



**ÇİNKO FOSFAT KAPLI, CİSPLATİN YÜKLÜ SİLİKA
NANOPARTİKÜLLERİNİN ÜRETİMİ VE MDR1 GEN
İNHİBİSYONU SAĞLANMIŞ BAŞ-BOYUN KANSERİ
HÜCRELERİNDE ETKİ MEKANİZMASININ
İNCELENMESİ**

Emre ÖZTÜRK

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Adem KARA**

**2025
Her hakkı saklıdır.**



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇİNKO FOSFAT KAPLI, CİSPLATİN YÜKLÜ SİLİKA
NANOPARTİKÜLLERİNİN ÜRETİMİ VE MDR1 GEN İNHİBİSYONU
SAĞLANMIŞ BAŞ-BOYUN KANSERİ HÜCRELERİNDE ETKİ
MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Emre ÖZTÜRK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adem KARA

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2025

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**ÇİNKO FOSFAT KAPLI, CİSPLATİN YÜKLÜ SİLİKA
NANOPARTİKÜLLERİNİN ÜRETİMİ VE MDR1 GEN İNHİBİSYONU
SAĞLANMIŞ BAŞ-BOYUN KANSERİ HÜCRELERİNDE ETKİ
MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Adem KARA danışmanlığında Emre ÖZTÜRK tarafından hazırlanan bu çalışma 21 / 05 / 2025 tarihinde aşağıdaki jüriler tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile (3/3)** kabul edilmiştir.

Başkan	: Doç. Dr. Ferhunde AYSİN	İmza	:
Üye	: Prof. Dr. Adem KARA	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Kübra SOLAK	İmza	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ
Enstitü Müdürü

* Bu tez çalışması TÜSEB tarafından 37545 nolu proje ile desteklenmiş olup, ayrıca tez konusu TÜBİTAK 2210-C Programı ile Öncelikli alan (Biyoteknolojik İlaç Geliştirme) kapsamında burs desteği almıştır.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

21 / 05 / 2025

İmzası

Emre ÖZTÜRK

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİNKO FOSFAT KAPLI, CİSPLATİN YÜKLÜ SİLİKA NANOPARTİKÜLLERİNİN ÜRETİMİ VE MDR1 GEN İNHİBİSYONU SAĞLANMIŞ BAŞ-BOYUN KANSEİ HÜCRELERİNDE ETKİ MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

Emre ÖZTÜRK

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Adem KARA

Bu tez çalışmasında, FaDu hücre hattında MDR1 geninin siRNA ile inhibisyonu sağlanarak, yeşil sentez yöntemiyle üretilen ZnP kaplı, SiO₂ nanopartiküllerine yüklenen cisplatinin (ZnP+SiO₂+CIS) tedavi etkinliği değerlendirilmiştir. Sentezlenen nanopartiküller, Zeta Potansiyeli, XRD, FTIR, SEM ve TEM analizleriyle yapısal ve morfolojik olarak karakterize edilmiştir. İlaç yükleme kapasitesi ve yüklenmiş ilaç miktarı, HPLC analizleriyle belirlenmiş; farklı pH koşullarında gerçekleştirilen in vitro salım testleriyle cisplatinin salım profili detaylı şekilde incelenmiştir. Hücre kültürü deneylerinde, ZnP+SiO₂+CIS uygulamasının FaDu hücre hattında IC₅₀ değeri 15 µg/mL bulunmuştur. MDR1 gen susturulmasının tek başına hücre canlılığı üzerinde sınırlı etkiye sahip olduğu belirlenirken, ZnP+SiO₂+CIS uygulamasının hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya neden olduğu ve tedavi etkinliğinde belirgin bir artış sağladığını göstermiştir. Ayrıca, RT-PCR ve Western blot analizleri ile MDR1 inhibisyonu ve nanopartikül tedavilerinin hücre ölümü, proliferasyonu ve sinyal iletim yollarındaki moleküler etkileri detaylı şekilde ortaya konmuştur. Elde edilen veriler, çoklu ilaç direncini geçip nanopartikül destekli kemoterapi yaklaşımlarının potansiyelini vurgulamıştır.

2025, 120 sayfa

Anahtar Kelimeler: Baş boyun kanseri, MDR1 Geni, siRNA, Çinko Fosfat Nanopartikül, Cisplatin, Terapi

ABSTRACT

MS. Thesis

INVESTIGATION OF THE TREATMENT EFFICACY OF ZINC PHOSPHATE LOADED CISPLATIN IN MDR1 GENE INHIBITED HEAD AND NECK CANCER CELL LINE

Emre ÖZTRK

Erzurum Technical niversity
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Adem KARA

In this thesis study, the treatment efficacy of cisplatin (ZnP+SiO₂+CIS) loaded onto ZnP-coated SiO₂ nanoparticles produced by green synthesis method by inhibiting MDR1 gene with siRNA in FaDu cell line was evaluated. Synthesized nanoparticles were structurally and morphologically characterized by Zeta Potential, XRD, FTIR, SEM and TEM analyses. Drug loading capacity and loaded drug amount were determined by HPLC analyses; release profile of cisplatin was examined in detail by in vitro release tests performed under different pH conditions. In cell culture experiments, IC₅₀ value of ZnP+SiO₂+CIS application was found as 15 µg/mL in FaDu cell line. While it was determined that MDR1 gene silencing alone had a limited effect on cell viability, ZnP+SiO₂+CIS application caused a significant decrease in cell viability and provided a significant increase in treatment efficacy. In addition, RT-PCR and Western blot analyses revealed detailed molecular effects of MDR1 inhibition and nanoparticle treatments on cell death, proliferation and signal transduction pathways. The obtained data highlighted the potential of nanoparticle-assisted chemotherapy approaches to overcome multidrug resistance.

2025, 120 pages

Keywords: MDR1 Gene, siRNA, Zinc Phosphate, Nanoparticle, Cisplatin, Therapy

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde ve tamamlanmasında değerli bilgi, tecrübe ve desteğiyle bana rehberlik eden, malzeme ve ekipmanlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Adem Kara'ya teşekkürlerimi sunarım.

Nanopartikül üretimi ve karakterizasyonu aşamalarında değerli bilgilerini ve deneyimleriyle destek olan ve yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Kübra Solak'a, mikrobiyoloji çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerini paylaşarak destek olan Arş. Gör. Dr. Damla Rüzgar'a ve her zaman genetik alanında fikirlerini ve bilgisini paylaşarak rehber olan Dr. Öğr. Gör. Neslişah Barlak'a gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Lisans ve Yüksek lisans öğretim sürecimde her daim bana desteğini esirgemeyen ve yanımda olan süreci daha verimli hale getiren çok değerli Fatma Çalık'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte, başta Nuran ve Vahip ÖZTÜRK olmak üzere, her zaman yanımda olan, anlayışları, fedakârlıkları ve bana olan inançlarıyla en büyük desteği sağlayan kıymetli aileme sonsuz minnettarım.

Yüksek lisans tez çalışmam süresince 2210-C Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmam süresince Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) A Grubu Acil Ar-Ge proje çağrısı kapsamında A2-02 ile malzeme alımlarında maddi desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Emre ÖZTÜRK
Mayıs 2025

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Baş Boyun Kanseri ve Epidemiyolojisi	2
1.3. Baş ve Boyun Kanseri Risk Faktörleri.....	3
1.3.1. Tütün kullanımı	4
1.3.2. Alkol kullanımı.....	4
1.3.3. İnsan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu	5
1.3.4. Afyon kullanımı.....	6
1.3.5. Diğer viral enfeksiyonlar	6
1.3.6. Bağışıklık yetmezliği.....	6
1.3.7. Diğer risk faktörleri	6
1.4. Baş ve Boyun Kanseri Mutasyonlar, Sinyal Yolları ve Hedeflenebilir Mekanizmalar	7
1.4.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR).	7
1.4.2. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	8
1.4.3. PI3K/AKT/mTOR Yolu	8
1.4.4. Siklin bağımlı kinazlar (CDK)	8
1.4.5. Aktivin reseptör benzeri kinaz-1(ALK1)	8
1.4.6. Transkripsiyonun sinyal dönüştürücüsü ve aktivatörü 3 (STAT3)	9
1.5. Baş Boyun Kanseri İlaç Direnci: <i>MDR1</i> Geninin Etkisi.....	9
1.6. <i>MDR1</i> Gen Susturulması: siRNA ile Çoklu İlaç Direncinin Aşılması	10
1.7. siRNA Aracılı Gen Susturmanın Avantajları	11
1.8. Baş ve Boyun Kanseri Tanı ve Evreleme	13
1.9. Baş ve Boyun Kanseri Tedavi Yöntemleri	14

1.9.1. HNSCC’de kemoterapi.....	15
1.9.2. HNSCC tedavisinde kullanılan monoklonal antikorlar	15
1.9.3. HNSCC tedavisinde immünoterapi	16
1.10. İlaç Taşıma Sistemleri ve Nanopartiküller	17
1.11. Nanopartiküllerde Aktif ve Pasif Hedefleme	18
1.11.1. Pasif hedefleme	18
1.11.2. Aktif hedefleme	19
1.12. Çinko Fosfat Nanopartikülleri	20
1.13. Silika Nanopartikülleri	21
1.14. Cisplatin Kemoterapi İlacı	22
2. KAYNAK ÖZETLERİ	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM	29
3.1. Materyal.....	29
3.2. İlaç Taşıyıcı Sistemin Oluşturulması	34
3.2.1. Bakteri süpernatantının elde edilmesi.....	34
3.2.2. Yeşil sentez yöntemiyle ZnP NP üretimi	35
3.2.3. SiO ₂ sentezi	36
3.3. CIS Yüklenmesi, ZnP NP ile Kaplama İşlemi ve HPLC ile İlaç Yükleme Miktarının Belirlenmesi.....	37
3.4. İlaç Salınımı Deneyleri	38
3.5. Nanopartikül Karakterizasyonu	38
3.5.1. UV-VİS analizi	38
3.5.2. X-ışını kırınım (XRD) analizi	39
3.5.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	39
3.5.4. Zeta potansiyel ve dinamik ışık saçılımı (DLS) analizi	40
3.5.5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi.....	40
3.5.6. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi.....	41
3.6. Hücre Kültürü Deneyleri	41
3.6.1. HNSCC hücre hattının (FaDu) kültüre edilmesi	41
3.6.2. Hücre canlılık analizi.....	42
3.6.3. Nanopartiküllerde hücresel alım.....	43
3.6.4. Flow sitometrik apoptoz analizi	44
3.6.5. Gen İnhibisyonu (<i>MDR1</i> Gen Susturma)	45
3.6.6. Hücre döngüsü (cell cycle) analizi	46

3.6.7. Gerçek zamanlı PCR (Real-Time PCR) analizi	47
3.6.7.1. RNA izolasyonu	47
3.6.7.2. cDNA sentezi.....	48
3.6.7.3. Real time PCR	48
3.6.8. Western Blot Analizi	51
3.6.8.1. Protein izolasyonu	51
3.6.8.2. Protein örneklerinin yükleme öncesinde hazır hale getirilmesi	51
3.6.8.3. Yürütme jelinin hazırlanması ve proteinlerin yüklenmesi.....	52
3.7. İstatiksel Analiz	54
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	55
4.1. ZnP Üretimi ve Karakterizasyonu	55
4.1.1. UV-VİS analizi	55
4.1.2. XRD analizi	58
4.1.3. TEM analizi.....	59
4.1.4. SEM analizi	60
4.1.5. FTIR analizi.....	61
4.1.6. Zeta potansiyeli analizi.....	64
4.2. İlaç Yükleme ve Salım Analizleri.....	65
4.2.1. İlaç yükleme HPLC analizi.....	67
4.2.2. İlaç salınımı	69
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	70
4.3.1. Hücresel alım.....	70
4.3.2. Hücre canlılık analizi.....	72
4.3.3. Apoptoz analizi.....	75
4.3.4. Hücre döngüsü (cell cycle) analizi	77
4.3.5. Real time pcr analizi.....	80
4.3.6. Western blotlama analizi	91
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	101
5.1. Sonuç.....	101
KAYNAKLAR.....	104

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

CO ₂	Karbondioksit
SiO ₂	Silisyum Dioksit
°C	Santigrat derece
g	Gram
kDa	Kilo dalton
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
uL	Mikrolitre
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
θ	Teta

Kısaltmalar

ABC	ATP-Bağlayıcı Kaset (ATP Binding Cassette) taşıyıcıları
AKT	Protein Kinaz B
ALK1	Aktivin Reseptör Benzeri Kinaz 1
APTES	3-Aminopropil Trietoksisilân
BAX	Bcl-2 ilişkili X Proteinini
BCL-2	B Hücre Lenfoma-2 proteini
β-Actin	Referans gen
BSA	Sığır Serum Albumin
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CIS	Cisplatin
cMOAT	Kanaliküler Çoklu Özgül Organik Anyon Taşıyıcısı
CTAB	Setiltrimetilamonyum Bromür
CVDK-8	Hücre canlılığı tespit kiti-8

DLS	Dinamik ışık saçılımlı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EPR	Arttırılmış geçiş ve alıkonma
ERK	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz
FaDu	İnsan Farengial Skuamöz Hücreli Karisnom Hücre Hattı
FBS	Fetal Sığır Serumı
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılıtesı spektroskopisi
HNSCC	Baş-Boyun Skuamöz Hücreli Karsinom
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IC ₅₀	Yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu
MSN	Mezogözenekli Silika nanopartiküller
mTOR	Memeli Hedefi olan Rapamisin
NF-κB p65	Nükleer Faktör kappa B'nin p65 alt birimi
PARP	Poli (ADP-riboz) Polimeraz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
P-gp	P-glikoprotein
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloęu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
siRNA	Küçük Girişimci RNA
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
UV-VİS	Ultraviyole–görünür bölge spektroskopisi
XRD	X Işını Kırınımı
ZnP	inko Fosfat
ZnP NP	inko Fosfat Nanopartikülleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Baş ve boyun kanseri bölgeleri. Paranasal sinüslerin, burun boşluğunun, ağız boşluğunun, dilin, tükürük bezlerinin, gırtlak ve farenksin (nazofarenks, orofarenks ve hipofarenks dahil) konumunu göstermektedir. (Orijinal yazılar Türkçe'ye çevrilmiştir)	2
Şekil 1.2. Kanser hücrelerinde MDR gelişimine katkıda bulunan mekanizmalar (Orijinal yazılar Türkçe'ye çevrilmiştir)	10
Şekil 1.3. MDR'nin mekanizması (a) ve sirna ile hedeflenmesi (b) (Orijinal yazılar Türkçe'ye çevrilmiştir)	12
Şekil 1.4. Baş ve boyun kanseri tedavisinde kullanılan başlıca terapötik yaklaşımlar (Orijinal yazılar Türkçe'ye çevrilmiştir)	15
Şekil 1.5. Kanser hücrelerine nanopartikül taşınımında aktif ve pasif hedefleme	20
Şekil 1.6. CIS'in moleküler yapısı	22
Şekil 1.7. CIS'in hücreye girişi ve DNA hasarı mekanizması (Orijinal yazılar Türkçe'ye çevrilmiştir)	23
Şekil 1.8. Tez çalışması süresince gerçekleştirilen deneysel süreçlerin şekilsel anlatımı.	25
Şekil 3.1. <i>Bacillus cereus</i> bakterisinden yeşil sentez yöntemi kullanılarak ZnP NP üretim aşamaları. A) <i>Bacillus cereus</i> , B) Bakterinin sıvı kültürüne alınması, C) Sıvı kültürü elde edilmesi ve pH nin ayarlanması, D) Çinko sülfoksitin eklenerek yeşil sentezin başlatılması, E) 24 saat sonra santrifüjlenmesi, F) Bakteri süpernatantı ve ZnP'nin elde edilmesi.....	36
Şekil 3.2. Tez çalışmaları süresince kullanılan UV-VIS spektroskopi cihazı	39
Şekil 3.3. IRTracer-100 SHIMADZU FTIR spektrometresi	40
Şekil 3.4. ELISA mikroparka okuyucu (Biotek EPOCH)	42
Şekil 3.5. Flow Sitometri cihazı.	47
Şekil 3.6. cDNA sentezinin gerçekleştirildiği Gradient PCR cihazı	48
Şekil 3.7. Real time pcr cihazı.....	50
Şekil 3.8. SYBR Green Master Mix ile Real-Time PCR aşamaları	50
Şekil 3.9. Western blot için, Commassie Reagent Solüsyonu kullanılarak absorbans ölçümü alınan bir proteinin 10 kuyulu jel için yükleme oranı hesaplama yöntemi.....	52
Şekil 3.10. Proteinleri jele yüklemek için 4X Laemmli sample buffer ile hazırlanışı....	52
Şekil 3.11. Protein örneklerinin jelde yürütülmesi	53
Şekil 4. 1. SiO ₂ (A), CIS (B), Yeşil sentez ile üretimi gerçekleştirilmiş ZnP NP (C), SiO ₂ ve CIS karışımı (D) ve SiO ₂ +CIS+ZnP NP (E) UV-VİS analizi sonuçları	57
Şekil 4.2. Yeşil sentez ile üretilmiş ZnP NP'lerin XRD analiz sonuçları	59
Şekil 4.3. ZnP TEM görüntüleri (a, b ve c) ve ZnP boyut dağılım grafiği (d)	60

Şekil 4.4. SiO ₂ NP (A) ve ZnP NP (B) SiO ₂ +ZnP NP'nin (C) Tem görüntüleri	60
Şekil 4.5. SiO ₂ NP, ZnP NP ve SiO ₂ +CIS+ZnP NP SEM görüntüleri	61
Şekil 4.6. ZnP (a), ZnP+SiO ₂ NP ve ZnP+ SiO ₂ +CIS NP FTIR sonuçları... ..	61
Şekil 4.7. Yeşil sentez ile 2 farklı protokol ile üretilmiş ZnP(A); tercih edilen 2. Protokol ile üretilmiş ZnP2 ve ZnP +SiO ₂ zeta potansiyel analiz sonuçları	65
Şekil 4.8. CIS ilacının farklı konsantrasyonlarda Uv-vis analizi.	66
Şekil 4.9. CIS ilacına ait 205 ve 300 absorpsiyon pikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi.	67
Şekil 4.10. Standart olarak 1 mg/mL CIS kullanılan SiO ₂ +ZnP örneğinin HPLC analiz sonuçları.....	67
Şekil 4.11. Standart olarak 1mg/ml CIS kullanılan SiO ₂ +CIS örneğinin HPLC analiz sonuçları.....	68
Şekil 4.12. Standart olarak 1mg/ml CIS kullanılan SiO ₂ +Cis+ZnP örneğinin HPLC analiz sonuçları.....	68
Şekil 4.13. SiO ₂ +Cis+ZnP ve SiO ₂ +Cis NP'lerinin pH'a duyarlı salım analiz grafikleri.	70
Şekil 4.14. ZnP+SiO ₂ NP'lerin hücre sel alımı	72
Şekil 4.15. FaDu hücrelerinde ZnP+SiO ₂ ve ZnP+SiO ₂ +CIS 15 µg/mL (IC50: 15 µg/mL) uygulamalarının 24 saat sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (Kontrol ve tüm uygulama grupları; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).....	74
Şekil 4.16. FaDu hücrelerinde MDR1 gen susturma sonrası ZnP+SiO ₂ (15 µg/mL) ve ZnP+SiO ₂ +CIS (15 µg/mL) uygulamalarının 24 saat sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (Kontrol ve tüm uygulama grupları; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).....	75
Şekil 4.17. FaDu hücre hattında 15 µg/mL dozunda farklı tedavi gruplarına ait flow sitometrisi analiz sonuçları. Her panelde hücrelerin Annexin V-FITC ve PI boyamaları ile apoptoz ve nekroz düzeyleri değerlendirilmiştir. a) Kontrol, b) siMDR1, c) siMDR1 ZnP+SiO ₂ , d) siMDR1 ZnP+SiO ₂ +CIS, e) ZnP+SiO ₂ , f) ZnP+SiO ₂ +CIS	76
Şekil 4.18. FaDu hücre hattında 15 µg/mL dozunda farklı tedavi gruplarına uygulanan Annexin V-FITC/PI boyaması sonrası toplam apoptoz oranları.	77
Şekil 4.19. FaDu hücre hattında 15 µg/mL dozunda uygulanan farklı tedavi gruplarına dair propidium iodide (PI) boyası ile elde edilen hücre döngüsü dağılımlarının flow sitometri histogramları	79
Şekil 4.20. MDR1 geni susturulmuş FaDu hücre hattı üzerinde 15 µg/mL NP MDR1 (a) uygulamalarının ve LRP (b) mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri	82
Şekil 4.21. MDR1 geni susturulmuş FaDu hücre hattı üzerinde 15 µg/mL NP uygulamalarının cMOAT (a) ve PTEN (b) mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri.	84

Şekil 4.22. MDR1 geni susturulmuş FaDu hücre hattı üzerinde 15 µg/mL NP uygulamalarının ERK (a) ve AKT (b) mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri.	86
Şekil 4.23. MDR1 geni susturulmuş FaDu hücre hattı üzerinde 15 µg/mL NP uygulamalarının BAX (a) ve BCL-2 (b) mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri.	87
Şekil 4.24. MDR1 geni susturulmuş FaDu hücre hattı üzerinde 15 µg/mL NP uygulamalarının PARP (a) ve CDK-2 (b) mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri.	89
Şekil 4.25. MDR1 geni susturulmuş FaDu hücre hattı üzerinde 15 µg/mL NP uygulamalarının CDK-4 (a) ve CDK-6 (b) mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri.	91
Şekil 4.26. FaDu hücrelerinde MDR1 susturma ve 15 µg/mL NP uygulamalarının MDR1 (a) ve Bcl-2 (b) protein seviyesi üzerindeki etkileri.	93
Şekil 4.27. FaDu hücrelerinde MDR1 susturma ve 15 µg/mL NP uygulamalarının PI3K (a) ve AKT (b) protein seviyesi üzerindeki etkileri.	96
Şekil 4.28. FaDu hücrelerinde MDR1 susturma ve 15 µg/mL NP uygulamalarının mTOR (a) ve NF-κB p65 (b) protein seviyesi üzerindeki etkileri.	98
Şekil 4.29. FaDu hücrelerinde MDR1 susturma ve 15 µg/mL NP uygulamalarının Kaspaz-3 (a) ve p38 MAPK (b) protein seviyesi üzerindeki etkileri.	100

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazların marka ve model bilgileri.....	29
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kit ve kimyasal markaları.....	30
Tablo 3.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	32
Tablo 3.4. Ekspresyon seviyeleri araştırılan genlere yönelik primerlerin listesi ve fonksiyonları	49
Tablo 3.5. Real-Time PCR reaksiyon karışımının içeriği ve hacimleri	50
Tablo 3.6. Western blot deneyi için jel hazırlamanın alt jel protokolü.	50
Tablo 3.7. Western blot deneyi için jel hazırlamanın üst jel protokolü.	50
Tablo 3.8. Western blotlama analizinde kullanılan primer antikor listesi	54
Tablo 4.1. FTIR analizi sonucunda elde edilen piklerin yorumlanması	63

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser, sağlıklı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla ortaya çıkan bir hastalıktır (Hausman 2019). Kontrolsüz şekil de çoğalan bu hücrelerin vücut geneline yayılması, hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır. Kanseri hücrelerinin oluşumu, genellikle çevresel, genetik ve bireysel faktörlerden kaynaklanan genetik mutasyonların bir sonucu olarak gelişmektedir (Zhou 2014). Ayrıca, tümör baskılayıcı genlerin inaktive olması veya hasar görmesi de kanser gelişimine neden olabilmektedir (L. H. Wang et al. 2019). Günümüzde küresel ölçekte önemli bir sağlık sorunu haline gelen kanserin, gelecekte de artış göstermesi ve bu konumunu koruması öngörülmektedir (Zhou 2014).

Kanserli dokular, biyolojik davranışlarına bağlı olarak benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) tümörler olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır. Malign tümörler, benign tümörlerin aksine, çevre dokulara invazyon ve uzak organlara metastaz yapma yeteneğine sahiptir. Benign tümörler cerrahi olarak çıkarıldığında genellikle tekrar oluşmazken, malign tümörler çıkarılmış olsalar dahi hastanın yaşamı boyunca yeniden gelişme ve yayılma potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, malign tümörler klinik seyir açısından daha agresif bir yapıya sahip olup, kanserin tedavi sürecini ve prognozunu doğrudan etkilemektedir (Wooster et al. 1994).

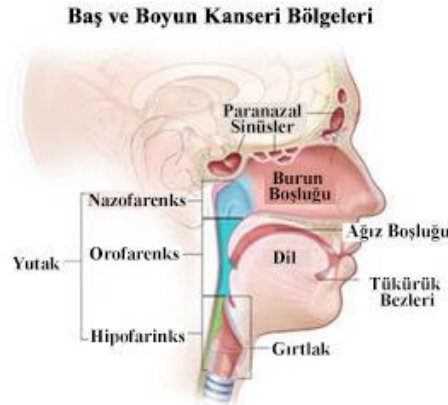
Latince kökenli “kanseri” kelimesi, “yengeç” anlamına gelmektedir. Bu adlandırma, kanser hücrelerinin bulunduğu dokuyu istila etmesi, çevre dokulara invazyon gerçekleştirmesi ve uzak organlara metastaz yapabilmesi nedeniyle kullanılmıştır. Karsinogenez, genetik ve fenotipik değişimlerin çok adımlı bir süreç halinde ilerlediği karmaşık bir mekanizmadır (Ekin 2021). Kanseri fenotipleri üzerine yapılan çalışmalar, tüm kanser türlerinin ortak altı temel özelliğe sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu özellikler; sürekli proliferatif sinyalleşme, büyüme baskılayıcı mekanizmalardan kaçış, hücre ölümüne direnç, sınırsız replikatif potansiyel (ölümsüzlük), anjiyogenezin indüksiyonu ve invazyon/metastaz aktivasyonudur. Daha sonraki araştırmalar, bu özelliklere iki ek mekanizmanın daha dahil olduğunu göstermiştir: yeniden programlanmış enerji metabolizması ve immün aracılı yıkımdan kaçış. Bu özellikler, kanserin biyolojik sürecini tanımlamak amacıyla sınıflandırılmıştır (Kato et al. 2018).

