



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

***VİTIS VINIFERA* (ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ) EKSTRAKTI
KULLANARAK HAZIRLANAN GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLLERİN VE 5-FLOROURASİL İLE KOMBİNE
KULLANIMININ KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA
APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Giray SALMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAĞLIK VE BİYOMEDİKAL BİLİMLER (DİSİPLİNLERARASI)

ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Şükriye YEŞİLOT

BURDUR - 2021

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

***VİTIS VINIFERA* (ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ) EKSTRAKTI
KULLANARAK HAZIRLANAN GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLLERİN VE 5-FLOROURASİL İLE KOMBİNE
KULLANIMININ KOLON KANSERİ HÜCRE HATTINDA
APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Giray SALMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAĞLIK VE BİYOMEDİKAL BİLİMLER (DİSİPLİNLERARASI)

ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Şükriye YEŞİLOT

Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0594-YL-19 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez dönemim süresince bana 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 ,

Aynı zamanda çalışmam süresince laboratuvarını bize açan ve yardımlarını esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesinden değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sunay 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 yine yüksek lisans öğrenimim boyunca her zaman yanımda olan, desteklerini esirgemeyen, gösterdiğim başarıların en güzel destekçileri, bugünlere gelmemde en büyük payı olan ve sürekli 'yaparsın' diye her seferinde yorulmadan bıkmadan elimden tutan annem ve babama,

Benden küçük olmasına rağmen benim yol arkadaşım, motivasyon kaynağım kardeşime,

en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
TÜRKÇE ÖZET	viii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Vitis vinifera</i> (Üzüm) Bitkisinin Genel Özellikleri	3
2.2. <i>Vitis vinifera</i> 'nın Farmakolojik Aktiviteleri	4
2.3. Nanoteknoloji	7
2.3.1. Nanoteknolojinin Araştırma ve Uygulama Alanları	7
2.3.2. Nanopartiküller	8
2.3.3. Nanopartiküllerin Sentezi	8
2.4. Gümüş Nanopartiküller	10
2.4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi (Yeşil Sentez)	11
2.5. Kolon Kanseri	12
2.6. HT-29 Hücre Hattı	14
2.7. 5-Florourasil	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. <i>Vitis vinifera</i> Ekstraktının Hazırlanması	17
3.2. Gümüş Nanopartikül (AgNP) Sentezi	17
3.3. Gümüş Nanopartikül Karakterizasyonu	17
3.4. Hücre Kültür Çalışmaları	18
3.4.1. Hücrelerin Ekimi ve FBS ile Muamelesi	18
3.5. BrDu Proliferasyon Deneyi	18
3.6. Western Blot Deneyi	19
4. BULGULAR	23
4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi	23
4.2. UV VIS Spektrofotometre ile AgNP Karakterizasyonu	23
4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu(SEM) ile AgNP Karakterizasyonu	24
4.4. HT-29 Hücrelerinde AgNP'lerin Doza Bağımlı Sitotoksik Etkisi	25
4.5. HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinde Gümüş Nanopartiküllerin (Vv-AgNP) ve 5 Florourasil ile Birlikte Kullanımının Apoptotik Etkisi	28
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİLLER

Şekil 2.1	<i>Vitis vinifera</i> (Üzüm) Bitkisi	3
Şekil 4.1.	Üzüm çekirdeği (<i>Vitis vinifera</i>) ekstraktı kullanılarak gümüş nanopartiküllerin biyosentezi; (A) <i>Vitis vinifera</i> (Vv) ekstraktı, (B) H _{Au} Cl ₄ çözeltisi, (C) H _{Au} Cl ₄ / <i>Vitis vinifera</i> ekstraktı, (D) AgNO ₃ / <i>Vitis vinifera</i> Ekstraktı.	22
Şekil 4.2.	Gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) UV-vis spektrumu	23
Şekil 4.3.	<i>Vitis vinifera</i> ile sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) SEM görüntüsü	24
Şekil 4.4.	HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin hücre canlılığı üzerine gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) doza bağımlı sitotoksik etkisi.	25
Şekil 4.5.	HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin hücre canlılığı üzerine gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) 5-Florourasil ile birlikte kullanımının doza bağımlı sitotoksik etkisi.	26
Şekil 4.6.	HT-29 kolon kanseri hücrelerinde gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) tek başına ve 5 Florourasil ile kombine uygulamalarının hücre canlılığı üzerine etkilerinin karşılaştırılması	26
Şekil 4.7.	Western blotla tespit edilmiş β -aktin ve kaspaz-3 bantlarına ait görüntüler	27
Şekil 4.8.	Vv-AgNP'in Kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi	28
Şekil 4.9.	Vv-AgNP ve 5-Florourasil birlikte kullanımının Kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi	28

SİMGELER ve KISALTMALAR

AgNP	Gümüş Nanopartikül
PEG	Polietilen Glikol
HAuCl₄	Kloroaurik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
Ag	Gümüş
UV-vis	UV-Visible Spectrophotometer (UV-Görünür Spektrofotometre)
SEM	Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskobu)
Vv	<i>Vitis vinifera</i> Ekstraktı
5-FU	5 Florourasil
LDH	Laktat Hidrojenaz
UV	Ultraviyole
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
BSA	Bovin Serum Albumin
PVDF	Polivinilidin Florür
LDH	Laktat Dehidrogenaz
NM	Nanometre
PLGA	Poly(laktik-ko-glikolitik asit)
XRD	X-Ray Difraktometre
HepG-2	Hepotocellular insan karaciğer karsinom hücre hattı
Vv-AgNP	<i>Vitis vinifera</i> Ekstraktından Sentezlenen Gümüş Nanopartiküller

ÖZET

***Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği) ekstraktı kullanarak hazırlanan gümüş nanopartiküllerin ve 5-Florourasil ile kombine kullanımının kolon kanseri hücre hattında apoptotik etkilerinin incelenmesi**

Kolon kanserinin tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi müdahale gibi klasik yöntemlerin yanında, yenilikçi tedavi yöntemlerinden olan in vitro hedefe yönelik nanoteknolojik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Metal nanopartiküllerin biyosentezi; toksik olmayan, ucuz ve biyouyumlu bir yöntem olarak, kanser tedavilerinde hedefe yönelik terapötik etkinlik elde etmek adına araştırmacılar tarafından daha fazla ilgi görmektedir. Bu çalışmada; antioksidan ve serbest radikal temizleme aktivitesine sahip *Vitis vinifera* ekstraktı ile biyosentezlenen gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) tek başına ve 5-Florourasil (5-FU) ile birlikte kullanımının HT-29 hücre hattı üzerine sitotoksik ve apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. *Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği) sulu ekstraktı kullanılarak yeşil sentezi gerçekleştirilen gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu için UV-görünür spektrofotometre (UV-vis) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (0-20 µg/mL) hazırlanmış Vv-AgNP'ler tek başına ve 5-FU ile kombine edilerek, HT-29 hücreleri ile 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Sentezlenen Vv-AgNP'lerin ve 5-FU ile kombinasyonunun HT-29 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri BrdU hücre proliferasyon testi ile apoptoz ilişkili Kaspaz-3 protein seviyelerinin belirlenmesi ise Western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak Vv-AgNP'lerin kontrol grubuna kıyasla HT-29 hücre hattı üzerinde hücre ölümünü arttırdığı gözlenmiştir. 1.25 µg/ml dozda kullanılan Vv-AgNP'lerin 5-FU ile birlikte uygulanmasında hücre canlılığında %50'den fazla azalma olduğu görülmüştür. Artan Vv-AuNP (5-10 µg/ml) dozlarında Kaspaz-3 aktivasyonunun arttığı, kombine kullanımda apoptotik etkinin daha belirgin olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada üzüm çekirdeği ekstraktı ile sentezlenmiş Vv-AgNP'lerin 5-FU ile kombine kullanımının kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkinlikte sinerjistik bir etki oluşturduğu ve kolon kanseri tedavisi için alternatif bir terapötik ajan olarak kullanılabileceği in vitro olarak gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera*, Gümüş Nanopartikül, 5-Florourasil, Kolon Kanseri, HT-29 Hücre Hattı

ABSTRACT

Investigation of the apoptotic effects of combined use of 5-Fluorouracil and silver nanoparticles using *Vitis vinifera* extract (grape seed) in colon cancer cell line

In the treatment of colon cancer, besides classical methods such as chemotherapy, radiotherapy and surgical intervention, in vitro targeted nanotechnological methods, which are one of the innovative treatment methods, have started to be developed. Biosynthesis of metal nanoparticles; As a non-toxic, inexpensive and biocompatible method, it attracts more attention from researchers to achieve targeted therapeutic efficacy in cancer treatments. In this study; We aimed to evaluate the cytotoxic and apoptotic effects of the use of silver nanoparticles (Vv-AgNP) biosynthesized with *Vitis vinifera* extract, which has antioxidant and free radical scavenging activity, alone or in combination with 5 Fluorouracil (5-FU) on HT-29 cell line. UV-visible spectrophotometer (UV-vis) and scanning electron microscope (SEM) were used for the characterization of green synthesis silver nanoparticles using the aqueous extract of *Vitis vinifera* (grape seed). Vv-AgNPs prepared in different concentrations (0-20µg / mL) were treated with HT-29 cells alone and combined with 5-FU for 72 hours. The cytotoxic effects of synthesized Vv-AgNPs and their combination with 5-FU on HT-29 cells were evaluated by BrdU cell proliferation test and the determination of apoptosis-related Caspase-3 protein levels by Western blot method. Depending on the increasing concentration, it was observed that Vv-AgNPs increased cell death on the HT-29 cell line compared to the control group. In the combined application of Vv-AgNPs used at a dose of 1.25 µg / ml with 5-FU, it was observed that there was a decrease in cell viability more than 50%. Caspase-3 activation was found to be increased in rising doses of Vv-AuNPs (5-10 µg / ml), and apoptotic effect was more pronounced in combined use. In this study; It has been shown in vitro that the combined use of Vv-AgNPs synthesized with grape seed extract and 5-FU creates a synergistic effect in cytotoxic and apoptotic activity on cancer cells and it can be used as an alternative therapeutic agent for colon cancer treatment.

Keywords: *Vitis vinifera*, Silver Nanoparticles, 5 Fluorouracil, Colon Cancer, HT-29 cell line

1. GİRİŞ

Kanser, çeşitli faktörler nedeniyle değişime uğramış hücrelerin, kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan bir hastalık olarak tanımlanmakta olup, günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biridir. Kanser türleri arasında özellikle kolon kanseri, batı ülkelerinde yüksek insidans ve mortalite göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütünün verilerine göre yılda 600.000'in üzerinde insan kolon kanseri nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Kanser tedavilerinde tümör hücrelerinin çevre dokuya minimum hasar vererek öldürülmesi hedeflenmektedir. Apoptoz (programlı hücre ölümü) hücrelerin inflamatuvar bir yanıt oluşturmada öldürülmesini sağlayan fizyolojik bir süreçtir ve bu nedenle kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bayram, 2017; Özkaya, 2009). Türkiye'de 2010 yılında yapılan bir çalışma sonucunda Kolon kanseri insidansı erkeklerde 20,7/100.000, kadınlarda ise 13,1/100.000'dir. Cinsiyete göre sahip olunan bu oranlar ile kolon kanseri erkeklerde dördüncü sırada, kadınlarda ise üçüncü sırada en yaygın görülen kanser türleri olarak belirlenmiştir (Çetin ve Şahin, 2020).

Kolon kanserinin tedavisi için günümüzde hormon terapi, radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler gibi pek çok yöntem kullanılmaktadır. Yoğun tarama ve geliştirilmiş tedavi yöntemleri kolon kanseri insidansını ve meme kanseri ile ilişkili mortalite oranını önceki yıllara oranla azaltmaya katkı sağlasa da halen ciddi anlamda sağ kalım oranını arttıramamaktadır. Aynı zamanda tedavi süresince Kolon kanserli hastaların yaşam kalitesinin artırılması da ayrı bir önem taşımaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı araştırmacılar kolon kanserinin tanı ve tedavisinde nanoteknolojinin kullanımını gündeme getirmiştir.

Nanoteknoloji, 1-100 nm büyüklüğündeki nanopartiküllerin üretimi, karakterizasyonu ve kullanımını kapsayan bir teknolojidir. Birçok teknolojik gelişme, istenen özellikleri elde etmek için oldukça çeşitli organik ve inorganik malzemeler kullanarak nanopartiküllerin tasarlanmasını ve karakterize edilmesini mümkün kılmaktadır (Albrecht ve ark., 2006). Bu bağlamda kanser tedavisinde umut verici varyantlardan biri gümüş nanopartiküllerdir. Son yıllarda adını sıkça duyuran gümüş nanopartiküller (AgNP), fiziksel ve kimyasal birtakım özelliklerinden dolayı

sağlık alanı başta olmak üzere oldukça geniş bir alanda kullanılabilir. Gümüş nanopartiküller, fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılarak sentezlenebilir. Son yıllarda gerek çevre dostu ve uygun maliyetli oluşu gerekse yüksek miktarlarda kolayca sentezlenebilmesi gibi özellikleri sayesinde diğer yöntemlere kıyasla yeşil sentez (biyosentez) daha çok tercih edilmektedir (Thakkar ve ark., 2010). Kuppusamy ve ark. 'ın yeşil biyosentez gümüş nanopartiküller ile yaptıkları in vitro kolon kanseri çalışmasında azalmış hücre canlılığı ve artmış sitotoksik etki bulunmuştur (Kuppusamy ve ark., 2016).



