gemsitabinin hücre fazı spesifik olup, temel olarak S fazındaki hücreleri öldürür. Hücreleri S fazında tutarak blokaj oluşturup, G1 fazına ilerlemesine engel olur. Hücre içinde aktif difosfata ve trifosfata metabolize olur. Ribonükleotid redüktazı inhibe eder. DNA yapısına katılmak için deoksisitidin trifosfatla yarış halindedir. Yaklaşık olarak tamamına yakını aktif ilaç ve metabolitleri şeklinde idrarla vücut dışına atılır. Myelosüpresyon doz kısıtlayıcı toksisitesidir. Bunun dışında grip benzeri tabloyla beraber ateş, bulantı, kusma, diare, stomatit, döküntü gibi yan etkiler görülebilir (Manavoğlu, 2004).

Gemsitabinin hücrel metabolizma ve etki mekanizmaları incelendiğinde, bir pirimidin antimetaboliti olan gemsitabin (2,2-difluoro 2-deoxycytidine, dFdC), hücre içinde nükleozid kinazlar yoluyla aktif difosfat (dFdCDP) ve trifosfat (dFdCTP) nükleozidlere metabolize olur. Gemsitabin sitotoksik etkisi dFdCDP ve dFdCTP'ye bağlı iki ayrı mekanizma ile DNA sentezinin inhibisyonuna bağlıdır. Birinci olarak, dFdCDP DNA sentezi için deoksinükleosid trifosfat (dCTP) oluşturan reaksiyonları katalize eden ribonükleotid redüktazı inhibe eder. Bu enzimin dFdCDP ile inhibisyonu genel olarak deoksinükleozid konsantrasyonlarında, özellikle de dCTP'de azalmaya yol açar. İkinci olarak da, dFdCTP DNA'da yer almak için dCTP ile rekabete girer. Aynı yolla, az miktarda gemsitabin RNA içinde de yer alabilir. Böylece, dCTP'nin hücre içi konsantrasyonundaki azalma dFdCTP'nin DNA yapısına girmesini kolaylaştırır. DNA polimeraz epsilon gemsitabini uzaklaştıramaz ve oluşan DNA zincirini onaramaz. Gemsitabin DNA yapısına girdikten sonra, DNA zincirinde bir nükleotidlik artışı olur. Prensip olarak bu artış, hücre ölümüne (apoptozis) yol açan ileri düzeyde DNA sentezinin tam inhibisyonu anlamına gelir (Mini ve ark., 2006).

Gemsitabin, sitidin deaminaz tarafından karaciğer, böbrekler, kan ve diğer dokularda hızlı bir şekilde metabolize edilmektedir. Hücre içinde gemsitabin tarafından monofosfatlar, difosfatlar ve trifosfatlar (dFdCMP, dFdCDP ve dFdCTP) meydana getirilmektedir. Gemsitabinin difosfat ve trifosfatlarının aktif yapılar olduğu kabul görmektedir. Hücre içi olarak oluşan bu metabolitler plazma veya idrarda tespit edilememektedir. Ana metaboliti olan 2'-deoksi-2', 2'-diflorüridin (dFdU) aktif olmayıp, plazma ve idrarda saptanır (Mini ve ark., 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

- Kurutulmuş üzüm çekirdeği
- HAuCl_4 (Alfa Aesar)
- HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı (HUKUK, Sap Enstitüsü, Ankara, Türkiye)
- Gemsitabin (Gemko, Koçak Farma)
- BrdU hücre proliferasyonu deney kiti (BioVision cat#K306-200)
- Bovin Serum Albumin (BSA)
- Poliakrilamid Jel
- Kemilüminas'a duyarlı film (Kodak 8116428)
- ECL reaktifi (Advansta, Sirius)
- TBST tamponu (%1 BSA ve %0.1 Tween-20 içeren)
- DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) besiyeri (PAN-biotech)
- Proteinaz inhibitör kokteyli (Roche cat# 11 836 145 001), RIPA tamponu (Sigma cat# 0278)
- Bradford reaktifi (BioRad 500-0006)
- PVDF membrana (Amersham cat# 10600023)
- PVDF membran (Millipore IPVH00010)
- Whatman kağıdı (Sigma Z691011)
- Primer antikor (Caspase-3 Bioss cat# bs-2593R; p53 Santacruz cat.# sc-393031; beta-Aktin Sigma cat.# A1978)
- Sekonder antikor (anti-mouse ProteinTech cat.# SA00001-1; anti-rabbit Santacruz cat.#sc-2357)

3.2. Yöntem

3.2.1. *Vitis vinifera* (Üzüm Çekirdeği) Ekstraktının Hazırlanması

- Kurutulmuş üzüm çekirdeği temin edilerek 1 gr olacak şekilde tartıldı.

- Tartılan üzüm çekirdeği havanda dövülerek toz haline getirildi.
- Toz halindeki üzüm çekirdeğine 100 ml distile su (dH₂O) eklenerek karıştırıldı.
- Karışım mikrodalga fırında 1 dakika (1200 W, 50 Hz) kaynatıldı.
- Soğuduktan sonra elde edilen ekstrakt whatmann 41 filtre kağıdından süzüldü ve üzüm çekirdeği sulu ekstraktı elde edildi.

3.2.2. Altın Nanopartiküllerin (Vv-AuNP) Sentezi

1mM Altın Nitrat Çözeltisi:

0,00153 gr. HAuCl₄ (Alfa Aesar) tartıldı ve 50 ml dH₂O'da çözdürüldü.

- Hazırlanan 1mM HAuCl₄ çözeltisinden 45 ml alınarak 5 ml *Vitis vinifera* ekstraktı ile karıştırıldı.
- Karışım karanlıkta bekletilerek, zamana bağlı renk değişimi gözlemlendi.

3.2.3. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

- Sarıdan koyu kahverengiye olan renk değişimi AuNP'lerin oluşumunu göstermektedir. Sentezlenmiş altın nanopartiküllerin UV-vis spektrumları Shimadzu UV-1801 UV-VIS spektrofotometre kullanılarak izlendi. AuNP solüsyonunun spektrumu 300-700 nm dalga boyu aralığında absorpsiyon taraması yapıldı.
- Elde edilen AuNP'lerin boyutu ve morfolojisini belirlemek üzere taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı. SEM analizi Süleyman Demirel Üniversitesi Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezinden (YETEM) hizmet alımı şeklinde yapıldı.

3.2.4. Hücre Kültürü

Çalışmada ticari olarak satın alınan insan kolon kanseri hücreleri (HT-29) hücre hattı kullanıldı. Hücrelerin tamamı L-glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum prüvat, %10 Fetal Bovin serum (FBS) ve Penisilin /Streptomisin eklenmiş DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) besiyeri (PAN-biotech)

içinde monolayer kültürler olarak % 5 CO₂'lik atmosfer ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

3.2.4.1. Hücrelerin Ekimi ve FBS İle Muamelesi

- Hücreler sayım için tripsinize ve ardından homojenize edildi.
- Her hücre grubu, Thoma lamında sayılarak 3000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri olacak şekilde 6 tekrar ve 2 sıra halinde 96 kuyulu kültür kabına ekimi gerçekleştirildi.
- Hücreler %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂' li %95 nemli kültür ortamına alınarak ve gece boyu inkübe edildi.
- HT-29 hücreleri biyosentez ile oluşturulmuş altın nanopartiküller (Vv-AuNP) ile artan dozlarda (0-400 µg/mL) muamele edildi.
- Muamele edilmeyen HT-29 kanser hücreleri ise kontrol grubu olarak kullanıldı.
- İnkübasyonu takiben 72. saatte sitotoksosite değerlendirmesi için BrdU protokolü uygulandı.

3.2.5. BrdU Hücre Proliferasyon Deneyi

Kültüre edilen HT-29 hücreleri BrdU hücre proliferasyon deneyinin bir gün öncesinde 96-kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Ertesi gün, kuyucuklarda tutunan hücrelerin besiyerleri aspire edildikten sonra, kontrol grubu %5 PBS içeren DMEM besiyeri ve test örnekleri ise 25, 50, 100, 200, ve 400 µM AuNP'ler içeren besiyeri ile muamele edildi. İkinci bir deney seti olarak her test kuyucuğu AuNP'ler ile birlikte 200'er µM Gemsitabin ile muamele edildi. Her deney örneği 100'er µL/kuyucuk hacimde 3'lü tekrar olacak şekilde çalışılmış ve söz konusu test bileşikler 72 saat boyunca HT-29 hücrelerinde uygulandı. Süre sonunda, BrdU hücre proliferasyonu deney kiti (BioVision cat#K306-200) uygulandı. Muamele edilen hücreler üzerine final konsantrasyonu 1X olacak şekilde 10 µL kit içeriğinde mevcut olan BrdU (10X) solüsyonu ile 4 saat boyunca 37°C kültür sıcaklığında muamele edildi. Sonrasında, kuyucukların

besiyerleri tamamen aspire edildikten sonra örnekler üzerine 100 µL/kuyucuk olacak şekilde kitin Fixing/Denaturing solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Süre sonunda bu solüsyon uzaklaştırılarak örnekler 100 µL/kuyucuk 1X BrdU Detection Antibody solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca yavaş çalkalanarak muamele edildi. Bundan sonra, her kuyucuk 300'er µL 1X Wash Buffer ile 2 defa yıkanmış ve yıkama sonrasında 100 µL/kuyucuk 1X Anti-mouse HRP-linked Antibody solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat süre ile muamele edildi. Akabinde, her kuyucuk 300'er µL 1X Wash Buffer ile 3 defa yıkanmış ve yıkama tamponu da aspire edildi. Spektrofotometrik ölçüm için her kuyucuğa 100 µL TMB substratı ilave edildi. Yaklaşık 30 dakika içerisinde renk değişimi gözlemlendiğinde TMB substratı içeren örnekler üzerine 100 µL/kuyucuk stop solüsyonu ilave edilerek 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Elde edilen optik dansite (OD) verileri excel programı kullanılarak analiz edildi ve konsantrasyona bağlı hücre proliferasyon grafiği çizildi.