1. GİRİŞ

Bu temel mekanizmalardan biri olan anjiyogenez, tümör gelişiminde kritik bir role sahiptir. Tümörler, besin ihtiyaçlarını difüzyon yoluyla karşılayarak ancak 1-2 mm çapındaki küçük hücre popülasyonları halinde varlıklarını sürdürebilirler. Ancak, bu pasif beslenme yöntemi, daha büyük tümörlerin gelişimi ve dolayısıyla klinik olarak kanser hastalığının oluşumu için yetersiz kalmaktadır. Tümör büyümesinin devam edebilmesi, yeterli düzeyde besin, oksijen, proteolitik enzimler ve diğer hayati bileşenlerin sağlanmasını gerektirir. Bu gereksinimi karşılamak amacıyla, tümör anjiyogenezi olarak adlandırılan süreç devreye girer ve yeni kan damarlarının oluşumunu tetikler (Tobelem 2007). Fizyolojik koşullarda gerçekleşen anjiyogenez, organizmanın bütünlüğünün korunması ve homeostazın devamlılığı açısından kritik bir rol oynarken, tümörlerde gözlenen anjiyogenez ise hastalığın ilerlemesi ve metastaz sürecinde belirleyici bir faktör olarak işlev görmektedir. Bu nedenle, tümör anjiyogenezi, kanserin yayılımını kolaylaştırarak hastalığın klinik seyrini önemli ölçüde etkilemektedir (Konukoğlu ve Turhan 2014).

1.2. Baş Boyun Kanseri ve Epidemiyolojisi

Baş ve boyun kanserleri, farklı anatomik bölgelerde gelişen maligniteleri kapsamaktadır. Bu hastalık grubu, ağız boşluğu, burun boşluğu, farinks, paranazal sinüsler ve tükürük bezleri gibi yapıları içermektedir (Dlamini et al. 2021) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Baş ve boyun kanseri bölgeleri. Paranazal sinüslerin, burun boşluğunun, ağız boşluğunun, dilin, tükürük bezlerinin, gırtlak ve farenksin (nazofarenks, orofarenks ve hipofarenks dahil) konumunu göstermektedir. (Orijinal yazılar Türkçe'ye çevrilmiştir) (Chow 2020).

1. GİRİŞ

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu (HNSCC), dünya genelinde en yaygın yedinci kanser türü olup, her yıl yaklaşık 890.000 yeni vaka teşhis edilmekte ve bu durum, küresel kanser vakalarının yaklaşık %4,5'ini oluşturmaktadır. Ayrıca, yıllık 450.000 ölümle, kanser kaynaklı ölümlerin %4,6'sına neden olmaktadır (Murray et al. 2023). İnsidans verileri incelendiğinde, yaklaşık 380.000 vakanın dudak ve ağız boşluğu kanseri, 185.000'inin larinks kanseri, 133.000'inin nazofarenks kanseri, 98.000'inin orofarenks kanseri, 84.000'inin hipofarenks kanseri ve 54.000'inin tükürük bezi kanseri olduğu rapor edilmektedir (Dlamini et al. 2021). Bu vakaların %90'ından fazlası, baş ve boyun bölgesinden sık rastlanan malignite türü olan HNSCC'den oluşmaktadır (Siegel et al. 2018).

HNSCC insidansı ve mortalite oranları, coğrafi bölgelere ve demografik faktörlere bağlı olarak önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Küresel düzeyde HNSCC, erkeklerde kadınlara kıyasla yaklaşık 2:1 oranında daha sık görülmekte olup, özellikle 50 yaş üzerindeki bireylerde daha yaygın olarak teşhis edilmektedir (Sung et al. 2021). HNSCC insidans oranları, başta Güney ve Güneydoğu Asya olmak üzere belirli bölgelerde daha yüksek seyretmektedir; bu durum, söz konusu bölgelerde kanserojen özelliklere sahip areka cevizi çiğneme alışkanlığının yaygın olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Cheong et al. 2017). Güney ve Güneydoğu Asya'yı takiben, Orta ve Doğu Avrupa ile Güney Amerika'da da insidans oranları görece yüksektir (Sung et al. 2021) Özellikle Hindistan, tütün tüketiminin (areka cevizi ile birlikte ya da tek başına) tüm HNSCC vakalarının yaklaşık %80'inden sorumlu olduğu ülke olarak en yüksek insidans oranlarına sahiptir (Gormley et al. 2022).

1.3. Baş ve Boyun Kanseri Risk Faktörleri

Baş ve boyun kanseri ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilen temel risk faktörleri arasında tütün ve alkol kullanımı, areka cevizi tüketimi, insan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu ve Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonu bulunmaktadır. Özellikle orofaringeal kanserlerde HPV enfeksiyonu önemli bir etiyolojik faktör olarak öne çıkarken, EBV enfeksiyonu ise özellikle Asya'da yaygın olarak gözlemlenmekte ve nazofarenks kanseri ile güçlü bir ilişki göstermektedir (Murray et al. 2023).

1.3.1. Tütün kullanımı

Batı Avrupa’da gerçekleştirilen bir çalışmaya göre HNSCC için en önemli risk faktörlerinden biri olmaya devam etmekte ve tüm vakaların yaklaşık %75’inden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Tuyns et al. 1988). İngiltere’de yapılan ulusal bir anket ise oral ve faringeal HNSCC olgularının %70’inde tütün kullanımının etkili olduğunu ortaya koymuştur (Parkin 2011).

Tütün dumanı, yüksek sıcaklıkta yanma sürecinde ortaya çıkan ve orofarenks epitel hücrelerinde DNA hasarına yol açarak malign dönüşümü tetiklediği bilinen polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrozaminler, aromatik aminler ve aldehitler gibi birçok kanserojen bileşik içermektedir. Ayrıca, ağır sigara kullanıcılarının HNSCC gelişme riski, sigara içmeyen bireylere kıyasla 5 ila 25 kat daha yüksek olarak rapor edilmektedir (Morita et al. 1999).

1.3.2. Alkol kullanımı

Sigara kullanmayan bireylerde alkol tüketiminin, dünya genelinde HNSCC vakalarının yaklaşık %4’üne katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (Zandberg et al. 2016). Alkol tüketimi ile HNSCC riski arasında doz-bağımlı bir ilişki olduğu belirtilmekte olup, tüketim miktarı ve sıklığı arttıkça risk de paralel olarak yükselmektedir. Tüm içiciler için göreceli risk 1,3 kat olarak hesaplanırken, günlük 50 gramdan fazla alkol tüketen bireylerde bu risk 2,5 katına çıkmaktadır. En yüksek risk düzeyi ise günde üç veya daha fazla alkollü içecek tüketen bireylerde gözlemlenmektedir (Zandberg et al. 2016).

HNSCC riski, tüketilen alkol türüne göre de değişkenlik göstermektedir. İçki türü (örneğin viski veya votka) tüketen bireylerde, bira veya şarap tüketenlere kıyasla daha yüksek risk bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu etkinin alkol konsantrasyonu temelinde değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı öne sürülmektedir (Castellsagué et al. 2004; Hashibe et al. 2007; Rumgay et al. 2021). Alkolün çözücü özellik göstermesi, mukozal dokunun sigara dumanı veya gıdalarda bulunan nitritler gibi kanserojen maddelere karşı duyarlılığını artırmaktadır. Ayrıca, etanolün alkol dehidrogenaz

1. GİRİŞ

aracılığıyla metabolize edilmesi sonucu oluşan asetaldehitin mutajenik etkiler gösterdiği ortaya konmuştur. Asetaldehit, yoğun alkol tüketiminin yol açtığı baş ağrısı ve yüz kızarması gibi semptomlardan sorumlu olup, disülfiram, metronidazol ve abakavir gibi belirli ilaçlar tarafından metabolizması inhibe edilerek alkolle etkileşimlere neden olabilmektedir (Chiou et al. 2011; Rumgay et al. 2021).

Özellikle dikkat çekici bir bulgu, asetaldehiti parçalayan enzim olan asetaldehit dehidrogenazdaki genetik varyantların HNSCC riski ile ilişkili olmasıdır. Bu enzim varyantlarına sahip bireylerde yoğun alkol tüketimi, HNSCC gelişme riskini artırmakla kalmayıp, aynı zamanda kemoradyoterapiye karşı daha düşük yanıt alınmasına ve kötü prognoza neden olmaktadır. Bu genetik varyantların, özellikle Doğu Asya popülasyonlarında yaygın olarak görülen ve alkol tüketimiyle ortaya çıkan kızarma sendromunun da temel nedeni olduğu bildirilmektedir (Chiou et al. 2011).

1.3.3. İnsan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu

İnsan papilloma virüsü (HPV), gelişmiş ülkelerde görülen HNSCC vakalarının %72'sinden sorumlu iken, gelişmekte olan ülkelerde bu oran %13'e kadar düşmektedir (De Martel et al. 2012). Kapsid proteinlerine göre farklılık gösteren ve yüksek onkogenik risk taşıyan 20'den fazla HPV serotipi tanımlanmıştır. Özellikle HPV16, Kuzey Amerika'daki HPV ile ilişkili orofaringeal HNSCC vakalarının %85-90'ını oluşturmaktadır. Buna karşılık, servikal kanser vakalarında HPV16 ve HPV18 birlikte değerlendirildiğinde, vakaların %50-75'inden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Varier et al. 2016).

HPV'nin neden olduğu onkogeneze süreci, cinsel temas sonucu gelişen mikro aşınmalara maruz kalan bazal keratinositlerin viral enfeksiyonu ile başlamaktadır (Zhang et al. 2021). HPV ile ilişkili orofaringeal kanser gelişiminde en önemli risk faktörlerinden biri bağışıklık sisteminin zayıflamasıdır. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile HPV enfeksiyonunun sıklıkla birlikte görüldüğü ve HIV taşıyan kadınlarda HPV enfeksiyonu riskinin 1,5 ila 2,5 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Heck et al. 2010).

1. GİRİŞ

1.3.4. Afyon kullanımı

Afyon kullanımı, gırtlak kanseri riskinin artışı ile ilişkilendirilmektedir. Haşhaş bitkisinin olgunlaşmamış tohum kabuklarından elde edilen afyon, çeşitli alkaloidler içeren yasadışı bir maddedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), afyonun farklı formlarının (çiğ, posa veya özsu halinde tüketildiğinde ya da içildiğinde) insanlar için kanserojen olarak sınıflandırıldığını bildirmektedir (Basnayake et al. 2023).

1.3.5. Diğer viral enfeksiyonlar

Nazofarenks karsinomu, birçok popülasyonda nadir görülmesine rağmen, Güney Çin’de yaygın olup bölgedeki en sık teşhis edilen kanser türleri arasında yer almaktadır. Yapılan araştırmalar, bu kanserin gelişiminde EBV’nin birincil etiyolojik faktör olarak önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Murray et al. 2023).

1.3.6. Bağışıklık yetmezliği

HIV enfeksiyonu veya organ nakli sonucunda gelişen bağışıklık yetersizliği, baş ve boyun bölgesinde kanser gelişme riskinin artışıyla ilişkilendirilmiştir. HIV enfeksiyonu taşıyan bireylerde, AIDS ile ilişkili olmayan malignitelerin görülme sıklığı belirgin şekilde daha fazladır. Özellikle, HIV enfeksiyonu bulunan hastalarda HNSCC insidansında iki ila üç kat artış gözlemlenmektedir (McCarter et al. 2016).

1.3.7. Diğer risk faktörleri

HNSCC gelişiminde, mesleki veya çevresel karsinojenlere maruz kalma (örneğin, asbest veya odun tozu), yetersiz ağız hijyeni, dengesiz beslenme ve genetik yatkınlık gibi çeşitli risk faktörleri yer almaktadır. Ayrıca, ağız boşluğunun kronik inflamasyonu ve enfeksiyonları, özellikle kronik periodontitis, HNSCC riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir (Bosetti et al. 2020).

1. GİRİŞ

Beslenme alışkanlıkları da bireylerin baş ve boyun kanserlerine karşı korunmasında veya bu hastalıklara duyarlılıklarının artmasında önemli bir rol oynayabilmektedir. Yapılan çok sayıda çalışma, meyve ve sebze tüketiminin baş ve boyun kanserleri üzerinde koruyucu bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşın, vaka kontrol çalışmaları, yüksek oranda eklenmiş nitrit içeren konserve etlerin sık tüketilmesinin nazofarenks karsinomu riskini artırabileceğini göstermektedir.

Radyoterapi öyküsü hem benign hem de malign hastalıklar açısından belirli riskler taşımaktadır. Daha önce radyasyon tedavisi uygulanmış bireylerde tiroid kanseri, tükürük bezi tümörleri, skuamöz hücreli karsinomlar (SCC) ve sarkomların insidansında artış gözlemlenmiştir. Bu ilişkinin varlığı kabul edilse de potansiyel olumsuz etkilerin ortaya çıkmasında belirli bir zaman gecikmesi olduğu ve genel riskin nispeten düşük kaldığı unutulmamalıdır (Murray et al. 2023).

1.4. Baş ve Boyun Kanseri Mutasyonlar, Sinyal Yolları ve Hedeflenebilir Mekanizmalar

1.4.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)

EGFR, hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez ve kanser hücrelerinin metastazını düzenleyen önemli bir molekül olduğu için kanser tedavisinde sıkça hedeflenen bir reseptördür. Bu transmembran protein, EGF ve TGF- α gibi ligantlarla bağlandığında, Erb ailesi proteinleriyle (ErbB2, ErbB3, ErbB4) dimerleşir ve MAPK kaskadları ile PI3K/AKT/mTOR yolunu aktive ederek hücre içi sinyal yollarını uyarır. Bu sinyaller, tümör gelişimi ve metastazları teşvik eden genlerin aktivasyonuna neden olur (Song et al. 2004; Goerner et al. 2010). Klinik araştırmalarda, EGFR ve VEGFR yollarını hedef alan inhibitörler ve monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. EGFR'in aşırı ekspresyonu, HNSCC'nin yaklaşık %90'ında görülen kötü prognoz belirteçlerinden biridir (Argiris et al. 2008).

1. GİRİŞ

1.4.2. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

VEGF, anjiyogenezden sorumlu ve yeni kan damarlarının oluşumunu uyaran önemli bir sinyal molekülüdür (Hinerman et al. 2004). VEGF'nin aşırı ekspresyonu, HNSCC vakalarının çoğunda tümör büyümesini, hücre hareketliliğini ve metastazları destekler. Tümör hücrelerinin aktive ettiği anjiyogenez, radyoterapi gören hastalarda tedaviye duyarlılığı azaltabilir (Minchenko et al. 1994).

1.4.3. PI3K/AKT/mTOR Yolu

PI3K/AKT/mTOR yolu, hücre döngüsünü düzenleyen bir hücre içi sinyal yoludur (LoPiccolo et al. 2008). Bu yolun aktive olması, tümörde apoptozun azalmasına ve hücre çoğalmasının artmasına yol açar. mTOR, HNSCC'de aktive olarak potansiyel bir terapötik hedef olarak öne çıkmaktadır (Liu et al. 2009).

1.4.4. Siklin bağımlı kinazlar (CDK)

Siklin bağımlı kinazlar, hücre döngüsünün düzenlenmesinde kritik bir rol oynar ve kanser gibi hastalıkların patogenezinde etkili olabilir (Goel et al. 2020). Çeşitli CDK inhibitörleri, HNSCC tedavisine yönelik olarak hem klinik öncesi hem de klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir. CDK 4/6 inhibitörleri arasında yer alan ribosiklib, HPV negatif HNSCC modellerinde sitostatik etki göstermiştir (Van et al. 2020). Başka bir çalışmada ise ribosiklib'in, HNSCC hücre hatlarında hücre döngüsünü durdurarak proliferasyonu baskıladığı ve bunun yanı sıra radyosensitizasyon etkileri sergilediği belirlenmiştir. Bu bulgular, CDK 4/6 inhibitörlerinin radyoterapi ile birlikte uygulanmasının HNSCC tedavisinde potansiyel bir tedavi stratejisi sunabileceğini göstermektedir (Tai et al. 2019).

1.4.5. Aktivin reseptör benzeri kinaz-1 (ALK1)

ALK1, TGF- β ailesine ait bir kinaz olup anjiyogenez ve damar gelişimini düzenleyen önemli bir moleküldür (Cunha and Pietras 2011).

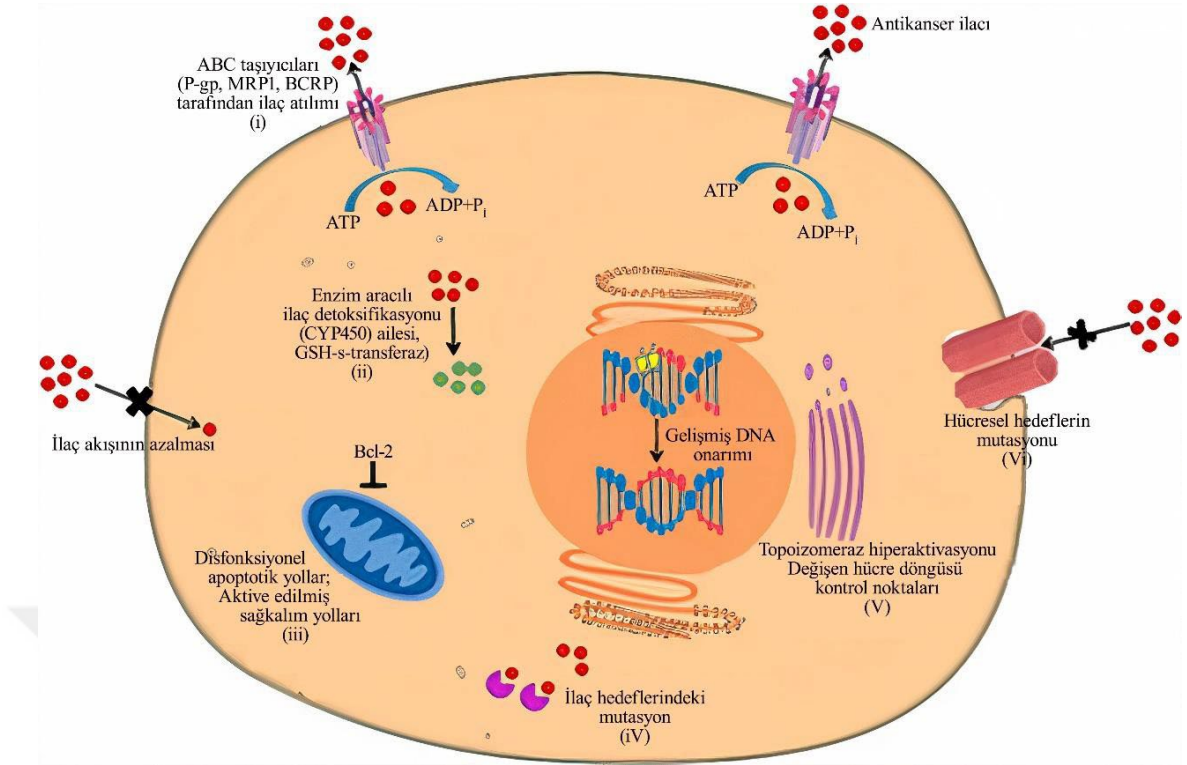
1.4.6. Transkripsiyonun sinyal dönüştürücüsü ve aktivatorü 3 (STAT3)

STAT3, hücre çoğalması, hayatta kalma, farklılaşma ve anjiyogenez gibi birçok hücrel süreçte yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. Kanser hücrelerinde STAT3, immünoşüpresif faktörlerin ifadesini azaltırken büyüme faktörlerinin ifadesini artırarak aşırı aktif hale gelir (Zou et al. 2020). Ayrıca, STAT3'ün bazı kontrol noktası moleküllerinin (PD-1, CTLA-4) artan ifadesinde yer aldığı bulunmuş, bu da STAT3 inhibitörlerinin kontrol noktası terapileriyle kombinasyonunun terapötik potansiyelini arttırmış ve direnci azaltmıştır (Goel et al. 2022)

1.5. Baş Boyun Kanseri İlaç Direnci: *MDR1* Geninin Etkisi

Çoklu ilaç direnci (MDR), tümör hücrelerinde kemoterapötik ilaçların hücre içi birikiminin azalması veya değişmesi ile birlikte gelişen çapraz direnç olgusudur (Tariq et al. 2020). Çoğu durumda, MDR mekanizması, *MDR1* geni tarafından kodlanan P-glikoproteinlerin (P-gp) aşırı eksprese edilmesiyle yakından ilişkilidir. P-gp, kanser hücrelerinin plazma membranında yüksek düzeyde bulunarak ATP bağımlı ilaç dışı akışını tetikler, bu da tümör hücrelerinde ilaç birikiminin azalmasına ve kemoterapinin başarısız olmasına yol açmaktadır (Tsuruo et al. 2003; Risnayanti et al. 2018).

MDR gelişiminde çeşitli biyokimyasal ve genetik mekanizmalar etkili olmaktadır. Bu mekanizmalar arasında; ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları aracılığıyla ilaçların hücre dışına aktif olarak atılması, hücrel metabolizma ve detoksifikasyon süreçleri yoluyla ilaçların inaktivasyonu, apoptotik yolların işlevsiz hale gelmesi, ilaç hedeflerinde meydana gelen mutasyonlar, DNA onarım mekanizmalarının etkinliğinin artması ve hücrel hedeflerde gerçekleşen genetik değişiklikler bulunmaktadır (Şekil 1.2) (Yadav et al. 2022).



Şekil 1.2. Kanser hücrelerinde MDR gelişimine katkıda bulunan mekanizmalar (Orijinal yazılar Türkçe'ye çevrilmiştir) (Yadav et al. 2022).

1.6. *MDR1* Gen Susturulması: siRNA ile Çoklu İlaç Direncinin Aşılması

Gen susturulması, gen ifadesinin epigenetik bir değişikliği olarak tanımlanır ve genellikle daha önce aktif olan bireysel genlerin veya büyük kromozomal bölgelerin inaktive edilmesine yol açar. Genlerin baskılanmasında rol oynayan mekanizmalar, DNA metilasyon seviyelerinde gerçekleşen değişiklikler ile kromatin sıkışmasına neden olan histon proteinlerinin kovalent modifikasyonlarını içerir; bu değişiklikler, genlerin transkripsiyonel süreçlerden uzak durmasına neden olur (Filipowicz and Paszkowski, 2013).

Susturma, hücrelerin gen ekspresyonunu kontrol etmek amacıyla kullandığı bir süreçtir. Fizyolojik anlamda susturma, hedef RNA'nın 3' çevrilmemiş bölgesine özgül bir şekilde bağlanan endojen küçük RNA molekülleri (miRNA'lar, 20-25 nükleotid uzunluğunda) tarafından gerçekleştirilir ve bu süreç translasyonu engellemek için çalışır. Bu süreç RNA interferansı (RNAi) olarak adlandırılır. Terapötik amaçlarla RNA interferansını kontrol etmek için, kimyasal olarak sentezlenen siRNA'lar veya küçük saç tokası inhibitör RNA'lar (shRNA'lar) kullanılır. shRNA'lar, iki iplik arasında kısa bir

1. GİRİŞ

halka bulunan modifiye edilmiş siRNA'lardır ve Dicer (ribonükleaz III) tarafından fonksiyonel bir siRNA'ya dönüştürülebilir. siRNA'nın antisens ipliği, hedef RNA'ya tamamlayıcı olarak tasarlanır. Bu bağlanma, transkripsiyonel baskılama oluşturacak şekilde RNA kaynaklı susturma kompleksini (RISC) meydana getirir. Deneysel veriler, siRNA'nın hücreye zarar verebileceğini ve bu nedenle yapay miRNA'ların kullanımının daha uygun olabileceğini göstermektedir (Priori et al. 2018).

1.7. siRNA Aracılı Gen Susturmanın Avantajları

Moleküler biyoteknolojideki hızlı ilerlemelerle birlikte, kodlamayan RNA'ların daha önce tahmin edilenden çok daha önemli işlevler üstlendiği giderek daha fazla keşfedilmekte ve bu RNA türlerinin yeni sınıfları tanımlanmaktadır. Bu sınıflardan, küçük girişimci RNA'lar (siRNA'lar) ve mikroRNA'lar (miRNA'lar) özellikle dikkat çekmektedir, çünkü gen düzenlemesindeki rolleri, onları ilaç keşfi ve geliştirilmesi için potansiyel hedefler haline getirmektedir. Gerçekte, siRNA'lar ve miRNA'ların terapötik potansiyeli, kanserler (Bader et al. 2011; Tabernero et al. 2013; Schultheis et al. 2014) ve enfeksiyonlar gibi birçok hastalığın tedavisinde başarılı bir şekilde gösterilmiştir (DeVincenzo et al. 2010; Chandra et al. 2012; Sendi et al. 2015). Geleneksel küçük terapötik moleküllerle karşılaştırıldığında, siRNA'lar ve miRNA'lar, özellikle "ilaçla tedavi edilemeyen" hedefler üzerinde etkili olma avantajı sunar; örneğin, enzimsiz işlevlere sahip ya da geleneksel ilaç moleküllerinin ulaşamadığı konformasyonlara sahip proteinler üzerinde etkili olabilirler (Daka and Peer, 2012). Bu RNA'lar, neredeyse herhangi bir geni hedef alacak şekilde tasarlanabilme esnekliğine sahiptir.

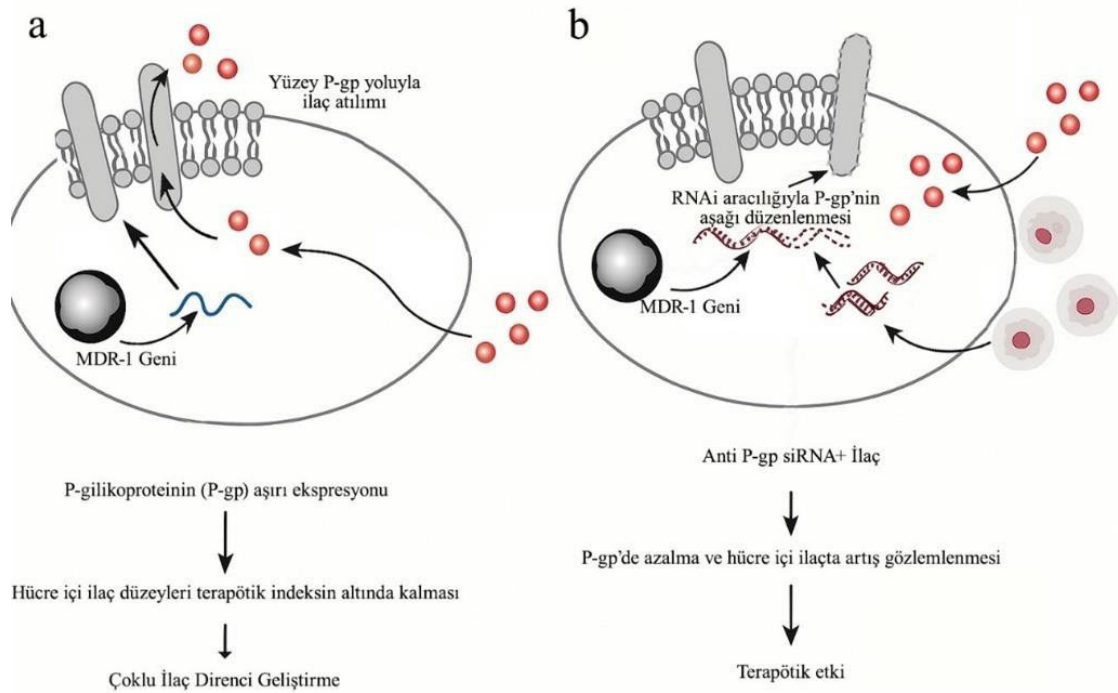
siRNA temelli terapötik stratejiler, hedef hücrelere sentetik siRNA'nın verilmesini ve böylece RNAi tetiklenmesini içerir. Bu işlem, belirli bir haberci RNA'nın (mRNA) ekspresyonunu inhibe ederek gen susturulmasını sağlamak için kullanılır (Behlke, 2006).