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Vitis vinifera* (Üzüm) Bitkisinin Genel Özellikleri

Üzüm (*Vitis vinifera*), Vitaceae familyasına ait vitis cinsi sarılgan bir bitki türüdür ve tarihte kültürü yapılan en eski meyve türüne ait verilen isimdir. Tarihsel olarak M.Ö. 5000 yılına kadar uzanan *V. vinifera*'nın anavatanı, Anadolu'yu da içine alan Küçük Asya ve Kafkasya bölgesidir. Diğer meyvelerle kıyaslandığında en fazla çeşide sahip türlerden birisi olan *V. vinifera*'nın 10.000'in üzerinde çeşidi bulunmaktadır. Üzüm bitkisinin yaprak, çiçek, meyve ve tohumunun görünümü ve bitkinin genel görünümü Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 *Vitis vinifera* (Üzüm) Bitkisi (Thomas Schoepke, www.plant-pictures.de, (2020))

Üzümün neredeyse bütün kısımlarında bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler gösterdiği düşünülmektedir (İsmail ve ark., 2014). Meyve kabuklarında antosiyaninler, pulpada hidrokisisinamik asitler ve tohumlarında ise proantosiyanidinlerin yoğunlaşmış taneleri bulunmaktadır. Bunun yanı sıra birçok stilbenoids ve Siyanidin-3-O-glukozit, Delfinidin-3-O-glukozit, Te malvidin-3-O-glukozit, Petunidin-3-O-glukozit, Peonidin-3-O-glukozit gibi zengin antosiyanin bileşikleri de içermektedir (Kamiloğlu, 2007).

V.vinifera'nın; anti-aging, anti-oksidan, anti-kanser etkileri bilinmekle birlikte kolera, çiçek hastalığı, cilt ve göz enfeksiyonları, böbrek ve karaciğer hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Marjan ve Hossein, 2009).

2.2. *Vitis vinifera*'nın Farmakolojik Etkileri

Tıbbi bitkiler binlerce yıldır çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır ve 19. yüzyıldan itibaren bu bitkilerden izole edilen birçok biyoaktif saf bileşik çok başarılı ilaçlar haline gelmiştir (Beutler, 2009). Ayrıca, günümüzde doğal ürünler yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesi için önemli bir kaynaktır (Cragg ve Newman, 2013).

Vitis vinifera (Üzüm) bitkisinde içerdiği birçok fenolik bileşik, stilbenoidler, antosiyaninler ile resveratrol gibi fitoaleksinleri barındırması ile birtakım farmakolojik aktivitelere sahiptir.

Resveratrol, başta üzüm olmak üzere birçok bitki türünde varolan doğal bir fitoaleksindir. Fitoaleksinler, bitkilerde Ultraviyole (UV) ışını, hasar ve enfeksiyonlara karşı gelişen ikincil yapılardır. Resveratrol, bitkilerde özellikle yer fıstığında, kırmızı üzümde ve ananasta yüksek konsantrasyon da bulunan, siyah üzümün soğuk hava koşulları ve mantar enfeksiyonları gibi etkenlere karşı kendini korumak için ürettiği bir maddedir (Kocatürk ve Kavas, 2007; Baur, 2006).

Resveratrol, diğer tüm fenolik bileşikler gibi, antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu sayede, reaktif oksijen türevleri temizlenerek, DNA hasarına engel olunur ve

hücre membranındaki lipid peroksidasyonu önlenir (Pal ve ark., 2003).

Resveratrol anti-aging etkiye sahiptir ve bu sayede yaşlanmayı yavaşlatıcı hatta yaşam süresini uzatıcı etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu etkiyi, insülin duyarlılığını arttırması, sirtuin geninin enzimatik aktivitesini arttırıcı etkisi (Pelin ve ark., 2007; Plin, 2005), ayrıca mitokondri sayısını arttırıcı etkisi ve antioksidan etkisi ile gerçekleştirmektedir. İnflamasyon karşıtı etkisi ile doku hasarı ve hücrel proliferasyonu baskılar ve bu sayede Cilt yapısını korur.

Ayrıca prostat kanseri patogenezi üzerinde yapılan bir çalışma, resveratrolün potansiyel olarak kanser nüksünü geciktirmek için anti-kanser ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Adi ve ark., 2017).

Yapılan klinik ve deneysel çalışmalar ile resveratrolün yüksek vücut ağırlığının düzenlenmesi, kardiyovasküler, serebrovasküler hastalık, diyabet ve kanserle bağlantılı süreçlerde etkili olduğu gösterilmiştir (Pelin ve ark., 2007; Martin, 2004).

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu ve bunların vücutta meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir, Antioksidanlar da, oksidasyon ürünlerini inhibe edebilen ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemede etkili olan bir savunma mekanizmasıdır.

Son yapılan çalışmalarda, serbest radikallerin birçok hastalıkta en etkili faktörlerden biri olduğunun tespit edilmesi, antioksidanlara yönelik ilgiyi oldukça arttırmıştır. Antioksidanlar, hastalıkların önlenmesinde ve insan sağlığının korunmasında büyük bir öneme sahiptir (Niki, 2010).

Vitis vinifera ekstraktı, antioksidan ve serbest radikal temizleme aktivitesine sahiptir (Jayaprakasha ve ark., 2003). *Vitis vinifera* ekstraktının neden olduğu antikanser etkilerini bireysel bileşenlerinin etkileriyle karşılaştıran yeni bir çalışmada, *Vitis vinifera* ekstraktının, bireysel bileşen epigallocatechin, prosiyanidinler ve bunların birleşmesine kıyasla büyüme inhibisyonunda daha güçlü

olduğunu buldu (Dinicola ve ark., 2016). Bir diğer çalışmada, yüksek konsantrasyonda bulunan resveratrol konsantrasyonunun (75-100 μ M), HT-29 ve SW-480 insan kolon kanseri hücre hatlarında p53 aktivasyonu yoluyla hücre proliferasyonunu baskıladığını ve apoptozu indüklediğini bildirmiştir (Vanamala ve ark., 2010).

Üzümde bulunan anti-oksidan özelliğinin C vitamininden 30, E vitamininden ise 50 kat daha fazla olduğu bilinmektedir (Lavanya ve ark., 2016). Güçlü antioksidan etkisi bilinen vitamin C, E ve ek olarak diğer antioksidanlara kıyasla üzüm çekirdeği ekstraktı, hücrelerde meydana gelen oksidatif hasara karşı önemli ölçüde koruma sağlamıştır (Bagchi ve ark., 1998).

Sadece tek bir hastalığı tarif etmeyen ve 100'den fazla hastalık grubunu içine alan Kanser, vücudumuzun çeşitli bölgelerindeki hücrelerin, DNA hasarına bağlı kontrolsüz çoğalması sonucu meydana gelen kötü huylu tümörlere verilen genel bir isimdir. Birçok tipi olmasına rağmen, tamamı DNA hasarına bağlı hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile başlamaktadır (Anand ve ark., 2008). Kanser hastalığını tedavi etmek, diğer organlara taşınmasını ve yayılmasını önlemek ve tümör büyümesini yavaşlatmak suretiyle kanser hastalığının meydana getirdiği rahatsızlıkları ortadan kaldırmayı antikanser etki olarak tanımlayabiliriz (Temel, 2015).

Yapılan bir çalışmada, 8 farklı üzüm çeşidinden etanol ve su kullanılarak elde edilen özütlerin antikanser aktivitesi kanser Huh7 karaciğer hücre hattı üzerinde test edilmiş ve sonucunda üzüm özütlerinin kanser hücrelerinin büyümesi, %14 ile %40 arasında değişen oranlarda inhibe ettiği tespit edilmiştir (Laila, 2019).

Diğer bir çalışmada ise üzüm tohum özütlerinin kolon kanseri hücre hatları üzerinde önemli oranda inhibisyon gösterdiklerini belirtmiştir (Dinicola ve ark., 2012).

2.3. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji kısaca, 1-100 nanometre büyüklüğündeki nano ölçekli parçacıkların karakterizasyonu, üretimi ve uygulamasını içerir. Bir nanometre (nm), metrenin milyarda biri, ya da 10^{-9} katıdır (Turgut ve ark, 2011).

Nanoteknolojinin ayrıca moleküler nanoteknoloji olarak da adlandırılan eski ve yaygın tanımı, makro ölçekli ürünlerin imalatı için atomların ve moleküllerin hassas kontrolünün belirli bir amacını ifade etmektedir (Çıracı, 2004).

Nanoteknoloji terim olarak ilk kez 1974 yılında Norio Taniguchi tarafından kullanılmış, ünlü fizikçi Richard Feynman tarafından atomların direkt kontrolü aracılığıyla bir sentez olasılığından bahsettiği *There's Plenty of Room at the Bottom* adlı konuşması sırasında nanoteknolojiyi besleyen ilk kavramlar tartışılmıştır (Feynman, 1960).

1980 yıllarında nanoteknolojinin bir bilim dalı olarak ortaya çıkması, teorik ve kamu işlerinin birleşmesiyle olmuştur. Bu gelişme, nanoteknoloji için ve maddenin atomik düzeyde hassas kontrolüne biraz daha dikkat çeken yüksek görünürlüklü deneysel çalışmalar için kavramsal bir çerçeve geliştirmiş ve yaygınlaştırmıştır.

2000'li yılların ortalarına doğru bu alana yönelik gelişmeler ve bilimsel ilgi artmaya başladı. Maddenin atomik düzeyde hassas kontrolü üzerine yoğunlaşan, ayrıca var olan ve tasarlanmış yöntemler, amaçlar ve uygulamaları da tartışan nanoteknoloji, yol haritaları üretmek için birçok projeler ortaya çıkarılmıştır.

2.3.1. Nanoteknolojinin Araştırma ve Uygulama Alanları

Nanoteknolojinin alanı oldukça geniştir ve giderek daha da genişlemektedir. Günümüzde enerji, otomotiv, inşaat, kozmetik, malzeme bilimi ve elektronik gibi alanlarda kullanımının yanında, tıp alanında da oldukça çarpıcı gelişmelere imkan sağlamaya başlamıştır.

Nanoteknolojinin araştırma ve uygulama alanlarına sektörel bazda baktığımızda Nanoteknoloji:

1. Tıp Alanında: Başta ilaç taşıma, biyoçipler, implantlar, antimikrobiyoller, yerel tanı ve yerel teşhis alanlarında,
2. Enerji Sektöründe: Güneş pilleri, bataryalar, yakıt pilleri, kapasitörler,
3. Otomotiv Sektöründe: Lastikler, yapım malzemeleri, katalizörler, ön camlar, yakıt pilleri,
4. Bilişim Teknolojileri: Veri depolama, ekranlar, lazer diotlar, fiberler,
5. İnşaat Sektöründe: Beton yalıtım kaplama,
6. Kozmetik Sektöründe: Güneş kremleri, dudak boyaları, diş macunları,
7. Askeri Alanda: Askeri elbiseler, detektörler, hissedebilen robot uzuvlar gibi alan ve uygulamaları kapsamaktadır (Kırca ve Menceloğlu, 2008; Bayındır, 2005).

2.3.2. Nanopartiküller

Nanopartiküller, çevresindeki arayüzey tabakası ile birlikte 1 ila 100 nanometre (nm) büyüklüğünde partiküllerdir. Arayüzey tabakası, temel olarak partiküllerin tüm özelliklerini etkileyen, nano ölçekli maddenin ayrılmaz bir parçasıdır. Arayüzey tabakası tipik olarak iyonlardan, inorganik ve organik moleküllerden oluşur. Organik molekül kaplaması ise inorganik nanoparçacıklar stabilizatörler, kaplama ve yüzey molekülleri veya pasiflize edici maddeler olarak bilinir (Batista ve ark., 2015).

2.3.3. Nanopartiküllerin Sentezi

Nanopartiküllerin sentezi için kullanılan herhangi bir yöntemin temel amacı, istenilen materyalin boyutunun nanometre aralığına (1-100 nm) getirilmesi ve

nanoparçacık özelliklere sahip olmasının sağlanmasıdır. Buna göre, sentez yöntemi, bir özelliğin veya diğerinin elde edilebilmesi için bu aralıktaki boyut kontrolünü sergileyebilir nitelikte olmalıdır.

Nanopartiküllerin sentezinde yeşil sentez, asal gaz yoğunlaşma, hidrojen redüksiyon, alev sentezi, mekanik öğütme, aşındırma, kimyasal çökeltme yöntemleri ve iyon implantasyonu, piroliz ve hidrotermal sentez gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Granqvist ve Buhrman, 1976; Hahn ve Averbach, 1990; Wang ve Bai, 2005; Hennes ve ark., 2014; Llamosa ve ark., 2014). Nanopartiküllerin sentezinde kullanılan tüm yöntemler, temel olarak aşağıdan yukarı “Bottom Up” ve yukarıdan aşağı “Top Down” olarak tanımlanan iki temel grup altında sınıflandırılabilir (Wolfgang, 2004).

Yukarıdan aşağıya prensibine dahil olan yöntemlerin temelinde, malzemeye dışarıdan mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler yoluyla enerji verilip sonrasında malzemeden nano boyutlarda partiküller elde etmek yer almaktadır. Yukarıdan aşağıya prensibi ile çalışan sentez yöntemlerine, mekanik öğütme ve aşındırma gibi yöntemler en genel örnek olarak verilebilir fakat klasik öğütme işlemlerinden çok daha fazla enerji tüketimine neden olduğu için yüksek enerjili öğütme veya yüksek hız değirmenleri olarak da adlandırılmaktadır (Sergeev, 2013).

Aşağıdan yukarıya prensibine dahil olan yöntemlerin temelinde ise atomik veya moleküler boyuttaki yapıların kimyasal reaksiyonlar ile büyütülerek partikül oluşumunun gerçekleştirilmesi yer almaktadır. Nanokristalin metal ve alaşımlarının direkt olarak aşırı doymuş buhar fazından üretiminde kullanılan ve günümüzde genellikle nano-boyutlu tozların sentezinde kullanılan eski bir yöntem olan gaz yoğunlaştırma tekniği aşağıdan yukarıya prensibiyle çalışmaktadır. Kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma, sol jel ve sprey piroliz yöntemleri de bu yaklaşımın en çok bilinen diğer üyeleridir (Stephan ve ark, 2003; Zaki, 2006).