3.2.6. Western Blot Deneyi

Hücre Lizatlarının Hazırlanması: Petri kültür kaplarında 72 saat boyunca Vv-AuNP ve Vv-AuNP+Gemsitabin ile muamelesi yapılan HT-29 hücrelerinin besi ortamı uzaklaştırılarak, hücreler 10 mL soğuk steril 1XPBS ile iki defa yıkandı. 1XPBS solüsyonu da uzaklaştırılarak üzerine 1 mL proteinaz inhibitör kokteyli (Roche cat# 11 836 145 001), RIPA tamponu (Sigma cat# 0278) hücrelerin üzerine konarak hücreler hücre kazıyıcısı yardımı (Falcon cat# 353085) ile ve steril 1,5 mL'lik ependorf tüpüne toplandı. Örnekler buzda 15 dakika bekletildikten sonra 1 dakika boyunca vortekslendi ve 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant lizat steril bir ependorf tüpe transfer edildi. Örnekler kullanılabileceği kadar -80°C'de dondurucuda (Nüve 490) saklandı.

Protein Miktar Tayini: Elde edilen hücre lizatlarının protein miktarı hesaplaması Bradford reaktifi (BioRad 500-0006) kullanılarak Bovin Serum Albumin (BSA) standartına karşı gerçekleştirildi. Önceden hazırlanmış stok BSA (10mg/mL) solüsyonundan 1:10 dilüsyonla 1µg/µL olacak şekilde çalışma solüsyonu hazırlandı.

Standart eğrinin çizilebilmesi amacıyla BSA solüsyonundan üçlü tekrarlar olacak şekilde 96 kuyucuklu kaplara 1, 3, 5, 7 ve 9 µg olacak şekilde pipetlendi. Dondurucuda saklanan -80°C'deki hücre lizatları buzda eritilerek aynı 96 kuyucuklu kaba üçer tekrar olacak şekilde 1'er µl kuyucuklara konuldu. BSA standardı ile birlikte test edilecek örnekler spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okundu. Verilerin ortalaması alınarak oluşturulan standart eğriden hesaplanan formüle göre örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

Poliakrilamid Jelin Hazırlanması: Deneyimizde kullandığımız %10'luk poliakrilamid jel resolving (ayrıştırıcı) ve kuyucukların olduğu stacking (yükleme) jelinden meydana gelmektedir. Resolving (ayrıştırıcı) jel (%10); 3,85 mL ddH₂O, 2,5 mL resolving (ayrıştırıcı) tampon, 3,5 mL Akrlamid/BisAkrlamid (29:08), 0,1 mL %10 SDS (Sodyum dodesil sülfat), 0,1 mL %10 APS (Amonyum persülfat) ve 10 µL Temed içeren toplam 10 mL'lik solüsyondur. Stacking jel ise; 1,5 mL ddH₂O, 0,625 mL Stacking tampon, 0,312 mL Akrlamid/BisAkrlamid (29:08), 25 µL %10 SDS, 25 µL %10 APS ve 2,5 µL Temed içermektedir. Stacking jel, iki cam arasındaki resolving jel polimerize olduktan sonra üzerine kuyucukların olduğu alanı dolduracak kadar konuldu. Stacking jel polimerize olduktan sonra önceden yerleştirilmiş olan tarak çıkarılarak yüklem kuyucuklarının oluşması sağlandı. Hazırlanan jel elektroforez tankına yerleştirilerek elektroforez aşamasına geçildi.

Örneklerin Poliakrilamid Jelde Elektroforezi: Bradford yöntemiyle protein konsantrasyonları belirlenen örneklerden 50'şer µg alınarak üzerine eşit hacimde β-merkaptotanol içeren western blot yüklem tamponu ilave edildi. Örnekler 5 dakika kaynar suda bekletildi. Western blot için özel üretilmiş pipet uçları aracılığıyla tankta hazırlanan poliakrilamid jelle yüklendi. Yüklenen deney örnekleri yürütme tamponu içerisinde, stacking jelde 80 voltta, resolving jelde ise 120 voltta elektroforezi sağlandı (Bio Rad). Yürüme sonunda PVDF membrana (Amersham cat# 10600023) transfer aşamasına geçildi.

Jelden PVDF Membrana Transfer: Poliakrilamid jelde yürütülen örnekler 3,75g Glisin ve 7,25g TrisBase içeren 1 Lt transfer tamponu aracılığıyla PVDF membrana transfer edildi. Bunun için tankın mevcut süngerleri transfer tamponuna 250 mL ilave edildikten sonra ıslatıldı. Transfer aparatının siyah kısmına süngerlerden biri

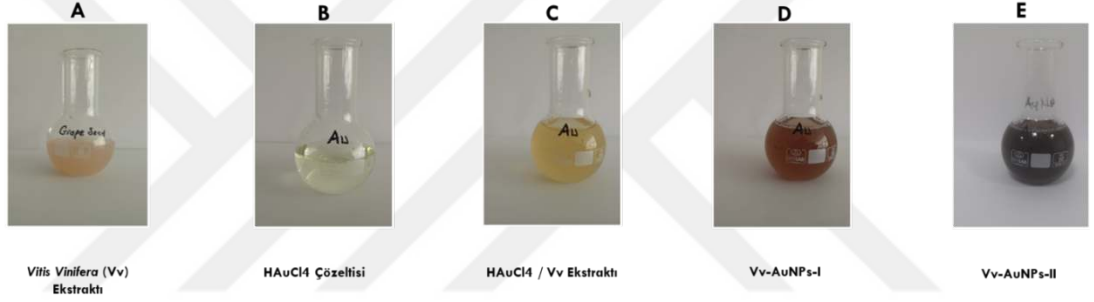
yerleştirildi. Bunun üstüne transfer tamponunda ıslatılmış transfer kağıdı konuldu. Poliakrilamid jel cam plakalar arasından çıkarılarak üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Sonra, saf metanolde ıslatılmış PVDF membran (Millipore IPVH00010) je üzerine yerleştirildi. Bunun üstüne yine transfer tamponuyla ıslatılmış whatman kağıdı (Sigma Z691011) ve diğer transfer süngeri yerleştirilerek transfer aparatı kapatıldı, devamında transfer tamponuyla dolu olan transfer cihazına (BioRad) yerleştirildi. Örneklerin gece boyunca 40 voltta transfer edilmesi sağlandı.

PVDF Membranın İmmünblotlanması: Transfer aşamasının devamında ardından membran %1 BSA ve %0.1 Tween-20 içeren TBST tamponunda 2 saat süresince blokladı. Bu bloklama tamponu içerisinde 1:1000 dilüe edilen primer antikor (Caspase-3 Bioss cat# bs-2593R; p53 Santacruz cat.# sc-393031; beta-Aktin Sigma cat.# A1978) ile membran gece boyu 4°C’de işaretlendi. Primer antikor ile muamele sonrasında antikor uzaklaştırıldı ve membran %0.1 Tween-20 içeren TBST yıkama tamponunda 15’er dakika 2 defa yıkandı. Sonrasında, bloklama tamponunda hazırlanmış 1:2000 dilüe sekonder antikor (anti-mouse ProteinTech cat.# SA00001-1; anti-rabbit Santacruz cat.#sc-2357) ile 2 saat boyunca muamele edildi. Sekonder antikorun uzaklaştırılmasından sonra membran yıkama tamponu 15’er dakika 2 defa yıkandı. Yıkama aşamasının ardından membran, ECL reaktifi (Advansta, Sirius) ile üst yüzeyi ıslatıldı. Yaklaşık 1 dakika beklendikten sonra ECL reaktifi membrandan kurutma kağıdına sızdırılması sağlandı ve membran zarar görmemesi için naylon dosya arasına alındı. Görüntüleme için kemilüminas’a duyarlı film (Kodak 8116428) kullanıldı. Karanlık odada işaretlerin alınabilmesi için film membranın üzerine yerleştirilerek ortalama 5 dakika bekletildi. Sonrasında film önce developer solüsyonunda sinyaller görülene kadar, sonrasında fiksatif solüsyonunda banyo edildi. Film banyosundan sonra elde edilen immünblotlama verileri tarayıcı yardımı ile dijital ortama fotoğrafları alındı. İmajlarda elde edilen sinyaller imageJ yazılımı (<https://imagej.nih.gov>) yardımı ile analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. Altın Nanopartiküllerin (AuNP) Biyosentezi