P-gp aracılı MDR'yi baskılamak amacıyla çeşitli P-gp inhibitörleri (Dantzig et al. 2003) veya substratları (Ni et al. 2011) kullanılabilir. Ancak, bu bileşiklerin yan etkileri, hedef dışı dokulara yönelimi ve kemoterapötik ilaçlarla etkileşimleri, klinik uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, P-gp ekspresyonunu baskılamak ve

1. GİRİŞ

MDR1 genini susturmak için güvenli bir alternatif olarak siRNA kullanılabileceği önerilmektedir (Essex et al. 2014). siRNA yaklaşımı, kimyasal inhibitörlere kıyasla daha düşük yan etki profili ve yüksek özgüllüğü ile önemli avantajlar sunmaktadır. Özellikle, siRNA'nın hücre zarlarından pasif difüzyon yoluyla geçememesi, spesifik olmayan dokular üzerindeki toksisitesini azaltarak hedeflenmiş gen susturma etkinliğini artırmaktadır (Aagaard and Rossi 2007).

Şekil 1.3 a'da P-gp'nin aşırı eksprese edilmesi nedeniyle kemoterapötik ilaçların hücre dışına atıldığı ve bunun sonucunda hücre içi ilaç birikiminin terapötik seviyenin altına düşerek MDR'nin geliştiği gösterilmektedir. Şekil 1.3 b'de ise siRNA aracılığıyla P-gp ekspresyonunun baskılanmasının, hücre içi ilaç birikimini artırarak kemoterapinin etkinliğini yükselttiği gösterilmektedir. Bu süreç, ilaçların hücre içinde daha uzun süre kalmasını sağlayarak kanser tedavisinde daha güçlü bir terapötik etki oluşturmaktadır (Essex et al. 2014).



Şekil 1.3. MDR'nin mekanizması (a) ve siRNA ile hedeflenmesi (b) (Orijinal yazılar Türkçe'ye çevrilmiştir) (Essex et al. 2014).

1.8. Baş ve Boyun Kanserinde Tanı ve Evreleme

Dünya genelinde her yıl yaklaşık 500.000 hastaya oral kavite, larinks ve nazofarenks kanseri tanısı konulmakta olup, bu vakaların yaklaşık 270.000'i mortalite ile sonuçlanmaktadır (Y. Wang et al. 2021). Günümüzde, hastaların preoperatif değerlendirilmesi amacıyla manyetik rezonans görüntüleme (MR), bilgisayarlı tomografi (BT) ve pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi ileri görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Oral kavite ve nazofarenks tümörlerinde, yumuşak doku değerlendirmesinde daha iyi sonuçlar vermesi nedeniyle MR daha çok tercih edilebilmektedir (Wiggins et al. 2022). Öte yandan, PET erken evre tümörlerde rutin bir tarama yöntemi olarak kullanılmamakla birlikte, ileri evre tümörlerin değerlendirilmesinde giderek artan bir öneme sahiptir (Jadvar et al. 2017). Görüntüleme işlemlerinin kontrastlı olarak gerçekleştirilmesi, elde edilen verilerin doğruluğunu ve tanısal güvenilirliği artırmaktadır (Beckett et al. 2015).

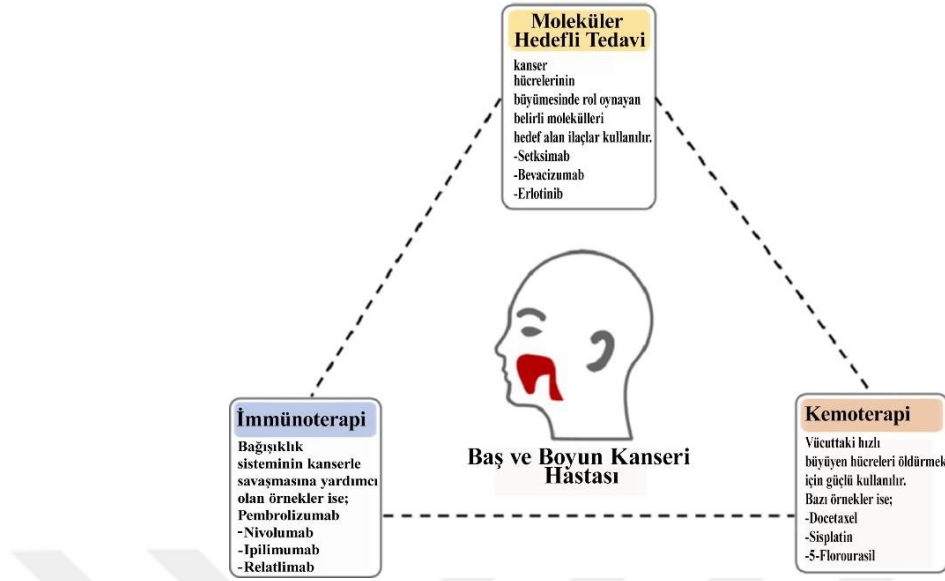
AJCC/UICC TNM sınıflandırma sisteminin sekizinci baskısı HNSCC evrelenmesinde uluslararası düzeyde kabul gören bir kılavuz olup, standart bir terminoloji sağlamaktadır (Kang et al. 2024). Radyoloğun temel görevi, klinisyenin doğru TNM evrelemesi yapmasına olanak tanıyacak şekilde görüntüleme bulgularına dayalı olarak tümörün anatomik özelliklerini değerlendirmektir. “T” kategorisi, birincil tümörün boyutunu ve yayılımını ifade eder. Sınıflandırma, tümöre dair herhangi bir bulgunun olmadığı T0’dan, tümörün boyutunun büyük olduğu ve çevre dokulara invazyon gösterdiği T4’e kadar değişkenlik göstermektedir. T evrelemesi, tümörün bulunduğu bölgeye bağlı olarak farklılık gösterdiğinden, doğru sınıflandırma için evreleme tablosuna başvurmak gereklidir. “N” kategorisi, bölgesel lenf nodu metastazının derecesini belirtir. Servikal lenf nodu tutulumu, HNSCC hastalarının prognozunu doğrudan etkileyen önemli bir faktördür. Özellikle, ektranodal yayılımın (ENE) belirlenmesi, tümör evresinin yükseltilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. “M” kategorisi, uzak metastazın varlığını (M1) veya yokluğunu (M0) ifade eder. HNSCC, öncelikli olarak akciğerlere, ardından kemik ve karaciğere metastaz yapma eğilimindedir (Dmytriw et al. 2014).

1.9. Baş ve Boyun Kanserinde Tedavi Yöntemleri

HNSCC tedavisi, hastalığın TNM evresi ve primer tümörün lokalizasyonuna bağlı olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapinin farklı kombinasyonları ile gerçekleştirilmektedir. Bunun yanı sıra, immünoterapi ve moleküler hedefe yönelik tedaviler de klinik çalışmalarda önemli bir yer tutmaktadır (Şekil 1.4). Sınırlı veya erken evre (evre I ve II) hastalık, HNSCC tanısı alan bireylerin yaklaşık %40'ında başlangıç aşamasında tespit edilmekte olup, bu evrede genellikle tek başına cerrahi müdahale veya radyoterapi yeterli olmaktadır (Marur and Forastiere 2008; Pfister et al. 2013). Lokal olarak ilerlemiş hastalığı bulunan (evre III ve IVA/B) hastalar için tedavi yaklaşımı, tümörün cerrahi olarak çıkarılabilir olup olmamasına göre değişmektedir. Bu evrede, hastaların büyük bir kısmında tedavi platin bazlı kemoradyoterapi ile sağlanmakta olup, bazı vakalarda indüksiyon kemoterapisi (IC) de tedavi sürecine dahil edilebilmektedir. Metastatik hastalıkta ise tedavi, hastanın genel performans durumuna bağlı olarak belirlenmektedir. İyi performans gösteren hastalar için kombine kemoterapi tercih edilirken, düşük performans durumuna sahip hastalarda tek ajanlı kemoterapi veya en iyi destekleyici bakım uygulanmaktadır (Marur and Forastiere, 2016).

Lokal veya bölgesel hastalık nükslerinde tedavi seçeneği, tekrarlayanın meydana geldiği bölge, tümör yükü ve hastanın daha önce aldığı tedavilere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu durumda, hastalığın cerrahi veya radyoterapi ile tamamen ortadan kaldırılmasının mümkün olmadığı vakalarda, cerrahi sonrası radyoterapi, kemoterapi ile birlikte yeniden ışınlama veya yalnızca kemoterapi gibi farklı tedavi stratejileri uygulanabilmektedir. Tüm bu tedavi yaklaşımları, cerrahi ya da cerrahi olmayan yöntemlerin benimsenmesine bakılmaksızın, belirli bir düzeyde organ fonksiyon kaybına yol açabilecek toksisite riskini de beraberinde getirmektedir (Marur and Forastiere 2008).

Baş ve Boyun Kanseri hastalarının tedavisi için klinik çalışmalarda kullanılan başlıca tedavi yaklaşımları



Şekil 1.4. Baş ve boyun kanseri tedavisinde kullanılan başlıca terapötik yaklaşımlar (Orijinal yazılar Türkçe'ye çevrilmiştir) (Goel et al. 2022).

1.9.1. HNSCC'de kemoterapi

Lokalize HNSCC, genellikle multidisipliner bir yaklaşımla cerrahi ve/veya kemoradyoterapi kullanılarak tedavi edilmektedir. Eş zamanlı kemoterapi, özellikle postoperatif dönemde veya cerrahi uygulanamayan hastalarda klinik sonuçları iyileştirdiği gösterilmiş bir yöntemdir. Bu tedavi yaklaşımı, radyoterapi ile birlikte uygulanan docetaxel, cisplatin ve 5-FU kombinasyonunu içermektedir (Pignon et al. 2009).

1.9.2. HNSCC tedavisinde kullanılan monoklonal antikorlar

HNSCC tedavisinde kullanılan ve klinik çalışmalarda etkinliği gösterilerek onaylanmış üç temel monoklonal antikor bulunmaktadır: Cetuximab, Pembrolizumab ve Nivolumab. Bu ilaçlar, farklı mekanizmalarla tümör hücrelerini hedef alarak tedavi sürecine katkıda bulunmaktadır (Goel et al. 2022).

Cetuximab, EGFR inhibitörü olarak etki gösterir. İlk olarak 2006 yılında platin bazlı tedavi sonrasında ve radyoterapi ile kombinasyon halinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. 2009 yılında ise platin–fluorourasil bazlı kemoterapiyle kombinasyon

1. GİRİŞ

halinde, rekürren/metastatik HNSCC (R/M HNSCC) tedavisinde kullanımına izin verilmiştir (Bonner et al. 2006).

Pembrolizumab, programlanmış hücre ölümü reseptörü-1 (PD-1) inhibitörü olup 2016 yılında, platin bazlı kemoterapi sonrası HNSCC tedavisi için onaylanmıştır. 2019 yılında ise metastatik veya cerrahi olarak çıkarılamayan rekürren HNSCC tedavisinde, tüm hastalar için platin ve fluorourasil (FU) ile kombinasyon halinde ve PD-L1 ekspresyonu olan hastalarda tek başına kullanılmak üzere onay almıştır (Seiwert et al. 2016; Burtneş et al. 2019).

Nivolumab, bir diğer PD-1 inhibitörü olup, 2016 yılında platin bazlı tedaviye rağmen hastalığı ilerleyen rekürren/metastatik HNSCC hastaları için onaylanmıştır. Bu monoklonal antikorlar, farklı mekanizmalarla tümör hücrelerinin büyümesini baskılamak, bağışıklık sisteminin anti-tümör yanıtını artırmak ve hastaların sağkalım süresini uzatmak amacıyla HNSCC tedavisinde kullanılmaktadır (Ferris et al. 2016).

1.9.3. HNSCC tedavisinde immünoterapi

Baş ve boyun kanserlerinde moleküler hedefli tedavilerin yoğunlaştırılması, genel sağkalım oranlarını belirgin şekilde artırmak için yeterli olmamaktadır. Bu nedenle, özellikle HPV ile ilişkili malignitelere sahip hastalar için immünoterapi, geleneksel tedavilerin ciddi yan etkileri olmadan umut vadeden yeni bir tedavi seçeneği sunmaktadır (Goel et al. 2022).

Bağışıklık sisteminin etkin bir şekilde çalışması durumunda, tümör hücrelerine karşı doğal bir direnç sağlayabileceği artık yaygın olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda, CTLA-4 ve PD-1/PD-L1 gibi negatif sinyal yollarının bloke edilmesi veya yardımcı uyarıcı sinyallerin indüklenmesi, bağışıklık yanıtının güçlendirilmesine yönelik stratejiler arasındadır. Bu kapsamda, MEDI0562 (OX-40 hedefli), urelumab ve utomiliumab (CD137 hedefli) ve motolimod (toll-benzeri reseptör-8 agonisti) gibi agonistik monoklonal antikorlar, bağışıklık sisteminin aktivasyonunu sağlamak amacıyla çeşitli klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir (Bauman et al. 2017).

Ayrıca, kemoterapinin yalnızca sitotoksik etkileriyle değil, aynı zamanda immünojenik değişiklikler yoluyla bağışıklık sistemini aktive edebileceği de bilinmektedir. Örneğin, cisplatin majör histokompatibilite kompleksi I (MHC-I) ekspresyonunu artırarak ve efektör hücrelerin litik aktivitesini yükselterek tümör mikroçevresinde immünosupresif sinyalleri düzenleyebilmektedir. Bu bulgular, immünoterapinin kemoradyoterapi ile kombinasyon halinde kullanılarak HNSCC’de klinik sonuçları iyileştirebileceğini göstermektedir (De Biasi et al. 2014).

İmmünoterapiler, HPV pozitif ve HPV negatif olmak üzere farklı tümör alt tiplerinde test edilmektedir. Klinik çalışmalarda, HPV pozitif vakalarda E6 ve E7 gibi virüse özgü tümör antijenlerinin hedef alınmasının etkili bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir. Son klinik veriler, kontrol noktası inhibitörlerinin doğru kullanımıyla sağkalım oranlarının önemli ölçüde artırılabilirliğini ortaya koymaktadır (Goel et al. 2022).

1.10. İlaç Taşıma Sistemleri ve Nanopartiküller

Geleneksel kemoterapötik ilaçların büyük bir kısmı, düşük farmakokinetik özelliklere sahip olup, vücuda yayılmaları sırasında spesifik olmayan şekilde dağılmaları nedeniyle ciddi yan etkilerle birlikte sistemik toksisiteye yol açmaktadır (Ojima et al. 2002). Bu olumsuz durumların önüne geçebilmek amacıyla, etkin madde dozunun azaltılması, uygulama aralığının uzatılması, yan etkiler ve toksisite risklerinin en aza indirilmesi, ayrıca ilaçların hedef bölgeye etkin bir şekilde ulaşmasını sağlayan ilaç taşıma sistemleri üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu sistemlerden biri de son yıllarda büyük ilgi gören nano ilaçlardır. Nano, Yunanca “cüce” anlamına gelen “nanos” kelimesinden türetilmiştir. Bir nanometre, bir metrenin milyarda biri büyüklüğündedir (Tüylek 2017). Nanoteknoloji, genellikle 1-100 nm boyutlarındaki çok küçük parçacıkların incelenmesini ve kullanımıyla ilgili bir bilim dalıdır (Gupta and Kompella 2006).

Nanoteknoloji, patolojik süreçlerin erken tespiti, önlenmesi ve hedefe yönelik tedavi yöntemleri gibi tıbbi amaçlarla, organik ya da sentetik nano-ölçekli materyallerin kimyasal, fiziksel, elektriksel, optik ve biyolojik özelliklerinden faydalanılması olarak

1. GİRİŞ

tanımlanabilir. Nano ilaçlar ve nano ilaç taşıma sistemleri sayesinde, biyoyararlanımı düşük olan ilaçların doğrudan hedeflenen bölgelere iletilmesi, tanıya yönelik daha etkili görüntüleme tekniklerinin geliştirilmesi ve özellikle kanserli dokuların daha yüksek doğrulukla tespiti gibi önemli avantajlar elde edilebilmektedir (Yavuz ve Marangoz 2018). Ayrıca, nanopartiküllerin yüzeyleri kanser hücrelerinde yoğun olarak bulunan reseptörlerle etkileşime girebilecek spesifik ligandlarla modifiye edilerek, sağlıklı hücreler yerine kanserli hücreler daha yüksek afiniteyle hedeflenebilmektedir (Danhier et al. 2010).

1.11. Nanopartiküllerde Aktif ve Pasif hedefleme

1.11.1. Pasif hedefleme

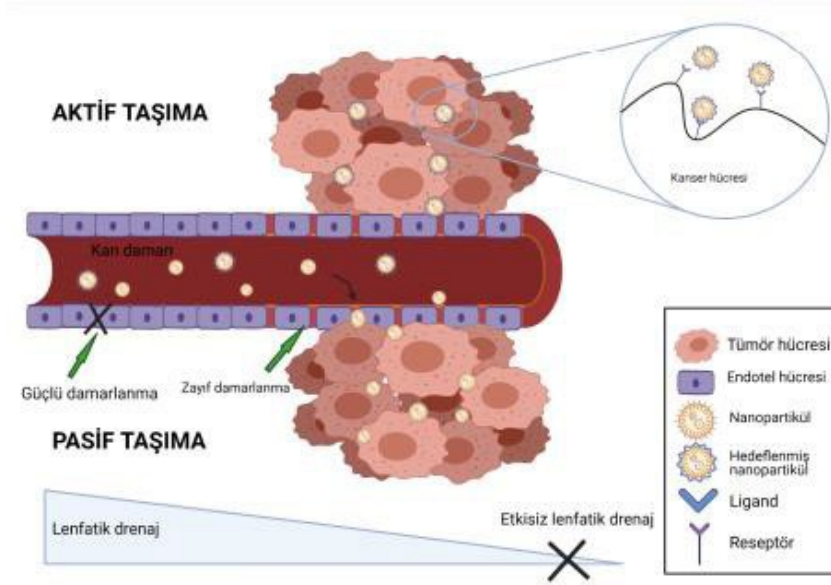
Tümör bölgesinde, agresif damarlanma süreci sırasında vasküler bariyerin bozulması sonucu, tümör dokusunda nano taşıyıcıların birikmesine yol açar (Maeda et al. 2013). Tümör damarlarındaki endotelial hücreler arasındaki mesafeler, tümör tipine, bulunduğu yere ve çevresel koşullara bağlı olarak 200 ile 2000 nm arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Ayrıca, lenfatik sistemin zayıf işlevi nedeniyle, nanopartiküller tümör interstisyumunda biriktiğinden, bu partiküller kolaylıkla tümör bölgesinden temizlenemez (Jain and Stylianopoulos 2010). Bu durum, pasif taşımanın temelini oluşturan EPR (Enhanced Permeability and Retention) etkisi olarak bilinir (Navya et al. 2019). İlacın hedef tümör dokusuna bırakılması için, ilaç dolaşımında uzun süre kalmalıdır. Pasif taşıma, EPR etkisi sayesinde ilacın tümör bölgesinde birikmesini ve doku içinde uzun süre kalmasını sağlar. Nano taşıyıcıların tümör dokusundaki birikimi, partikül boyutu, şekli (morfoloji), yüzey yükü ve yüzey kimyası gibi fizikokimyasal özelliklere bağlıdır (Bertrand et al. 2014). Ayrıca, nanomateryal-ilac formülasyonunun biyolojik sistemlerdeki dağılımı, kan perfüzyonundan, sistemik yol boyunca biyomoleküllerle pasif etkileşimlerden ve fagositoz ya da renal klirens gibi immünolojik temizlik süreçlerinden etkilenmektedir (Rosenblum et al. 2018). Bu nedenle, nanopartiküllerin boyutunun 10 nm ile 200 nm arasında olması gerektiği belirtilmektedir, böylece retikulo-endotelial sistemdeki makrofajlardan kaçabilecek kadar küçük ve kapillerlerden geçişi engelleyecek kadar büyük olur (Chitgupi et al. 2017).

Tümör hücrelerinin pasif hedeflenmesine yönelik başarılı uygulamalarla ilgili birkaç çalışma bulunmaktadır (Navya et al. 2019). İlaçların kaplanması da pasif taşımaya dahildir; ilaçların bir maddeyle kaplanması, kontrollü biyoyayılım ve salınımla sonuçlanır (Shi et al. 2016). Pasif hedefleme yöntemlerinin terapötik etkinliği, EPR etkilerinin tümörlerdeki heterojenliği ile sınırlıdır. Şiddetli tümör hücre büyümesinden kaynaklanan değişken endotel boşlukları nedeniyle, nanopartiküllerin hedef alandan homojen olmayan bir şekilde damar dışına çıkması ve çevre dokuya yayılması söz konusu olabilir (Chauhan and Jain 2013). EPR tabanlı pasif hedefleme, temel hedefleme mekanizması olarak kabul edilmekte ve in vivo çalışmalarda etkinliği kanıtlanmış olsa da, yine de bazı sınırlamalara sahiptir. Özellikle erken evrelerde bazı tümörler EPR etkisi göstermeyebilir. Ayrıca, aynı tümör içinde bile vasküler geçirgenlik homojen olmayabilir, bu nedenle EPR etkisine dayalı nanoparçacıklar sınırlı bir etkinlik gösterebilir (Peer et al. 2020).

1.11.2 Aktif hedefleme

Biyolojik engellerin etkilerini iyileştirmek ve bağışıklık engelini en aza indirmek amacıyla, nano ilaç formülasyonlarına ek olarak hedefleme işlevselliği gereklidir. Bu, aktif hedefleme gereksinimini işaret eder (Navya et al. 2019). Ligand aracılı hedefleme yöntemi olarak da bilinen aktif hedefleme, hedef hücrelerin bağlandığı ve bu hücreler tarafından kolayca alınmasını sağlayan, afiniteye dayalı tanıma ve tutma özelliklerini içerir. Nanomateryal tabanlı akıllı ve hedeflenmiş sistemler, ligandların hedef antijenlerle etkileşim özelliğini kullanır (Bertrand et al. 2014).

Pasif hedefleme ile karşılaştırıldığında, aktif hedeflemenin en belirgin avantajları arasında, daha gelişmiş tümör hedefleme yeteneği ve genellikle reseptör aracılı endositoz yoluyla ilacın dokuda birikme potansiyeli bulunur (Chitgupi et al. 2017). Birçok biyomolekül, antikolar, proteinler, nükleik asitler, peptitler, karbonhidratlar ve vitaminler gibi küçük organik moleküller, hedefleme amacıyla ligand olarak kullanılabilir (Verma and Stellacci 2010; Mout et al. 2012).



Şekil 1.5. Kanser hücrelerine nanopartikül taşınımında aktif ve pasif hedefleme (Yao et al. 2020).

Şekil 1.5’te görüldüğü üzere, pasif hedefleme mekanizması, EPR etkisine bağlı olarak tümör bölgesinde nanopartiküllerin birikmesini sağlarken, aktif hedefleme ligand-reseptör etkileşimleri aracılığıyla spesifik hücresel alımı artırmaktadır.

1.12. Çinko Fosfat Nanopartikülleri

Çinko fosfat (ZnP), su veya biyolojik ortamda düşük çözünürlüğe sahip olduğu için toksik olmayan bir malzeme olarak korozyon önleyici, tıp, elektrik gibi birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Del Amo et al. 1998; Czarnecka et al. 2003). Çeşitli ham maddeler kullanılarak bir dizi ZnP sentezi yöntemi geliştirilmiştir, ancak bu ürünler nanomalzeme olarak kabul edilmemektedir (G. Sziklai et al. 1982; Grzmil et al. 2007). Öte yandan, ZnP’lern kanser tedavisindeki potansiyeli üzerine yapılan araştırmalar şu ana kadar oldukça sınırlıdır (Vafaei et al. 2020).

ZnP nanopartikül (ZnP NP), kemoterapi tedavisinde ilaç yükleme alanı sağlamakla birlikte, düşük pH’lı hafif asidik koşullar altında bozunma özellikleri sayesinde tümör bölgesine ulaşmadan önce ilacın erken salınımını ve inaktivasyonunu engelleyerek koruyucu bir rol üstlenebilir. Ayrıca, bu malzemeler, yüklenen ilaçların asidik ortam ve H_2O_2 seviyelerini artırarak glikoz oksidasyonunu katalize eder ve açık

terapisi başlatabilir. Bunun yanı sıra, terapötik amaçlarla akıllı dağıtım sistemlerinin etkinliğini tetikleyen güçlü endojen uyarıcılar olarak da kullanılabilirler (Yuan et al. 2024).

ZnP'lerin yüzey özellikleri, pH, sıcaklık, reaksiyon süresi ve substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. ZnP NP'ler, tek adımlı ve kolay sentez prosedürleriyle, geleneksel yöntemlere göre toksik kimyasallar ve yan ürünlerden kaçınarak daha çevre dostu sentez protokollerine sahip olabilir. Ayrıca hem sentetik hem de doğal polimerle modifiye edilmiş ZnP NP'ler, küçük moleküler boyutları ve membranlardan geçişteki kolaylıkları sayesinde hedeflenmiş uygulamalar için biyouyumluluğu artırma gibi gelişmiş özellikler sunar. Buna ek olarak, polimerle işlevselleştirilmiş ZnP'ler, biyoteknoloji ve elektrokimya alanlarında hem in vitro hem de in vivo çalışmalar için cazip bir araştırma konusu oluşturabilir (Shathi et al. 2022).

1.13. Silika Nanopartikülleri

Silika nanopartiküller (SiO_2), son yıllarda ilaç taşıma sistemlerinde büyük ilgi görmüş ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Narayan et al. 2018). Yüksek yüzey alanı, ayarlanabilir gözenek boyutu ve yüzey modifikasyonuna uygun yapısı sayesinde ilaçlardan proteinler, DNA ve RNA gibi makromoleküllere kadar geniş bir yelpazede kargo taşıyıcısı olarak kullanılabilir (Slowing et al. 2007; Möller et al. 2016; Cha et al. 2017). Özellikle, SiO_2 'lerin iç ve dış yüzeylerinin bağımsız fonksiyonelleştirilebilmesi ve gözenek açıklığının kontrollü kapılma mekanizmalarına uygun olması, hedefe yönelik ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesini sağlamaktadır (Narayan et al. 2018).