Nanopartikül sentezinde kullanılan yöntemleri yukarıda açıklanan kategoriler haricinde fiziksel veya kimyasal temelli olarak iki ayrı yaklaşımla da sınıflandırmak mümkündür. Mekanik enerjinin kullanıldığı ve fiziksel özelliklerin ön planda olduğu yöntemler fiziksel sentez, süreç içerisinde kimyasal reaksiyonların yer aldığı

yöntemler ise kimyasal sentez olarak sınıflandırılabilir (Wolfgang, 2004).

Nanopartiküllerin çözelti ortamında sentezi için fiziksel ve kimyasal olarak yukarıda da belirtildiği gibi çok sayıda klasik yöntem uygulanmaktadır, fakat özellikle son yıllarda daha ucuz, çevre dostu, toksik etki yaratmayan biyolojik yöntemlerin yer aldığı “yeşil nanoteknoloji” ön plana çıkmakta ve büyük ilgi görmektedir (Bar ve ark., 2009).

2.4. Gümüş Nanopartiküller

Boyutu 1 ila 100 nanometre arasında olan gümüş nanopartiküller, sık sık 'gümüş' olarak nitelendirilse de bazıları, büyük bir yüzey-kütle gümüş atomu oranı nedeniyle büyük bir oranda gümüş oksitten oluşur. Yapılacak olan uygulamaya bağlı olarak çok sayıda nanopartikül şekli oluşturulabilir. Yaygın olarak kullanılan şekli küresel gümüş nanopartiküllerdir. Ancak elmas, sekizgen ve ince tabakalı gümüş nanopartiküllerde popülerdir (Graf ve ark., 2003).

Son derece geniş yüzey alanları, çok sayıda ligandın koordinasyonuna izin verir. Tıp tedavilerine uygulanabilen gümüş nanoparçacıkların özellikleri, laboratuarda ve hayvan çalışmalarında incelenerek, potansiyel etkinlik, toksisite ve maliyetler değerlendirilmektedir (Beykaya ve Çağlar, 2016).

Gümüş nanopartikülleri (AgNP), sahip olduğu antibakteriyel ve dezenfektan özellikler ve nanotıp uygulamalarındaki başarılı sonuçlarından dolayı, üzerinde birçok çalışmaların yapıldığı malzemelerden biri olup, günümüze kadar ise çeşitli yöntemlerle üretimleri yapılmış olan bir nanopartiküldür (Duncan, 2011).

Hücre zarından kolaylıkla geçebilmeleri sayesinde antibakteriyel, antivirüs, antifungal ve antimikrobik özellikler taşıdıkları için sağlık alanında önemli bir yere sahip olan gümüş nanopartiküller, tıp alanıyla birlikte tarım sektöründen elektronik sektörüne, gıda sektöründen ev aletlerine kadar birçok çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. En önemli etkisini ise tedavi amaçlı kullanıldığı tıp alanı oluşturmaktadır (Altuner, 2014). Gümüş nanopartiküllerinin taşıdığı antibakteriyel özelliğinin diğer

materyallerin antibakteriyel özelliğinden ayıran en önemli farkı, bakterilerin zamanla antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirebildikleri direnci gümüşe karşı geliştiremiyor olmasıdır. Bu niteliği ile gümüş uzun yıllardır bilim insanlarının ilgi alanına girmektedir.

Tarihi süreç içerisinde kadim medeniyetler (Persler, Yunanlılar ve Romalılar), gümüşün antibakteriyel etkisinin olduğunu keşfettiklerinde, gıdalarını gümüş kaplarda muhafaza etmişlerdir. Orta çağda on milyonlarca insanın ölümüne yol açan veba salgınlarında, aristokratların yemek takımlarında gümüş kullanmalarının, vebadan korunmalarına yardımcı olduğu belirlenmiştir (Altuner, 2014).

2.4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi (Yeşil sentez)

Nanopartiküllerin biyosentezi (yeşil sentez), fiziksel ve kimyasal senteze alternatif olarak nanopartikül sentezinde kullanılan ve nanoteknoloji ile biyoteknolojiyi birbirine bağlayan bir yaklaşımdır (Ahmat ve Sharma, 2012). Yeşil sentezde zehirli indirgeme ajanları yerine; metal nanoparçacık, metal oksit nanoparçacık, manyetik nanoparçacık ve kuantum nokta sentezi gibi birtakım yöntemler kullanılarak yeşil sentez yapılmaktadır. Gümüş, altın, paladyum, demir, bakır, kurşun, titanyum, lityum, çinko, seryum ve metal oksit nanopartikülleri gibi birçok metalden yeşil sentez yöntemiyle nanopartiküller sentezlenebilmektedir (Ge ve ark., 2014).

Mantarlar, bitkiler, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler ve mikroorganizmalar, nanopartiküllerin yeşil sentezinde indirgeme, kaplama ve dengeleyici ajanların kaynağı olarak kullanılabilirler (Kharissova ve ark., 2013).

AgNP'lerin yeşil sentezi için gereken temel malzeme, gümüş metal iyon çözeltisi ile indirgeyici bir biyolojik maddedir. Çoğu durumda, hücrelerde bulunan indirgeyici ajanlar veya diğer bileşenler, stabilize edici ve kapatma ajanları olarak işlev görür, bu nedenle dışarıdan kapatma ve stabilize edici ajanların ilave edilmesine gerek yoktur (Sharma ve ark, 2009).

İndirgeyici ajanlar biyolojik sistemlerde yaygın olarak dağılır. AgNP'ler, beş canlı organizma sınıfından dört canlı organizma sınıfına ait farklı organizmalar kullanılarak sentezlenmiştir ve buna Monera (gerçek çekirdeği olmayan prokaryotik organizmalar), Protista (gerçek çekirdekli tek hücreli organizmalar), mantarlar (ökaryotik, saprofit / parazit), planta (ökaryotik, ototroflar) ve hayvani (ökaryotik, heterotroflar örnek olarak gösterilebilir (Sharma ve ark, 2009).

AgNP'nin yeşil sentezi için kullanılan bitkiler arasında *Acalypha indica*, *Rhododendron dauricum*, *Allium sativum*, *Boswellia ovalifoliolata*, *Calotropis procera*, *Camelia sinensis*, *Catharanthus roseus*, *Citrus sinensis peel*, *Memecylon edule*, *Coleus aromaticus*, *Melia azedarach*, *Mentha piperit*, *Nelumbo nucifera*, *Trachyspermum copticum*, *Syzygium cumini* örnek olarak verilebilir (Kumar ve ark., 2013).

2.5 Kolon Kanseri

Kolon kanseri veya kolorektal kanser, kalın bağırsak, rektum ve apandisiti içine alan bölgede görülen kontrolsüz hücre büyümelerini kapsamaktadır. Sıklıkla kalın bağırsakta gelişen adenom poliplerden başlayan kolon kanseri, ölümle sonuçlanan vaka sayısına bakıldığında dünyada ikinci, yıllık 1 milyonun üzerine yeni vaka ile de dünyanın en yaygın görülen üçüncü kanser türüdür. Türkiye'de 2010 yılı verileri itibariyle Kolon kanseri insidansı erkeklerde 20,7/100.000, kadınlarda 13,1/100.000'dir. Cinsiyete göre sahip olunan bu oranlar ile Kolon kanseri erkeklerde dördüncü, kadınlarda ise üçüncü sırada en yaygın görülen kanser türleri olarak belirlenmiştir. Son yıllarda dünya genelinde ve Türkiye'de sağlık harcamalarında çok ciddi artışlar meydana gelmiştir (Rukiye ve Bayram, 2020).

Kalın bağırsak kanseri her yaşta görülebilmektedir lakin vakaların % 90'ından fazlası, kırk yaş ve üzerindedir. Kırk yaşından itibaren her on yılda risk yaklaşık iki katına çıkmaktadır. Ailesinde kalın bağırsak kanseri veya kalın bağırsak polipi bulunan kişilerde ve ülseratif kolit hastalığı olanlarda risk daha da artmaktadır (Giovanucci, 2002).

Kolon kanserlerinde sıkça görülen belirtiler arasında, boşaltım sisteminde ishal-kabızlık gibi değişikliklerin olması ve uzun sürmesi, dışkılama sırasında tam boşalmadığı hissi, dışkıda kan görülmesi ve/veya dışkı renginde koyulaşma, karında şişkinlik, kan tahlillerinde beklenmeyen anemi (kansızlık), kramp tarzında ağrı veya gaz şikâyeti, açıklanamayan kilo kaybı ve halsizlik ile çabuk yorulma gösterilebilir (American Cancer Society, 2018).

Kolon kanseri tanısında yukarıdaki belirtilerin görülmesi durumunda şüphelinir ve kesin tanı için kolonoskopi ile tüm barsak segmenti kameralı bir sistem ile kontrol edilir. Şüpheli bulgular, polip veya ülser lezyonlardan alınan biyopsi ile tanı konulur (Şimşek, 2019).

Kolon kanseri teşhisi konulan bir kişide öncelikle ayrıntılı fiziki muayene ve kan tahlillerini takiben radyolojik görüntüleme teknikleri (Tomografi, MRI veya PET CT) ile hastalığın başka organlara yayılım gösterip göstermediği (Metastaz) saptanmalıdır (Şimşek, 2019).

Kolon kanserlerinin tedavisinde iki unsur çok büyük önem arz etmektedir. İlki kanserin evresi ikincisi ise kanserin yerleşim yeridir. Erken evre veya lokal ileri kolon kanserlerinde tedavide ilk sırayı cerrahi yöntem alır iken rektum kanserlerinde ise genellikle neoadjuvan (ameliyattan önce) kemoterapi ile radyoterapi (Işın) tedavisi verilerek tümör küçültülmeye çalışılır ve sonrasında hasta opere edilir. Dördüncü evre olarak adlandırdığımız metastatik durumdaki hastalarda ise sistemik tedavi aslolan tedavi yöntemidir. Kolon kanserlerinde uygulanan kemoterapötik ajanlar ise oksaliplatin, irinotekan, fluorourasil bazlı kombine tedaviler içermekte ve daha ileri aşamalarda regorafenib, trifluridine/tipiracil gibi ajanlar uygulanmaktadır. Biyolojik ajanlar (Bevacizumab, Cetuximab, Panitumumab gibi) ise sıklıkla kemoterapilere eklenmektedir (Anonim, 2017).

Günümüzde kolon kanserinin tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi müdahale gibi klasik yöntemler bulunmasının yanında, yeni tedavi yöntemlerinden olan hedeflendirilmiş terapilerde (monoklonal antibodiler, anjiyogenez inhibitörleri kullanılarak gerçekleştirilir) kullanılmaya başlanmıştır (Albayrak ve ark., 2014).

Kolon kanserlerinde etkin bir şekilde gerçekleştirilebilecek hedeflendirilmiş terapi ve gen terapi çalışmaları özellikle p53 geni üzerinde yoğun şekilde sürdürülmektedir (Waldnar ve Neurath, 2010).

Bu gelişmeler ümit verici olsada halen kolon kanserinde hastalığın prognozunda en önemli unsur hastalığın erken teşhisi olup erken evre kolon kanserinde 5 yıllık yaşam oranı %70' lerin üzerinde iken metastatik yani hastalığın 4. evresinde bu oran %10'un altında kalmaktadır (Diyarbakırlıoğlu ve ark., 2014).

2.6. HT-29 Hücre Hattı

HT-29, biyolojik ve kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılan bir insan kolon kanseri hücre hattıdır. İlk başta 1964 yılında Jorgen Fogh tarafından 44 yaşında bir Kafkas kadınından türetilen HT-29 hücreleri, sıkı ve bir tek katmanlı olması bakımından ince bağırsaktaki enterositlere benzerlik göstermektedir (Martinez-Maqueda ve Miralles, 2015).

HT-29 hücreleri p53 tümör antijenini oldukça fazla üretmektedir fakat p53 geninin 273. pozisyonunda mutasyona sahiptir. Bu mutasyon sonucunda histidin ile argininin yer değiştirir. Hücreler, suramin içeren ortamlarda yüksek ekspresyonlu c-myc oncojeni ile eşleşmesi sonucu hızlıca çoğalma gösterirler. Bununla birlikte, c-myc oncojeni düzensizdir, ancak HT-29 hücrelerinin büyüme faktörü gereksinimleri ile bir ilişkisi muhtemeldir (Maria-Elizabeth ve ark., 1989).

HT-29 hücre hattının laboratuvar ortamında gerçek kolon dokusunu simüle etme yeteneği ve farklılaşma kabiliyeti gibi özellikleriyle prelinik araştırmalarda ve özellikle epitelyal hücre araştırmalarında kullanılmaktadır. Ayrıca hücre hattında, xenograftlar yoluyla kemirgen hayvanlar (fare, sıçan vb.) üzerinde in vivo olarakda çalışmalar yapılabilmektedir (Hirn ve ark., 1988).

HT-29 hücreleri, hücre kültürü içindeki galaktoz tarafından, glukoz ile yer değiştirmesiyle son olarak enterosit içinde farklılaşır (Martinez-Maqueda D ve Miralles B, 2015). Bu nedenle HT-29 hücre çalışmaları, forskolin, Kolşisin, nocodazol ve taksolün bir sonucu olarak indüklenmiş farklılaşmayı göstermiştir

(Cohen E, 1999) ve galaktoz aracılı farklılaşma ile de adherens bağlantılarının güçlenmesine neden olmaktadır (Gout ve ark., 2004).