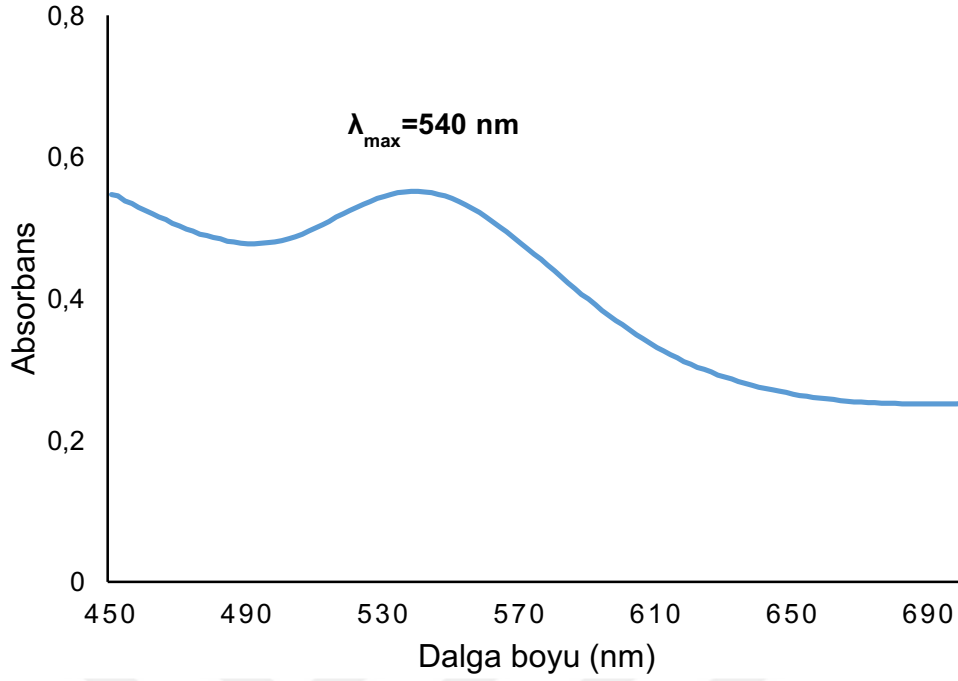
Altın nanopartiküller *Vitis vinifera* (Üzüm Çekirdeği) sulu ekstraktı kullanılarak sentezlendi. Elde edilen üzüm çekirdeği sulu ekstraktı açık pembe renkli, HAuCl₄ çözeltisi açık sarı renkliydi. 1 mM HAuCl₄ çözeltisine üzüm çekirdeği ekstraktının eklenmesini takiben karışım karanlıkta bekletilerek, zamana bağlı renk değişim süreci takip edildi. Altın nanopartiküllerinin oluşumunun bir göstergesi olan sarı-kırmızı renkten koyu kahverengiye doğru oluşan renk değişimi gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Üzüm çekirdeği (*Vitis vinifera*) ekstraktı kullanılarak altın nanopartiküllerin biyosentezi; (A) *Vitis vinifera* (Vv) ekstraktı, (B) HAuCl₄ çözeltisi, (C) HAuCl₄/*Vitis vinifera* ekstraktı, (D) Altın nanopartiküllerin ilk görüntüsü (Vv-AuNP-I), (E) Altın nanopartiküllerin son görüntüsü (Vv-AuNP-II)

4.2. UV-VIS Spektrofotometre ile Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

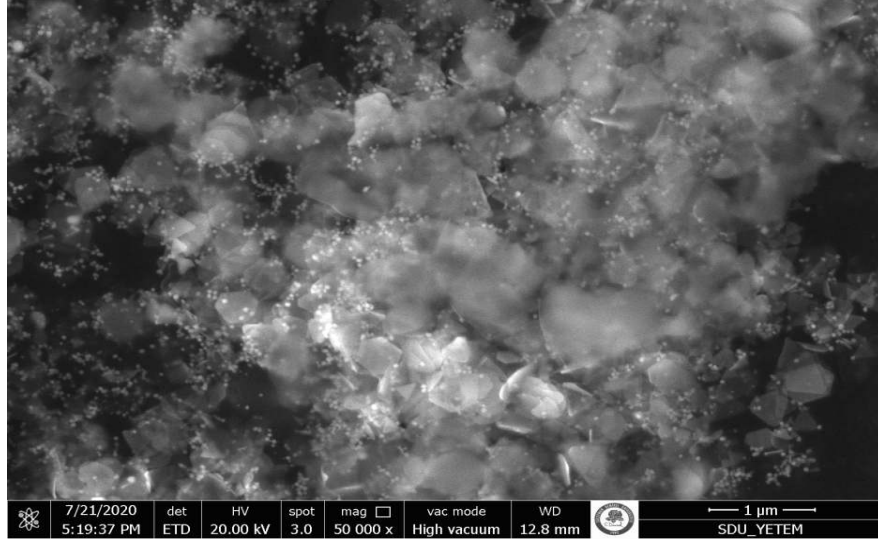
Hazırlanan AuNP'lerin 300-700 nanometre aralığında absorpsiyonları, UV visible spektrofotometre kullanılarak değerlendirildi. UV-vis ölçümlerine göre altın nanopartiküllerin 500-600 nanometre dalga boyu aralığında pik vermesi beklenmektedir. Üzüm çekirdeği ekstraktı kullanılarak hazırlanan AuNP'ler için 540 nm'de güçlü bir absorbans piki gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) UV-vis spektrumu

4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Üzüm çekirdeği ekstraktı ile biyosentezlenmiş altın nanopartiküllerin boyut ve yüzey morfolojisinin görüntülenebilmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analizi gerçekleştirildi. Yapılan görüntüleme sonucunda Vv-AuNP'lerin genellikle küresel ve kübik bir morfolojiye sahip ve 100 nm'den daha küçük boyutlarda olduğu belirlendi (Şekil 4.3).



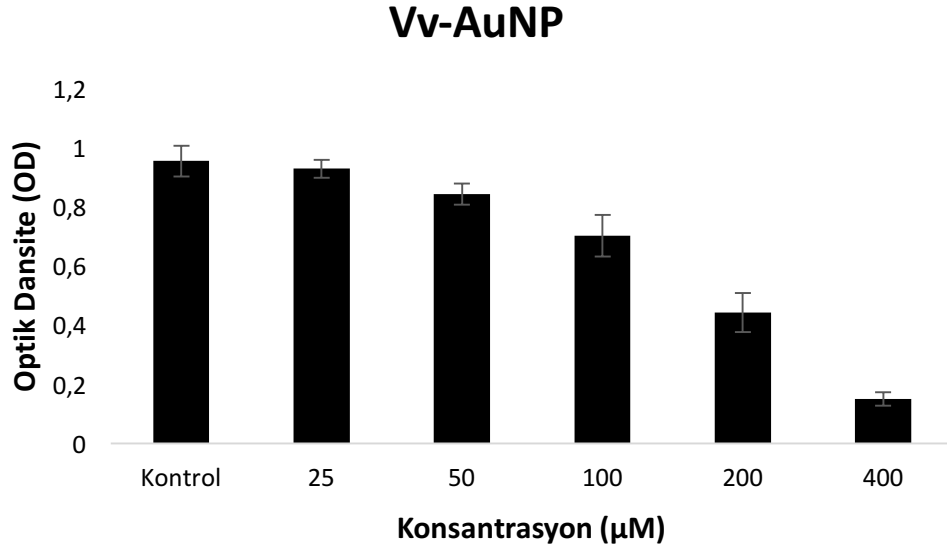
Şekil 4.3. *Vitis vinifera* ile sentezlenmiş altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) SEM görüntüsü

4.4. HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinde Altın Nanopartiküllerin (Vv-AuNP) ve Gemsitabinle Birlikte Kullanımının Doza Bağımlı Sitotoksik Etkisi