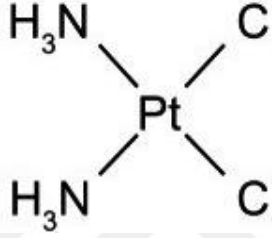
Bunun yanı sıra, SiO_2 'ler, yüklememe kapasitelerinin yüksek olması ve yüzey modifikasyonları ile hedeflenmiş taşıma stratejileri sunmaları nedeniyle dikkat çekmektedir (Solak et al. 2021). Uygun boyut aralığında (50-100 nm) tasarlanan ve modifiye edilen SiO_2 NP'leri, kan-beyin bariyerini (BBB) aşarak beyin dokusuna ulaşabilmektedir. Ayrıca, pH, redoks veya ısı gibi tetikleyiciler aracılığıyla kontrollü ilaç salımı gerçekleştirebilmekte, böylece sistemik yan etkilerin azaltılmasına katkıda

1. GİRİŞ

bulunmaktadır (Solak et al. 2025). Bu özellikleri sayesinde SiO₂, modern ilaç taşıma sistemlerinde umut vadeden bir platform olarak değerlendirilmektedir.

1.14. Cisplatin Kemoterapi İlacı

Cisplatin (CIS), merkezi bir platin (II) atomuna bağlı iki klorür ligandı ve iki amonyak molekülü içeren nötr bir koordinasyon kompleksidir (Şekil 1.6). Platin atomu, azot ile güçlü ve neredeyse geri dönüşümsüz kovalent bağlar oluştururken, klorür ligandlarıyla olan etkileşimleri sulu çözeltilerde, belirli pH ve sıcaklık koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Lugones et al. 2022).



Şekil 1.6. CIS'in moleküler yapısı (Dilruba ve Kalayda 2016).

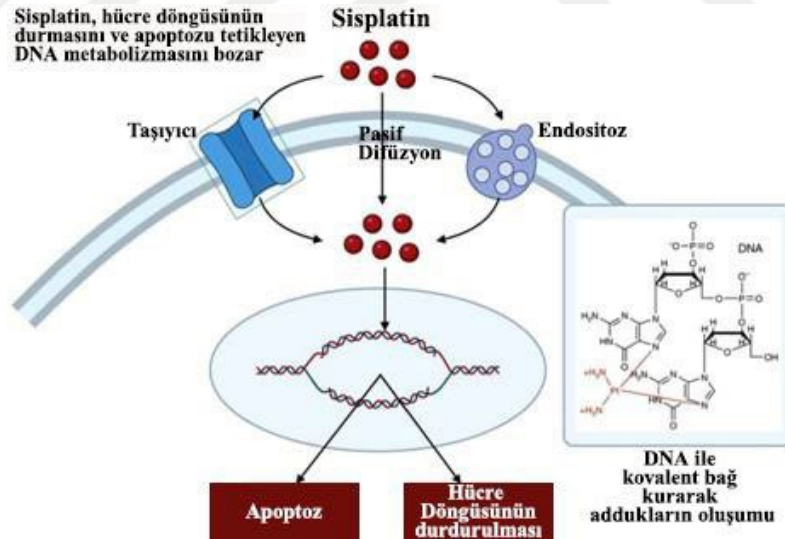
CIS ilk olarak 1844 yılında M. Peyrone tarafından sentezlenmiş olup, kimyasal yapısı 1893 yılında Alfred Werner tarafından tanımlanmıştır. Ancak, bu bileşiğe yönelik bilimsel ilgi 1960'lara kadar sınırlı kalmıştır. Michigan Eyalet Üniversitesi'nde Rosenberg ve arkadaşları tarafından 1965 yılında yapılan çalışmalar, platin örgü elektrotların belirli elektroliz ürünlerinin *Escherichia coli* hücrelerinde bölünmeyi inhibe edebildiğini ortaya koymuş ve bu bulgu, platin bazlı bileşiklerin kanser kemoterapisinde potansiyel bir ajan olarak kullanımına yönelik büyük bir ilgi uyandırmıştır. Bu araştırmalar sonucunda, söz konusu biyolojik aktiviteden sorumlu bileşik olarak cis- diklorodiaminplatin (II) (CIS) tanımlanmıştır. Bu keşiften itibaren, platin, paladyum ve diğer soy metallerin koordinasyon kompleksleri kanser tedavisinde önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir (Dasari and Bernard Tchounwou 2014).

CIS, yumurtalık, testis ve baş ve boyundaki solid tümörler de dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde antikanser aktivitesi gösterdiğinden özellikle ilgi çekici olmuştur.

1. GİRİŞ

1960’larda sitotoksik özelliklere sahip olduğu keşfedildi ve 1970’lerin sonunda germ hücreli kanserlerin sistemik tedavisinde anahtar bileşen olarak yerini aldı. Kanser için yaygın olarak kullanılan birçok kemoterapi ilacı arasında CIS en ikna edici olanlardan biridir. 1978’de kanser tedavisi için FDA tarafından onaylanan ilk platin bileşiği idi (Kelland, 2007) Bu, platin (II) ve diğer metal içeren bileşiklere potansiyel antikanser ilaçları olarak ilgi duyulmasına yol açmıştır (Frezza et al. 2010).

Hücre içine alındıktan sonra CIS, çekirdeğe taşınarak sitotoksik etkilerini burada göstermektedir (Şekil 1.7). Çekirdek içine girdikten sonra, akuasyon adı verilen bir süreçten geçer; bu süreçte, CIS molekülündeki bir veya her iki klorür ligandı su molekülleri ile yer değiştirir. Bu dönüşüm, çekirdek içindeki yüksek su konsantrasyonu tarafından kolaylaştırılmaktadır (Huang et al. 2015). Akuasyona uğrayan CIS, DNA ile kovalent bağlar oluşturarak DNA adduktları meydana getirir. CIS’in birincil hedefi pürin bazları olup, özellikle guanin (G) ve daha düşük oranda adenin (A) ile etkileşime girer. Bağlanma, öncelikli olarak G bazının N7 pozisyonunda gerçekleşirken, daha nadir olarak A bazının N3 pozisyonunda da meydana gelebilmektedir (Johnstone et al. 2013).



Şekil 1.7. CIS'in hücreye girişi ve DNA hasarı mekanizması (Orijinal yazılar Türkçe'ye çevrilmiştir) (Elmorsy et al. 2024).

CIS'in DNA ile etkileşimi, intrastrand (aynı iplik üzerinde) ve interstrand (karşılıklı iplikler arasında) çapraz bağların oluşumuna neden olmaktadır. Intrastrand çapraz bağlarda, CIS, aynı DNA ipliği üzerindeki bitişik guanin bazlarına bağlanarak bu iki baz arasında kovalent bir köprü oluşturur. Interstrand çapraz bağlarda ise CIS, karşıt

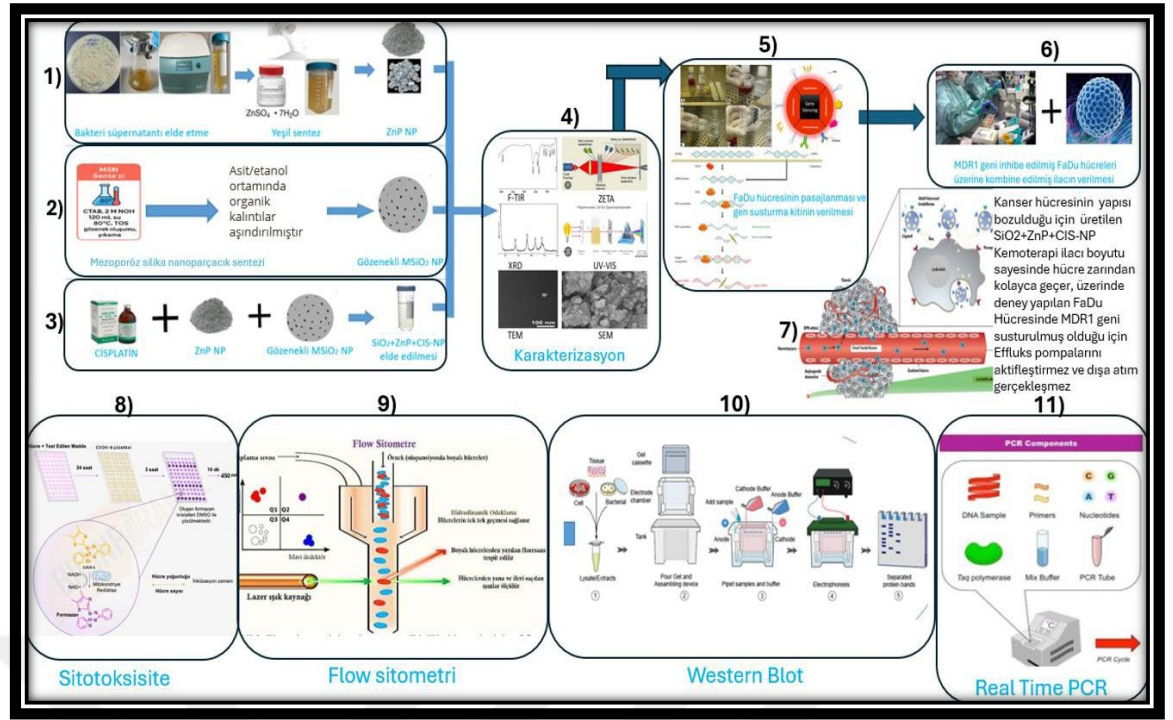
1. GİRİŞ

DNA ipliklerindeki G bazları ile etkileşime girerek DNA iplikleri arasında kovalent bir bağlanma meydana getirir (Chválová et al. 2007). CIS'in DNA ile kovalent bağ oluşturmaları sonucunda DNA molekülünde yapısal değişikliklere neden olan bileşikler, DNA adduktları olarak adlandırılır. Bu adduktlar, DNA çift sarmalında bükülme ve çözölmelere yol açarak yapısal bütünlüğü bozar ve DNA'nın normal işlevini sürdürmesini engeller (Bellon et al. 1991). Bununla birlikte, CIS kaynaklı DNA adduktlarının varlığı, DNA replikasyonu ve transkripsiyon süreçlerini olumsuz yönde etkiler. DNA'daki bu yapısal bozukluklar, DNA polimeraz ve RNA polimeraz enzimlerinin ilerlemesini engelleyerek replikasyon ve transkripsiyon süreçlerinde duraksamalara yol açar. DNA metabolizmasındaki bu bozulmalar, hücre döngüsünün durmasına ve nihayetinde hücre ölümünün tetiklenmesine neden olmaktadır (D. Wang et al. 2010).

CIS, güçlü antikanser etkisine sahip olmasına rağmen, özellikle böbrekler üzerinde ciddi toksik etkilere yol açması nedeniyle tedavi sürecinde önemli yan etkilere neden olmaktadır. Bu olumsuzlukların önüne geçebilmek amacıyla, CIS'in nanopartiküller aracılığıyla hedefe yönelik olarak taşınması, sistemik toksisitenin azaltılması açısından etkili bir strateji olarak değerlendirilmektedir (Anees et al. 2021).

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen deneysel süreçler Şekil 1.8'te verilmiştir. ZnP NP'ler, kanser hücrelerine yönelik potansiyel etkileşimleriyle incelenmektedir. Sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerine nüfuz edebilir ve farklı tedavi yöntemleriyle kombine edilebilirler. Gen susturma, araştırma ve tedavilerde önemli bir teknolojidir. siRNA, RNAi aracılığıyla gen ekspresyonunu baskılayan etkili bir yöntemdir. MDR1 geni, ilaç direncinde kritik rol oynayan p-gp proteinini kodlar ve kanser hücrelerinin kemoterapiye direncini artırır. MDR1'in susturulması, ilaç duyarlılığını artırarak tedaviye yanıtı iyileştirebilir. Bu tez çalışmasında, MDR1 geninin susturulmasıyla birlikte CIS yüklü ZnP NP uygulamasının FaDu hücreleri üzerindeki hücre ölümü etkileri ve metabolik yollar üzerindeki rolü araştırılmıştır.

1. GİRİŞ



Şekil 1.8. Tez çalışması süresince gerçekleştirilen deneysel süreçlerin şekilsel anlatımı.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Goel et al. (2022) tarafından HNSCC, tütün tüketimi ve yüksek riskli HPV enfeksiyonunun başlıca risk faktörleri olduğu altıncı en yaygın cilt dışı kanserdir. Çok sayıda tedavi yöntemindeki gelişmelere rağmen, HNSCC için sağkalım oranları önemli ölçüde iyileşmemiştir; çok sayıda klinik sonuç, bir kombinasyon stratejisinin (en iyi bilinen docetaxel, sisplatin ve 5-florourasil) en etkili tedavi seçeneği olduğunu göstermiştir. İmmünolojik kontrol noktalarını hedef alan immünoterapi, tek başına veya kemoterapötik veya hedefli terapötik ilaçlarla birlikte bir dizi klinik çalışmada test edilmektedir (Goel et al. 2022).

Xu et al. (2004) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, kanser tedavisinde ilaç direncine neden olan MDR1 geninin ifadesini baskılamak amacıyla küçük girişimci siRNA'lar kullanılmıştır. Çalışmada, kimyasal olarak sentezlenen çift sarmallı RNA'lar (dsRNA) ile vektör tabanlı saç tokası siRNA'ların etkinliği karşılaştırılmış ve NCI/ADR-RES çoklu ilaca dirençli meme karsinomu hücrelerinde bu yöntemlerin etkileri analiz edilmiştir. Ayrıca, siRNA'ların MDR1 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri, antisens oligonükleotidler ve MDR1 promotörünü hedef alan yapay transkripsiyon faktörleri ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, siRNA'ların *MDR1* geninin inhibisyonunda diğer yöntemlerle karşılaştırılabilir düzeyde etkili olabileceğini ortaya koymuştur. Bu çalışma, MDR'nin moleküler düzeyde hedeflenmesine yönelik yeni stratejilere katkı sağlamaktadır (Xu et al. 2004).

Zhang et al. (2023) nanoterapinin HNSCC tedavisinde nanopartikül tabanlı ilaç taşıma sistemleri kullanılarak etkinliğini artırdığı ve sağlıklı dokulara zarar verme riskini azalttığı bulunmuştur. Bu tedavi yöntemi, düşük toksisite, modifiye edilebilirlik ve uzun süreli etki gibi avantajlar sunarak, tümör mikroçevresini hedef alarak tedaviye yanıtı iyileştirmeyi amaçlamaktadır (Zhang et al. 2023).

Önceki çalışmaya benzer şekilde Yadav et al. (2022) çalışmalarında nanoteknoloji tabanlı yaklaşımların, MDR'yi aşmada önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Çalışmada, MDR gelişiminde efflux taşıyıcıları, tümör mikroçevresi ve moleküler

2. KAYNAK ÖZETLERİ

hedeflerdeki değişiklikler gibi çeşitli faktörlerin etkili olduğu vurgulanmış ve bu direnç mekanizmalarını aşmak için nanotaşıyıcı tabanlı ilaç dağıtım sistemlerinin potansiyeli incelenmiştir. Sonuçlar, çok işlevli nanomalzemelerin biyoyararlanımı ve farmakokinetiği iyileştirerek kemoterapötik ilaçların etkinliğini artırdığını ve MDR'yi aşmada etkili bir strateji sunduğunu göstermektedir (Yadav et al. 2022).

Doğan ve Öztop (2023) hastalar üzerindeki değerlendirmeleri şu şekilde ele almışlardır; HPV16 pozitif ve negatif hastalardan elde edilen hücre hatlarında yapılan in vitro değerlendirmelerde; CIS, cetuximab, bu ajanların kombinasyonu ve bunlara ek olarak uygulanan 15 Gy radyoterapi protokolleri, sitotoksiste, apoptoz ve DNA hasarı düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. Bununla birlikte, sadece radyoterapi uygulanan grupta, HPV16 pozitif ve negatif hücre hatları karşılaştırıldığında; hücre proliferasyonu, apoptotik oranlar ve DNA hasarına uğramış hücre yüzdeleri açısından anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Bulgular, HPV negatif hücrelerde radyoterapinin daha belirgin hücre ölümü, apoptoz ve DNA hasarı oluşturduğunu ortaya koymuştur (Doğan and Öztop 2023).

ZnP NP'ler, çeşitli kanser hücre hatlarında antikanser etkinlik gösteren yenilikçi NP'ler arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalar, bu NP'lerin farklı kanser türleri üzerinde biyolojik aktivite sergilediğini ortaya koymuştur.

Vafaei et al. (2020) ZnP NP'lerin meme kanseri (MCF-7) hücre hattına karşı etkinliği üzerine gerçekleştirdikleri bir çalışmada, nanopartiküllerin apoptotik hücre ölümünü indüklediği ve hücre döngüsünü alt-G1 fazında durdurduğu belirlenmiştir. ZnP NP'ler, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini artırarak hücrel stres mekanizmalarını tetiklemiş ve tümör baskılayıcı p53 gen ekspresyonunu yukarı yönde düzenlemiştir. Bu sonuçlar, ZnP NP'lerin meme kanseri tedavisinde potansiyel bir antitümör ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Vafaei et al. 2020).

Benzer şekilde, Shakir and Hammadi (2022) yaptıkları çalışmada ZnP NP'lerin lösemi (HL-60) hücre hattı üzerindeki etkileri de incelenmiş ve NP'lerin doza bağlı sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan ZnP

2. KAYNAK ÖZETLERİ

NP'ler, 24 saatlik inkübasyon sonrası hücre ölüm oranlarında artışa neden olmuş ve IC₅₀ değeri 270,5 µg/mL olarak belirlenmiştir. Karakterizasyon analizleri, sentezlenen ZnP NP'lerin yüksek saflık seviyesine sahip olduğunu ve uygun biyouyumluluk gösterdiğini ortaya koymuştur (Shakir and Hammadi 2022).

Bu bulgular, ZnP NP'lerin farklı kanser türlerinde terapötik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar aşağıdaki Tablo 'da sunulmuştur (**Tablo 3.1**).

Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazların marka ve model bilgileri

1. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE MIKROBİYOLOJİ CİHAZLARI	
Cihaz İsmi	Marka
CO ₂ 'li İnkübatör	ESCO Cell Culture
Çalkalayıcı İnkübatör	Zhicheng ZHWY-2102C
Steril Class II Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™
Otoklav	Hirayama HV 50-L
pH Metre	OHAUS
İnvert Mikroskop	Leica
Pürmüz	
Öze	
2. DEPOLAMA VE SOĞUTMA SİSTEMLERİ	
Cihaz İsmi	Marka
+4 °C Soğutucu	Vestfrost
-20 °C Derin Dondurucu	Vestfrost
-80 °C Derin Dondurucu	ESCO Lexicon
3. SANTRİFÜJ VE PARÇALAMA EKİPMANLARI	
Cihaz İsmi	Marka
Santrifüj	Hettich
Mini Santrifüj	WiseSpin
Yatay Çalkalayıcı	Heidolph
Manyetik Karıştırıcı	Wisd Wisestir
Vorteks	Wisd Wisemix
Sonikatör	Çalışkan Lab Ultrasonik
4. ALIŞMALARIN YÜRÜTÜLMESİ İÇİN TEMEL İHTİYAÇ EKİPMANLARI	
Cihaz İsmi	Marka
Su Banyosu	Wisd WiseBath
Hassas Terazı	Weightlab Instruments
Isı Bloğu	BioSan
Saf Su Cihazı	Millipore Direct-Q-3
Ultra Saf Su Cihazı	Direct-Q®
5. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK CİHAZLARI	
Cihaz İsmi	Marka
PCR Cihazı	SensoQuest Labcycler
Real Time PCR Cihazı	Qiagen

Tablo 3.1. (Devam)

Elisa Mikroplate Okuyucu	Biotek EPOCH
Flow Sitometri Cihazı	Beckman Coulter CytoFLEX
Blotlama Cihazı	BioRad
Jel/Membran Görüntüleme Cihazı	BioRad
Güç Kaynağı	BioRad
6. ANALİTİK VE KARAKTERİZASYON CİHAZLARI	
Cihaz İsmi	Marka
X Işını Kırınım Kristalografisi (XRD)	PANalytical Empyrean XRD
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	FEI QUANTA FEG 450
Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	Hitachi HighTech HT7700
Zetametre	Malvern Zetasizer Nano ZSP
HPLC	Shimadzu Prominence LC-20A
Ultraviyole-Görünür Spektroskopisi (UV-Vis)	SHIMADZU UV-1800
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	SHIMADZU IRTracer-100

Bu tez çalışmasında kullanılan kit ve kimyasal markaları aşağıdaki Tablo 3.2'de sunulmuştur.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kit ve kimyasal markaları

1. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE GENEL LABORATUVAR REAKTİFLERİ	
Materyal	Marka
RPMI 1640 media: Liquid	HyClone
Fetal Sığır Serum (FBS)	Gibco®
Trypsin/EDTA	Gibco®
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	Ecotech Biotechnology
Penisilin/Streptomisin Antibiyotik	Gibco®
Hücre Canlılık Tespit Kiti-8 (CVDK8)	Ecotech Biotechnology
Maxime™ RT PreMix (Random Primer)	Intron Biotechnology
Total RNA Kit	Ecotech Biotechnology
Phen Green SK Diasetat (5/6 karışımı)	MCE MedChemExpress
2. WESTERN BLOT VE PROTEİN ANALİZİ REAKTİFLERİ	
Materyal	Marka
Merkaptoetanol	Sigma Aldrich®
Akrilamid	Ecotech Biotechnology
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (Temed)	Sigma-Aldrich®
Amonyum Persülfat (APS)	Invitrogen
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma
Whatman Blotlama Kağıdı	Sigma-Aldrich®

Tablo 3.2. (Devam)

PVDF Membran	Sigma-Aldrich®
Runnig Buffer (Tris Glisin SDS)	Ecotech Biotechnology
Laemmli Sample Buffer (4x)	Ecotech Biotechnology
ECL Western Blotting Substratı	Ecotech Biotechnology
Ponceau S	Ecotech Biotechnology
Bradford Reagent	Ecotech Biotechnology
Sığır Serum Albümin (BSA)	Bioshop
Protein Marker	Ecotech Biotechnology
Proteaz İnhibitörü	MCE MedChemExpress
Fenilmetansülfonil Florür (PMSF)	Thermo Scientific
Primer Antikor	Affinity, ELABscience, BT Lab, Santa Cruz Biotechnology
Anti-Rabbit ve Anti-Mouse Sekonder Antikor	Elabscience, ABclonal
3. FLOW STOMETRİ VE GEN SUSTURMA ANALİZİ REAKTİFLERİ	
Materyal	Marka
Cell Cycle Assay Kit (Red Fluorescence, Katalog No: E-CK-A351, ABD)	Elabscience®
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI	Biolegend
Sybr Green Master Mix	Enzo 2x Ampigene qPCR Green Mix Hi-ROX
MDR1 Süpresör Kit	Ecotech Biotechnology
4. SOLVENTLER VE GENEL KİMYASALLAR	
Materyal	Marka
Ethanol	Honeywell
Methanol	Honeywell
Propanol	Merck
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Ecotech Biotechnology
Twen-20	AFG Bioscience LLC
5. MİKROBİYOLOJİK KÜLTÜR ORTAMLARI	
Materyal	Marka
Tryptic soy broth (TSB)	Sigma Aldrich®
Tryptic soy agar (TSA)	Sigma Aldrich®
6. KİMYASAL MADDELER VE TAMPONLAR	
Materyal	Marka
R029066 Cisplatin %95min (1Gram)	R.R Scientific
ZnSO ₄ 7H ₂ O (Çinko Sülfat Heptahidrat)	Sigma (mA:287 g/mol)
Tris Base	Sigma
Hidroklorik Asit (HCl)	Tekkim
Soyum Klorür (NaCl)	BioShop
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma Aldrich®

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanış prosedürleri aşağıdaki Tablo 3.3’de sunulmuştur.

Tablo 3.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı.

1. MİKROBİYOLOJİK BESİYERİ ÇÖZELTİLERİ	
Çözelti	Hazırlanışı
Triptic Soy Broth (TSB)	30 g TSB tozu, 1 L saf su içerisinde çözündürülerek iyice karıştırılmış ve otoklavda 121°C’de 15 dakika boyunca steril edilmiştir.
Triptic Soy Agar (TSA)	40 g TSA tozu, 1 L saf su içerisinde çözülerek kaynatılmış, ardından otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında ortam yaklaşık 50°C’ye soğutulmuş ve steril petri kaplarına dökülerek katılaştırılmıştır.
2. TAMPON VE TUZ ÇÖZELTİLERİ	
Çözelti	Hazırlanışı
pH 7,4 PBS	10X PBS çözeltisinden 25 mL alınarak 225 mL saf su ile seyreltilmiş ve pH değeri HCl ile 7,4’e ayarlanmıştır.
pH 6,0 PBS	10X PBS çözeltisinden 25 mL alınarak 225 mL saf su ile seyreltilmiş ve pH değeri HCl ile 6,0’a ayarlanmıştır.
3. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇÖZELTİLERİ	
Çözelti	Hazırlanışı
Besiyeri	RPMI besiyerine %10 oranında FBS ve %1 oranında penisilin/streptomisin ilave edilerek tam (komple) besiyeri hazırlanmış ve +4 °C’de saklanmıştır.
PBS	Bir tablet, 200 mL ultra saf suda çözündürülerek 25°C’de; 0,137 M sodyum klorür, 0,0027 M potasyum klorür ve 0,01 M fosfat tamponu içeren, pH 7,4’e ayarlanmış PBS solüsyonu hazırlanmıştır.
4. STERİLİZASYON ÇÖZELTİLERİ	
Çözelti	Hazırlanışı
%70 Etanol	Sterilizasyon amacıyla 700 mL saf suya 300 mL etanol eklenerek %70’lik etanol çözeltisi hazırlanmıştır.
5. ELEKTROFOREZ VE BLOTLAMA ÇÖZELTİLERİ	
Çözelti	Hazırlanışı
%10 SDS	10 g SDS, toplam hacim 100 mL olacak şekilde ultra saf suyla çözündürülerek %10’luk SDS solüsyonu elde edilmiştir.