HT-29 hücreleri, yaklaşık dört günlük bir iki katına çıkma süresi ile büyüme faktörleri olmayan hücre kültüründe çoğalabilse de, iki kat daha fazla fetal serumu verilmesi ile bu süre bir güne de düşürülebilmektedir (Maria-Elizabeth ve ark., 1989). Ayrıca HT-29 hücreleri yüksek glikoz tüketimine sahiptir ve 25 mM glikoz ve % 10 serum içeren standart ortamda farklılaşmamış olarak kalabilmektedir (Martinez-Maqueda ve Miralles, 2015).

2.7. 5-Flourourasil

Kemoterapik ilaçlar, DNA-interaktif ajanlar, antitübilin ajanlar, moleküler hedefli ajanlar, monoklonal antikorlar, hormonlar, antimetabolitler gibi etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır (Nussbaumer, 2011). 5-Flourourasil, kemoterapide kolorektal kanserler başta olmak üzere çeşitli tümörlerin tedavisinde kullanılan bir urasil analogudur (Longley ve ark., 2003). Genellikle intravenöz bolus olarak ya da devamlı infüzyonlar halinde uygulanmaktadır. Devamlı infüzyonlar halinde verilmesi ile daha verimli sonuçlar görülmekte ve daha az toksik etki göstermektedir (Isanbor ve O'Hagan, 2006; Nussbaumer, 2011; Schöffski, 2004). Kanser tedavisinde kullanılan bu ajanın in vivo olarak üretilen aktif formu bahsedilen üridin 5'- fosfat formudur. 5- Florourasil (5-FU), hücre döngüsünün S fazını inhibe ederek DNA sentezi engelleyen ve hücre ölümünü tetikleyen, fluoropirimidin formda bir antimetabolit kemoterapi ilacıdır.

5-Flourourasil tek başına veya kemoterapötik ajanlarla birlikte olarak kolon, karaciğer, pankreas, yumurtalık, meme ve beyin gibi pek çok kanser türüne karşı yaygın olarak kullanılmaktadır (Longley ve ark., 2003). 5-FU, kolorektal kanser tedavisinin temel kemoterapi ajanıdır, ancak toplam sağkalım oranı kemoterapi alan kişilerde yaklaşık % 20 civarındadır. Bununla birlikte, 5-FU'nun tümöre karşı seçiciliği düşüktür ve terapötik dozda kullanıldığında özellikle kemik iliği, gastrointestinal sistem ve deri için oldukça toksik aktiviteye neden olur (Gusella ve ark., 2009).

Kanserin tüm evrelerinde çok hedefli olmaları, tedaviye destek olmaları, toksik etkiye sahip olmamaları, kolay kullanılabilir ve ulaşılabilir olmaları ile genellikle ilaçlarla sinerjik etki göstermeleri bakımından doğal terapötikler çok önemli yer tutmaktadır (Wani ve ark., 2016).

Yapılan bir çalışmada premetrexed disodium (MTA)'nın 5-Flourourasil ile kombinasyonunun HT29 hücre tümörlerini taşıyan atimik antitümör etkilerine ve minimal toksisiteye yol açtığı görülmüştür (Eric, 2002). Yine antibakteriyel, antioksidan ve antifungal etkileri bilinen *Pistacia eurycarpa* bitkisi ile 5-FU kombinasyonunun HT-29 Kolon kanser hücre hattındaki etkinliğinin incelendiği bir çalışmada HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerinin canlılığının azalması ve apoptoza yönelmesinde kombine kullanımın, 5-FU'nun tek başına uygulanmasına göre daha etkili olmuştur. Ayrıca, çalışmada kullanılan bitki ekstraktları tek başlarına uygulandıklarında, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücrelerinin canlılığı ve apoptoza yönelmesinde çok önemli etkilere sahip oldukları belirlenmiştir (Erdoğan ve ark., 2019).

Yine antioksidan ve antihelmintik aktivitesi olan bir izoflavon olan genistein ile 5-FU kombinasyonunun, HT-29 kolon kanser hücre hattı üzerindeki apoptotik aktivitesinin incelendiği bir araştırmada kolon kanserlerinde yeni bir kemoterapötik etki sergilediğini göstermektedir (Jin-Taek ve ark., 2005).

Bu yüzden, 5-FU ile birlikte bitkisel kaynaklı bileşenlerin kombinasyonu, toksisite ve yan etkilerin azaltılmasına ve sağkalımı arttırmaya katkıda bulunabilir (Erdoğan ve ark., 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. *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. Gümüş Nanopartiküllerin (Vv-AgNP) Sentezi

5mM Gümüş Nitrat Çözeltisi:

0,085 gr. AgNO₃ (Chembio) tartıldı ve 100 ml dH₂O'da çözündürüldü.

- Hazırlanan 5mM AgNO₃ çözeltisinden 95 ml alınarak 5 ml *Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği) ekstraktı ile karıştırıldı.
- Karışım mikrodalga fırında 1 dakika (1200 W, 50 Hz) kaynatıldı.

3.3. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

- Sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin UV-vis spektrumları Shimadzu UV-1801 UV-VIS spektrofotometre kullanılarak izlendi. AgNP solüsyonunun spektrumu 300-700 nm dalga boyu aralığında absorbans taraması yapıldı.
- Elde edilen AgNP'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.

3.4. 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) (PAN-biotech) besiyeri içinde monolayer kültürler olarak % 5 CO₂'lik atmosfer ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

3.4.1. 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 gümüş nanopartiküller (Vv-AgNP) ile artan dozlarda (0-20 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.

3.5. 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 1.25, 2.5, 5, 10 ve 20 µM Vv-AgNP'ler içeren besiyeri ile muamele edildi. İkinci bir deney seti olarak her test kuyucuğu Vv-AgNP'ler ile birlikte 200'er µM 5 Fluorourasil (5-FU)

ile muamele edildi. Her deney örneği 100'er µL/kuyucuk hacimde 3'lü tekrar olacak şekilde çalışılmış ve söz konusu test bileşikleri 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.

3.6. Western Blot Deneyi

Hücre Lizatlarının Hazırlanması: Petri kültür kaplarında 72 saat boyunca Vv-AgNP ve Vv-AgNP+5FU 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 kullanılabildiği kadar -80°C’de dondurucuda (Nüve 490) saklandı.

Protein Miktar Tayini: Elde edilen hücre lizatlarının protein miktarı hesaplaması Bradford (BioRad 500-0006) reaktifi 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 (ayırıştırıcı) ve kuyucukların olduğu stacking (yükleme) jelinden meydana gelmektedir. Resolving (ayırıştırıcı) jel (%10); 3,85 mL ddH₂O, 2,5 mL resolving (ayırıştırıcı) 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 jele 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 bloklandı. 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

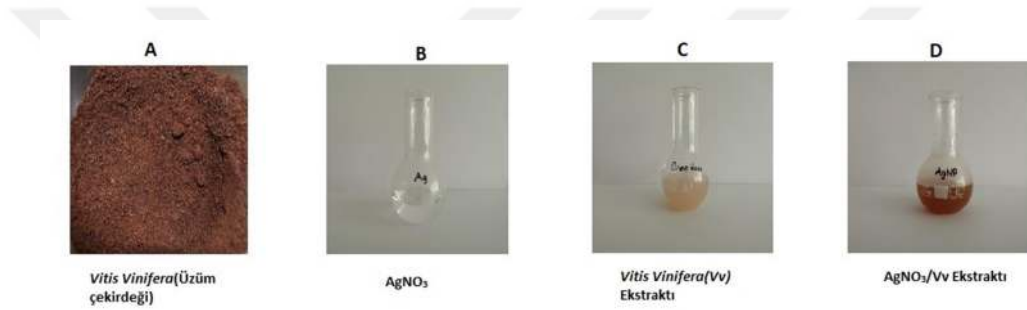
edildi. Film banyosundan sonra elde edilen imm nblotlama verileri tarayıcı yardımı ile dijital ortama fotoğrafları alındı. İmajlarda elde edilen sinyaller imageJ yazılımı (<https://imagej.nih.gov>) yardımı ile analiz edildi.



4. BULGULAR

4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi (Vv-AgNP)

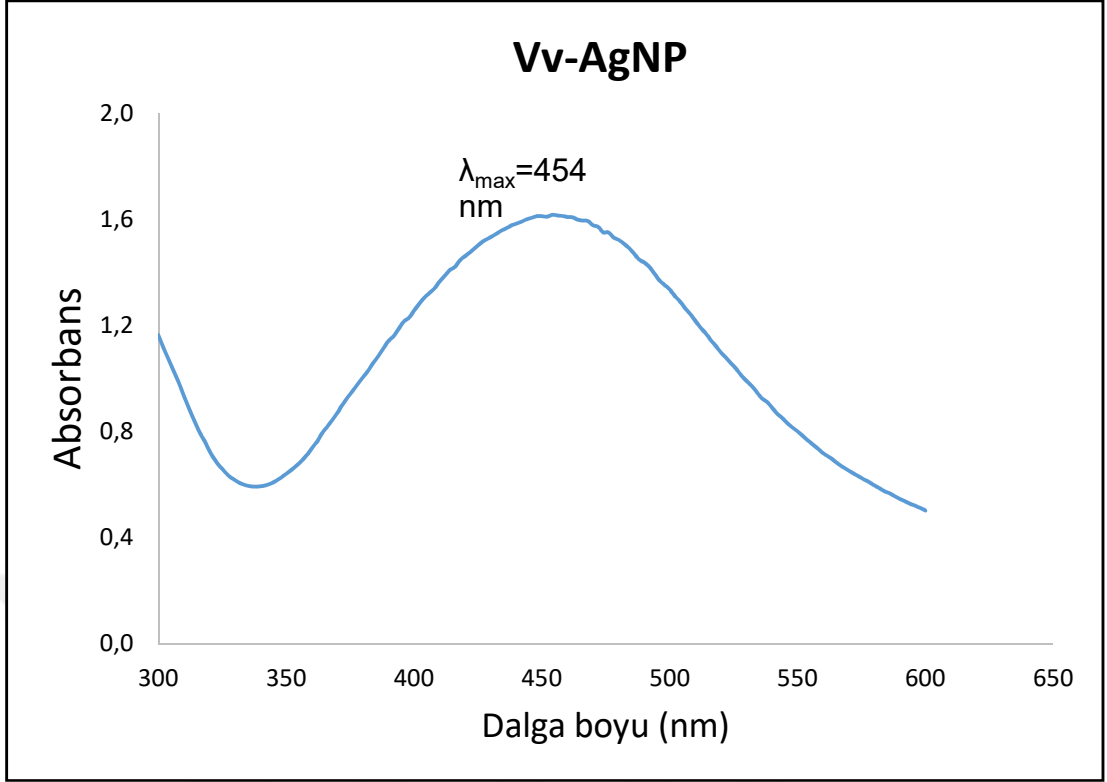
Gümüş nanopartiküller *Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği) sulu ekstraktı kullanılarak sentezlendi. Elde edilen üzüm çekirdeği ekstraktı açık pembe renkli, gümüş nitrat solüsyonu renksizdi. 5 mM gümüş nitrat solüsyonuna üzüm çekirdeği ekstraktının eklenmesi ve ısıtma işlemini takiben renk değişim süreci takip edildi. Gümüş nanopartiküllerinin oluşumunun bir göstergesi olan açık pembe renkten 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) H₂AuCl₄ çözeltisi, (C) H₂AuCl₄/*Vitis vinifera* ekstraktı, (D) AgNO₃/*Vitis vinifera* Ekstraktı.

4.2. UV VIS Spektrofotometre ile Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

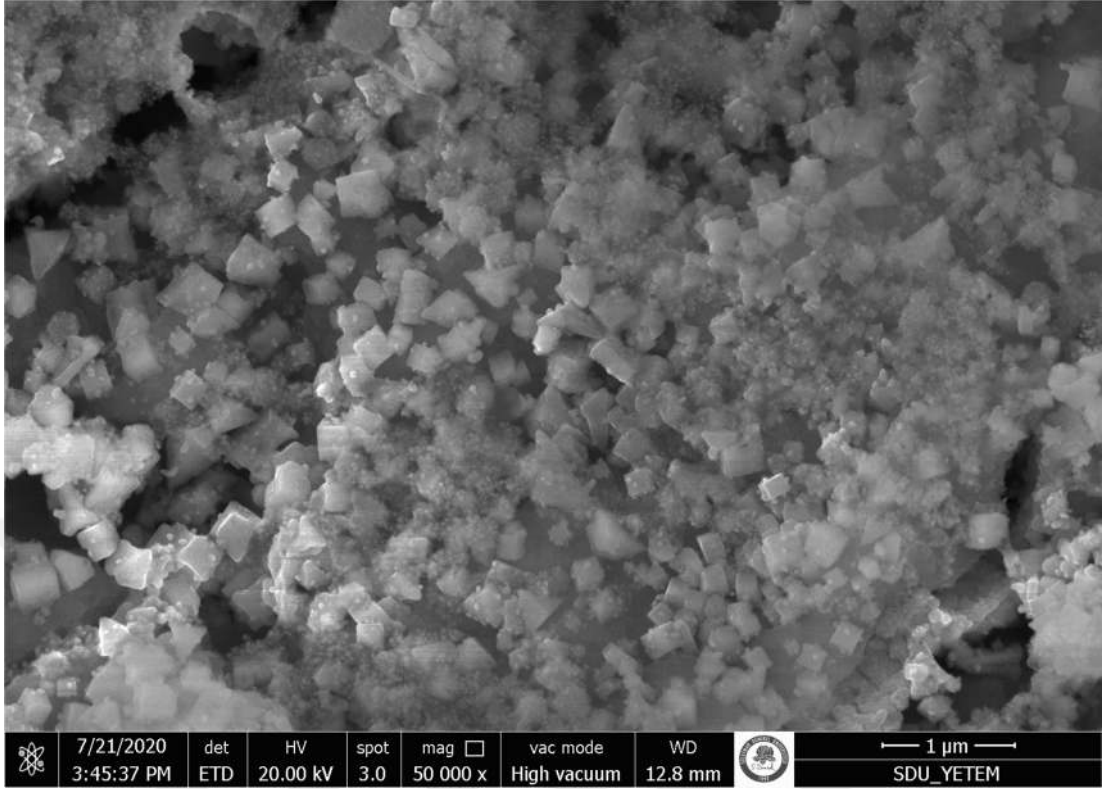
Hazırlanan AgNP'lerin 300-700 nanometre aralığında absorpsiyon taraması, UV visible spektrofotometre kullanılarak değerlendirildi. UV vis ölçümlerine göre gümüş nanopartiküllerin 400-500 nanometre dalga boyu aralığında pik vermesi beklenmektedir. *Vitis vinifera* ekstraktı kullanılarak hazırlanan AgNP'ler için 454 nm'de güçlü bir absorpsiyon piki gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) UV-vis absorbans ile karakterizasyonu.