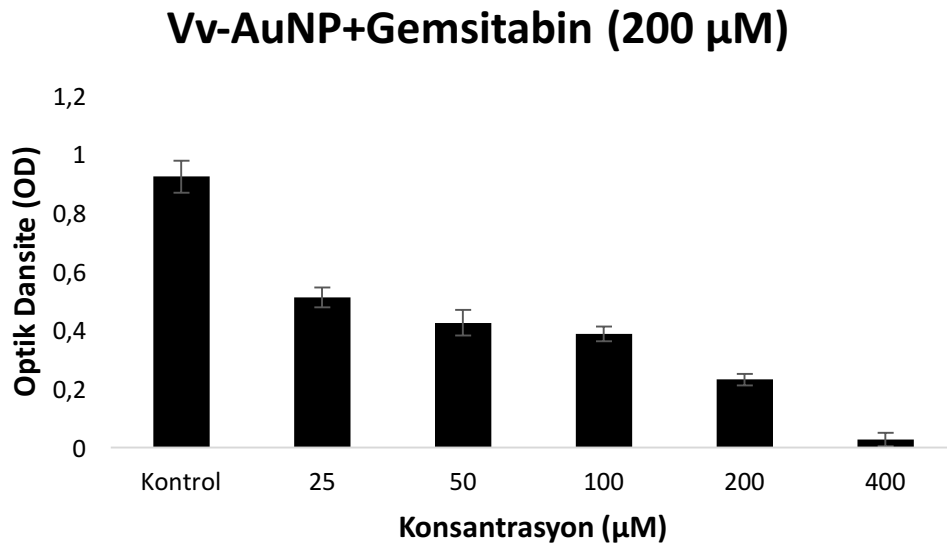
Çalışmamızda, *Vitis vinifera* ile sentezlenmiş altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) farklı konsantrasyonlarda insan kolon kanseri hücre hattı HT-29 hücreleri üzerinde in vitro sitotoksitesi BrdU hücre proliferasyon testi ile değerlendirildi. HT-29 kolon kanseri hücreleri farklı konsantrasyonlarda (0-400µg/mL) hazırlanmış Vv-AuNP'lerle ve 200 µg/ml sabit dozda Gemsitabin ile birlikte 72 saat boyunca muamele edildi. Vv-AuNP ile muamele edilmemiş HT-29 hücreleri kontrol grubu olarak kabul edildi. Sonuçlar, üç bağımsız deneyin ortalama±standart sapması olarak ifade edildi. Kontrol hücelere göre muamele edilen hücrelerin canlılık oranlarının istatistiksel anlamlılığı, Student t-testi kullanılarak belirlendi (*p<0,05).

Çalışmadan elde etmiş olduğumuz sonuçlar kontrole göre Vv-AuNP'lerin HT-29 hücrelerinde doza bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığını gösterdi. İnkübasyonun 72. saatinde Vv-AuNP'lerin 200 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında %50'den fazla azalma görüldü. 200 µg/ml dozunda görülen bu azalma kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.000) (Şekil 4.4). Kontrole göre 200 µg/ml sabit dozda Gemsitabin ile birlikte Vv-

AuNP'lerin artan dozlarda kullanımında, 25 µg/ml ve üzeri dozda Vv-AuNP uygulandığında hücre canlılığında %50'den fazla azalma görüldü. 25 µg/ml dozda görülen hücre canlılığındaki bu azalma kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,000) (Şekil 4.5). Vv-AuNP'ler Gemsitabin ile birlikte kullanıldığında hücre canlılığı üzerine kombine etkiye artış görüldü.

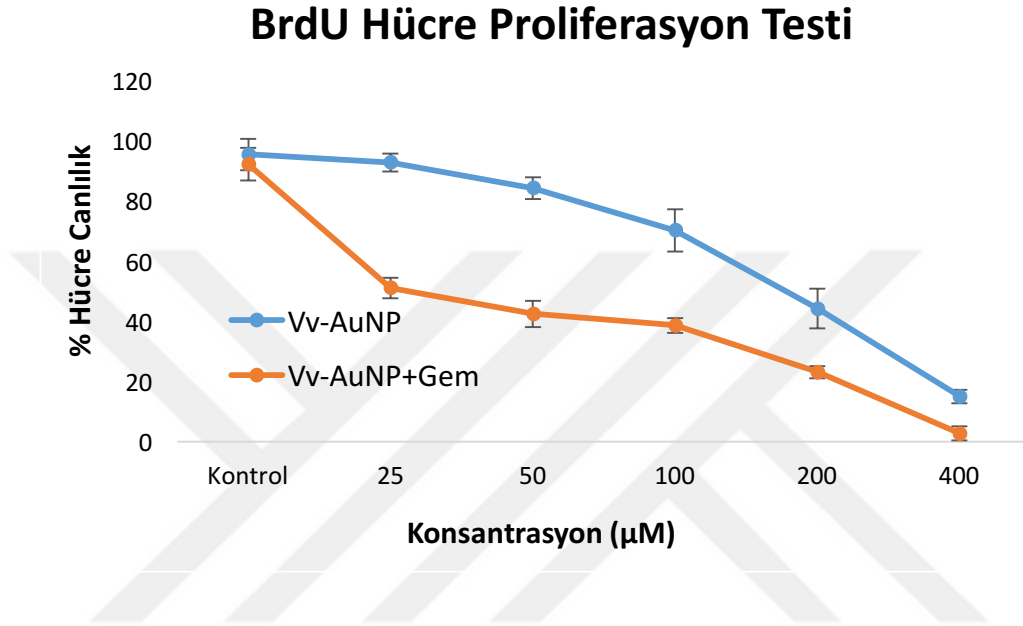


Şekil 4.4. HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin hücre canlılığı üzerine altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) doza bağımlı sitotoksik etkisi.



Şekil 4.5. HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin hücre canlılığı üzerine altın

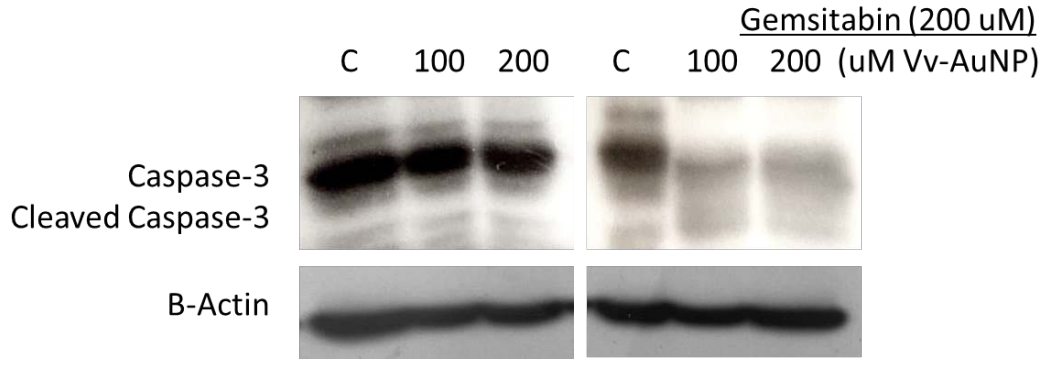
nanopartiküllerin (Vv-AuNP) Gemsitabin ile birlikte kullanımının doza bağımlı sitotoksik etkisi.



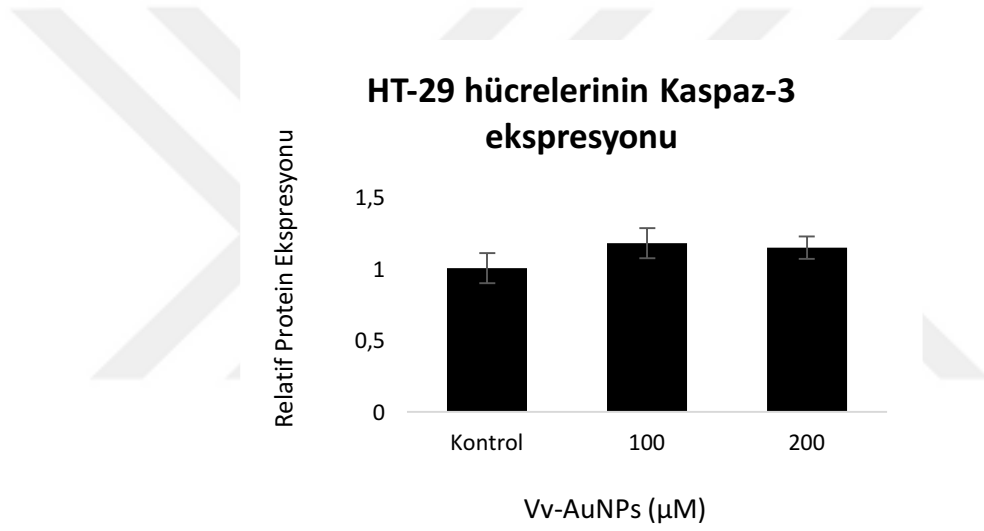
Şekil 4.6. HT-29 kolon kanseri hücrelerinde altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) tek başına ve Gemsitabin ile kombine uygulamalarının hücre canlılığı üzerine etkilerinin karşılaştırılması

4.5. HT-29 İnsan Kolon Kanser Hücrelerinde Altın Nanopartiküllerin (Vv-AuNP) ve Gemsitabinle Birlikte Kullanımının Apoptotik Etkisi