Tablo 3.3. (Devam)

%10 APS	0,1 g APS, 1 mL'ye tamamlanacak şekilde ultra saf suda çözündürülerek %10 APS çözeltisi hazırlanmıştır.
%1 Running Buffer	10X Tris-Glycine SDS buffer'dan 100 mL alınarak 900 mL saf suyla seyreltilerek %1 çalışma tamponu hazırlanmıştır.
Blotlama Solüsyonu	40 mL Tris-Glycine SDS buffer, 40 mL etanol ve 120 mL saf su karıştırılarak blotlama solüsyonu oluşturulmuştur.
Resolving gel buffer	1,5 M Tris tamponu için 36,3 g Tris, 150 mL ultra saf suda çözülerek pH 8,8'e ayarlanmış ve toplam hacim 200 mL'ye tamamlanmıştır.
Stacking gel buffer	0,5 M Tris tamponu için 3 g Tris, 40 mL ultra saf suda çözülerek pH 6,8'e ayarlanmış ve hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır.
BSA	Her bir PVDF membran için 1,6 g BSA, 4 mL TBS-T içerisinde çözülerek bloklama çözeltisi hazırlanmıştır.
10X TBS	80 g NaCl, 2 g KCl ve 30 g Tris baz, saf suda çözündürülerek pH 7,4'e ayarlanmış ve toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak 10X TBS solüsyonu elde edilmiştir.
TBS-T	10X TBS'den 50 mL alınmış, üzerine 2,5 mL %20 Tween-20 eklenmiş ve toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlanarak TBS-T çözeltisi hazırlanmıştır.
%1 Running Buffer	10X Tris-Glycine SDS buffer'dan 100 mL alınarak 900 mL saf suyla seyreltilerek %1 çalışma tamponu hazırlanmıştır.
Blotlama Solüsyonu	40 mL Tris-Glycine SDS buffer, 40 mL etanol ve 120 mL saf su karıştırılarak blotlama solüsyonu oluşturulmuştur.
Resolving gel buffer	1,5 M Tris tamponu için 36,3 g Tris, 150 mL ultra saf suda çözülerek pH 8,8'e ayarlanmış ve toplam hacim 200 mL'ye tamamlanmıştır.
Stacking gel buffer	0,5 M Tris tamponu için 3 g Tris, 40 mL ultra saf suda çözülerek pH 6,8'e ayarlanmış ve hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır.
BSA	Her bir PVDF membran için 1,6 g BSA, 4 mL TBS-T içerisinde çözülerek bloklama çözeltisi hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. (Devam)

10X TBS	80 g NaCl, 2 g KCl ve 30 g Tris baz, saf suda çözündürülerek pH 7,4'e ayarlanmış ve toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak 10X TBS solüsyonu elde edilmiştir.
TBS-T	10X TBS'den 50 mL alınmış, üzerine 2,5 mL %20 Tween-20 eklenmiş ve toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlanarak TBS-T çözeltisi hazırlanmıştır.
%1 Running Buffer	10X Tris-Glycine SDS buffer'dan 100 mL alınarak 900 mL saf suyla seyreltilerek %1 çalışma tamponu hazırlanmıştır.

3.2. İlaç Taşıyıcı Sistemin Oluşturulması

İlaç taşıyıcı sistemin temel bileşeni olan ZnP NP, biyoyumlu ve çevre dostu bir yöntem olan yeşil sentez tekniğiyle üretilmiştir. Bu yöntemde, nanoparçacıkların sentezinde indirgen ve stabilize edici ajan olarak görev yapan biyolojik bileşenleri elde etmek amacıyla *Bacillus cereus* bakterisi kültürlenmiş ve ardından süpernatant (bakteri hücrelerinden arındırılmış kültür sıvısı) izole edilmiştir.

3.2.1. Bakteri süpernatantının elde edilmesi

Bacillus cereus 18112 suşu, Erzurum Teknik Üniversitesi YÜTAM Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. İlgili bakteri izolatu, kanlı agar içeren petri kutusundan steril bir öze yardımıyla alınarak Triptik Soy Agar (TSA) besiyerine inoküle edilmiştir. 30 °C sıcaklıkta 24 saat süresince inkübe edilen kolonilerden yeniden alınan bakteri kültürü, Triptik Soy Broth (TSB) sıvı besiyerine aktarılmış ve benzer şekilde 30 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, kültür 9.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüş ve üst faz (süpernatant) dikkatlice alınarak yeşil sentez işlemlerinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

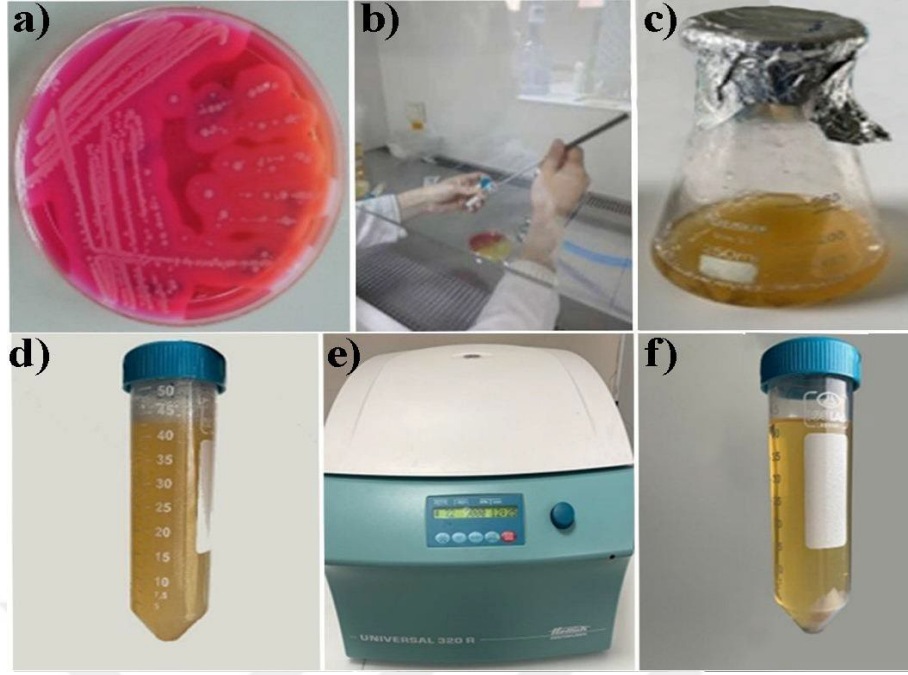
3.2.2. Yeşil sentez yöntemiyle ZnP NP üretimi

ZnP NP'lerin biyolojik kaynaklı üretimi amacıyla, *Bacillus cereus* bakterisinin süpernatantı kullanılarak yeşil sentez yöntemi uygulanmıştır (Şekil 3.1). NP'lerin daha küçük boyutlarda elde edilebilmesi için iki farklı sentez protokolü geliştirilmiştir:

Protokol 1: 0,86 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 mL bakteri süpernatantı içerisine ilave edilerek 80 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Ahmed et al. 2021).

Protokol 2: 69 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,4 mL distile su içerisinde çözölmüş; pH değeri 8'e ayarlanmış 10 mL bakteri süpernatantına, bu çözelti manyetik karıştırıcı üzerinde damla damla ilave edilmiştir. Karışım, 70 °C sıcaklıkta 4,5 saat süreyle inkübe edilmiştir (Hamk 2023).

Her iki protokol sonucunda elde edilen ürünler, UV-Vis spektroskopisi, zeta potansiyel ölçümü ve XRD analizleri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında, ikinci protokol daha uygun bulunarak üretim süreci bu yöntemle devam ettirilmiştir.



Şekil 3.1. *Bacillus cereus* bakterisinden yeşil sentez yöntemi kullanılarak ZnP NP üretim aşamaları. A) *Bacillus cereus*, B) Bakterinin sıvı kültürüne alınması, C) Sıvı kültürü elde edilmesi ve pH nin ayarlanması, D) Çinko sülfoksitin eklenerek yeşil sentezin başlatılması, E) 24 saat sonra santrifüjlenmesi, F) Bakteri süpernatantı ve ZnP'nin elde edilmesi.

3.2.3. SiO₂ sentezi

SiO₂ sentezi, bir makalede verilmiş olan yönteme dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, 0,25 g CTAB ve 0,875 mL 2 M NaOH çözeltisi, 120 mL saf su içerisine eklenmiş ve karışım 80 °C'de manyetik karıştırıcı ile homojenize edilmiştir. Daha sonra, 1,25 mL TEOS çözeltisi damla damla ilave edilerek karışım 80 °C'de 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Oluşan ürün, %5 asetik asit içeren etanolde bir gece çalkalanarak gözenekli yapı kazandırılmış ve ardından saf su ile metanol kullanılarak yıkama işlemi uygulanmıştır.

Son aşamada, glukozamin ve EPBA çapraz bağlayıcıları sisteme dahil edilerek, pH ve glikoz duyarlılığı olan bir ilaç taşıyıcı yapı oluşturulmuştur. Bu sistem, özellikle hedefe yönelik ve kontrollü CIS salımı için tasarlanmıştır (Tan et al. 2015).

3.3. CIS Yüklmesi, ZnP NP ile Kaplama İşlemi ve HPLC ile İlaç Yükleme Miktarının Belirlenmesi

SiO₂ NP'lere CIS yüklmesi ve ZnP NP ile kaplanması işlemleri aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir:

1 mg SiO₂, 15 mL'lik steril bir falkon tüpüne alınarak, üzerine 5 mL otoklavlanmış distile su eklenmiş ve elde edilen süspansiyon, homojen bir karışım elde edebilmek amacıyla beş kez, birer dakikalık sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Ardından kısa süreli vorteksleme uygulanmıştır. Aynı şekilde, ayrı bir tüpte 2 mg CIS, 1 mL distile su içerisinde çözülmüş ve benzer sonikasyon ve vorteksleme işlemleri uygulanarak çözeltinin homojenliği sağlanmıştır. Elde edilen iki süspansiyon birleştirilmiş ve karışım, oda sıcaklığında 24 saat boyunca yatay çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından, 10 mg ZnP, 2 mL distile su içerisinde çözümlenerek sonikasyon ve vorteksleme işlemleriyle ZnP NP süspansiyonu elde edilmiştir. Bu süspansiyon, SiO₂+CIS karışımına ilave edilmiş ve kaplama işleminin gerçekleşebilmesi için karışım 8 saat süreyle çalkalanmıştır. İşlem sonunda karışım, 9.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve oluşan pellet, steril koşullarda alüminyum folyo ile sarılarak kurutulmuştur.

Kurutulan SiO₂+CIS+ZnP bileşiği, 1 mg/mL derişimindeki otoklavlanmış distile su ile karıştırılmış ve homojen bir yapı elde edilene kadar sonikasyon ve vorteksleme işlemleri yeniden uygulanmıştır. Hazırlanan bu sıvı formdaki CIS çözeltisi, HPLC analizlerinde standart referans olarak kullanılmıştır.

Analizlerde, CIS'in kantitatif tayini için uygun dalga boyunda çalışan UV dedektörü (SPD-20A) tercih edilmiştir. Bu çalışmada, başlangıçta 5 mg SiO₂, 0,5 mg CIS ve 10 mg ZnP (toplam madde miktarı=15,5 mg) kullanılarak oluşturulan karışım kurutulduğunda toplam 9,5 mg kuru toz elde edilmiştir. Bu tozdan 2 mg alınarak 2 mL otoklavlı suda (1 mg/mL) çözdürülmüş ve HPLC analizine tabi tutulmuştur. Yöntem geliştirme ve validasyon aşamalarında, CIS tayini için (Kaushik et al. 2010), ZnP için (Sultana et al. 2006) ve SiO₂ analizi için (Núñez et al. 2008) literatürlerde bulunan belirli protokoller temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz bileşimi, kolon tipi, akış hızı,

enjeksiyon hacmi ve kolon sıcaklığı gibi kromatografik parametreler, CIS'in analizine uygun şekilde optimize edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar değerlendirilerek süpernatantta kalan serbest CIS miktarı hesaplanmış ve başlangıçtaki ilaç miktarından çıkarılarak nanoparçacıklara yüklenen CIS miktarı dolaylı yoldan belirlenmiştir.

3.4. İlaç Salınımı Deneyleri

İlaç salınım profili, farklı pH koşullarında değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, pH 6,0 ve pH 7,4'e ayarlanmış PBS çözeltileri hazırlanmıştır. Kurutulmuş SiO₂+Cis ve SiO₂+Cis+ZnP NP örneklerinden 12'şer mg tartılarak her biri iki gruba ayrılmış ve dört adet deney grubu oluşturulmuştur. Her gruba 12 mL PBS (pH 6,0 veya 7,4) eklenerek süspansiyonlar sonikasyon yoluyla hazırlanmıştır.

Hazırlanan süspansiyonlardan 2 mL'lik örnekler alınıp, içerik ve zaman bilgileri etiketlenmiş şekilde 6'şar adet eppendorf tüpüne dağıtılmıştır. Tüpler, 37 °C'de yatay çalkalamalı inkübatörde 1, 2, 4, 6, 8 ve 24. saatlerde analiz edilmek üzere inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen zamanlarda alınan örnekler 9.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatantları ayrılmış ve CIS salınımı, UV-Vis spektrofotometresinde 205 nm ve 300 nm dalga boylarında analiz edilmiştir.

3.5. Nanopartikül Karakterizasyonu

3.5.1. UV-VİS analizi

Bu çalışmada, yeşil sentez yöntemiyle elde edilen ZnP yapıların optik özelliklerini belirlemek amacıyla UV-VIS (Ultraviyole-Görünür) spektroskopi analizi gerçekleştirilmiştir. Analizlerde, malzemenin ışığı soğurma (absorpsiyon) kapasitesi değerlendirilmiştir. Hazırlanan ZnP numunesi, 1 mg/mL derişimde saf su ile seyreltilerek ölçüme hazır hale getirilmiştir. Ölçümler sırasında, ilk olarak saf su kullanılarak cihaz sıfırlanmış (kör olarak alınmış), ardından numune küvete yerleştirilerek 200–700 nm dalga boyu aralığında spektral tarama yapılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

UV-VIS spektroskopi ölçümleri, Thermo SCIENTIFIC marka spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Elde edilen spektrumlar, ZnP yapısının optik davranışının ve olası elektronik geçişlerin incelenmesinde kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Tez çalışmaları süresince kullanılan UV-VIS spektroskopi cihazı.

3.5.2. X-ışını kırınım (XRD) analizi

Yeşil sentez yöntemiyle 2 farklı protokol kullanılmıştır. Elde edilen 2 farklı ZnP yapılarının kristal özelliklerini belirlemek amacıyla X-ışını kırınım (XRD) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için her bir numuneden 2 mg alınarak, 1 mL otoklavlanmış saf su içerisinde çözündürülmüş ve sonikasyon ile homojen bir süspansiyon elde edilmiştir. Elde edilen süspansiyonlar cam lameller üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Hazırlanan lameller, XRD cihazına uygun aparata çift taraflı bant ile sabitlenmiş ve analiz işlemi bu şekilde gerçekleştirilmiştir. Cihaz 45 kV ve 40 mA akım değerlerinde çalıştırılmış, monokromatör kullanılmamıştır. Anot malzeme: Cu; 2θ için ince kalibrasyon= $0,0367^\circ$; K-Alfa 1 dalga boyu= 1.5405980 , K-Alfa 2 dalga boyu= 1.5444260 ve Diverjans aralığı: $0,05$ mm olarak ayarlanmıştır. Örnekler 0.070° adım boyutunda ve tarama eksenini 2θ , $4,98^\circ$ – $90,03^\circ$ tarama aralığında taranmıştır.

3.5.3. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Üretilen ZnP, ZnP+SiO₂ ve ZnP+SiO₂+CIS numuneleri, toz formda FTIR spektrometresine ait okutma kısmına yerleştirilip cihaz kısılcısıyla sıkıştırılarak ölçüm

3. MATERYAL ve YÖNTEM

alınmıştır (Şekil 3.3.). FTIR analizi, sentezlenen nanopartiküllerin ve ilgili kompozit yapıların yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupların tanımlanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Numunelerin kızılötesi absorpsiyon spektrumları, $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında alınmıştır. Spektrumlar örneklerin geçirgenliklerinden yararlanılarak (transmittans) beklenen karakteristik pikleri; silika matrisine ait Si–O–Si gerilme titreşimleri, Zn–O ve P–O bağlarına ait karakteristik pikleri ile yüklenmiş olan CIS ilacına ait fonksiyonel grupların varlığını doğrulamak amacıyla yapılmıştır.



Şekil 3.3. IRTracer-100 SHIMADZU FTIR spektrometresi.

3.5.4. Zeta potansiyel ve dinamik ışık saçılımı (DLS) analizi

Farklı iki protokol ile sentezlenen ZnP nanopartiküllerinin yüzey yükü (zeta potansiyel), hidrodinamik çap (Rh) ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile belirlenmiştir. Analiz öncesinde her bir numune 1 mg/mL derişimde olacak şekilde tartılarak otoklavlanmış saf su ile seyreltilmiş ve sonikasyon ile homojen bir süspansiyon elde edilmiştir. Böylece partiküllerin agregasyon oluşturarak ölçüm doğruluğunu azaltması önlenmiştir. Aynı analizler, seçilen en uygun protokol doğrultusunda sentezlenen ZnP+SiO₂ numunesi için de gerçekleştirilmiştir.

3.5.5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Sentezlenen ZnP NP'lerinin, SiO₂ yapılarının ve bu iki maddenin birlikte kullanımı ile oluşan ZnP+SiO₂ yapıların morfolojisinin ve boyutlarının incelenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi uygulanmıştır. Analiz için her bir

numuneden 2 mg alınarak, 1 mL otoklavlanmış saf su ile karıştırılmış ve sonikasyon yardımıyla homojen bir dağılım sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyonlar cam lamel üzerine damlatılarak kurutulmuş ve ardından SEM görüntülemesi için hazırlanmıştır.

3.5.6. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi

Gözenekli yapıya sahip SiO₂ NP'lerin ve bu yapıya ZnP NP'lerin eklenmesiyle elde edilen ZnP+SiO₂'nin daha ayrıntılı morfolojik incelemeleri için geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi yapılmıştır. Her bir numune, saf su içerisinde 1 mg/mL derişimde hazırlanarak homojen bir süspansiyon haline getirilmiş ve TEM analizine uygun olarak cihaza damlatılmıştır.

3.6. Hücre Kültürü Deneyleri

3.6.1. HNSCC hücre hattının (FaDu) kültüre edilmesi

Bu çalışmada, insan HNSCC hücre hattı olan FaDu kullanılmıştır. Hücreler, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren komplet RPMI besiyeri ile kültürlenmiştir. Steril koşullar altında Class II biyogüvenlik kabininde T-25 flasklara ekilen hücreler, 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.

Hücreler, yüzey alanının yaklaşık %70–80'ini kaplayana kadar takip edilmiş ve medyumun renk değişimi düzenli olarak kontrol edilmiştir. Kırmızı ton, ortamın taze olduğunu; sarıya dönüş ise besin azalması ve pH değişimini göstermiştir (Demir ve Oğuz 2025). Bu nedenle ortam en az iki günde bir yenilenmiştir. Ortam değişiminde ölü hücreleri uzaklaştırmak için mevcut medyum alınmış, hücreler PBS ile yıkanarak taze besiyeri eklenmiştir. Hücre çoğaltma, ekim ve dondurma işlemlerinde; PBS ile yıkamanın ardından hücrelere %0,25 tripsin-EDTA uygulanarak 37 °C, %5 CO₂ koşullarında 3–5 dakika inkübe edilmiştir. Tripsin, FBS'in bağlanmasını engelleyerek hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlamış; ardından hücreleri korumak amacıyla, tripsin hacminin en az üç katı komplet RPMI eklenmiştir. Ayrılan hücreler steril tüplere alınıp 2700 rpm'de 4 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant atılmıştır. Elde edilen hücre pelletleri, uygun miktarda taze besiyeri ile süspanse edilerek deneylerde kullanılmıştır.

Dondurulması planlanan hücreler, %8 DMSO ve %50 FBS içeren kriyoprotektif komplet RPMI ortamına alınmış ve kriyojenik tüplere aktarılmıştır. Tüpler, sırasıyla +4°C’de 1 saat, ardından -20°C’de 1–1,5 saat bekletilmiş ve sonrasında -80°C dondurucuya aktarılmıştır. Uzun süreli saklama için, -80°C’de bir gece tutulduktan sonra sıvı azot tankına (-196°C) yerleştirilerek kriyoprezervasyonu sağlanmıştır (Aksoy 2021).

3.6.2. Hücre canlılık analizi

Hücre canlılığı, üretici firma protokolü doğrultusunda CVDK-8 kiti (Ecotech Biotechnology, Türkiye) kullanılarak değerlendirilmiştir. T-25 hücre kültür flasklarında çoğaltılan FaDu hücreleri, %70–80 konfluens düzeyine ulaştıklarında flasklardan tripsinizasyon yöntemi ile ayrılarak sayımı yapılmış ve 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyuda 2000-5000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından, mevcut medyum uzaklaştırılmış ve yerine 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanmış ZnP+SiO₂ ve ZnP+SiO₂+CIS içeren medyumlar eklenmiştir. Uygulamalar üç tekerrürlü olacak şekilde gerçekleştirilmiş, ardından plaklar tekrar inkübatöre alınarak 24 saat daha inkübe edilmiştir.

24 saatin sonunda her kuyucuktaki uygulama solüsyonları uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa üretici talimatlarına uygun şekilde 10 µL CVDK-8 çözeltisi ile 90 µL taze besiyeri içeren karışım eklenmiştir. Plaka, ışık geçişini engellemek için alüminyum folyo ile sarılmış ve 3 saat süreyle inkübatöre yerleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda absorbens değerleri 450 nm dalga boyunda ELISA mikroparka okuyucu (Biotek EPOCH) (Şekil 3.4.) ile ölçülmüştür. Hücre canlılığı yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Hücre canlılığı \%} = \frac{\text{Absorbans}_{\text{Uygulama}}}{\text{Absorbans}_{\text{Kontrol}}} \times 100$$



Şekil 3.4. ELISA mikrolaka okuyucu (Biotek EPOCH).

3.6.3. Nanopartiküllerde hücresel alım

NP'lerin hücre içine alımının incelenmesi amacıyla, her bir kuyucuğa 350.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür plaklarına hücre tohumlaması yapılmış ve plakalar 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi dolduğunda, üç kuyucuktaki besiyeri uzaklaştırılarak; ilk kuyucuğa yalnızca taze kültür ortamı, ikinciye 15 µg ZnP+SiO₂ içeren süspansiyon, üçüncü kuyucuğa ise 15 µg ZnP+SiO₂+CIS ile birlikte CIS içeren çözelti eklenmiştir. Diğer üç kuyucuğa ise aynı uygulamalar, hücrelerle temas 3 saat gecikmeli olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Toplamda 6 saatlik bir sürecin sonunda tüm hücreler toplanmış ve 2000 rpm hızında santrifüjlenmiştir.

Santrifüjleme sonrası üst faz (süpernatant) uzaklaştırılmış ve hücrelerin oluşturduğu pellet, 500 µL taze kültür ortamı içinde süspansiyon haline getirilmiştir. Hücre içi metal iyonlarının tayininde, Phen Green SK diacetate (PGSK) adlı floresan boya kullanılmıştır. Her örneğe, son derişimi 20 mM olacak şekilde 5 µL PGSK boyası ilave edilmiş ve örnekler, karanlık koşullarda oda sıcaklığında 15 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Ardından örnekler 2000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant atılmış ve kalan hücre pelletine 100 µL cell staining buffer eklenerek yeniden süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonları, Beckman Coulter CytoFLEX model akım sitometri cihazı ile analiz edilmiştir.

3.6.4. Flow sitometrik apoptoz analizi

ZnP+SiO₂ ve ZnP+SiO₂+CIS ile muamele edilen FaDu hücrelerinde apoptoz ve nekroz süreçlerinin değerlendirilmesi amacıyla Annexin V-FITC/PI boyama yöntemi (Biolegend, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI) kullanılmıştır. Fosfatidilserin'in hücre membranının dış yüzeyine translokasyonu yoluyla apoptozun tespiti Annexin V ile sağlanırken; PI, membran bütünlüğü bozulmuş hücreleri tanımlamak amacıyla kullanılmıştır.

DeneySEL protokol aşağıdaki adımlar izlenerek yürütülmüştür:

1. Her bir deney grubu için iki teknik tekrar olacak şekilde, 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 350.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübasyon koşullarında 24 saat süreyle kültüre edilmiştir.
2. Inkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından, ilgili deney gruplarına 15 µg/mL konsantrasyonlarında ZnP+SiO₂ ve ZnP+SiO₂+CIS içeren kültür medyumları ilave edilmiştir. Hücreler, bu koşullar altında ilave 24 saat inkübe edilmiştir.
3. Sürenin sonunda hücreler tripsin ile ayrıştırılarak toplanmış, ardından 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Oluşan hücre pelletinin üzerine 150 µL PBS eklenmiş ve yeniden santrifüjleme işlemi yapılarak yıkama gerçekleştirilmiştir.
4. Her bir örnek için, 10 µL PI, 5 µL Annexin V ve 100 µL Annexin V Binding Buffer içeren boyama çözeltisi hazırlanarak hücre pelletleri bu karışım ile süspanse edilmiştir.
5. Hazırlanan hücre süspansiyonlar, oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
6. Boyama işleminin ardından, her örnek 96 kuyucuklu plakalardaki uygun kuyucuklara aktarılmış ve hücreler Beckman Coulter CytoFLEX marka akım sitometrisi cihazı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.6.5. Gen İnhibisyonu (*MDR1* Gen Susturma)

MDR1 gen ekspresyonunun baskılanması amacıyla Suppressor Kit (Ecotech Biotechnology, Türkiye) kullanılmıştır. Gen susturma işlemi, üretici firmanın protokolü esas alınarak gerçekleştirilmiştir.

Her bir kuyucuğa 350.000 FaDu hücresi eklenen 6 kuyucuklu plaklar, 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin morfolojisi mikroskop altında kontrol edilmiş ve gen susturma işlemi uygulanmıştır.

1. Aktif Mix Hazırlığı

Aktif mix için iki ayrı tüp hazırlanmıştır:

Tüp 1: 150 µL Dilution Buffer, 1 µL Aktif Mix ve 1 µL 2X Reaction Buffer birleştirilmiş, pipetaj ile homojen hale getirilmiştir.

Tüp 2: 150 µL Dilution Buffer ve 1 µL Encapsulation Buffer pipetajla karıştırılmıştır.

Her iki tüp içerikleri birleştirilerek tekrar pipetajla karıştırılmış ve karışım oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.

2. Kontrol Mix Hazırlığı

Kontrol mix de aynı şekilde iki tüpte hazırlanmıştır:

Tüp 1: 150 µL Dilution Buffer, 1 µL Kontrol Mix ve 1 µL 2X Reaction Buffer eklenerek pipetaj ile karıştırılmıştır.

Tüp 2: 150 µL Dilution Buffer ve 1 µL Encapsulation Buffer pipetaj ile homojenize edilmiştir.

Her iki tüp karıştırıldıktan sonra hazırlanan kontrol mix, oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan aktif ve kontrol karışımları, hücrelerin bulunduğu kuyucuklardaki eski besiyerleri uzaklaştırılıp taze medyum ile değiştirildikten sonra uygulanmıştır. Kontrol grubu kuyucuklarına 300 µL kontrol mix, MDR1 susturma grubu kuyucuklarına ise 300 µL aktif mix ilave edilmiştir.