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

Vitis vinifera ekstraktı ile biyosentezi gerçekleştirilen gümüş nanopartiküllerin boyut ve yüzey morfolojisinin görüntülenebilmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analizi gerçekleştirildi. Yapılan görüntüleme sonucunda Vv-AgNP'lerin genellikle kübik bir morfolojiye sahip ve 100 nm'den daha küçük boyutlarda olduğu belirlendi (Şekil 4.3).



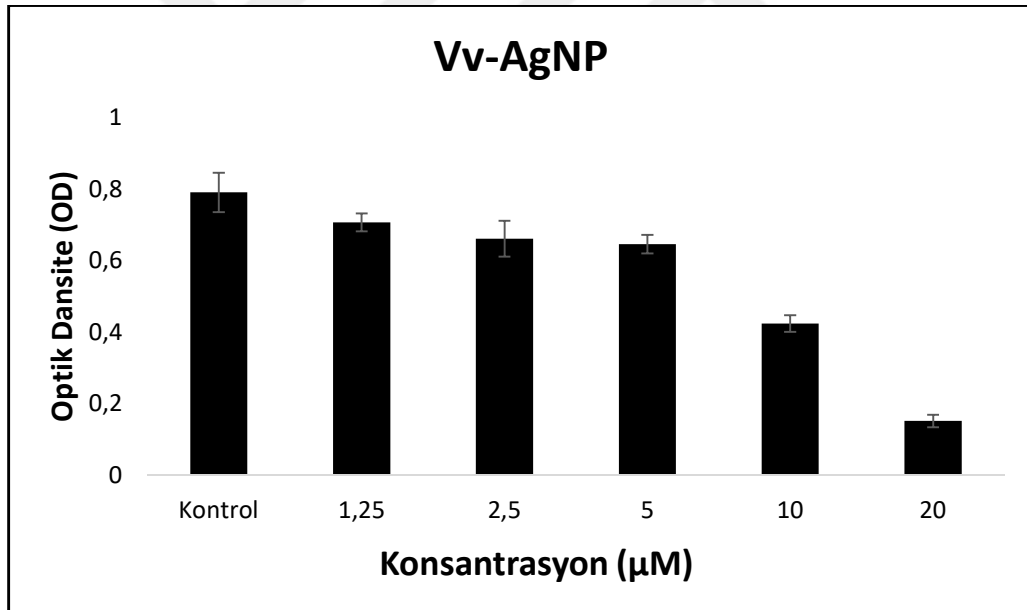
Şekil 4.3 *Vitis vinifera* ile sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) SEM görüntüsü

4.4. HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinde Gümüş Nanopartiküllerin (Vv-AgNP) ve 5 Florourasil ile Birlikte Kullanımının Doza Bağımlı Sitotoksik Etkisi

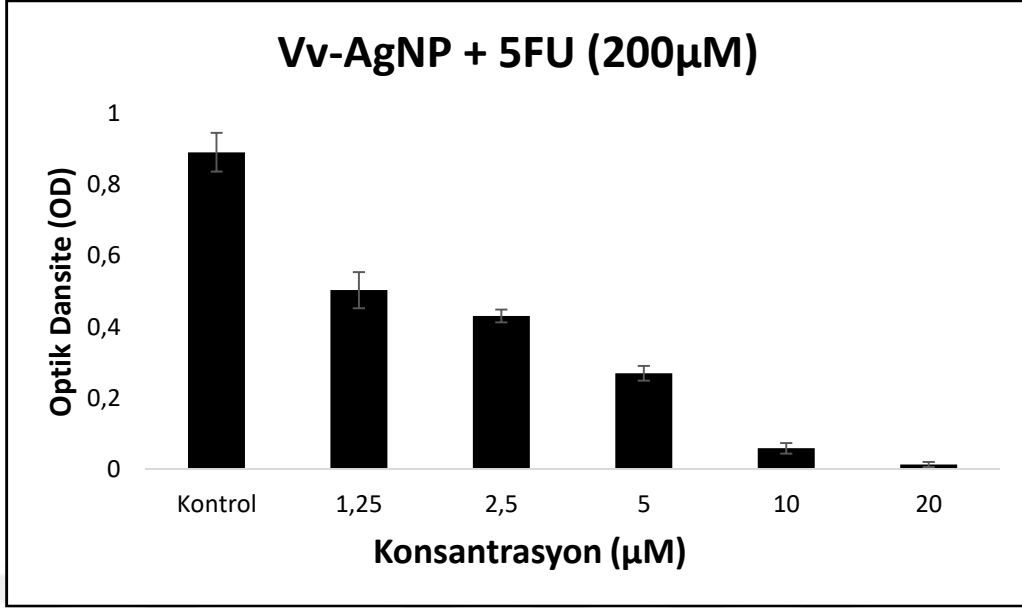
Çalışmamızda, *Vitis vinifera* ile sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) farklı konsantrasyonlarda insan kolon kanseri hücre hattı HT-29 hücreleri üzerinde in vitro sitotoksitesi BrdU hücre proliferasyon testi ile değerlendirildi. HT-29 kolon kanseri hücreleri farklı konsantrasyonlarda (0-20µg/mL) hazırlanmış Vv-AgNP'lerle ve 200 µg/ml sabit dozda 5 Florourasil (5-FU) ile birlikte 72 saat boyunca muamele edildi. Vv-AgNP ile muamele edilmemiş HT-29 hücreleri kontrol grubu olarak kabul edildi. Sonuçlar, üç bağımsız deneyin ortalama±standart sapması olarak ifade edildi.

Kontrol hücrelere göre muamele edilen hücrelerin canlılık oranlarının istatistiksel anlamlılığı, Student t-testi kullanılarak belirlendi (* $p < 0,05$).

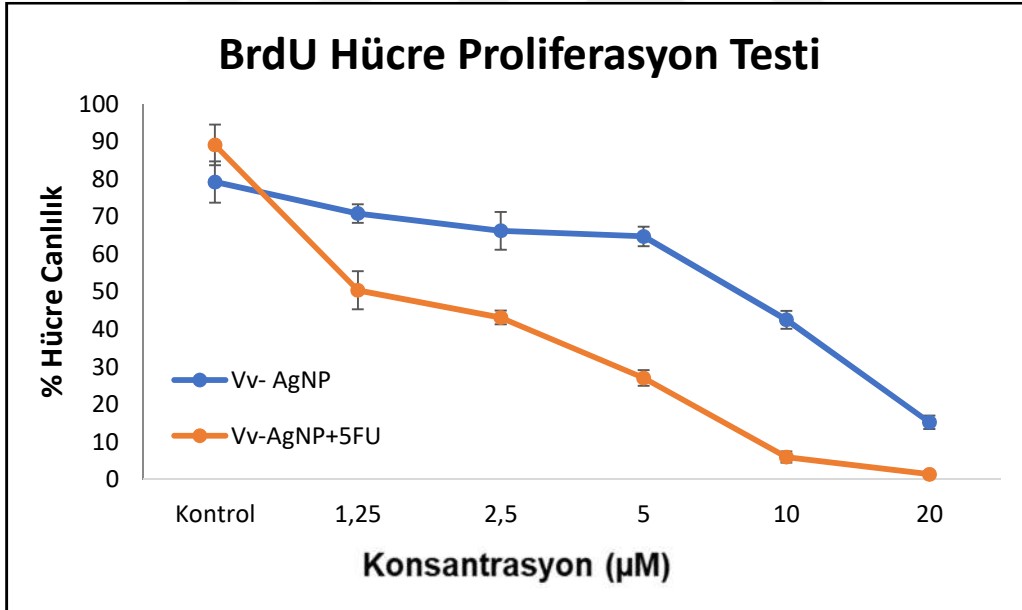
Çalışmadan elde etmiş olduğumuz sonuçlar kontrole göre Vv-AgNP'lerin HT-29 hücrelerinde doza bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığını gösterdi. İnkübasyonun 72. saatinde Vv-AgNP'lerin 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda hücre canlılığında %50'den fazla azalma görüldü. 10 $\mu\text{g/ml}$ dozunda görülen bu azalma kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.000$) (Şekil 4.4). Kontrole göre 200 $\mu\text{g/ml}$ sabit dozda 5-FU ile birlikte Vv-AgNP'lerin artan dozlarda kullanımında, 1.25 $\mu\text{g/ml}$ dozda Vv-AgNP uygulandığında hücre canlılığında %50'den fazla azalma görüldü. 1.25 $\mu\text{g/ml}$ dozda görülen hücre canlılığındaki bu azalma kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$) (Şekil 4.5). Vv-AgNP'ler 5-FU ile birlikte kullanıldığında hücre canlılığı üzerine kombine etkiye artış görüldü.



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



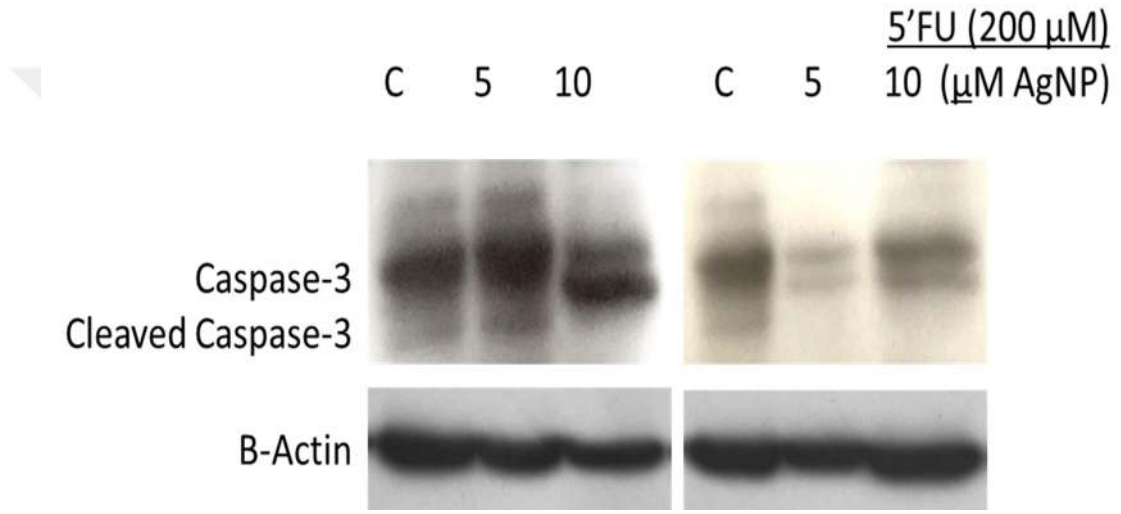
Şekil 4.5 HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinin hücre canlılığı üzerine gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) 5 Florourasil ile birlikte kullanımının doza bağımlı sitotoksik etkisi.



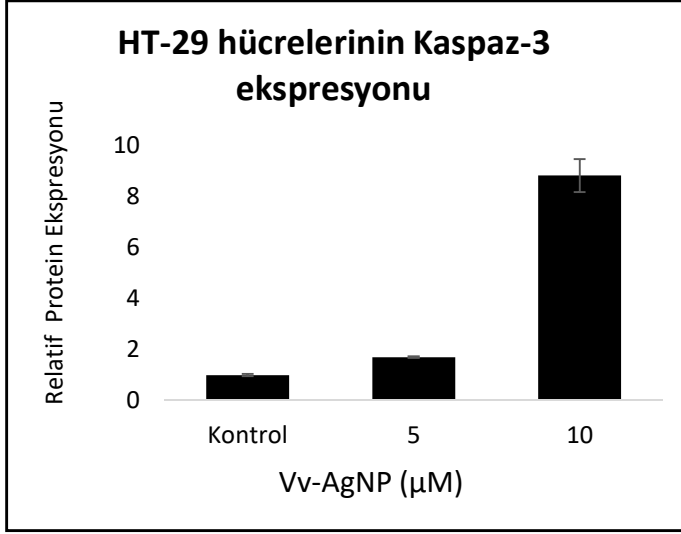
Şekil 4.6 HT-29 kolon kanseri hücrelerinde gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) tek başına ve 5 Florourasil ile kombibe uygulamalarının hücre canlılığı üzerine etkilerinin karşılaştırılması

4.5 HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinde Gümüş Nanopartiküllerin (Vv-AgNP) ve 5 Florourasil ile Birlikte Kullanımının Apoptotik Etkisi

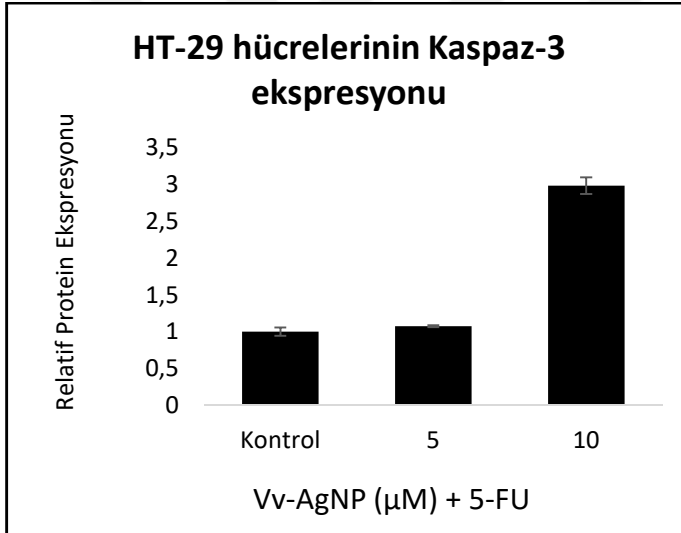
Apoptoz ilişkili protein seviyelerinin belirlenmesi için yapılan Western blot deneyinde kaspaz-3 proteini için şekil 4.7’deki jel görüntüleri elde edilmiştir. Protein seviyesinin karşılaştırılması için referans olarak β -aktin kullanılmıştır. Artan Vv-AgNP dozlarına bağlı kaspaz-3 aktivasyonunun kontrole kıyasla arttığı, 5 Florourasil 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-AgNP’in Kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi



Şekil 4.9 Vv-AgNP ve 5 Florourasil (5-FU) kombine kullanımının Kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi

5. TARTIŞMA

Nanoteknoloji terimini, atom ve moleküllerin bir araya getirilmesi ile nanometre ölçeklerde işlevsel yapıların oluşturulması şeklinde özetleyebiliriz. İnsan saç telinin kalınlığının yaklaşık olarak 100.000 nanometre olduğu ve kullanılabilir bir nanoyapının büyüklüğünün ise 1-100 nanometre olduğu dikkate alınırsa nanoteknolojinin uğraş alanının atomlar ve moleküller düzeyinde olduğu net bir şekilde görülür (Albrecht ve ark., 2006).