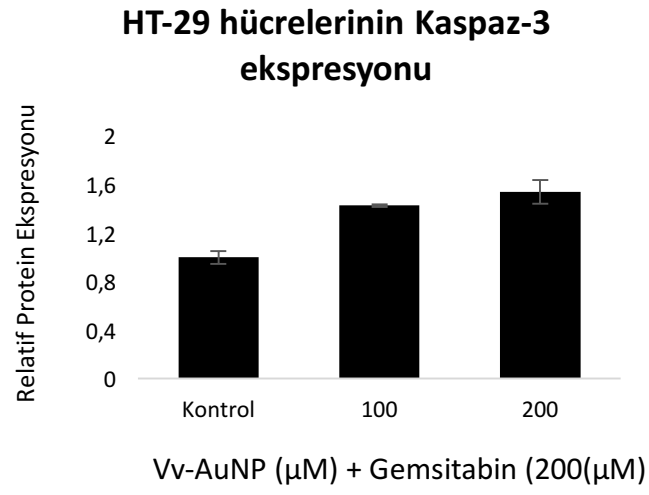
Apoptoz ilişkili protein seviyelerinin belirlenmesi için yapılan Western blot deneyinde kaspaz-3 proteini için şekil 4.7’deki jel görüntüleri elde edilmiştir. Protein seviyesinin karşılaştırılması için referans olarak β -aktin kullanılmıştır. Artan Vv-AuNP dozlarına bağlı kaspaz-3 aktivasyonunun kontrole kıyasla arttığı, Gemsitabin ile kombine kullanımının Kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerindeki etkisini kontrole kıyasla güçlendirdiği gözlenmiştir.



Şekil 4.7. Western blotla tespit edilmiş β -aktin ve kaspaz-3 bantlarına ait görüntüler



Şekil 4.8. Vv-AuNP'in Kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi



Şekil 4.9. Vv-AuNP ve Gempitabinin birlikte kullanımının Kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi

5. TARTIŞMA

Nanoteknoloji maddenin yapısının, kullanışlı ve özgün özelliklere sahip yeni malzeme ve cihazlar üretmek için kontrol edilmesine yönelik gelişmekte olan bir grup teknolojiye verilen isimdir. Nanoteknoloji son yıllarda endüstri, sağlık ve tıp alanları ile bilimsel araştırmalara yönelik uygulama alanlarında kendisine önemli bir kullanım alanı bulmuştur (Ramsden J, 2009).

Son yirmi yılda nanoteknolojinin hızla ilerlemesi ile nano tıp yeni bir bilim dalı ve teknoloji alanı olarak kanser hastalığına çareler aramaya başlamıştır. Son yıllarda ise farklı kanser hücre hattı uygulamalarının nanoteknoloji bilimi ile birleşmesi neticesinde tümör hücrelerini öldüren, sağlıklı (normal) hücrelere hasar vermeyen nanopartiküllerle üretilen yeni nesil ilaçlarla hedefe yönelik kanser tedavilerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır (Cai ve ark., 2008; Dağlıoğlu ve ark., 2018).

Özellikle Altın nanopartiküller (AuNP) kendilerine özgü kimyasal, fiziksel ve nontoksik özellikleri nedeni ile kanser tedavisi ve görüntülemesinde kullanımlarının araştırılması yönünden en yaygın çalışılan nanometallerden biridir. Altın nanopartiküller (AuNP); basit bir şekilde sentezlenmesi ile yüzey modifikasyonları, ayarlanabilir çekirdek boyutu ve şekli, optik özellikleri nedeniyle görüntüleme ajanları, teranostik ajanlar ve ilaç taşıyıcılar olarak bilimsel araştırmalar da ilgi odağıdır (Kim ve Jon, 2012; Lu ve ark., 2012).

Altın nanopartiküllerin sentezi için birbirinden çeşitli birçok yöntem geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam etmektedir. Altın nanopartiküllerin sentezi için birbirinden farklı fiziksel ve kimyasal metotlar kullanılmakta olup, bunlar hem ekonomik değil hem de zararlı kimyasalların kullanımından dolayı çevreye zararlıdır. Altın nanopartiküllerin sentezlenmesinde bitkiler, bakteri, alg ve fungi kullanımına dayalı biyolojik sentez metotları, fiziksel ve kimyasal metotlara göre ekonomik, toksik olmayan ve çevreye zararsız yöntemlerdir (Rana ve ark., 2020).

Metal nanopartiküllerden olan Altın nanopartiküllerin ilaç dağıtım, teşhis ve tedavi uygulamalarındaki etkinlikleri baz alındığında, altın nanopartiküllerin çok

kapsamlı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle biyomedikal uygulamalarda benzersiz özelliklerinden faydalanılmasının yanında deneysel çalışmalarda altın nanopartiküllerin toksisitesinin değerlendirilmesine de odaklanmış, in vivo biyolojik dağılım ve in vitro toksisite üzerine yapılan çalışmalar önem kazanmaya başlamıştır. Buna rağmen literatürlerde, altın nanopartiküllerin hücrelerle olan etkileşimlerini yönlendiren moleküler süreçler hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu bilgi eksikliği düşük sitotoksositeye sahip, etkili teşhis ve tedavide kullanılabilecek nanomalzemelerin tasarımını engellemektedir. AuNP'ler bazı çalışmalarda toksik bazı çalışmalarda toksik olmayan partiküller olarak tanımlanmıştır. Çalışmalar boyut, yüzey yükü, agregasyon derecesi ve şeklin AuNP'lerin potansiyel toksisitesi ve stabilitesi ile ilgili temel parametreler olduğunu göstermiştir (Rossi ve Monticelli , 2016; Sufian ve ark., 2017).

Yapmış olduğumuz çalışmada, *Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği) sulu ekstraktı kullanılarak biyosentezi gerçekleştirilen altın nanopartiküller ve Gemsitabin ile birlikte kullanılmasının insan kolon kanseri hücre hattı HT-29 üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisi ilk kez değerlendirilmiştir.

Çalışmamızın ilk basamağında altın nanopartiküller *Vitis vinifera* (Üzüm Çekirdeği) sulu ekstraktı kullanılarak sentezlendi. Elde edilen üzüm çekirdeği sulu ekstraktı açık pembe renkli, gümüş nitrat solüsyonu açık sarı renkliydi. 1 mM HAuCl₄ çözeltisine üzüm çekirdeği ekstraktının eklenmesini takiben karışım karanlıkta bekletilerek, zamana bağlı renk değişim süreci takip edildi. Altın nanopartiküllerinin oluşumunun bir göstergesi olan sarı-kırmızı renkten koyu kahverengiye doğru oluşan renk değişimi gözlemlendi. Altın nanopartiküllerinin yeşil sentezine yönelik yapılan benzer çalışmalarda da altın nanopartiküllerin belirli zaman aralıklarında renk değişikliği gösterdiği ortaya konulmuştur (Baran ve Saydut, 2019; Umamaheswari ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2018).

Yapmış olduğumuz çalışmada hazırlanan Vv-AuNP'lerin 300-700 nanometre aralığında absorpsiyonları, UV visible spektrofotometre kullanılarak değerlendirildi. UV-vis ölçümlerine göre altın nanopartiküllerin 500-600 nanometre dalga boyu aralığında pik vermesi beklenmektedir. Üzüm çekirdeği ekstraktı kullanılarak hazırlanan VV-AuNP'ler için 540 nm'de güçlü bir absorban piki gözlemlendi.

Biyosentez metodu uygulanan farklı altın nanopartikül çalışmalarının UV-vis analizinde altın nanopartiküllerin 540 nm dalga boyunda güçlü bir pik verdiği görülmüştür (Asariha ve ark., 2020; Islam ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2020).

Çalışmamızda Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile biyosentezi gerçekleştirilen altın nanopartiküllerin karakterizasyonu araştırıldı. SEM analizi sentezlenen nanomalzemenin boyutu ve morfolojik özelliklerinin aydınlatılmasında kullanılmaktadır (Umamaheswari ve ark., 2018). Üzüm çekirdeği ekstraktı ile biyosentezlenmiş altın nanopartiküllerin boyut ve yüzey morfolojisinin görüntülenebilmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analizi gerçekleştirildi. Yapılan görüntüleme sonucunda Vv-AuNP'lerin genellikle küresel ve kübik bir morfolojiye sahip ve 100 nm'den daha küçük boyutlarda olduğu belirlendi. SEM verilerine göre nanomalzemelerin 100 nm'nin altında olduğu ve bu sonucunda benzer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür (Baran ve Saydut, 2019; Islam ve ark., 2019; Kumar ve ark., 2019).