3.6.6. Hücre döngüsü (cell cycle) analizi

Hücre döngüsü analizi için, her bir kuyuya 350.000 hücre ekilerek 6 kuyulu plakalarda kültür yapılmıştır. Hücreler 24 saat inkübe edilerek yüzeye tutunmaları sağlanmış, ardından mikroskopla kontrol edilmiştir. Sonrasında hücrelere 15 µg/mL dozda ZnP+SiO₂ ve ZnP+SiO₂+CIS uygulanmış, eş zamanlı olarak gen susturma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonrası hücreler tekrar 24 saat inkübe edilip, 2500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

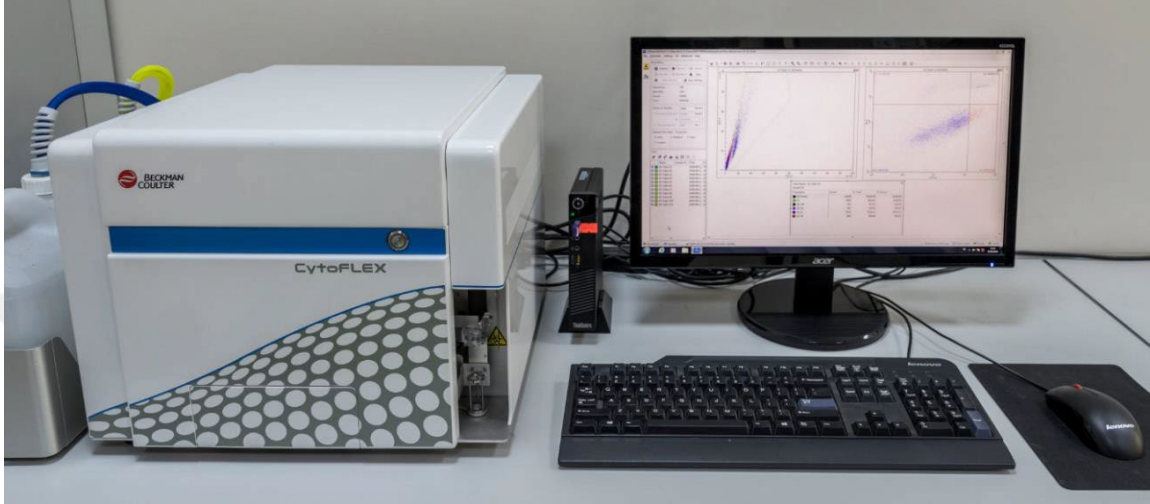
Hücre döngüsü analizleri, Elabscience® Cell Cycle Assay Kit (Red Fluorescence, Katalog No: E-CK-A351, ABD) kullanılarak, üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. İşlem basamakları aşağıda özetlenmiştir:

Tedavi uygulanmış ve kontrol gruplarındaki FaDu hücreleri, %70-80 konfluens seviyesine ulaştıklarında, tripsinizasyon ile toplanarak 1,5 mL Eppendorf tüplerine aktarıldı. Her örnek için yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler iki kez PBS ile yıkandıktan sonra, -20 °C’de önceden soğutulmuş %70 etanol içerisinde yavaşça karıştırılarak damla damla ekleme yöntemiyle sabitlendi. Etanol sabitlemesi sonrası hücreler en az 2 saat boyunca 4 °C’de inkübe edilmiştir.

Sabitleme işleminin ardından, etanol uzaklaştırılarak hücreler PBS ile tekrar yıkandı. Ardından her örneğe kit içerisinde sağlanan RNase A ve Propidium Iodide (PI) boyama çözeltisi ilave edildi. Hücre süspansiyonları karanlık koşullarda 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Boyama sonrası örnekler, flow sitometri cihazı (Şekil 3.5.) kullanılarak PE-A kanalı üzerinden analiz edildi. Analizler sırasında her örnek için en az 10.000 hücre sayıldı. Veriler FlowJo yazılımı (v10.6.2) ile değerlendirildi ve hücreler DNA içeriklerine göre G0/G1, S ve G2/M fazlarına ayrılarak yüzde dağılımları hesaplandı. Sub-G0/G1 fazı, apoptotik hücre popülasyonunu göstermek amacıyla dikkate alınmıştır.



Şekil 3.5. Flow Sitometri cihazı.

3.6.7. Gerçek zamanlı PCR (Real-Time PCR) analizi

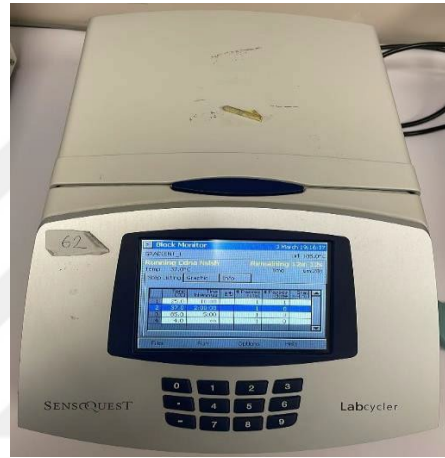
3.6.7.1. RNA izolasyonu

Her bir kuyuya 350.000 hücre ekilerek 6 kuyulu plakalarda kültür yapılmıştır. Hücreler 24 saat inkübe edilerek yüzeye tutunmaları sağlanmış, ardından mikroskopla kontrol edilmiştir. Sonrasında hücrelere 15 µg/mL dozda ZnP+SiO₂ ve ZnP+SiO₂+CIS uygulanmış, eş zamanlı olarak gen susturma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonrası hücreler tekrar 24 saat inkübe edilip, 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak RNA izolasyonuna geçilmiştir.

RNA izolasyonu, Ecotech Biotechnology’ye ait Total RNA Kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Hücre pelletleri lizis tamponu ve %70 etanol ile işlenip spin kolona aktarılmış, ardışık yıkama adımları uygulanmıştır. Elüsyon tamponu ile RNA elde edilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonu, Take3 mikropalak okuyucusunda Biotek EPOCH cihazı ile ölçülmüştür.

3.6.7.2. cDNA sentezi

cDNA sentezinde iNtRON Biotechnology tarafından üretilen Maxime RT PreMix (Random Primer) kiti, üretici talimatlarına uygun biçimde kullanılmıştır. Her bir tüpe 0,1-1 µg aralığında toplam RNA eklenmiş ve son hacim 20 µL'ye steril saf su ile tamamlanmıştır. Ardından, tüpler Gradient PCR cihazına yerleştirilmiş ve reaksiyon parametreleri; 45 °C'de 60 dakika cDNA sentezi, 95 °C'de 5 dakika RNaz inaktivasyonu şeklinde ayarlanmıştır (Şekil 3.6.). Sentezin tamamlanmasının ardından, elde edilen cDNA örnekleri 20–50 µL steril saf su ile seyreltilmiştir.



Şekil 3.6. cDNA sentezinin gerçekleştirildiği Gradient PCR cihazı.

3.6.7.3. Real time PCR

Elde edilen cDNA örnekleri, her bir tüpteki toplam hacmi 25 µL olacak şekilde nükleazlardan arındırılmış su ile seyreltilmiştir. Seyreltilen cDNA örnekleri, gen ekspresyon seviyelerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla SYBR Green tabanlı Real-Time PCR yöntemi ile incelenmiştir. Bu analizde, Tablo 3.4'te belirtilen MDR1, LRP, cMOAT, PTEN, ERK, AKT, Bax, Bcl-2, PARP, CDK2, CDK4 ve CDK6 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür ve fonksiyonlarının uyumlarına göre grafikleri birleştirilerek (4.3.5. Real time pcr analizi başlığı içerisindeki metinde) sonuçlar yorumlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tablo 3.4. Ekspresyon seviyeleri araştırılan genlere yönelik primerlerin listesi ve fonksiyonları.

Gen Adı	Gen Fonksiyonu	Primer Dizisi
<i>MDR1</i>	İlaç direncinde görev alırlar.	F: TGCTCAGACAGGATGTGAGTTG R: TAGCCCCTTTAACTTGAGCAGC
<i>LRP</i>	İlaç direncinde görev alırlar.	F: ACCCATCCTACGTGCCTC R: CTGTTGGCACAGGCAAACCT
<i>cMOAT</i>	Hücre içi taşıma görev alır.	F: CAAACTCTATCTTGCTAAGCAGG R: TGAGTACAAGGGCCAGCTCTA
<i>PTEN</i>	Büyüme baskılama dengesini sağlar.	F: TCTGCGGCTGCTCCTCTTTAC R: CATCCGTCTACTCCCACGTTCTA
<i>ERK</i>	Sinyal iletimi ve hücre proliferasyonu süreçlerinde yer alırlar.	F: ACAGGCTGTTCCCAAATGCT R: CGAACTTGAATGGTGCTTCG
<i>AKT</i>	Sinyal iletimi ve hücre proliferasyonu süreçlerinde yer alırlar.	F: GGCGAGCTGTTTTTCCATTTG R: GGCCATCTTTGTCCAGCATTAA
<i>Bax</i>	Apoptozun düzenlenmesinde role sahiptirler (Bax: pro-apoptotik)	F: CGCATCCTGAGGCACCGG R: TTTCATCCAGGATCGAGCAGGG
<i>Bcl-2</i>	Apoptozun düzenlenmesinde role sahiptirler (Bcl-2: anti-apoptotik)	F: CGCATCCTGAGGCACCG R: TTTCATCCAGGATCGAGCAGGG
<i>CDK-2</i>	Apoptoz süreci ve hücre döngüsü kontrolü ile ilişkilidirler.	F: AAAGCCAGAAACAAGTTGACG R: GAGATCTCTCGGATGGCAGT
<i>PARP</i>	Apoptoz süreci ve hücre döngüsü kontrolü ile ilişkilidirler.	F: AAGGCGAATGCCAGCGTTAC R: GCACTCTTGGAGACCATGTCA
<i>CDK-4</i>	Hücre döngüsünün G1 fazı ilerleyişinde görev yaparlar.	F: ATGGCTACCTCTCGATATGAGC R: CATTGGGGACTCTCACACTCT
<i>CDK-6</i>	Hücre döngüsünün G1 fazı ilerleyişinde görev yaparlar.	F: TTCCCAGGCAGGCTTTTCAT R: CTGTATTACAGCTCCGAGGTGTTCT

Her bir PCR tüpü için, Tablo 3.5'te belirtilen bileşenler kullanılarak toplam 10 µL hacminde reaksiyon karışımı hazırlanmış; son aşamada 2 µL seyreltilmiş cDNA ilave edilmiştir. Reaksiyon, Qiagen Rotor-Gene Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Real time pcr cihazı.

Tablo 3.5. Real-Time PCR reaksiyon karışımının içeriği ve hacimleri

Bileşen	Hacim (µL)
SYBR Green Master mix	5
Nükleaz içermeyen su	2,2
Forward primer	0,4
Reverse primer	0,4
cDNA	2
TOPLAM	10

Çalışmada uygulanan RT-PCR protokolüne ilişkin ayrıntılı bilgiler Şekil 3.8’de sunulmuştur. Gen ekspresyon düzeylerinin normalize edilmesinde referans gen olarak β -actin kullanılmıştır. Hedef genlerin relatif ekspresyon seviyeleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplanmıştır.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Polimeraz aktivasyonu	95°C	2 dk	1
Denatürasyon	95°C	5 sn	40
Bağlanma/ Uzama	60°C	30 sn	40

Şekil 3.8. SYBR Green Master Mix ile Real-Time PCR aşamaları.

3.6.8. Western Blot Analizi

3.6.8.1. Protein izolasyonu

FaDu hücreleri, her bir kuyucuğa 350.000 hücre gelecek şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücreler, 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından gen susturma işlemi uygulanmıştır. Gen susturma işlemi takiben, hücrelere $Zn+SiO_2$ ve $ZnP+SiO_2+CIS$ kombinasyonları uygulanmış ve hücreler tekrar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Toplamda 48 saat süren inkübasyon süreci tamamlandıktan sonra protein izolasyonuna geçilmiştir. İlk adımda, her kuyucuktaki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin parçalanması amacıyla PMSF, proteaz inhibitörü ve RIPA içeren lizis tamponu hazırlanmıştır. Bu tampon her kuyucuğa ilave edilerek hücreler bir scraper yardımıyla kazınarak toplanmıştır. Hücre lizatlarının etkin bir şekilde parçalanması için dondurma ve çözme yöntemi uygulanmış, ardından santrifüj işlemi gerçekleştirilerek proteinlerin ayrılması sağlanmıştır.

3.6.8.2. Protein örneklerinin yükleme öncesinde hazır hale getirilmesi

Protein örneklerinin konsantrasyonlarının tayini ve jel yükleme miktarlarının belirlenmesi amacıyla Coomassie reagent çözeltisi kullanılmıştır. Örnekler bu reaktif ile inkübe edilmiş ve ardından 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerine göre, her bir örneğin jele yüklenecek uygun hacmi hesaplanmıştır (Şekil 3.9). Daha sonra proteinler, %4 oranında Laemmli Sample Buffer ile karıştırılmış (Şekil 3.10) ve 100 °C’de, kuru ısı bloğunda 5 dakika süreyle ısıtılarak denatüre edilmiştir. Bu işlemin ardından protein örnekleri jel elektroforezi için hazır hale getirilmiştir.

$$1.) \frac{1. \text{ Absorbans değeri} + 2. \text{ Absorbans değeri}}{2} = \text{Ölçülen değerlerin ortalaması (A)}$$

$$2.) A - \text{Blank olarak alınan absorbans değeri} = \text{Proteinin kendi absorbansı (Y)}$$

$$3.) Y = 0,0766 \cdot X - 0,121$$

$$4.) \frac{30}{X} = \frac{1 \text{ kuyu için}}{\text{yüklenecek miktar (ul)}}$$

Şekil 3.9. Western blot için, Commassie Reagent Solüsyonu kullanılarak absorbans ölçümü alınan bir proteinin 10 kuyulu jel için yükleme oranı hesaplama yöntemi.

$$3X (\text{Elimizdeki Protein miktarı}) + 1X (\text{Hazırlanacak olan buffer miktarı})$$

BUFFER HAZIRLANIŞI:

$$(\text{Örnek sayısı} + 1 (\text{sample buffer})) \times 1X = (B) \text{ hazırlanacak bufferın toplam miktarı}$$

$$\begin{array}{ccc} 100 \text{ ul} & & 1000 \text{ ul} \\ A & \times & B \\ \hline A = \frac{B}{10} \end{array}$$

A = Gerekli olan merkaptotanol miktarı

B - A = Gerekli olan 4X Laemli Buffer miktarı

Şekil 3.10. Proteinleri jele yüklemek için 4X Laemli sample buffer ile hazırlanışı.

3.6.8.3. Yürütme jelinin hazırlanması ve proteinlerin yüklenmesi

Jel hazırlama aşamasında, ilk olarak alt jel (resolving jel) aşağıdaki kimyasallar ve oranlar ile 50 mL'lik falkon içerisinde hazırlanmış, vortekslenmiş ve iki camın arasına yüklenmiştir.

Tablo 3.6. Western blot deneyi için jel hazırlamanın alt jel protokolü

Saf su	1,4 mL
Akrilamid solüsyonu	1,65 mL
Resolving jel buffer solüsyonu	1,875 mL

Tablo 3.6. (Devam)

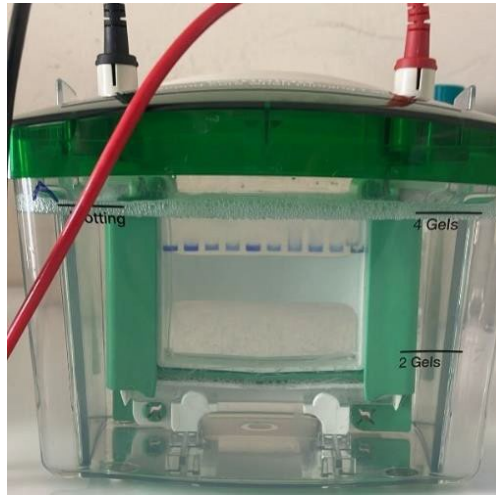
%10 SDS	50 µL
%10 APS	50 µL
TEMED	2 µL

Yüklenen jelin üzerine izopropanol eklenerek hem hava ile arasındaki bağı kesmiş hem de jelin baskılanarak jel içerisinde hava kabarcığı kalmasının önüne geçilmiştir. 40 dakika süre ile jelin donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra, jelin üst kısmında kalan izopropanol uzaklaştırılmış ve üst jel (stacking jel) hazırlanmıştır.

Üst jel hazırlığı sırasında ise, Tablo 3.7’de görülen kimyasallar ve eklenecek hacimlere göre 50 ml’lik falkon içerisinde hazırlanmış, vortekslenmiş ve iki camın arasında kurumuş alt jelin üzerine camları tam dolduracak kadar yüklenmiş ve tarakları takılmıştır. 40 dakika süreyle donmaya bırakılmıştır. Jel donduktan sonra, taraklar dikkatlice çıkarılmış ve protein örnekleri, oluşan kuyucuklara yüklenmiştir. Aynı miktardaki protein örnekleri, SDS-PAGE jelinde yürütülmüştür (Şekil 3.11).

Tablo 3.7. Western blot deneyi için jel hazırlamanın üst jel protokolü

Saf su	2,175 mL
Akrilamid solüsyonu	397,5 µL
Stacking jel buffer solüsyonu	375 µL
%10 SDS	30 µL
%10 APS	30 µL
TEMED	7,5 µL



Şekil 3.11. Protein örneklerinin jelde yürütülmesi.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Yürütülen proteinler, Trans-Blot® Turbo™ Transfer cihazı (Bio-Rad, Hercules) kullanılarak PVDF membranlara transfer edilmiştir. Membranlar, oda sıcaklığında 1,5 saat boyunca BSA ile bloke edilmiştir. Blokaj işlemi sonrasında membranlar TBS-T ile yıkanmış ve ardından +4 °C’de bir gece boyunca Tablo 3.8’de verilen primer antikorlar ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından, primer antikorlar uzaklaştırılmış ve membranlar TBS-T ile yıkanmıştır. Son aşamada, uygun sekonder antikorlarla membranlar oda sıcaklığında 1,5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, membranlar tekrar TBS-T ile yıkanmış ve protein sinyalleri ClearBand ECL Western Blotting Substrate (Ecotech Biotechnology) kullanılarak Bio-Rad ChemiDoc™ MP görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

Tablo 3.8. Western blotlama analizinde kullanılan primer antikor listesi.

Primer Antikor	Üretici ve katalog numarası	Sulandırma oranı (Antikor/TBS-T)
MDR1	Santa Cruz Biotechnology, sc-55510	1/500
Kaspaz-3	Affinity, AF6311	1/1000
Bcl-2	Affinity, BF9103	1/1000
Beta-actin	Elabscience, E-AB-40517	1/2000
NF-κB p65	Santa Cruz Biotechnology, sc-8008	1/500
mTOR	Shanghai YL Biotech Co., YLD5238	1/1000
AKT	Elabscience, E-AB-20804	1/500
PI3K (p85)	Shanghai YL Biotech Co., YLD6133	1/500
p38 MAPK	Santa Cruz Biotechnology sc-7972	1/1000

3.7. İstatiksel Analiz

Çalışmada gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) uygulanmıştır. Analiz öncesinde verilerin normallik dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile, varyansların homojenliği ise Levene testi ile değerlendirilmiştir. ANOVA sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunması durumunda çoklu karşılaştırmalar için Tukey post-hoc testi kullanılmıştır. Tüm analizlerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler IBM SPSS Statistics (sürüm 20.0) ve Origin yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiş, elde edilen sonuçlar grafiksel olarak sunulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. ZnP Üretimi ve Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında, yeşil sentez yöntemiyle optimize edilen reaksiyon koşulları sonucunda ZnP NP başarıyla sentezlenmiştir. CIS ilacının etkin bir biçimde yüklenmesi ve kontrollü salınımının sağlanabilmesi amacıyla, yüksek yüzey alanına ve gözenekli morfolojiye sahip SiO₂ nanoparçacıkları sentezlenmiştir. Daha sonra CIS, sentezlenen SiO₂ yapılarının gözenekli matrisi içerisine yüklenmiş; ardından bu gözeneklerin ZnP ile kapatılmasıyla, SiO₂+CIS+ZnP NP bileşiği elde edilmiştir.

4.1.1. UV-VİS analizi

Bu çalışmada, yeşil sentez yöntemiyle optimize edilen reaksiyon koşulları sonucunda elde edilen ZnP NP, SiO₂ yapıları, CIS kemoterapi ajanı ve bunların kombinasyonları olan SiO₂+CIS+ZnP UV-Vis spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir. Sonuçların güvenilirliğini artırmak amacıyla, ölçümler tam spektrum aralığında (200–700 nm) gerçekleştirilmiştir.

Literatürde, ZnP NP'lerin UV-Vis spektrumlarında genellikle 200–250 nm aralığında bir absorpsiyon bandı gözlemlendiği belirtilmektedir (Shirazi and Rajabi 2023). Bu absorpsiyon bandı, esasen Zn²⁺ iyonları ile PO₄³⁻ grupları arasında oluşan koordinasyon komplekslerinden kaynaklanmaktadır. Bu bant, çoğunlukla tek bir geniş pik şeklinde ortaya çıkmakta olup, elektron geçişlerinden ziyade ligand-metal etkileşimleri ve yüzey etkileriyle ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, PO₄³⁻ gruplarına ait olduğu düşünülen daha geniş bir absorpsiyon bandı yaklaşık 350 nm olarak gözlemlenmiştir (Said et al. 2022).

Bununla birlikte, ZnP NP'leri, metalik NP'lerde (örneğin altın veya gümüş) görülen belirgin yüzey plazmon rezonansı gibi bir özellik sergilememektedir. Gözlemlenen absorpsiyon piki konumları ve yoğunlukları, kullanılan sentez yöntemi,

partikül boyutu, çözeltinin pH'ı ve ortam koşulları gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir.

Elde edilen UV-Vis verileri, sentezlenen ZnP NP'lerinin literatürdeki verilerle uyumlu olduğunu ve başarılı bir sentezin gerçekleştirildiğini göstermektedir. Sentez farklı koşullarda yapılmış olsa da absorpsiyon değerlerinde gözlemlenen kaymalara rağmen, Şekil 4.1 (C) 205 nm'deki pik Zn^{2+} iyonlarına, 250 nm'deki pik ise PO_4^{3-} gruplarına ait olup, sentezin doğruluğunu ve başarısını doğrulamaktadır.

Hazır olarak temin edilen CIS kemoterapi maddesinin absorbans değerinin tespiti amacıyla, aynı yöntemle UV-Vis spektrofotometrik analiz gerçekleştirilmiştir. Absorbans değeri, ilaç yükleme süreçlerinin başarısını değerlendirmek için önemli bir parametre olarak kullanılmıştır. 200–300 nm aralığında, özellikle CIS'in 203 nm civarında belirgin bir ana absorpsiyon bandı gözlemlenmiştir. Bu bant, platin iyonlarının d-orbitalleri ile ilgili elektron geçişleriyle ilişkilidir. Ayrıca, 260-280 nm aralığında bir omuz bandı oluşmuş ve bu bölgedeki pikler CIS'in absorpsiyonunun en yüksek olduğu noktaları göstermektedir. Bu optik özellikler, CIS'in platin (II) iyonunun kare düzlemli yapısına ve ligand-metal etkileşimlerine dayanmaktadır (Camacho et al. 2023).

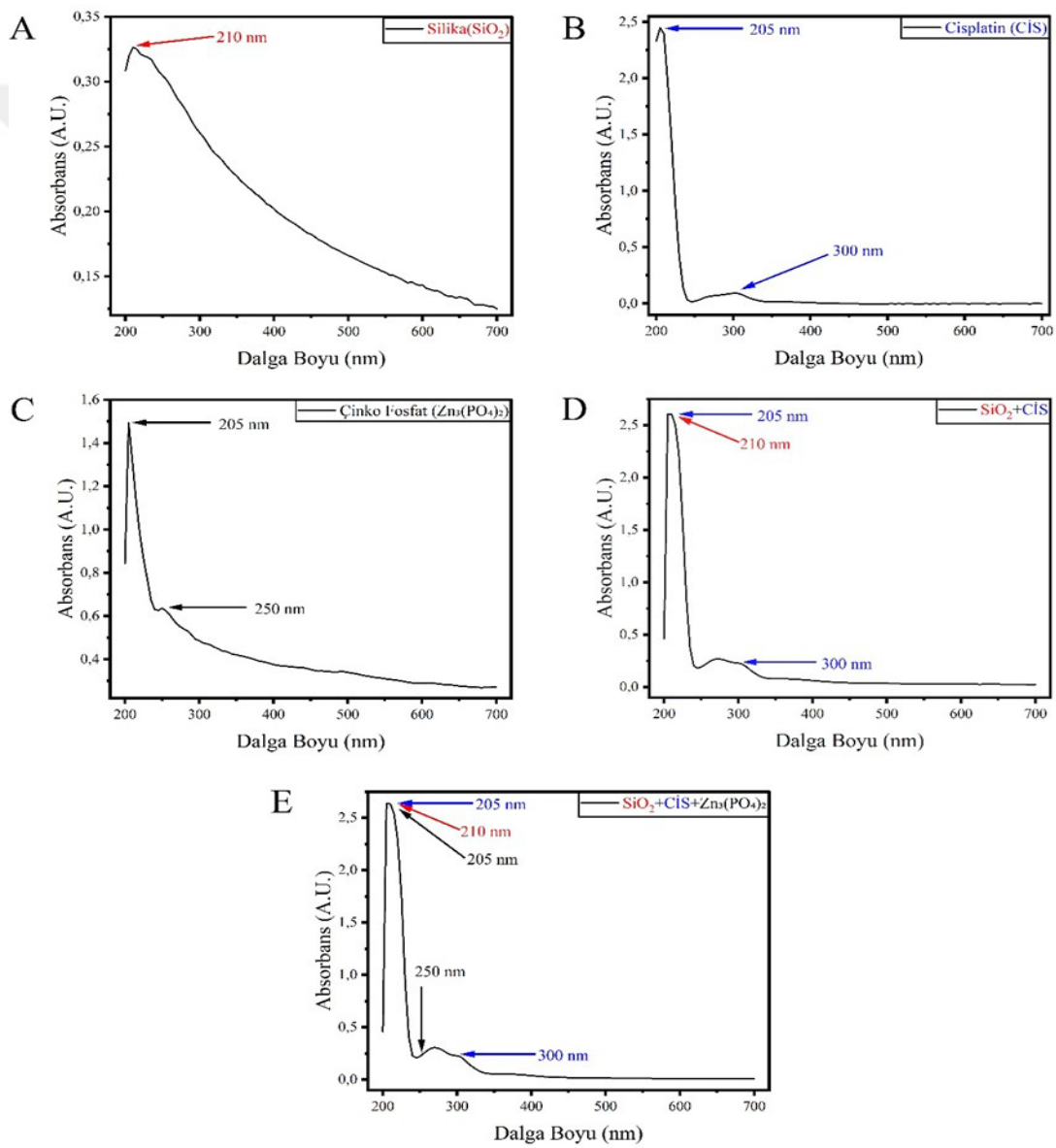
Elde edilen UV-Vis verileri, literatürdeki bilgilerle paralel olarak, Şekil 4.1 (B)'de 205 nm ve 300 nm'de gözlemlenen absorpsiyon piki ile CIS'in kimyasal yapısının doğruluğunu ve uygunluğunu doğrulamaktadır.