Nanoteknolojinin uğraş alanı oldukça geniştir ve zamanla genişlemektedir. Günümüzde fizik, kimya, biyoloji, bilgisayar, malzeme bilimi, elektronik gibi alanlarda kullanımının yanında, başta ilaç taşıma, biyoçipler, implantlar, antimikrobiyoller, yerel tanı ve teşhis yöntemleri gibi çalışmaların yer aldığı tıp alanında da oldukça çarpıcı gelişmelere imkan sağlamaya başlamıştır (Kırca ve Menceloğlu, 2008; Bayındır, 2005).

Son yıllarda ise farklı kanser türlerinde hücre hattı uygulamalarının nanoteknoloji alanı ile birleşmesini takiben tümör hücrelerini öldüren, sağlıklı (normal) hücrelere hasar vermeyen nanopartiküllerle üretilen yeni nesil ilaçlarla hedefe yönelik kanser tedavilerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak boyutu 100 nanometre (nm) altında olan gümüş ve altın gibi bazı nanopartiküller, enzimler, reseptörler ve antikorlar gibi büyük biyolojik moleküllerle kıyaslandığında hem hücrelerin yüzeyinde hem de hücre içlerinde biyomoleküllerle ender görülen etkileşimler sunarak kanser teşhisinde ve tedavisinde devrim yaratabileceği düşünülmektedir (Cai ve ark., 2008; Dağlıoğlu ve ark., 2018).

Vitis vinifera (Üzüm) bitkisi içerdiği birçok fenolik bileşik, stilbenoidler, antosiyaninler ile resveratrol gibi fitoaleksinleri barındırması ile birtakım farmakolojik aktivitelere sahiptir. Yapılan çalışmalarda, *Vitis vinifera* ekstraktının, antioksidan ve serbest radikal temizleme aktivitesi (Jayaprakasha ve ark., 2003), bireysel bileşen epigallocatechin, prosiyanidinler ve bunların birleşmesine kıyasla büyüme inhibisyonunda daha güçlü olduğu (Dinicola ve ark., 2016) ve yüksek konsantrasyonda bulunan resveratrol konsantrasyonunun (75-100 μ M), HT-29 ve

SW-480 insan kolon kanseri hücre hatlarında p53 aktivasyonu yoluyla hücre proliferasyonunu baskıladığını ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Vanamala ve ark., 2010).

Gümüş nanopartiküller, hücre zarından kolaylıkla geçebilmeleri sayesinde antibakteriyel, antivirüs, antifungal ve antimikrobik özellikler taşıdıkları için tıp alanında önemli bir yere sahiptir (Rai ve ark., 2009). Gümüş nanopartiküller, gerek taşıdığı antibakteriyel özelliklerinin bakterilerin zamanla antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirebildikleri direnci gümüşe karşı geliştiremiyor oluşu nedeniyle, gerekse benzersiz fiziksel, kimyasal ve biyolojik niteliklerinden dolayı uzun yıllardır bilim insanlarının ilgi alanına girmektedir (Altuner, 2014; Chen ve Schluesener., 2008).

Gümüş nanopartiküllerin sentezi için birbirinden farklı birçok yöntem bulunmakta ve bu yöntemler zamanla daha da çeşitlenmektedir. Kimyasal ve fiziksel sentez metodları hem pahalı oluşları hem de tehlikeli kimyasallar ile birlikte kullanılmalarından dolayı dezavantajlar içermektedir (Bhat ve ark., 2015). Gümüş nanopartiküllerin biyolojik sentezinde ise bitkiler, algler, mantarlar, mayalar ve bakteriler gibi doğal kaynaklar kullanılmaktadır. Biyolojik (yeşil) sentez, gerek maliyetlerinin düşüklüğü gerekse çevre dostu olması gibi avantajları nedeniyle daha fazla tercih edilen güvenli bir sentez yöntemidir (Latha ve ark., 2018). Ayrıca biyolojik sentez ile elde edilen gümüş nanopartiküllerin taşıdığı biouyum özelliği ile canlı uygulamalar için önemli bir nitelik taşımaktadır (Rajan ve ark., 2015).

Son yıllarda yeşil sentez gümüş nanopartiküller ile ilgili antimikrobiyal, antifungal, antibakteriyel ve antiviral etkileri üzerinde yapılan çalışmalar yanında, sitotoksik ve apoptotik etkisi ile ilgili çalışmalar da yapılmaya başlamıştır.

Yapmış olduğumuz çalışmada, *Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği) sulu ekstraktı kullanılarak biyosentezi gerçekleştirilen gümüş nanopartiküller ve 5-Flourourasil ile kombine kullanılmasının insan kolon kanseri hücre hattı HT-29 üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisi ilk kez değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda; gümüş nanopartiküller *Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği) sulu ekstraktı kullanılarak sentezlendi. Elde edilen üzüm çekirdeği ekstraktı açık pembe renkli, gümüş nitrat solüsyonu renksizdi. 5 mM gümüş nitrat solüsyonuna üzüm çekirdeği ekstraktının eklenmesi ve ısıtma işlemini takiben renk değişim süreci takip edildi. Gümüş nanopartiküllerinin oluşumunun bir göstergesi olan açık pembe renkten kahverengiye doğru oluşan renk değişimi gözlemlendi. Gümüş nanopartiküllerin oluştuğunun göstergesi olan renk değişimi yapılan benzer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (Geethalakshmi ve Sarada 2010; Al-ogaidi ve ark., 2017).

Yapmış olduğumuz çalışmada hazırlanan Vv-AgNP'lerin 300-700 nanometre aralığında absorpsiyonları, UV visible spektrofotometre (UV-vis) kullanılarak değerlendirildi. UV-vis ölçümlerine göre gümüş nanopartiküllerin 400-500 nanometre dalga boyu aralığında pik vermesi beklenmektedir. Üzüm çekirdeği ekstraktı kullanılarak hazırlanan AgNP'ler için 454 nm'de güçlü bir absorbans piki gözlemlendi. Biyosentez metodu uygulanan farklı gümüş nanopartikül çalışmalarının UV-vis analizinde gümüş nanopartiküllerin 454 nm dalga boyunda güçlü bir pik verdiği görülmüştür (Wang ve ark., 2017). Curcuma Longa (Zerdeçal) bitki özütü kullanılarak AgNP biyosentezinin yapıldığı bir çalışmada ise UV-vis analizinde gümüş nanopartiküllerin maksimum 435 nm dalga boyunda olduğu bildirilmiştir (Alsammarrhaie ve ark., 2018). Fıstık (*Pistacia vera* L.) yaprağından AgNP biyosentezi yapılan diğer bir çalışmada ise UV-vis analiz sonucuna göre AgNP'lerin maksimum 460.67 nm'de belirgin plazma rezonansı bildirilmiştir (Eren ve Baran, 2019).

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi, sentezlenen nanopartiküllerin büyüklüğü ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan bir analiz yöntemidir (Eren ve Baran, 2019). Çalışmamızda üzüm çekirdeği ekstraktı ile biyosentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin boyut ve yüzey morfolojisinin görüntülenebilmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analizi gerçekleştirildi. Yapılan görüntüleme sonucunda Vv-AgNP'lerin genellikle kübik bir morfolojiye sahip ve 100 nm'den daha küçük boyutlarda olduğu belirlendi. Bitki ekstraktları ile elde edilen AgNP'lerin yer aldığı ve UV, XRD, SEM ve EDX analizlerinin kullanıldığı bir çalışmada AgNP'lerin küresel, altıgen, düzensiz

şekillerde olduğu ve 10 ile 90 nm boyutlar arasında değiştiği belirtilmiştir (Singh ve ark., 2015). *Justicia spicigera* bitki özütünden elde edilen biyosentez AgNP'lerin yer aldığı diğer bir çalışmada ise, SEM analizine göre elde edilen AgNP'lerin küresel morfolojiye ve 86 ile 100 nm arasında bir partikül boyutuna sahip olduğu gözlenmiştir (Mazariegos ve ark., 2019). SEM verilerine göre kullandığımız nanomalzemelerin kübik morfolojide ve 100 nm'nin altında bulunması, benzer çalışmaların sonuçlarıyla uyum göstermektedir.

Çalışmamızda, *Vitis vinifera* ile sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) farklı konsantrasyonlarda insan kolon kanseri hücre hattı HT-29 hücreleri üzerinde in vitro sitotoksitesi BrdU hücre proliferasyon testi ile değerlendirildi. Elde etmiş olduğumuz sonuçlar kontrole göre Vv-AgNP'lerin HT-29 hücrelerinde doza bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığını gösterdi. İnkübasyonun 72. saatinde Vv-AgNP'lerin 10 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığında %50'den fazla azalma görüldü. Kontrole göre 200 µg/ml sabit dozda 5-FU ile birlikte Vv-AgNP'lerin artan dozlarda kullanımında, 1.25 µg/ml dozda Vv-AgNP uygulandığında hücre canlılığında %50'den fazla azalma görüldü. Vv-AgNP'ler 5-FU ile birlikte kullanıldığında hücre canlılığı üzerine kombine etkide artış görüldü.

Gümüş nanopartiküllerinin apoptotik ve sitotoksik etkilerine ilişkin literatür değerlendirildiğinde; *Acanthopanax sessiliflorus* bitki özütlerinden biyosentez ile elde edilen AgNP'lerin kullanıldığı ve UV-vis, SEM ve XRD analizleri ile karakterizasyonunun yapıldığı bir çalışmanın, in vitro MTT sitotoksik analiz sonucunda, AgNP'lerin (10–100 µg/ml) artan konsantrasyonlarda insan keratinositlerinde doza bağlı toksisitesini ortaya çıkardığı bulunmuştur (Sapkota ve ark., 2017). Gümüş nanopartiküllerin insan hepatocellular karsinoma (HepG-2) hücre hattı üzerinde apoptotik ve sitotoksik etkilerinin incelendiği diğer bir araştırmada ise, AgNP'lerin HePG-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile değerlendirilmiş ve AgNP'ler, HePG-2 hücrelerinin büyümesini doza bağımlı bir şekilde önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur. Bununla birlikte, sub-G1 apoptotik hücre popülasyonu, doza bağımlı bir şekilde önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (Zhu ve ark., 2016). Biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis* ve insan akciğeri (L132) ve akciğer karsinomu (A549)

hücrelerinde çok boyutlu etkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, doza bağlı şekilde özellikle memeli hücrelerinde apoptoza neden olduğu ve AgNP'lerin, H. pylori ve H. felis'e karşı anti-bakteriyel ve anti-biyofilm aktivitesi gibi çok boyutlu etkiler ile birlikte ayrıca insan kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Sangiliyandi ve ark., 2015).

Gümüş nanopartiküllerin de dahil olduğu ve çeşitli nanopartiküllerin in vitro sitotoksitesini MTT testi kullanılarak değerlendirilen başka bir çalışmada, bir sıçan karaciğerinden türetilmiş hücre hattı üzerinde (BRL 3A), AgNP'lere maruz kaldıktan 24 saat sonra apoptotik etkisini, mitokondriyal fonksiyon ve membran bütünlüğünü (LDH sızıntısı baz alarak  l  lm   t r)  nemli ölçüde azaltarak sağladığı bulunmuştur. Ayrıca apoptotik ve sitotoksik etkinin AgNP dozuna bağlı olduğu g r lm   t r. SEM analizi sonucu ise, tüm nanopartiküllerin hücrede birikmediğini, ancak bazılarının membranlarla ilişkili kaldığını gösterdi. Test edilen diğer tüm nanopartiküllerin (Fe₃O₄, Al, MoO₃, MnO₂) AgNP'ye göre daha az sitotoksik etki gösterdiği görüldü. (Hussain ve ark., 2005). Yine biyosentez AgNP'lerin kullanıldığı diğer bir çalışmada , spermatogonial kök hücre özelliklerine sahip bir fare hücre hattı üzerindeki etkileri incelendiğinde de konsantrasyona bağlı benzer bir sitotoksikite gözlenmiştir (Braydich-Stolle ve ark., 2005). Gümüş nanopartiküllerin, Fare karaciğer birincil hücre kültürü ve insan karaciğer karsinom hücre hattında (HepG-2) sitotoksik etkilerinin MTT testi ile incelendiği başka bir çalışma sonuçları ise; AgNP'lerin normal hücelere (farelerin birincil karaciğer hücreleri) kıyasla kanserli hücrelerin (HepG2 hücre hattı) büyümesi üzerinde 44 kat daha güçlü inhibe edici etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir (Firouz ve ark., 2014).