Çalışmamızda, *Vitis vinifera* ile sentezlenmiş altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) farklı konsantrasyonlarda insan kolon kanseri HT-29 hücre hattı hücreleri üzerinde in vitro sitotoksitesi BrdU hücre proliferasyon testi kullanılarak değerlendirildi. HT-29 kolon kanseri hücreleri farklı konsantrasyonlarda (0-400µg/mL) hazırlanmış Vv-AuNP'ler ile 72 saat süresince muamele edildi. Vv-AuNP ile muamele edilmemiş HT-29 hücreleri kontrol grubu olarak kabul edildi. Çalışmadan elde etmiş olduğumuz sonuçlar doğrultusunda Vv-AuNP'lerin HT-29 hücrelerinde doza bağımlı bir şekilde hücre canlılığını yitirdiği gözlemlendi. İnkübasyonun 72. saatinde Vv-AuNP'lerin 200 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında %50'den fazla azalma görüldü. 200 µg/ml sabit dozda Gemsitabin ile birlikte Vv-AuNP'lerin artan dozlarda kullanımında 25 µg/ml ve üzeri dozda kullanıldığında hücre canlılığında %50'den fazla azalma görüldü. Vv-AuNP'ler Gemsitabin ile birlikte kullanıldığında kontrole kıyasla sitotoksite üzerine kombine etkide artış görüldü. Altın nanopartiküllerinin sitotoksitesine ilişkin literatür değerlendirildiğinde; bir çalışmada, insan lösemi (HL-60) ve insan hepatosellüler karsinoma (HepG2) hücre hatlarında 30, 50 ve 90 nm çapında AuNP'lerinin sitotoksitesi, MTT yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Elde edilen bulgular ışığında, AuNP'lerinin HL-60 hücrelerinde sitotoksik etkisinde nanopartikül çapı, konsantrasyonu ve maruziyet süresinin belirleyici faktörler olduğu görüşü doğrulanmıştır (Mateo ve ark., 2014).

Bu bulguların aksine, Vijayakumar ve Ganesan (2013) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise farklı nanopartikül çapına sahip altın nanopartiküllerin artan dozlarda kullanımında MCF7, PC-3 ve CHO22 hücre hatlarında sadece hafif bir toksisite gösterdiği veya bazı durumlarda hiç toksisite göstermediği sonucuna varılmıştır. (Vijayakumar ve Ganesan, 2013). Altın nanopartiküllerinin üç farklı hücre hattında toksisitesinin test edildiği bir diğer çalışmada, sonuçlar altın nanopartiküllerin BHK21 ve HepG2 hücrelerinde 30-120 nM doz aralıklarında toksik olmamasına rağmen, A549 hücrelerinde toksik olduğu gösterilmiştir (Carnovale ve ark., 2016).

Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) tarafından sıfır değerlikli 10, 30 ve 60 nm boyutlarında steril altın nanopartiküller geliştirilmiştir. Bu partiküllerin nanotoksikoloji çalışmalarında kullanılabilmeleri için toksikolojik etkilerinin karakterize edilmesi amacı ile yapılan çalışmada altın nanopartiküller HepG2 hücrelerinde DNA'daki oksidatif hasar potansiyelleri açısından değerlendirilmiştir. Sitotoksisite MTT deneyi ile değerlendirilmiş ve oksidatif DNA hasarı incelenmiştir. Sonuçta, Au NP'lerin 0,2 µg/ml veya 2 µg/ml'den düşük dozlarda HepG2 hücrelerinde ve DNA'da doza bağlı oksidatif hasar oluşturmadığı, hücre ölümüne ve serbest radikal üretimine neden olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar NIST altın nanopartiküllerin in vitro/ in vivo genotoksisite çalışmaları için kontrol malzemeleri olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Nelson ve ark., 2013).

Çalışmamızda BrdU proliferasyon yöntemiyle; HT-29 kolon kanseri hücrelerinin hücre canlılığı üzerine altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) ve altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) Gemsitabin ile birlikte kullanımının doza bağımlı sitotoksik etkisinin varlığı ortaya konulmuştur. Sitotoksisite çalışmalarında, altın nanopartiküllerin şeklinin toksisite üzerinde etkileri de değerlendirilmiş; bu konuda yapılan bir çalışmada altın nanoküpler (AuNC) ve altın nano-oktahedralar (AuNO) kullanılmıştır. NP'lerin yüzeyi poli(akriloil-L(D)-valin (L(D)-PAV) ile kaplanmıştır. MTT sonuçları L- ve D-PAV-AuNC'ler ya da L- ve D-PAV-AuNO'ların

konsantrasyona bağı (0,5 – 8 pM) sitotoksositeye neden olduğunu göstermiştir. 8 pM konsantrasyonda L-PAV kaplı altın nanopartiküller ile, D-PAV kaplı altın nanopartiküllerden daha fazla sitotoksosite gözlenmiş, hücre canlılıkları sırasıyla partikül içermeyen kontrole (%100) göre 76% ve 87% olarak bulunmuştur (Deng ve ark., 2017). Bugüne kadar yapılan çalışmalara baktığımızda Nanopartiküllerin bir yandan sitotoksik, neoplastik, genotoksik etkilere, reaktif oksijen türleri üretimine, apoptoz ve nekroza sebep olduğunu ve dolayısıyla toksik olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur (Åkerlund ve ark., 2018; Hamzeh ve Sunahara, 2013; Uboldi ve ark., 2016). Diğer yandan yukarıda sayılan etkileri anlamlı bir düzeyde artırmadığı için toksik olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Chávez-García ve ark., 2018; Khare ve ark., 2011; Miller ve ark., 2010).

Gemsitabin, geniş bir antitümör aktivitesi spektrumuna sahip, bilinen bir sitotoksik ajandır. Bununla birlikte, ilaç direnci, in vivo olarak verimsiz uygulanması ve sistemik toksisitesi nedeni ile klinik kullanımı kısıtlanmaktadır. Gemsitabinin çeşitli kemoterapötik ilaçlarla birlikte uygulanması, klinik düzeyde önemli etkiler ve olumlu sonuçlar göstermesi ile birlikte, hidrofiliten hidrofobiye, farmakokinetik, toksisite ve diğer ilaçlarla birlikte uygulandıklarında etki profillerindeki farklılık nedeniyle yaygın bir sorun gözlenmiştir. Kemoterapötik ajanın kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini iyileştirmek için ön ilaç olarak modifiye edilerek kullanımı, çeşitli nanotaşıyıcılara yükleyerek kullanımı, nanopartiküllerle kombine kullanımı şeklinde çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Gemsitabinin, akciğer epitel kanseri hücre hattı A549 hücrelerine konjuge kitosan nanopartiküller kullanılarak nano formülasyon yoluyla verildiği bir çalışmada, önemli sitotoksosite ve serbest Gemsitabin'den daha etkili hücresel etkileşme gösterdiği bulunmuştur (Wang ve ark., 2017).

Gemsitabinin gümüş nanopartiküllerle kombine kullanımının insan yumurtalık kanseri hücre hattı A2780'de sinerjik sitotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada GEM ve AgNP'lerin, hücre canlılığını ve proliferasyonunu azaltarak, artan LDH sızıntısı ve ROS oluşumunu indükleyerek antikanser etkiler uyguladıkları gösterilmiştir (Yuan ve ark., 2017). Akasya sakızı (GA) kullanılarak hazırlanan altın nanopartiküllerin Gemsitabin ile birlikte kullanıldığı sitotoksosite çalışmalarında,

serbest GEM ile karşılaştırıldığında, GEM-GA AuNP'lerin insan meme adenokarsinomu (MDA-MB-231) hücre hattında daha fazla sitotoksikite gösterdiği bulunmuştur (Devi ve ark., 2020). Bu çalışmalar, bizim çalışmamızla paralel bir şekilde kanser tedavilerinde kombinasyon bazlı tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin faydalı olacağını desteklemektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda, HT-29 hücrelerinde Altın Nanopartiküllerin (Vv-AuNP) ve Gemsitabinle birlikte kullanımının apoptotik etkisi araştırılmıştır. Bu araştırma yapılırken; apoptoz ilişkili protein seviyelerinin belirlenmesi için yapılan Western blot deneyinde kaspaz-3 proteini için jel görüntüleri elde edilmiştir. Protein seviyesinin karşılaştırılması için referans olarak β -aktin kullanılmıştır. Artan Vv-AuNP dozlarına bağlı kaspaz-3 aktivasyonunun arttığı, Gemsitabin ile kombine kullanımın apoptotik etkinliği güçlendirdiği gözlenmiştir. Floresan etiketli karboksilat modifiye polistiren nanopartiküller kullanılarak yapılan bir çalışmada artan kaspaz 3 ve azalmış hücre proliferasyonu ile hücre apoptozunu indükleyebildiği ortaya konulmuştur (Huang ve ark., 2015). Altın nanopartiküllerinin kaspaz-3 yolağı üzerinden hematopoietik kök hücre üzerinde yapılan çalışmada apoptik etkisi ortaya konulmuştur (Khalilzadeh ve ark., 2016). Polilaktik-ko-glikolik asit bazlı nanopartikülleri kullanılarak tiroid kanseri hücrelerinde , kaspaz-3 proteinine bağlı olarak nanopartiküllerin apoptoz üzerindeki etkinliğini arttırdığı anlaşılmıştır (Hu ve ark., 2019). Bu doğrultuda yapmış olduğumuz çalışmanın diğer çalışmalar ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kolon kanseri, görülme sıklığı bakımından tüm kanserler arasında meme, prostat ve akciğer kanserlerinden sonra 4.sırada yer almakta ve erkek ve kadınlarda görülen kanserlerin yaklaşık %10-15' ini oluşturmaktadır. Dünyada her yıl yaklaşık 1 milyon yeni vaka teşhis edilmekte ve kolon kanserine bağlı 500.000 ölüm bildirilmektedir. Gemsitabin, geniş bir antitümör aktivitesi spektrumuna sahip olduğu bilinen sitotoksik bir ajandır. İlaç direnci, in vivo olarak verimsiz uygulanması ve sistemik toksisitesi klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Benzer nedenlerle kanser tedavisinde var olan tedavi seçenekleri yetersiz görülmekte olup yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Nanoteknolojinin kullanımı ile biyoyumlu antikanser ajanların geliştirilmesi kanser tedavisindeki güncel yaklaşımlardan biridir. Bizim çalışmamızda ise son zamanlarda adını sıkça duyuran yeşil sentez altın nanopartiküllere yer verilmiştir.