Sentezlenen SiO_2 NP'lerin absorbans değerinin doğruluğunun tespiti amacıyla UV-Vis spektroskopisi kullanılmış ve elde edilen sonuçlar literatürdeki kaynaklarla karşılaştırılmıştır. SiO_2 ve α -CNT/ SiO_2 kompozitlerinin UV/Vis emilim spektrumları sunulmuştur. Bu spektrumda, fonksiyonelleştirilmemiş SiO_2 için yaklaşık 210 nm civarında güçlü bir emilim piki gözlemlenmiştir. Ancak, bu bant, fonksiyonelleştirme işlemi ve α -CNT'lerin eklenmesiyle birlikte, artan ağırlık yüzdesiyle yaklaşık 220 nm'ye kaymıştır (Yusof and Johan 2014).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Literatürde verilen bilgilere göre, SiO_2 üretiminden sonra elde edilen 210 nm'lik absorbans piki, Şekil 4.1 (A)'de yer aldığı üzere, sentez sürecinin başarılı olduğunu doğrulamaktadır. Elde edilen absorbans değeri, $\text{SiO}_2+\text{CIS}+\text{ZnP}$ bileşiği içindeki SiO_2 varlığını gözlemlemek için kullanılabilir.

Şekil 4.1 (D ve E)'de bölümlerinde yer alan SiO_2+CIS ve $\text{SiO}_2+\text{CIS}+\text{ZnP}$ NP'lerin içeriklerinin doğru bir şekilde aktarıldığı ve başarılı bir şekilde sentezlendiği kanıtlanmıştır.

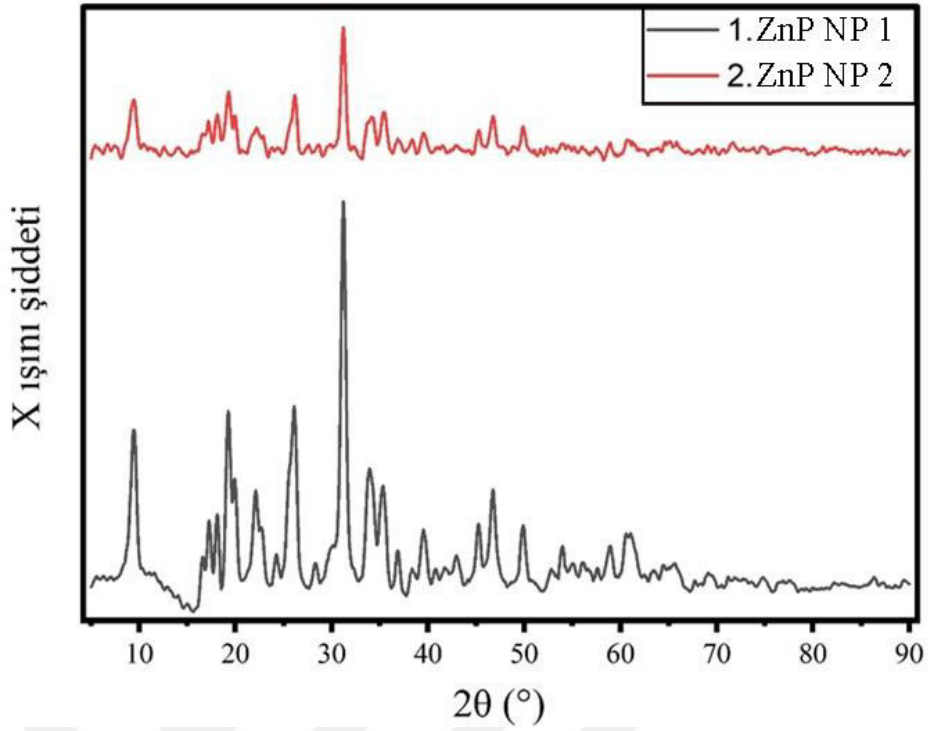


Şekil 4.1. SiO_2 (A), CIS (B), Yeşil sentez ile üretimi gerçekleştirilmiş ZnP NP (C), SiO_2 ve CIS karışımı (D) ve $\text{SiO}_2+\text{CIS}+\text{ZnP}$ NP (E) UV-VİS analizi sonuçları.

4.1.2. XRD analizi

X-ışını kırınımı (XRD), kristalin yapıya sahip malzemelerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan, güçlü ve tahribatsız bir analiz tekniğidir. Bu yöntem aracılığıyla; yapı bilgisi, faz tayini, tercihli kristal yönelimleri (doku), ortalama kristalit boyutu, kristallik düzeyi, içsel gerilmeler ve kristal kusurlarına ilişkin önemli yapısal parametreler elde edilebilmektedir. XRD deseninde gözlemlenen kırınım tepeleri, numuneyi oluşturan kafes düzlemleri tarafından belirli açılarda saçılan tek renkli X-ışınlarının yapıcı girişimi sonucu ortaya çıkar. Bu tepe noktalarının yoğunlukları ise kafes içerisindeki atomların düzenine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Dolayısıyla, her kristalin kırınım deseni, o malzemenin atomik düzeydeki periyodik yapısının karakteristik bir parmak izi niteliğindedir (Bunaciu et al. 2015)

Bu çalışmada, iki farklı protokol kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle elde edilen ZnP NP'lerinin kristal yapılarını belirlemek amacıyla XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kırınım deseninde 2θ değerleri sırasıyla $9,6^\circ$, $17,2^\circ$, $18,2^\circ$, $19,2^\circ$, $20,0^\circ$, $22,1^\circ$, $22,9^\circ$, $26,1^\circ$, $31,3^\circ$, $34,0^\circ$, $35,3^\circ$, $36,9^\circ$, $38,3^\circ$, $39,5^\circ$, $45,2^\circ$, $46,7^\circ$, $49,9^\circ$, $58,9^\circ$, $60,6^\circ$, $64,4^\circ$ ve $65,7^\circ$ olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.2). Bu veriler, literatürde bildirilen verilerle büyük ölçüde uyumluluk göstermektedir (Jian Dong et al. 2011). Söz konusu çalışmada, $9,65^\circ$, $16,68^\circ$, $17,79^\circ$, $18,26^\circ$, $19,38^\circ$, $22,17^\circ$, $25,67^\circ$, $31,31^\circ$, $35,67^\circ$, $39,88^\circ$, $46,78^\circ$, $47,54^\circ$, $49,94^\circ$, $56,41^\circ$ ve $61,07^\circ$ olmak üzere on beş güçlü kırınım tepe noktası rapor edilmiştir (Jian Dong et al. 2011).

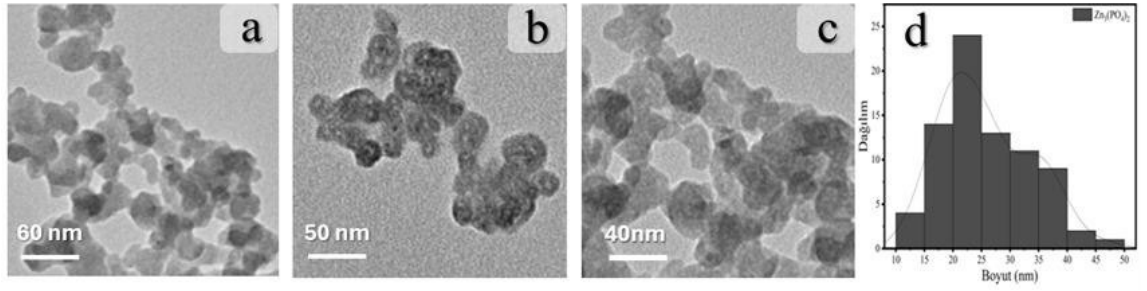


Şekil 4.2. Yeşil sentez ile üretilmiş ZnP NP'lerin XRD analiz sonuçları.

Kristalit boyutu hesaplamalarında Debye-Scherrer denklemi kullanılarak sonuçlar hesaplanmıştır. Elde edilen kırınım deseninin literatürde bildirilen fazlarla örtüşmesi, sentezlenen ZnP NP'lerinin kristal yapısının uygun biçimde oluştuğunu göstermektedir (Jian Dong et al. 2011). Yapılan analizler sonucunda, ZnP NP'lerin triklinik kristal sistemine ait olduğu belirlenmiştir.

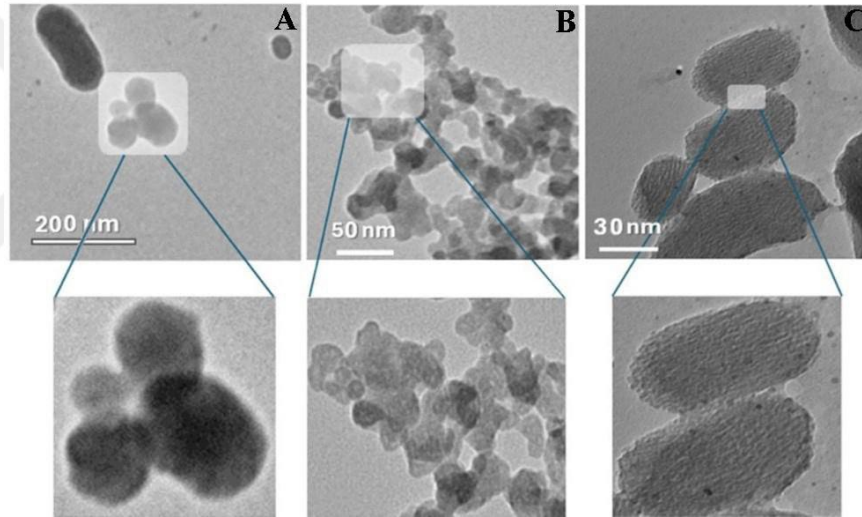
4.1.3. TEM analizi

Şekil 4.3 (d)'de sunulan grafikte görüldüğü üzere, ZnP'nin morfolojisi ve parçacık boyutu incelenmiştir. TEM (Transmission Electron Microscopy) görüntüleri, ZnP'nin ortalama parçacık boyutunun yaklaşık 22 nm olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.3. ZnP TEM görüntüleri (a, b ve c) ve ZnP boyut dağılım grafiği (d).

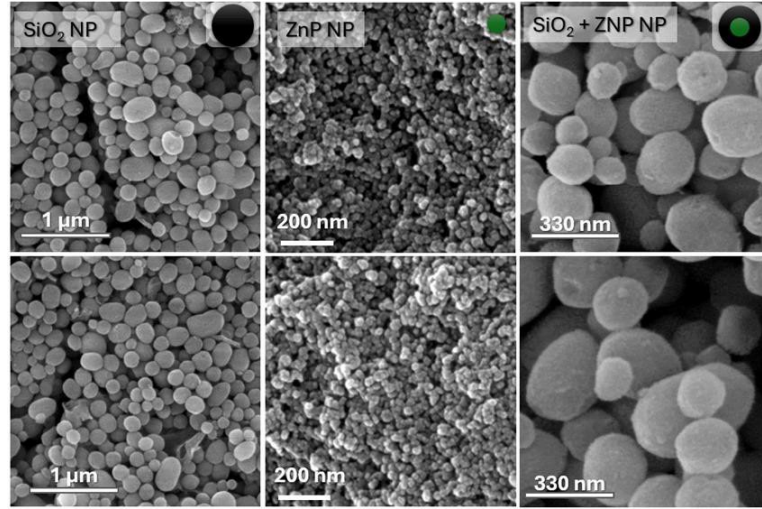
ZnP ve SiO₂'nin morfolojileri, ayrı ayrı ve birlikte, TEM (Transmission Electron Microscopy) ile incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda, ZnP NP'lerinin SiO₂'nin gözeneklerini kapattığı ve oluşan SiO₂+ZnP NP yapının başarılı bir şekilde sentezlendiği belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. SiO₂ NP (A) ve ZnP NP (B) SiO₂+ZnP NP'nin (C) Tem görüntüleri.

4.1.4. SEM analizi

Şekil 4.5'de, saf SiO₂ NP'ler, ZnP NP'leri ile modifiye edilmiş SiO₂ ve CIS yüklenmiş SiO₂ NP'lerinin SEM (Scanning Electron Microscopy) görüntüleri sunulmaktadır. SEM analizi sonucunda, ZnP NP'lerin küçük boyutları nedeniyle bulutsu bir yapı oluşturduğu ve bu nedenle net bir şekilde gözlemlenemediği belirlenmiştir. Buna karşılık, SiO₂ NP'ler daha büyük boyutlara sahip olduğundan dolayı görüntüleri daha net elde edilmiştir. Son olarak, ZnP ve CIS ile modifiye edilen SiO₂ NP'lerinin küresel morfolojisinin belirgin şekilde ortaya çıktığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5. SiO₂ NP, ZnP NP ve SiO₂+CIS+ZnP NP SEM görüntüleri.

4.1.5. FTIR analizi

Bu çalışmada sentezlenen nanopartiküllerin fonksiyonel gruplarını ve kimyasal bağ yapılarını doğrulamak amacıyla FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. FTIR analizi, moleküllerin titreşim modlarına karşılık gelen kızılötesi ışınları absorplama eğilimini ölçerek, bileşenlerin kimyasal yapısı hakkında bilgi sağlar. Analiz sonucu elde edilen spektrumda belirli dalga sayılarında gözlemlenen karakteristik pikler, örneğin yapısında yer alan fonksiyonel grupların (örneğin OH, NH, C=O, PO₄³⁻) varlığını doğrulamaktadır (Song 2017).

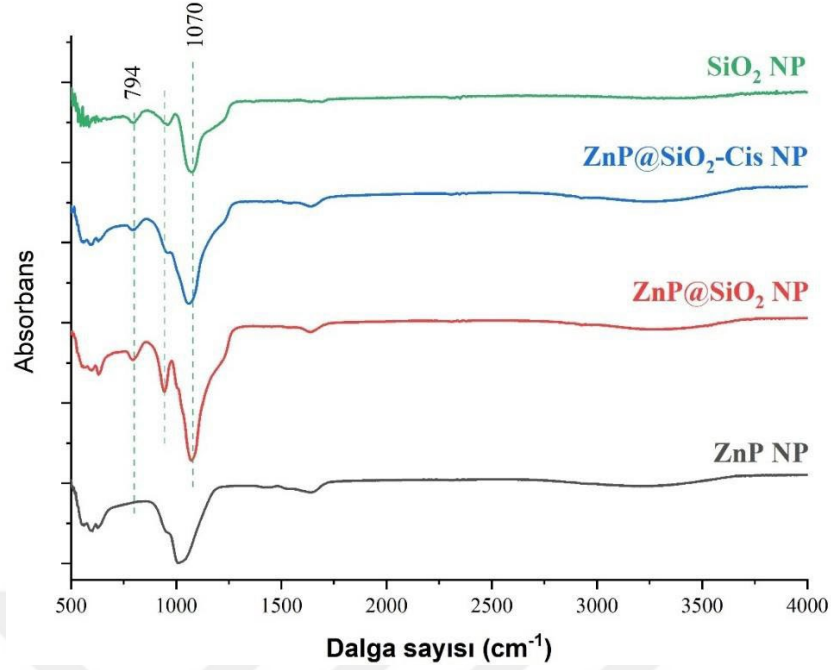
Şekil 4.6'de yer alan ZnP ve SiO₂ içeren NP'lerin FTIR analizleri, NP'lerin yapısal özelliklerini ve etkileşimlerini ortaya koymaktadır. ZnP örneğinde 2756–3643 cm⁻¹ aralığında gözlemlenen geniş bant, yüzeyde adsorbe olmuş su moleküllerine bağlı –OH gruplarının gerilme titreşimlerine işaret etmektedir. Literatürde bu titreşim genellikle 3430 cm⁻¹ civarında rapor edilmekte ve hidroksil gruplarına bağlanmış su varlığıyla ilişkilendirilmektedir (Jastrzbski et al. 2011). Spektrumda 1635 cm⁻¹'de tespit edilen pik ise, su moleküllerine ait bükülme (H–O–H bending) titreşimleri ile uyumludur. Bu bulgu, literatürde verilen 1641 cm⁻¹'de tanımlanan ve adsorbe suyun karakteristik titreşimi olarak değerlendirilen pike karşılık gelmektedir (Ramesh and Narayanan 2014). Aynı zamanda, bu bölgede CIS'in amin (–NH₂) gruplarının bükülme titreşimleri de gözlemlenebildiği için, bu pik hem suyun hem de ilacın varlığına işaret edebilir (Ramesh and Narayanan 2014).

1300–1500 cm^{-1} aralığında belirginleşen pikler, CIS'in $-\text{NH}_2$ gruplarına ait simetrik bükülme ve C–N gerilme titreşimleri ile ilişkilidir. Azhar ve arkadaşları (2017), bu tür titreşimleri 1325 cm^{-1} civarında rapor etmişlerdir. Bu bölgedeki titreşimler, CIS molekülünün yapısal özelliklerini doğrulamaktadır (Azhar et al. 2017).

Yaklaşık 500–600 cm^{-1} aralığında gözlemlenen pikler, Pt–N ve Pt–Cl bağlarına ait titreşimlerle birlikte, çinko ve oksijen Zn–O bağlarının gerilme titreşimleriyle de örtüşmektedir. Bu durum, CIS ve ZnP yapılarının FTIR spektrumunda üst üste binen titreşim modları oluşturduğunu göstermektedir (Moustafa and El-Egili 1998).

794 cm^{-1} ve 1070 cm^{-1} civarında kaydedilen pikler, sırasıyla Si–O–Si simetrik ve asimetrik gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Bu bantlar, silika yapısının başarılı bir şekilde sentezlendiğini ve nanokompozit içerisinde yer aldığını göstermektedir (Innocenzi 2003).

Ayrıca, ZnP+SiO₂+CIS NP örneğinde 974 cm^{-1} civarında düşük yoğunluklu bir pik gözlemlenmiştir. Bu pik, doğrudan CIS'e ait olmayıp, literatürde DNA ile etkileşime giren P–O bağlarının gerilme titreşimleri olarak tanımlanmaktadır (Theophanides 1981). Aynı zamanda, SiO₂ matrisiyle olası etkileşimlerin de bu sinyale katkı sağladığı düşünülmektedir.



Şekil 4.6. ZnP (a), ZnP+SiO₂ NP ve ZnP+ SiO₂+CIS NP FTIR sonuçları.

FTIR analizi sonucunda elde edilen karakteristik piklerin temsil ettikleri fonksiyonel gruplar ve ilgili bağ türleri Tablo 4.1 üzerinden ayrıntılı bir şekilde sunulmuştur.

Tablo 4.1. FTIR analizi sonucunda elde edilen piklerin yorumlanması

Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	Pik Ataması	Açıklama
794	Si–O–Si simetrik gerilme	SiO ₂ yapısından
1070	Si–O–Si asimetrik gerilme	SiO ₂ yapısından
1630	–NH ₂ bükülme / su bükülme	CIS işareti
1300–1500	–NH ₂ ve C–N titreşimleri	CIS işareti
500–600	Pt–N / Pt–Cl (veya Zn–O) titreşimleri	CIS + ZnP çakışması
974	Muhtemel P–O titreşimi veya matriks etkileşimi	CIS/ SiO ₂ etkisi

4.1.6. Zeta potansiyeli analizi

Zeta potansiyeli, bir partikülün çevresindeki sıvı ortamla etkileşimi sonucu oluşan elektriksel çift katman içindeki potansiyel farkını ifade eder. Bu değer, partikülün yüzey yükü ve çevresindeki iyonların dağılımı ile ilişkilidir. Yüksek mutlak zeta potansiyel değerleri (örneğin, ± 30 mV ve üzeri), partiküller arasındaki elektrostatik itmeleri artırarak agregasyonu önler ve böylece süspansiyonun kararlılığını sağlar. Düşük zeta potansiyel değerleri ise partiküllerin bir araya gelerek topaklanma eğilimini artırır (Mauter et al. 2018).

Bu çalışmada sentezlenen ZnP ve ZnP+SiO₂ NP'lerinin zeta potansiyel değerleri ölçülerek kolloidal stabiliteleri değerlendirilmiştir. Zeta potansiyeli, NP yüzey yükünü ve buna bağlı olarak süspansiyon içerisindeki kararlılığını belirleyen önemli bir karakterizasyon parametresidir.

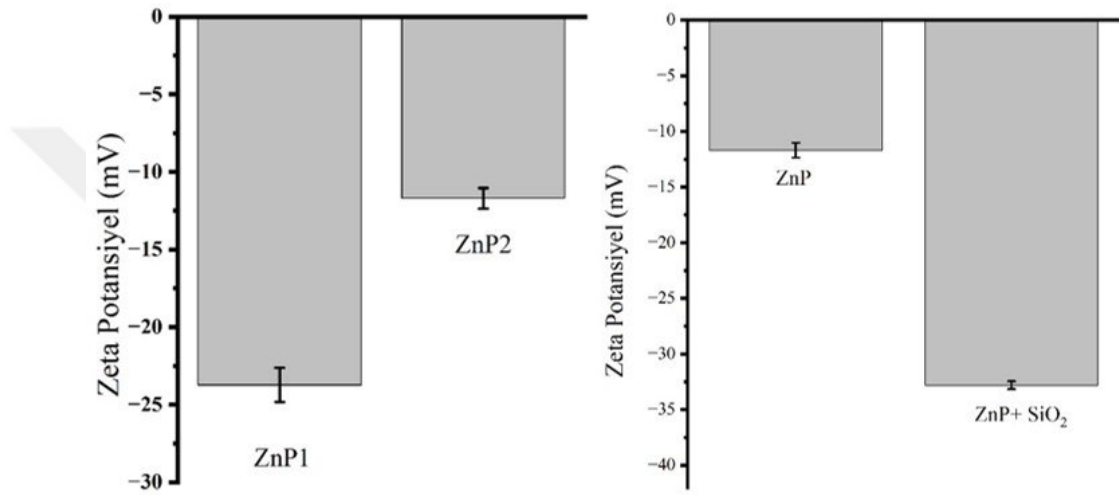
Yapılan ölçümler sonucunda, ZnP1 örneğinin zeta potansiyeli yaklaşık -25 mV, ZnP2 örneğinin ise -12 mV olarak bulunmuştur. Benzer şekilde, ZnP'nin zeta potansiyeli -11 mV iken, SiO₂ ile kaplanmış ZnP+SiO₂ NP zeta potansiyeli -35 mV düzeyinde ölçülmüştür (Şekil 4.7). Bu sonuçlar, SiO₂ kaplamanın NP yüzeyinde yük yoğunluğunu artırarak partiküller arası elektrostatik itici kuvvetleri güçlendirdiğini ve bu sayede sistemin daha kararlı hale geldiğini göstermektedir.

Zeta potansiyel değeri mutlak olarak ± 30 mV'un üzerine çıktığında süspansiyonun kararlı olduğu kabul edilir (Hunter 2013). Bu bağlamda, ZnP+SiO₂ NP'leri yüksek kolloidal stabiliteye sahipken, kaplamasız ZnP NP ise özellikle ZnP2 örneğinde daha düşük stabilite gözlenmiştir. Başka bir araştırmada, metal oksit NP'lerin zeta potansiyelinin, partikül konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği ve bu değişimin partikül stabilitesi üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Wang et al. 2013).

Literatürde benzer bulgulara rastlanmaktadır. SiO₂ kaplamalı ZnP NP'lerinin kaplamasız partiküllere kıyasla daha negatif zeta potansiyel değerlerine sahip olduğunu ve bunun kararlılığı artırdığını belirtmiştir (Herrmann et al. 2014). Ayrıca zeta potansiyel

ölçümünün NP'lerin biyolojik ortamda etkileşimlerini ve biyouyumluluklarını öngörmeye kritik rol oynadığı vurgulanmaktadır (Bhattacharjee 2016).

Sonuç olarak, bu çalışma ZnP+SiO₂ nanopartiküllerinin yüzey modifikasyonu ile stabilitesinin artırılabilirliğini göstermektedir. Bu bulgu, özellikle ilaç taşıyıcı sistemler, biyosensör uygulamaları veya doku mühendisliği gibi alanlarda nanopartikül tasarımında dikkate alınması gereken önemli bir parametreyi ortaya koymaktadır.

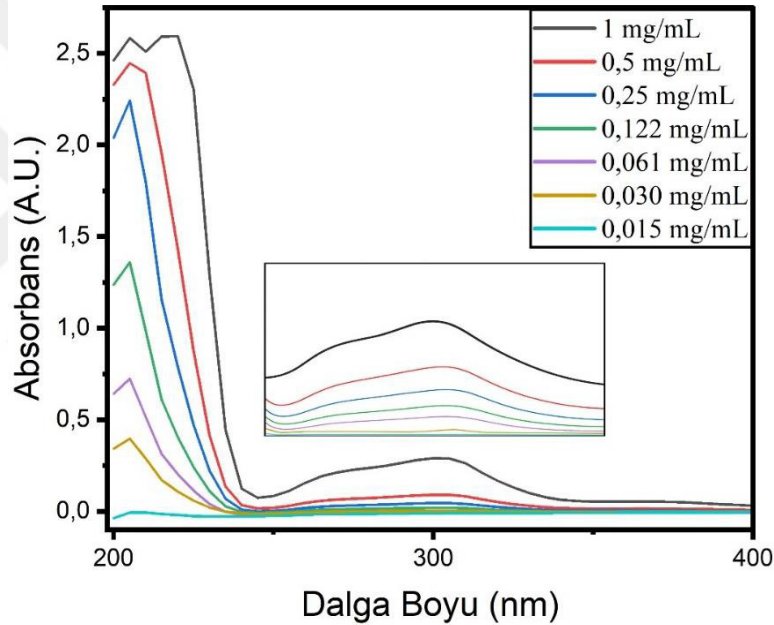


Şekil 4.7. Yeşil sentez ile 2 farklı protokol ile üretilmiş ZnP(A); tercih edilen 2. Protokol ile üretilmiş ZnP2 ve ZnP+SiO₂ zeta potansiyel analiz sonuçları.