Çalışmamızda BrdU hücre proliferasyon deney yöntemiyle; HT-29 kolon kanseri hücrelerinin hücre canlılığı üzerine gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) ve gümüş nanopartiküllerin (Vv-AgNP) 5-Flourourasil ile kombibe kullanımının doza bağımlı sitotoksik etkisinin varlığı ortaya konulmuştur.

5-Flourourasil (5-FU) geniş spektrumlu etkili bir kanser ilacıdır. 5-FU, kolorektal kanser tedavisinin temel kemoterapi ajanıdır, ancak toplam sağkalım oranı kemoterapi alan kişilerde yaklaşık % 20 civarındadır. Bununla birlikte, 5-FU hızlı bir

şekilde emilerek kan kapillerlerinden sistemik dolaşıma geçer. Bu durum sistemik toksisite riskini artırırken hedef alandaki etkinlik kaybına sebep olur ve terapötik dozda kullanıldığında özellikle kemik iliği, gastrointestinal sistem ve deri için oldukça toksik aktiviteye neden olur (Gusella ve ark., 2009). Bu etkileri nedeniyle klinik kullanımı kısıtlanmaktadır.

Kemoterapötik ajanın kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini iyileştirmek için ön ilaç olarak modifiye edilerek kullanımı, çeşitli nanotransportlara yükleyerek kullanımı, nanopartiküllerle kombine kullanımı ve nanopartiküllerle kapsüllenerek kullanımı şeklinde çeşitli araştırmalar sürmektedir. 5-FU'nun diğer güçlü antikanser ajanlar ile kombinasyon halinde tümör hedefli dağıtımı için polimerik nanopartiküllerin kullanılması, 5-FU'nun terapötik etkinliğini artırmak için önemli bir strateji olarak kabul edilmektedir (Samira ve ark., 2020). Ayrıca, 5-FU ile birlikte bitkisel kaynaklı bileşenlerin kombinasyonu, toksisite ve yan etkilerin azaltılmasına ve sağkalımı arttırmaya katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Erdoğan ve ark., 2019).

Yapılan bir çalışmada, 5-FU, biyoyararlanımı ve biyoatılımı oldukça düşük olan Chrysin (5.7-Hidroksiflavon) ile birlikte, poly(laktik-ko-glikolitik asit) (PLGA) ve polietilen glikol (PEG) maddelerinin nanopartikülleri ile kombine şekilde in vitro olarak verilmiştir. HT-29 insan kolon kanseri hücre hattında ve MTT testi kullanılarak 5-FU'nun nanopartiküllerle birlikte kullanımının etkisi incelenmiş ve sonuçlar Chrysin ve 5-FU'nun kanser hücrelerine birlikte verilmesi için kullanılan PLGA-PEG-PLGA nanopartiküllerinin kanser tedavisinde etkiyi kayda değer şekilde arttıracacağı ortaya konulmuştur (Samira ve ark., 2020).

Başka bir çalışmada ise, 5-FU gümüş nanopartiküllerle kapsüllenerek uygulanmış, hemotoksik, sitotoksik etkileri ile birlikte SKOV-3, MDA-MB-435 ve A-549 hücre hatları üzerinde MTT deneyi ile de kanser hücrelerine olan etkileri incelenmiştir. Sonuçlara göre 5-FU moleküllerinin AgNP'lerde kapsüllemesi, ilacın salımını artırmış, hemolitik toksisitede önemli bir azalma görülmüş, açık bir şekilde doza bağımlı bir sitotoksisite ile hücresel canlılığın azaldığı rapor edilmiştir (Gang ve Gang, 2017). Bu çalışmalar, bizim çalışmamızla paralel bir şekilde kanser

tedavilerinde, ilaç-nanopartikül kombinasyon bazlı tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin faydalı olacağını desteklemektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda, HT-29 hücrelerinde Gümüş Nanopartiküllerin (Vv-AgNP) ve 5-FU birlikte kullanımının apoptotik etkisi araştırılmıştır. Artan Vv-AgNP dozlarına bağlı kaspaz-3 aktivasyonunun arttığı, 5-FU ile kombine kullanımın apoptotik etkinliği güçlendirdiği gözlenmiştir. Gümüş nanopartiküller kullanılarak yapılan bir çalışmada, kaspaz proteinin apoptotik etkiyi indükleyebildiği ortaya konulmuştur (Khan ve ark., 2017). Nanopartikül kullanılarak yapılan başka bir çalışmada artan kaspaz 3 ve azalmış hücre proliferasyonu ile hücre apoptozunu indükleyebildiği ortaya konulmuştur (Huang ve ark., 2015). Tiroid kanseri SW579 hücreleri üzerine SHP2-hedefli nanopartiküllerin sitotoksik ve apoptotik etkilerinin incelendiği bir çalışmada hedeflenen nanopartiküllerin tek başına hücre büyümesi ve apoptoz üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı, apoptotik etkinin doksorubisin kullanımı ile BAX ve kaspaz-3 ekspresyonunun anlamlı dercede arttırıldığı anlaşılmıştır (Hu ve ark., 2019). Bu doğrultuda yapmış olduğumuz çalışmanın diğer çalışmalar ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kolon kanserleri, gerek dünyada her yıl yaklaşık olarak 1 milyon üzerinde yeni vaka teşhisiyle gerek yıllık 500.000 ölümle sonuçlanan vaka sayısı ile gerekse görülen tüm kanser türleri içindeki %10-15'e dayanan oranlarıyla oldukça ciddi bir kanser türüdür. 5-Florourasil (5-FU), geniş spektrumlu ve birçok kanser türüne karşı etkisi olduğu bilinen sitotoksik bir ajandır. Bununla birlikte, 5-FU kan kapillerlerinden kolaylıkla emilerek sistemik dolaşıma geçer ve bu durum sistemik toksisite riskini artırırken hedef alandaki etkinlik kaybına sebep olmaktadır. İn vivo olarak verimsiz uygulanması ve sistemik toksisitesi 5-FU'nun klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Benzer nedenlerle kanser tedavisinde var olan tedavi seçenekleri tatmin edici bulunmamakta olup alternatif yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Nanoteknolojinin kullanımı ile birlikte biyouyumlu antikanser ajanların geliştirilmesi kanser tedavisi alanındaki yeni yaklaşımlardan birini oluşturmaktadır. Bizde son zamanlarda adını oldukça sık duyduğumuz yeşil sentez gümüş nanopartiküllere çalışmamızda yer verdik.

Çalışmamızda, *Vitis vinifera* (üzüm çekirdeği) ekstraktı kullanılarak gümüş nanopartiküllerin biyosentezi gerçekleştirildi. Bu sayede gümüş 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 AgNP'lerin konsantrasyona bağlı olarak hücre büyümesini inhibe ettiğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, gümüş nanopartiküller bu çalışmada üzüm çekirdeği ekstraktı kullanılarak başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Biyosentezlenen gümüş nanopartiküllerin HT-29 kolon kanseri hücrelerine karşı 5-Florourasil ile birlikte kullanılmasının sitotoksik ve apoptotik etkiler sergilediği gösterilmiştir. Bu bulgulara dayanarak biyosentezlenmiş gümüş nanopartiküllerinin insan kolon kanseri tedavisi için umut vaat edici yeni bir terapötik ajan olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca sitotoksik ve apoptotik ajan olarak kullanılan AgNP'lerin partikül büyüklüğü ve çözelti dozunun bu etkileri üzerinde artırıcı veya azaltıcı ilişkilerinin tespiti için de daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızın 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

- Adi YB, Rachel AM, Maia YW (2017).** The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials, *npj Precision Oncology*, **1**, 35.
- Ahmad N, Sharma S (2012).** Green synthesis of silver nanoparticles using extracts of *Ananas comosus*. *Green and Sustainable Chemistry*, **2**(4), 141-147.
- Al-ogaidi I, Salman MI, Mohammad, FI, Aguilar Z, Al-ogaidi M, Hadi YA, Al-rhman ve RMA (2017).** Antibacterial and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles Synthesized in Green and Black Tea, **5** (1), 39–45.
- Albayrak A, Gürsan N, Gündoğdu C (2014).** Kolorektal kanserlerde c-erbB-2 ve p53 ekspresyonunun prognostik önemi, *J Clin Exp Invest*, **5**.
- Albrecht MA, Evan CW, Raston CR (2006).** Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chemistry*, **8**, 417-32.
- Alsammarraie FK, Wang W, Zhou P, Mustapha A, Lin M (2018).** Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and investigation of their antibacterial activities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **171**, 398- 405.
- Altuner EE (2014).** Nano Kremlerin Üretimi. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, **4**(1), 52-57.
- American Cancer Society (2018).** Colorectal Cancer Signs and Symptoms. *American Cancer Society*. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-and-symptoms.html> (Erişim Tarihi: 14.03.2020).
- Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB (2008).** Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*. **25** (9), 2097–116.
- Anonim (2017).** Kolon Kanseri Nedir? Kolon Kanseri Belirtileri ve Tedavi Yöntemleri Nelerdir?. *Memorial*, <https://www.memorial.com.tr/saglik-rehberleri/kolon-kanseri>. (Erişim Tarihi: 30 Nisan 2020).
- Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Bagchi DJ, Balmoori J, Stohs SJ (1998).** Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice, *Gen Pharmacol.*, **30**(5), 771-6.
- Bar H, Bhui DK, Sahoo GP, Sarkar P, De S., Misra A, (2009).** Green synthesis of Silver Nanoparticles Using Latex Of *Jatropha curcas*. *Colloids Surfaces A. Physicochem. Eng. Aspects*, **339**, 134-139.
- Batista CA, Silvera L, Ronald G, Kotov NA (2015).** Nonadditivity of nanoparticle interactions. *Science*. **350**, 6257.

Baur JA et al. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, **444**, 337-342.

Bayındır M (2005). Nanoteknoloji destekli akıllı elbiseler. *Bilim ve Teknik*, **453**, 11-12.

Bayram D (2017). Silibinin'in Vitro Ortamda CCL-228-SW 480 Kolon Kanseri Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkisinin Araştırılması. *SdÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **2**, 1-7.

Beutler JA (2009). Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol*. **9**, 1-9.

Beykaya M, Çağlar A (2016). Bitkisel Özütlere Kullanılarak Gümüş-Nanopartikül (AgNP) Sentezlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma. *Aku J. Sci. Eng.*, **16**, 631-641.

Bhat MA, Nayak BK, Nanda (2015). Evaluation of Bactericidal Activity of Biologically Synthesised Silver Nanoparticles from *Candida albicans* in Combination with Ciprofloxacin, *Mater. Today Proc.*, **2(9)**, 4395–4401.

Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC (2005). In-vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci.*, **88**: 412-419.

Cai W, Gao T, Hong H, Sun J (2008). Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl.*, **1(1)**, 17-32.

Chen X, Schluesener HJ (2008). Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett.* **176(1)**, 12.

Cohen E (1999). Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *J Cell Sci*, **112** (16), 2657-66.

Cragg GM, Newman DJ (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*, **1830**, 3670–3695.

Çetin NR, Şahin B (2020). Türkiye’de Kolon ve Rektum Kanseri Tedavi Maliyetinin Yukarıdan Aşağı Maliyet Yaklaşımı ile Belirlenmesi. *Sosyal Güvenlik Dergisi*, **16**, 140-141.

Çıracı S (2004). *Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri*. 1, Ankara: Tübitak, s: 5-6.

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

Dinicola S, Cucina A, Pasqualato A, D'Anselmi F, Proietti S, Lisi E, Pasqua G, Antonacci D, Bizzarri M (2012). Antiproliferative and apoptotic effects triggered

by grape seed extract (GSE) versus epigallocatechin and procyanidins on colon cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, **13** (1), 651–664.

Diyarbakırhoğlu C, Gürsu RU, Müderrisoğlu C, Polat H, Ulaş N, Gür C (2014). Kolon Kanserli Hastaların Demografik Özellikleri ve Tedavi Yanıtı. *İstanbul Med J*, **15**, 199-202.

Duncan TV, (2011). Applications Of Nanotechnology In Food Packaging And Food Safety: Barrier Materials, Antimicrobials And Sensors. *J Colloid Interface Sci*, **363**(1): 1-24.

Erdoğan MK, Ağca CA, Aşkın H (2019). Enhanced antiproliferative and apoptotic effects of 5-fluorouracil by combined with Pistacia eurycarpa Extracts on human colorectal cancer cells. *Biological Diversity and Conservation*, **12** (1),27-38.

Eren A, Baran MF (2019). Green Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles (AgNPs) From Maize (Zea Mays L.), *Applied Ecology And Environmental Research*, **17**(2), 4097-4105.

Eren A, Baran MF (2019). Fıstık (Pistacia vera L.) Yaprağından Gümüş Nanopartikül (AgNP)’lerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi. *Turk J Agric Res*, **6**(2), 165-173.

Eric R, Et all (2002). Pemetrexed disodium combined with oxaliplatin, SN38, or 5-fluorouracil, based on the quantitation of drug interactions in human HT29 colon cancer cells. *International Journal of Oncology*, **21**, 361-367.

Feynman RP (1960). There's plenty of room at the bottom, *Engineering and science*, **23**: 22-36.

Firouz F, Farshad HS, Amir-Ahmad S, Hamidreza AA, Hossein R (2014). Toxicity Effect of Silver Nanoparticles on Mice Liver Primary Cell Culture and HepG2 Cell Line, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* , **13** (1): 235-242.