Çalışmamızda, *Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği) ekstraktı kullanılarak altın nanopartiküllerin biyosentezi gerçekleştirildi. Bu sayede altın nanopartiküllerin biyosentezinde kullanılabilecek çevre dostu, uygun maliyetli ve oldukça basit yeni bir yöntem geliştirilmiş oldu. Aynı zamanda, bu çalışma bir kolon kanseri hücre hattı olan HT-29 hücrelerinde biyolojik olarak sentezlenen AuNP'lerin konsantrasyona bağlı olarak hücre büyümesini inhibe ettiğini ortaya koydu.

Sonuç olarak, altın nanopartiküller bu çalışmada üzüm çekirdeği ekstraktı kullanılarak başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Biyosentezlenen altın nanopartiküllerin HT-29 kolon kanseri hücrelerine karşı Gemsitabin ile birlikte kullanılmasının sitotoksik ve apoptotik etkiler sergilediği gösterilmiştir. Bu bulgulara dayanarak biyosentezlenmiş altın nanopartiküllerinin insan kolon kanseri tedavisi için umut vaat edici yeni bir terapötik ajan olduğunu düşünmekteyiz. Ancak bu çalışmanın in vitro bir çalışma olması nedeniyle bulgularımızı desteklemek için in vivo kolon kanseri modellerinde denenmesi ve etki mekanizmasının moleküler düzeyde açıklanabilmesi için daha ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Ajnai G, Chiu A, Kan T, Cheng CC, Tsai TH, Chang J (2014).** Trends of gold nanoparticle-based drug delivery system in cancer therapy. *Jp J Exp Med.* **6**, 172-178.
- Åkerlund E, Cappellini F, Di Bucchianico S, Islam S, Skoglund S, Derr R, Karlsson HL (2018).** Genotoxic and mutagenic properties of Ni and NiO nanoparticles investigated by comet assay, γ -H2AX staining, Hpvt mutation assay and ToxTracker reporter cell lines. *Environ Mol Mutagen.*, **59(3)**, 211-222.
- Albrecht MA, Evan CW, Raston CR (2006).** Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chemistry.*, **8**, 417-32.
- Arab L, Il'yasova D (2003).** The epidemiology of tea consumption and colorectal cancer incidence. *J Nutr.*, **133(10)**, 3310-3318.
- Asariha M, Chahardoli A, Karimi N, Gholamhosseinpour M, Khoshroo A, Nemati H, Shokohinia Y, Fattahi A (2020).** Green synthesis and structural characterization of gold nanoparticles from *Achillea wilhelmsii* leaf infusion and in vitro evaluation. *Bull Mater Sci.*, **43**, 57
- Baran MF, Saydut A (2019).** Altın nanomalzeme sentezi ve karakterizasyonu. *DÜMF Müh Der.*, **10(3)**, 1033-1040.
- Biçer M (2008).** *Bakır Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu.* Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Sakarya.
- Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R (1994).** Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *J Chem Soc Chem Comm.*, **7**, 801-802.
- Cabadak H (2008).** Hücre Siklusu ve Kanser. *ADU Tip Fak Derg.*, **9(3)**, 51- 61.
- Cai W, Gao T, Hong H, Sun J (2008).** Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl.*, **1(1)**, 17-32.
- Canpolat F (2016).** Hücre Siklusu ve Apoptoz. *Güncel Dermatoloji Dergisi.*, **1(1)**, 11-17.
- Carnovale C, Bryant G, Shukla R, Bansal V (2016).** Size, shape and surface chemistry of nano-gold dictate its cellular interactions, uptake and toxicity. *Prog Mater Sci.*, **83**, 152-190.
- Chávez-García D, Juárez-Moreno K, Campos CH, Tejeda EM, Alderete JB, Hirata GA (2018).** Cytotoxicity, genotoxicity and uptake detection of folic acid-functionalized green upconversion nanoparticles Y₂O₃/Er³⁺, Yb³⁺ as biolabels for cancer cells. *J mater sci.*, **53(9)**, 6665-6680.

Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small J.*, **1(3)**, 325-327.

Cos P, Ying Li, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Poel BV (1998). Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod.*, **61**, 71-76.

Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.*, **12(4)**, 564– 582.

Çoşkunçay S (2017). *Gümüş Nanopartiküllerin Akestanesi (Aesculus Hippocastanum) Yaprak Özütü ile Biyosentezi, Biyolojik Aktivite ve İlaç Salınım Özelliklerinin Belirlenmesi.* Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.

Dağhoğlu Y, Yılmaz HÖ, Yılmaz O (2018). Memeli Tümör ve Normal Hücre Hatlarında Nanopartikül Uygulamaları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **27(2)**, 136-174.

Deng J, Yao M, Gao C (2017). Cytotoxicity of gold nanoparticles with different structures and surface-anchored chiral polymers. *Acta biomater.*, **53**, 610-618.

Devi L, Gupta R, Jain SK, Singh S, Kesharwani P (2020). Synthesis, characterization and in vitro assessment of colloidal gold nanoparticles of Gemcitabine with natural polysaccharides for treatment of breast cancer. *J Drug Deliv Sci Tec.*, **56**, 101565.

Donaldson K, Murphy FA, Duffin R, Poland CA (2010). Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol.*, **7**, 5.

Dranoff G (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.*, **4(1)**, 11-22.

Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *Febs Lett.*, **416**, 123-129.

Genç AC, Hacibekiroğlu İ (2017). Mikrobiyota ve Kanser. *J Biotechnol and Strategic Health Res.*, **1**, 123-131.

Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM (2008). Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliver Rev.*, **60(11)**, 1307-1315

Gibson JD, Khanal BP, Zubarev ER (2007). Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles. *J Am Chem Soc.*, **129(37)**, 11653-11661.

Guyton AC, Hall JE (2001). Protein sentezi, hücre fonksiyonu ve hücre çoğalmasının genetik kontrolü. In: Çavuşcuoğlu H, eds. *Tıbbi Fizyoloji*. 10th ed. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd Şti, 24-37.

Hamzeh M, Sunahara GI (2013). In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. *Toxicol in Vitro.*, **27(2)**, 864-873.

Han G, You CC, Kim BJ, Turingan RS, Forbes NS, Martin CT (2006). et al. Light-regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles. *Angew Chem Int Edit.*, **45(19)**, 3165-3169.

Hong R, Han G, Fernández JM, Kim BJ, Forbes NS, Rotello VM (2006). Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J Am Chem Soc.*, **128(4)**, 1078-1079.

Hu Z, Qin J, Li T, Guo J (2019). Thyroid cancer MR molecular imaging via SHP2-targeted nanoparticles. *Int J Nanomed.*, **14**, 7365.

Huang JP, Hsieh PC, Chen CY, Wang TY, Chen PC, Liu CC, Chen CP (2015). Nanoparticles can cross mouse placenta and induce trophoblast apoptosis. *Placenta.*, **36(12)**, 1433-1441.

Islam NU, Jalil K, Shahid M, Muhammad N, Rauf A (2019). Pistacia integerrima gall extract mediated green synthesis of gold nanoparticles and their biological activities. *Arab J Chem.*, **12(8)**, 2310-2319.

Ismail EH, Khalil MM, Al Seif FA, El-Magdoub F, Bent AN, Rahman A, Al USD (2014). Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using Extract of Grape (*Vitis Vinifera*) Leaves and Seeds. *Prog Nanotechnol Nanomater.*, **3**, 1-2.

Kar P, Laight D, Shaw KM, Cummings MH (2006). Flavonoid-rich grape seed extracts: A new approach in high cardiovascular risk patients? *Int J Clin Pract.*, **60(11)**, 1484-1492.

Kasap H, Kasap M, Demirhan O, Alptekin D, Lüleyap Ü, Pazarbaşı A, Güzel IA (2010). *Tıbbi Biyoloji ve Genetik*. Adana: Adana Nobel Kitabevi.

Kayaalp SO (1998). *Tıbbi Farmakoloji*. Ankara : Hacettepe- Taş Kitapçılık, 8.baskı, 376-411.