Garg S and Garg A (2017). 5-FLuorouracil Encapsulated Silver Nanoparticle For Effective. *International Journal of Current Research*, **9**(06), 53269-53273.

Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MMQ (2014). Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int J Nanomed.*, **9**, 2399–2407.

Geethalakshmi R, Sarada, DVL (2010). 23 Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using Trianthema decandra extract and evaluation of their anti microbial activities, *Int. J. Eng. Sci. Technol.*, **2**(5), 970–975.

Giovanucci E (2002). Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, **31**(4), 925-943.

Gout S ve ark. (2004). Early enterocytic differentiation of HT-29 cells: biochemical changes and strength increases of adherens junctions. *Exp. Cell Res.*, **299**(2), 498-510.

Graf C, Vossen DLJ, Imhof A, Van-Blaaderen A (2003). A General Method To Coat Colloidal Particles with Silica. *Langmuir*, **19** (17), 6693–6700.

Granqvist CG, Buhrman RA (1976). Ultrafine metal particles. *Journal of Applied Physics*, **47** (5), 2200-2219.

Gusella M, Frigo AC, Bolzonella C, Marinelli R, Barile C, Bononi A, Pasini F (2009). Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *British journal of cancer*, **100**(10), 1549.

Hahn H, Averbach RS (1990). The production of nanocrystalline powders by magnetron sputtering. *Journal of Applied Physics*, **67** (2), 1113-1115.

Hennes M, Lotnyk A, Mayr SG (2014). Plasma-assisted synthesis and high-resolution characterization of anisotropic elemental and bimetallic core shell magnetic nanoparticles. *Beilstein J. Nanotechnol*, **5**, 466-475.

Hewakuruppu YL, Dombrovsky LA, Chen C, Timchenko V, Jiang X, Baek S, Taylor RA (2013). Plasmonic "pump probe" method to study semi-transparent nanofluids. *Applied Optics*, **52** (24), 6041-6050.

Hirn M, Reggio H, Bivic AL (1988). HT-29 cells are an in vitro model for the generation of cell polarity in epithelia during embryonic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **85** (1), 136–140.

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.

Hubler A, Lyon D (2013). Gap size dependence of the dielectric strength in nano vacuum gaps. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*. **20** (4), 1467-1471.

Hubler A, Osuagwu O (2010). Digital quantum batteries: Energy and information storage in nanovacuum tube arrays. *Complexity*, **15**(5), 48-55.

Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells, *Toxicol In Vitro*. **19**(7),975-83.

Isanbor C, O'Hagan D (2006). Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents. *J Flu Chem.*, **127**, 303-319.

Ismail EH, Khalil A, Seif FA, El-Magdoub F (2014). Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using Extract of Grape (*Vitis vinifera*) Leaves and Seeds. *Progress in Nanotechnology and Nanomaterials*. **3**, 1-2.

Jaillon O (2007). The French–Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization, The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*. **449** (7161): 463–467.

Jayaprakasha GK, Selvi T, Sakariah KK (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts, *Food Res.Int.*, **36**, 117-122.

Jin-Taek H, Joohun HA, Ock J (2005). Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **332**, 433-440.

Kamiloğlu Ö (2007). Üzümlerde Antosiyaninler ve Biyosentezi. *Alatarım*, **6** (1), 47-52.

Khan Y, Numan M, Ali M, Khali AT, Ali T, Abbas N, Shinwari ZK (2017). Biosynthesized silver nanoparticles using different plant extracts as anti-cancer agent. *J Nanomedine Biotherapeutic Discov.*, **7**(154), 2.

Kharissova VO, Dias HVR, Kharisov BI, Perez BO, Perez VMJ (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trend in Biotechnology*, **31**, 240-248.

Kırca M, Mengeloğlu Y (2008). *Nanoteknoloji ve Türkiye*, TÜSİAD Rekabet Stratejileri Dizisi 11, Kasım İstanbul/Türkiye, s: 75

Kocaturk PA, Kavas GO (2007). Resveratrol effects on streptozotcin-induced diabetes. *Trace Elem Electrolytes*, **24** (2), 112-116.

Kumar A, Chisti Y, Banerjee U (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, **31**, 346–356.

Kuppusamy P, Ichwan SJ, Al-Zikri PN, et al. (2016). In Vitro Anticancer Activity of Au, Ag Nanoparticles Synthesized Using Commelina nudiflora L. Aqueous Extract Against HCT-116 Colon Cancer Cells. *Biol Trace Elem Res*, **173**, 297-305.

Laila RAE (2019). *Anadolu’da Yetiştirilen Bazı Üzüm (Vitis vinifera L.) Çeşitlerinin Biyokimyasal İçeriğinin, Antikanser ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Kastamonu Üniversitesi/Türkiye.

Latha D, Sampurnam S, Arulvasu C, Prabu P, Govindaraju K, Narayanan V (2018). Biosynthesis and characterization of gold nanoparticle from Justicia adhatoda and its catalytic activity, *Mater. Today Proc.*, **5**(2), 8968–8972.

Lavanya R, Venkata C, Sridhar R, Ramakrishna V, Ryan JE, Joshua DL, Jairam KPV (2016). Grape compounds suppress colon cancer stem cells in vitro and

in a rodent model of colon carcinogenesis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **16**, 278.

Liamosa D, Ruano M, Martinez L, Mayoral A, Roman E, Garcia-Hernandez M, Huttel Y (2014). The ultimate step towards a tailored engineering of core shell and core Shell shell nanoparticles. *Nanoscale*, **6** (22), 13483-13486.

Limei W, Birgit W, Eva-Maria P, Martina B (2014). Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. *Biochem Pharmacol*, **92** (1), 73–89.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, **3** (5), 330-338.

Marie-Elisabeth F, Anne-Marie C, Bernadette B, Jan M (1989). Proliferation of the Human Colon Carcinoma Cell Line HT29: Autocrine Growth and Deregulated Expression of the c-myc Oncogene. *Cancer Research*, **49**, 6566-6571.

Marjan N, Hossein H (2009). Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*, **23**(9), 1197-1204.

Martin AR, et al (2004). Resveratrol, apolyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem. Pharmacol*, **67**, 1399-1410.

Martínez-Maqueda D, Miralles B (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health*. 1.Baskı Fransa: Springer. p: 113–124.

Mazariegos EB, Benjamín V, Daniel G, Ali A, Olivia TC, Carlos CD, Federico G (2019). Silver nanoparticles from *Justicia spicigera* and their antimicrobial potentialities in the biocontrol of foodborne bacteria and phytopathogenic fungi. *Rev Argent Mikrobiol*, **51**(2), 103-109.

Niki E (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, **49**, 503-515.

Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey JL, Souverain SF (2011). Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta*, **85**, 2265-2289.

Omidvar A (2016). Metal-enhanced fluorescence of graphene oxide by palladium nanoparticles in the blue-green part of the spectrum. *Chinese Physics B.*, **25** (11), 102-118.

Omidvar A (2018). Enhancing the nonlinear optical properties of graphene oxide by repairing with palladium nanoparticles. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, **103**, 239-245.

Özkaya AB (2009). *Hct-116 Kolon Kanser Hücre Hattında Yeşil Çay Etkin Maddesi Olan -Epigallocatekin-3-Gallat'ın Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi.* Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi/Türkiye.

Pal S et al. (2003). Red Wine Polyphenolics Increase LDL Receptor Expression and Activity and Suppress the Secretion of ApoB100 from Human HepG2 Cells. *J. Nutr.* **133**, 700-706.

Pelin AK, Güzin ÖK, Demet İB (2007). Pretreatment Effect Of Resveratrol On Streptozotocin-Induced Diabetes. *Biol. Trace Elem. Res.*, **118**(3), 244-249.

Plin C, et al (2005). Resveratrol protects against cold ischemia-warm reoxygenation – induced damages to mitochondria and cells in rat liver. *European J. Phismacol*, **528**, 162-168.

Sangiliyandi G, Jae-Kyo J, Jae WH, Xi-Feng Z, Jung HP, Jin-Hoi K (2015). Multidimensional effects of biologically synthesized silver nanoparticles in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and human lung (L132) and lung carcinoma A549 cells. *Nanoscale Research Letters*, **10**, 35.

Samira K, Sevda J, Samin H, Ommoleila M, Soodabeh D (2020). Preparation and characterization of PLGA-PEG-PLGA polymeric nanoparticles for co-delivery of 5-Fluorouracil and Chrysin. *J Biomater Sci Polym Ed.*, **31**(9), 1107-1126.

Sapkota K, Narayanan KB, Han SS (2017). Environmentally Sustainable Synthesis of Catalytically-Active Silver Nanoparticles and Their Cytotoxic Effect on Human Keratinocytes. *Journal of Cluster Science volume*, **28**, 1605–1616.

Singh V, Shrivastava A, Wahi N (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles by plants crude extracts and their characterization using UV, XRD, TEM and EDX. *African Journal of Biotechnology*, **14**(33): 2554-2567.

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

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

Rashidian VMR (2017). Investigating the extrinsic size effect of palladium and gold spherical nanoparticles. *Optical Materials*, **64**, 413-420.

Rajan R, Chandran K, Harper S., Yun SI, Kalaichelvan PT (2015). Plant extract synthesized silver nanoparticles: an ongoing source of novel biocompatible materials. *Industrial Crops and Products*, **70**: 356-373.

Robinson J (2012). *Wine and Spirits: Understanding Wine Quality*. 2. Baskı, London, Wine & Spirits Education Trust, s: 2-5.

Schöffski P (2004). The modulated oral fluoropyrimidine prodrug S-1, and its use in gastrointestinal cancer and other solid tumors. *Anti-Cancer Drugs*. 2004; **15**: 85-106.

Sergeev BE (2013). *Nanochemistry*, 2.Baskı, Amsterdam: Elsevier B.V., p: 31-48.

Sharifzadeh M (2006). *Nanotechnology Sector Report*, Cronus Capital Markets, Mayıs 2006, Toronto/Canada, p: 15.

Sharma VK, Yngard RA, Yekatarina L (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, **145**(1-2), 83-96.

Stephen W, Richard J, Alison G, (2003). Physics at the Nanoscale, and Nanotechnology Production Methods with Special Focus on Biology. *Azo Nano*. <http://www.azonano.com/Details.asp?ArticleID=1207>. (Erişim Tarihi: 25 Nisan 2020).

Stephenson C, Hubler A (2015). Stability and conductivity of self assembled wires in a transverse electric field. *Sci. Rep.* **5**, 15044.

Şimşek A (2019). Kolorektal Kanserler. *Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü*. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/yayinlar/sunular/Ca_Farkindalik_Egitimi_31.10.2019/Kolorektal_Kanserler_Prof.Dr._Abdurrahman_Simsek.pdf. (Erişim Tarihi: 20 Nisan 2020).

Taylor R, Coulombe S, Otanicar T, Phelan P, Gunawan A, Wie L, Rosengarten G, Prasher R, Tyagi H (2013). Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids. *Journal of Applied Physics*, **113** (1), 011301(19).

Taylor RA, Otanicar TP (2012). Nanofluid-based optical filter optimization for PV/T systems. *Light: Science & Applications*, **1** (10), 34.

Taylor RA, Otanicar TP, Herukerrupu Y, Bremond F, Rosengarten G, Hawkes ER, Jiang X, Coulombe S (2013). Feasibility of nanofluid-based optical filters. *Applied Optics*, **52** (7), 1413-22.

Temel MK (2015). The development of cytotoxic chemotherapeutics in the twentieth century. *Turkish journal of oncology*, **30**(2), 96-108.

Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine*, **6**, 257-262.

Thomas Schoepke. www.plant-pictures.de, (Erişim Tarihi: 09.02.2020)

Turgut O, Keskin LH, Avşar AF (2011). Nanoteknoloji nedir ?. *Turkish Medical Journal*. **5**(1), 45.

Vanamala J, Reddivari L, Radhakrishnan S, Tarver C (2010). Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates

apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. *BMC Cancer*. **10**(1), 238.

Waldner MJ, Neurath MF (2010). The molecular therapy of colorectal cancer, *Molecular aspects of medicine*, 31, 171-178.

Wang J, Bai J (2005). High-magnetic-moment core-shell-type FeCo Au AgFeCo Au Ag nanoparticles. *Appl. Phys. Lett*, **87**, 152502.

Wang M, Zhang W, Zheng X, Zhu P (2017). Antibacterial and catalytic activities of biosynthesized silver nanoparticles prepared by using an aqueous extract of green coffee bean as a reducing agent, *RSC Adv.*, **7**(20), 12144–12149.

Wani ZA, Guru SK, Rao AS, Sharma S, Mahajan G, Behl A, Kuma A, Sharma PR, Kamal A, Brushan S, Mondle DM (2016). A novel quinazolinone chalcone derivative induces mitochondrial dependent apoptosis and inhibits PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human colon cancer HCT-116 cells. *Food and Chemical Toxicology*, **87**, 1-11.

Wolfgang L (2004). Bottom-up Methods for Making Nanotechnology Products. *Azo Nano*. <http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=1079>. (Erişim Tarihi: 29 Nisan 2020).

Yang G, Xie J, Deng Y, Bian Y, Hong F (2012). Hydrothermal synthesis of bacterial cellulose/AgNPs composite: a “green” route for antibacterial application. *Carbohydrate Polymers*, **87**(4): 2482-2487.

Zaki A, (2006). Processing and Synthesis Techniques for the Preparation of Nanomaterials. *Azo Nano*. <http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=1710>. (Erişim Tarihi: 28 Nisan 2020).

Zhu B, Yinghua L, Zhengfang L, Mingqi Z, Tiantian X, Changbing W, Ning D (2016). Silver Nanoparticles Induce HePG-2 Cells Apoptosis Through ROS-Mediated Signaling Pathways, *Nanoscale Res Lett.*, **11**, 198.