Khademi-Azandehi P, Moghaddam J (2015). Green synthesis, characterization and physiological stability of gold nanoparticles from *Stachys lavandulifolia* Vahl extract. *Particuology.*, **19**, 22–26.

Khalilzadeh B, Charoudeh HN, Shadjou N, Mohammad-Rezaei R, Omid Y, Velaei K, Rashidi MR (2016). Ultrasensitive caspase-3 activity detection using an electrochemical biosensor engineered by gold nanoparticle functionalized MCM-41: Its application during stem cell differentiation. *Sensors and Actuators B: Chemical.*, **231**, 561-575.

Khanna S, Venojarvi M, Roy S, Sharma N, Trikha P, Bagchi D, Bagchi M, Sen CK (2002). Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Radical Bio Med.*, **33(8)**, 1089–1096.

Khare P, Sonane M, Pandey R, Ali S, Gupta KC, Satish A (2011). Adverse effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. *J Biomed Nanotechnology.*, **7(1)**, 116-117.

Kim D, Jon S (2012). "Gold nanoparticles in image-guided cancer therapy". *Inorg Chim Acta.*, **393**, 154-164.

Klug WS, Cummings MR, Spencer CA (2011). Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kanser. In: Öner C, Sümer S, Öner R, Ögüş A, Açık L. Genetik Kavramlar. 8th ed. Ankara: Palme Yayıncılık.; 434-56.

Kumar PV, Kala SMJ, Prakash KS (2019). Green synthesis of gold nanoparticles using *Croton Caudatus* Geisel leaf extract and their biological studies. *Mater Lett.*, **236**, 19-22.

Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, Olmedo I, Clos A, Sadagopa Ramanujam VM (2010). et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biop Res Co.*, **393(4)**, 649-655.

Li Q, Lu B, Zhang L, Lu C (2012). "Synthesis and stability evaluation of size-controlled gold nanoparticles via nonionic fluorosurfactant-assisted hydrogen peroxide reduction". *J mater chem.*, **22**, 13564-13570.

López PJT, Albero JS, Rodríguez-Montes JA (2014). Primary and secondary prevention of colorectal cancer. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*, **7**, CGast-S14039.

Lu F, Doane TL, Zhu JJ, Burda C (2012). "Gold nanoparticles for diagnostic sensing and therapy". *Inorg Chim Acta.*, **393**, 142-153.

Manavoğlu, O (2004). Klinik Onkoloji El Kitabı. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık, 218-29.

Mateo D, Morales, P, Ávalos A, Haza AI (2014). Oxidative stress contributes to gold nanoparticle-induced cytotoxicity in human tumor cells. *Toxicol mech method.*, **24(3)**, 161-172.

McLean MH, Murray GI, Stewart KN, Norrie G, Mayer C, Hold GL, Thomson J, Fyfe N, Hope M, Mowat NA, Drew JE, El-Omar EM (2011). The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *Plos One.*, **6(1)**, 15366.

Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer.*, **6(12)**, 924-935.

Miller RJ, Lenihan HS, Muller EB, Tseng N, Hanna SK, Keller AA (2010). Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Envir sci techn.*, **44(19)**, 7329-7334.

Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol.*, **17**, 7-12.

Misra R, Acharya S, Sahoo SK (2010). Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today.*, **15(19-20)**, 842-50.

Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK (2008). Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *J Nanopart Res.*, **10(3)**, 507-517.

Nelson BC, Petersen EJ, Marquis BJ, Atha DH, Elliott JT, Cleveland D, Jackman J. (2013). NIST gold nanoparticle reference materials do not induce oxidative DNA damage. *Nanotoxicology.*, **7(1)**, 21-29.

Oberdörster G (2010). Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Intern Med.*, **267**, 89-105.

Parida UK, Bindhani BK, Nayak P (2011). Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using onion (*Allium cepa*) extract. *World J Nano Sci Eng.*, **1(4)**, 93.

Pissuwan D, Niidome T, Cortie MB (2011). The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *J Control Release.*, **149(1)**, 65-71.

Polizzi MA, Stasko NA, Schoenfisch MH (2007). Water-soluble nitric oxide-releasing gold nanoparticles. *Langmuir.*, **23(9)**, 4938-4943.

Ramsden J (2008). *Essentials of nanotechnology*. BookBoon.

Rana A, Yadav K, Jagadevan S (2020). A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. *Jl Clean Prod.*, **272**, 122880.

Ray SD, Bagchi D, Lim PM, Bagchi M, Gross S.M, Kothari SC, Preuss HG, Stohs SJ (2001). Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res Commun Mol Pathol.*, **109**, 165-197.

Ray SD, Parikh H, Hickey E, Bagchi M, Bagchi D (2001). Differential effects of IH636 grape seed proanthocyanidin extract and a DNA repair modulator 4-aminobenzamide on liver microsomal cytochrome 4502E1-dependent aniline hydroxylation. *Mol Cell Biochem.*, **218**, 27-33.

Ray SD, Patel D, Wong V, Bagchi D (2000). *In vivo* protection of DNA damage associated apoptotic and necrotic cell deaths during acetaminophen-induced nephrotoxicity, amiodarone-induced lung toxicity and doxorubicin-induced cardiotoxicity by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.*, **107(1-2)**, 137-166.

Rossi G, Monticelli L (2016). Gold nanoparticles in model biological membranes: A computational perspective. *BBA-Biomembranes.*, **1858(10)**, 2380-2389.

Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir.*, **21(23)**, 10644-10654.

Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y (2004). Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev.*, **202**, 275- 293.

Srinath B, Rai VR (2015). "Rapid biosynthesis of gold nanoparticles by *Staphylococcus epidermidis*: Its characterisation and catalytic activity". *Mater Lett.*, **146**, 23-25.

Sufian MM, Khattak JZK, Yousaf S, Rana MS (2017). Safety issues associated with the use of nanoparticles in human body. *Photodiagn Photodyn.*, **19**, 67-72.

Tan G, Onur MA, Sağlam N, (2012). "Utilization of gold nanostructures in biomedical applications". *Turk J Biol.*, **36**, 607- 621.

Tanrıverdi Z (2015). *Kolorektal Kanser Hücreleri Üzerine (İn Vitro) İrinotecan ve Kukurbitasin I Kombine Tedavisinin Etkisi.* İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya/Türkiye

Taton TA (2002). Nanostructures as tailored biological probes. *Trends Biotechnol.*, **20**, 277-279.

Tunca EÜ (2015). Nanoteknolojinin Temeli Nanopartiküller ve Nanopartiküllerin Fitoremediasyonu. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi.*, **5(2)**, 23-34.

Uboldi C, Urbán P, Gilliland D, Bajak E, Valsami-Jones E, Ponti J, Rossi F (2016). Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Toxicol in Vitro.*, **31**, 137-145.

Umamaheswari C, Lakshmanan A, Nagarajan NS (2018). Green synthesis, characterization and catalytic degradation studies of gold nanoparticles against congo red and methyl orange. *J Photoch Photobio B*, **178**, 33-39.

Usta DD (2014). *Kolon kanser hücreleri için altın kaplı manyetik yüklü transfeksiyon ajanlarının kullanılması.* Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

Vijayakumar S, Ganesan S (2013). Size-dependent in vitro cytotoxicity assay of gold nanoparticles. *Toxicol Environ Chem*, **95(2)**, 277-287.

Vithiya K (2011). *Biosynthesis of Nanoparticules.* Industrial Biotechnology Division, School of Bio Sciences and Technology, VIT University, Vellore-632-014, TamilNadu, India.

Wang F, Wang Y, Ma Q, Cao Y, Yu B (2017). Development and characterization of folic acid-conjugated chitosan nanoparticles for targeted and controlled delivery of gemcitabine in lung cancer therapeutics. *Artif Cells Nanomed B.*, **45(8)**, 1530-1538.

Yetişgin AA, Güney BC (2017). *Altın Nanopartiküllerin Tanı ve Tedavide Kullanımı.* Yıldız Teknik Üniversitesi. İstanbul.

Yıldız N (2011). *Gümüş Nanopartiküllerin Liken Özütü ile Biyosentezi.* Ankara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Ankara.

YILMAZ S (2014). *Ht-29 Kanser Hücrelerinin Metastaz Takibi İçin Mikro Kanallarda Tespiti ve Sayılması.* Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara/Türkiye.

Yuan YG, Peng QL, Gurunathan S (2017). Silver nanoparticles enhance the apoptotic potential of gemcitabine in human ovarian cancer cells: combination therapy for effective cancer treatment. *Int J Nanomedicine.*, **12**, 6487–6502.

Zhang P, Wang P, Yan L, Liu L (2018). Synthesis of gold nanoparticles with *Solanum xanthocarpum* extract and their in vitro anticancer potential on nasopharyngeal carcinoma cells. *In j nanomed.*, **13**, 7047.

Zhang X, Fan L, Cui Y, Cui T, Chen S, Ma G, Wang L (2020). Green synthesis of gold nanoparticles using longan polysaccharide and their reduction of 4-nitrophenol and biological applications. *Nano.*, **15(1)**, 2050002.