4.2. İlaç Yükleme ve Salım Analizleri

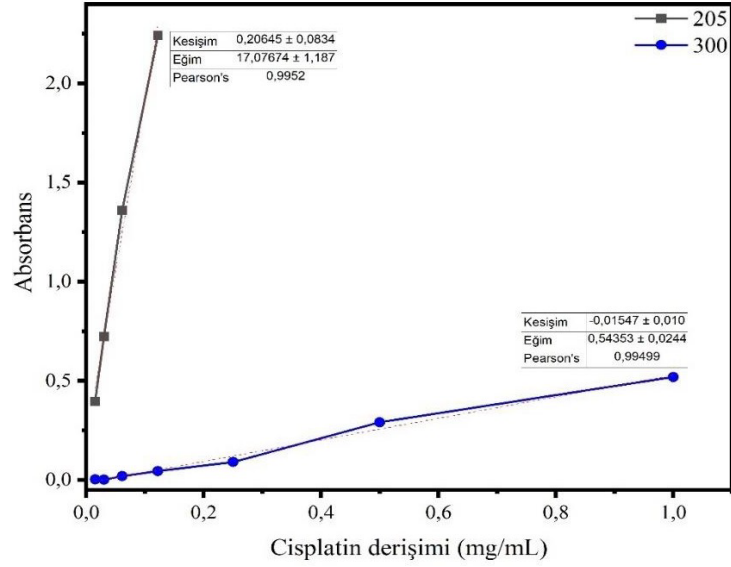
Bu çalışmada, CIS ilacının absorpsiyon özelliklerini belirlemek amacıyla UV-Görünür Bölge (UV-Vis) spektrofotometrisi kullanılmıştır. Analizler, 200-700 nm dalga boyu aralığında farklı konsantrasyonlardaki CIS çözeltileri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen spektral veriler, CIS'in karakteristik absorpsiyon piklerinin yaklaşık 203-205 nm ve 280-300 nm civarında konumlandığını göstermiştir (Şekil 4.8). Bu piklerin, ligandan metal iyonuna doğru gerçekleşen yük aktarımı ile platin (II) merkezli d-orbitalleri arasındaki elektronik geçişlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. (Campbell et al. 2020; Camacho et al. 2023).

Literatürde, CIS'in UV-Vis absorpsiyon spektrumunda çeşitli piklerin rapor edildiği görülmektedir. Örneğin, bir çalışmada 301 nm'de belirgin bir absorpsiyon piki gözlemlenmiştir. Başka bir araştırmada ise 269 nm ve 366 nm'de pikler rapor edilmiştir, bu da cisplatinin farklı ortam ve koşullarda çeşitli absorpsiyon özellikleri sergileyebileceğini göstermektedir (Campbell et al. 2020). Ayrıca, 207 nm'de bir maksimum absorpsiyonun varlığı da bildirilmiştir (Lai et al. 2018). Bu çalışmada, 205 nm ve 300 nm dalga boylarında absorpsiyon pikleri elde edilmiştir. Elde edilen veriler, literatürdeki bulgularla uyumlu olup, CIS'in karakteristik absorpsiyon özelliklerini doğrulamaktadır. Belirlenen maksimum absorpsiyon dalga boyları, sonraki kalibrasyon eğrisi oluşturma ve konsantrasyon tayinlerinde referans olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.8. CIS ilacının farklı konsantrasyonlarda Uv-vis analizi.

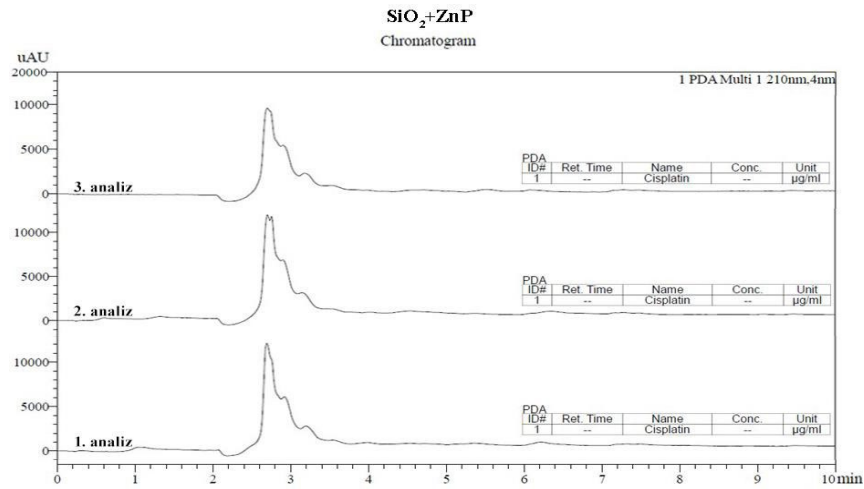
Bu çalışmada, CIS ilacının konsantrasyonunun UV-Görünür Bölge (UV-Vis) spektrofotometrisi ile kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. 205 nm'de elde edilen kalibrasyon eğrisi, yüksek doğrulukta doğrusal bir ilişki göstermiştir. Elde edilen korelasyon katsayısı (R^2) 0,99520 olduğu tespit edilmiştir. 300 nm'de elde edilen kalibrasyon eğrisi, yine aynı şekilde yüksek doğrulukta doğrusal bir ilişki göstermiştir. Bu pike ait R^2 ise 0,99499 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Her iki pik ile elde edilen korelasyonlar, Beer-Lambert yasasına uygunluk açısından oldukça yüksek bir güvenilirlik sunmaktadır.



Şekil 4.9. CIS ilacına ait 205 ve 300 absorpsiyon pikleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi.

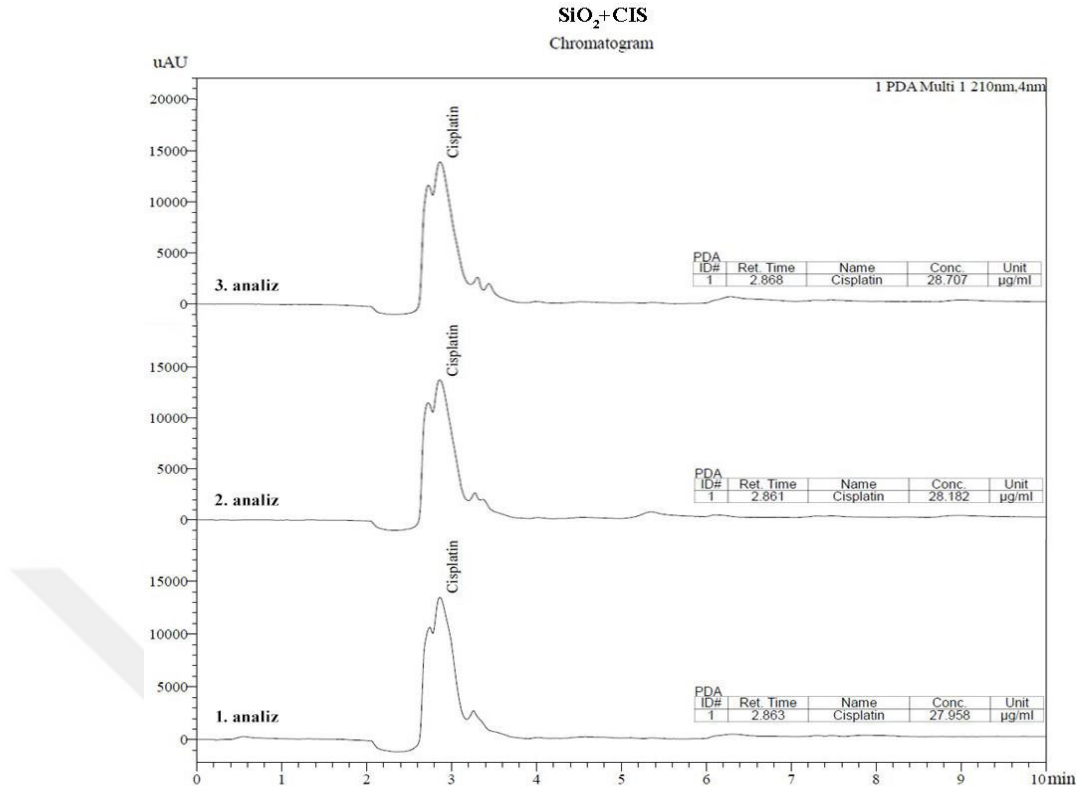
4.2.1. İlaç yükleme HPLC analizi

HPLC, ilaç yükleme analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir analitik tekniktir. Bu yöntem, yüksek duyarlılık ve özgüllük sunarak, ilaçların kantitatif ve kalitatif analizlerinde güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlar (Nikolin et al. 2004). Küçük moleküllerden büyük biyoterapötiklere kadar çeşitli bileşenlerin analizinde kullanılabilir. HPLC, tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar sunarak, ilaç yükleme analizlerinde güvenilirlik sağlar (Nikolin et al. 2004).

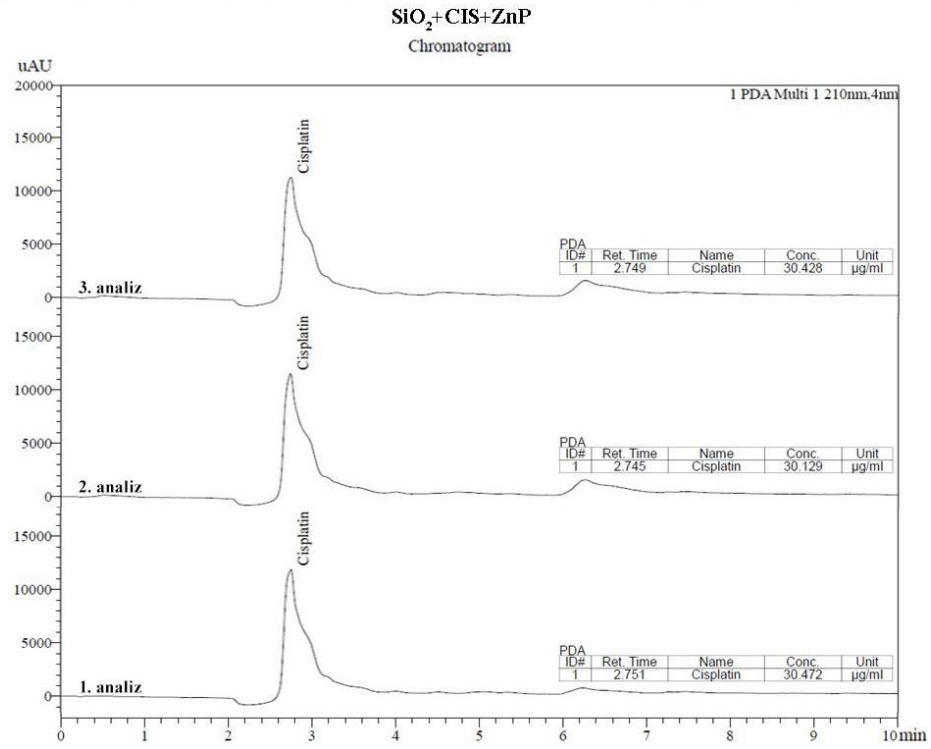


Şekil 4.10. Standart olarak 1 mg/mL CIS kullanılan SiO₂+ZnP örneğinin HPLC analiz sonuçları.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.11. Standart olarak 1mg/ml CIS kullanılan SiO₂+CIS örneğinin HPLC analiz sonuçları.



Şekil 4.12. Standart olarak 1mg/ml CIS kullanılan SiO₂+Cis+ZnP örneğinin HPLC analiz sonuçları.

Yapılan HPLC analizlerinde, yalnızca SiO₂ NP'lere yüklenen CIS örneklerinde ortalama 28,28 µg/mL konsantrasyon elde edilirken, ZnP immobilizasyonu sonrasında bu değer 30,34 µg/mL'ye yükselmiştir. Bu artış, ZnP yapısının ek bağlanma yüzeyleri sağlayarak ilaç yükleme verimini artırdığını göstermektedir. Retansiyon zamanında gözlenen hafif öne kayma, Zn varlığının mobil faz-istasyonier faz etkileşimlerini etkileyebileceğini işaret etmekte; ancak analizlerde yüksek tekrarlanabilirlik ve düşük varyasyon sağlandığı için yöntemin güvenilirliği korunmuştur. İlaç içermeyen SiO₂+ZnP kontrol örneklerinde herhangi bir CIS sinyali tespit edilmemiştir; bu da sistemin özgüllüğünü ve analiz koşullarının uygunluğunu teyit etmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda, 1 mg SiO₂+Cis+ZnP NP örneğinde 30,34 µg CIS tespit edilmiştir.

4.2.2. İlaç salınımı

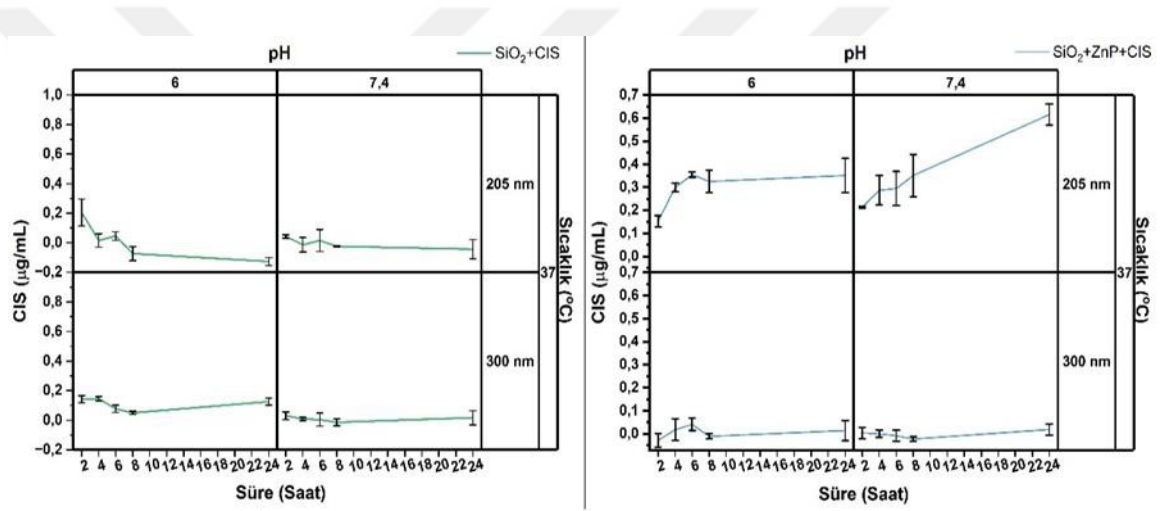
Bu çalışmada, SiO₂ taşıyıcı yüzeye bağlanmış CIS ile, bu yapıya ZnP kaplaması eklenerek oluşturulan formülasyonlar incelenmiştir (Şekil 4.13). SiO₂+CIS NP'lerin 205 nm'deki ölçümleri, hem pH 6 hem de pH 7,4 koşullarında iki evreli bir salınım profili göstermiştir. İlk evrede (0–2 saat) salınım miktarı hızla 0,15–0,20 µg/mL'ye çıkmış; ikinci evrede (2–24 saat) salınım hızı yavaşlayarak 24. saatte 0,05–0,08 µg/mL düzeyinde dengeye ulaşmıştır. Bu durum, yüzeye daha zayıf bağlanmış CIS'in ilk saatlerde hızla serbest kalması ve kalan moleküllerin daha güçlü etkileşimlerle sistemde tutulmasıyla açıklanabilir. Ayrıca, mesoporöz silika taşıyıcıların CIS maddesini benzer iki aşamalı salınım profili sergilediği, başlangıçta hızlı salınım evresi ardından yavaş salınım fazına geçildiği literatürde belirtilmiştir (Zakeri et al. 2021). 300 nm'deki ölçümler her iki pH'da da 0,02 µg/mL'nin altında kalmış; bu, asıl ilacın absorbansını veren 205 nm verilerinin daha güvenilir olduğunu göstermektedir.

SiO₂+ZnP+CIS NP'lerin 205 nm ve 300 nm'deki salınım kinetiği incelendiğinde, 205 nm'de pH 6 koşulunda ilk 4 saatte salınım miktarı 0,30–0,40 µg/mL'ye kadar yükselmiş, ardından 4–24 saat aralığında yaklaşık 0,35 µg/mL civarında sabit kalmıştır. pH 7,4 ortamında ise salınım, başlangıçta 0,20 µg/mL iken 24. saatte kadar kademeli olarak 0,65 µg/mL'ye çıkmıştır. Bu sonuç, ZnP'ın ilacın ortama kontrollü ve pH'a duyarlı biçimde serbest kalmasını sağladığını işaret etmektedir. Literatürde, pH-duyarlı

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

kaplamalara sahip NP sistemlerinin nötr pH'da stabil kalıp asidik ortamda kontrollü salınım gerçekleştirdiği vurgulanmakta, özellikle pH 6–7 arasında hızlı ilk salınım sonrası 24–72 saatte daha yavaş yayılım sağlandığı bildirilmektedir.

300 nm ölçümleri her iki pH'da da 0,03 µg/mL'nin altında bulunmuştur. Sonuç olarak, en yüksek salım SiO₂+ZnP+CIS NP'lerde pH 7,4 koşullarında (0,65 µg/mL) 205 nm'de gerçekleşmiştir. Bu davranış, ZnP kaplamasının hem salım kinetiğini uzatarak kontrollü salınım sağladığını hem de Zn-tabanlı pH-kilitli sistemlerin tümör benzeri ortamda yüksek salınım gösterdiğini destekleyen mekanizmalarla uyumludur (Alotaibi et al. 2024).



Şekil 4.13. SiO₂+Cis+ZnP ve SiO₂+Cis NP'lerinin pH'a duyarlı salım analiz grafikleri.

4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.3.1. Hücresel alım

PGSK, hücre zarını geçebilen ve hücre içindeki serbest iki değerlikli metal iyonlarıyla (özellikle Zn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺) şelat oluşturarak floresans şiddetinde azalmaya neden olan bir göstergedir. Bu özelliği sayesinde PGSK, hücre içi metal iyonlarının varlığını dolaylı olarak ölçmekte ve özellikle NP temelli tedavi sistemlerinin hücresel alım etkinliğini değerlendirmede kullanışlıdır (Fernández-Castané et al. 2017). Akış sitometrisi ile birlikte kullanıldığında, PGSK'nin floresansındaki azalma, hücre içerisine

alınan metal iyonlarını ya da metal içeren NP'leri tespit etmede kantitatif veri sunar (Du et al. 2015)

PGSK'nin Zn iyonlarına duyarlılığı, üretilen NP'nin içeriğindeki Zn'nin hücre alımının tespiti için etkili bir araç olmasını sağlar. Bu bağlamda, PGSK'nin Zn^{2+} iyonlarına duyarlılığı ve Zn bazlı NP'lerin hücre alımının değerlendirilmesinde kullanımı, literatürde dolaylı olarak desteklenmektedir.

FaDu hücre hattına 8 ve 24 saat süreyle, 0 $\mu\text{g/mL}$ (kontrol grubu) ve 15 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda NP uygulaması yapılarak hücre alım seviyesi PGSK boyası kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.14). PGSK boyasının çalışma prensibine göre, metal iyonlarının hücre içine giriş miktarı arttıkça F_0/F oranında düşüş gözlemlenir. Bu yöntem, daha önce sitotoksikite çalışmaları ve metalik NP'ler ile yapılan çalışmalarda metal raspsının ölçülmesi için güvenilir bir araç olarak kullanılmıştır.

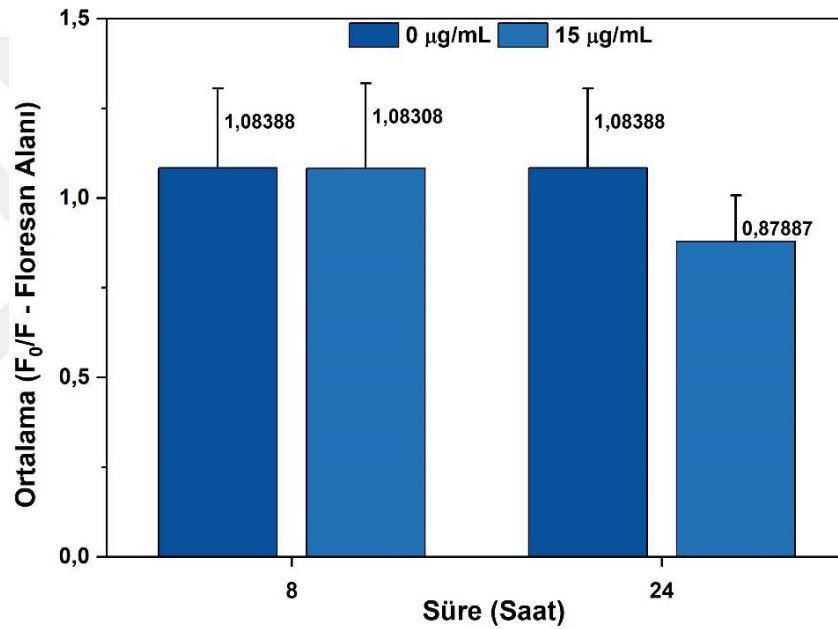
Elde edilen verilere göre, 8. saatte kontrol (0 $\mu\text{g/mL}$) ve uygulama grubunda (15 $\mu\text{g/mL}$) benzer F_0/F oranları (sırasıyla 1,08388 ve 1,08308) ölçülmüş olup, gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Bu durum, 8 saatlik sürede nanopartiküllerin hücre içine etkin bir şekilde giriş yapmadığını veya henüz ölçülebilir seviyede olmadığını göstermektedir. Benzer şekilde, literatürde hızlı hücre içi alımın genellikle 12–24 saatlik inkübasyondan sonra net olarak gözlemlendiği belirtilmiştir.

Buna karşın, 24 saat sonunda 15 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda uygulanan NP'ler için F_0/F oranında belirgin bir düşüş (0,87887) gözlenmiş olup, kontrol grubunun F_0/F oranına (1,08388) göre anlamlı olarak düşüktür. Bu düşüş, NP'lerin hücre içine daha fazla Zn taşıdığını ve metal iyonunun floresans sönmesine yol açtığını düşündürmektedir. Benzer metallerle yapılmış NP çalışmalarında, PGSK aracılığıyla 24 saatlik inkübasyondan sonra hücrelerde belirgin metal içe alımı rapor edilmiştir (Carter et al. 2014).

Diğer bir ifadeyle, NP'lerin etkin hücre alımı için en az 24 saatlik bir inkübasyon süresinin gerekli olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuç, özellikle 300 nm altı

büyükölükteki (tipik NP için mg ölçeğinde) NP'lerin endositotik mekanizmalarla zamanla birikimini gösteren niteliklerle uyumludur.

Elde edilen verilerin değeriendirilmesinde, NP'lerin FaDu hücrelerine hücrese alımı zaman bağımlı bir davranış sergilemekte olup, 24 saatlik uygulama süresinde etkin ve anlamlı bir hücrese alım gerçekteşmiştir. Bu durum, ZnP taşınımına bağılı ilaç salınımının hedef hücrelere daha etkili ulaşması açısından önem taşımaktadır ve metal içeren NP sistemlerinin terapötik potansiyelini destekleyici bir kanıt olarak literatürde yer alır.



Şekil 4.14. ZnP+SiO₂ NP'lerin hücrese alımı.

4.3.2. Hücre canlılık analizi

FaDu hücrelerine ZnP+SiO₂ ve ZnP+SiO₂+CIS uygulamalarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değeriendirmek amacıyla, hücreler 24 saat boyunca 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 ve 100 µg/mL sabit konsantrasyonlarla muamele edilmiştir (Şekil 4.15.). ZnP+SiO₂+CIS kompleksi için IC₅₀ değeri 15 ug/mL bulunmuştur.

ZnP+SiO₂ formülasyonunun hücre canlılığı üzerinde konsantrasyona bağlı olarak anlamlı etkisi tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile ZnP+SiO₂'nin 20, 30, 40, 50 ve 75 µg/mL konsantrasyonlarında gözlemlenen yüksek derecede anlamlı farklılık ($p < 0,001$), doz-bağımlı sitotoksikite gösterimiyle uyumludur. Literatürde, Zn-fonksiyonelleştirilmiş NP çeşitli kanser hücre hatlarında doz-yanıt eğrisi şeklinde anlamlı canlılık azalmasına neden olduğu rapor edilmiştir ($p < 0,001$) (Gelbard, 2024).

ZnP+SiO₂ 5 µg/mL grubu ile daha yüksek konsantrasyonlar (20–100 µg/mL) arasında $p < 0,001$ anlamlılık, 20 µg/mL ile 30–40 µg/mL arasındaki farkın da benzer düzeyde anlamlı bulunması, sitotoksik etkinliğin düşük doz sınırını ve artan dozda yoğunlaştığını göstermektedir. Bu, SiO₂ taşıyıcı ile desteklenen doz-yanıt davranışıyla literatürde bildirilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

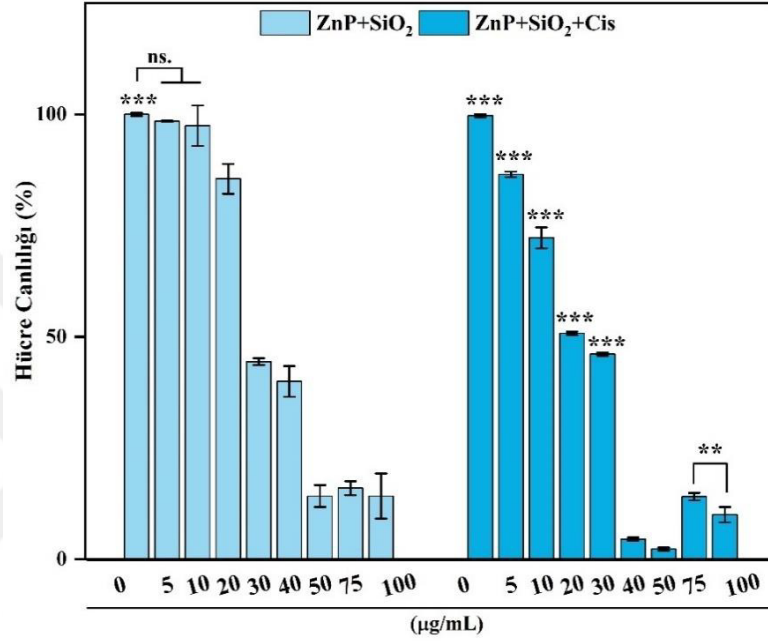
ZnP+ SiO₂ 30 µg/mL grubu ile daha yüksek konsantrasyonlar (50, 75, 100 µg/mL) arasındaki $p < 0,001$ ilişki, parçacık yükü arttıkça canlılıkta belirgin düşüş olduğunu doğrulamaktadır; bu, yüksek doz Zn-fonksiyonelleştirilmiş NP'lerin FaDu hücrelerinde sitotoksikite oluşturduğuna dair önceki bulgularla örtüşmektedir.

ZnP+SiO₂+CIS uygulamalarında da benzer şekilde, kontrol grubu ile tüm konsantrasyonlarda (5–100 µg/mL) yüksek derecede anlamlı farklar ($p < 0,001$) gözlemlenmiş; özellikle 5–30 µg/mL grupları arasında ve daha yüksek dozlarda (40–100 µg/mL) karşılaştırmalar, anlamlı farklılık düzeylerini korumuştur ($p < 0,001$ veya $p < 0,01$). Bu sonuç, CIS+ZnP NP konsantrasyona bağlı şekilde hücre canlılığını azaltarak güçlü bir toksik etki oluşturduğunu göstermektedir. Kaynaklardan elde edilen verilerde, SiO₂ taşıyıcı CIS'li NP MTT/CCK-8 testlerinde doz-yanıt göstermesi literatürel referanslarla desteklenmiştir.

Ayrıca, ZnP+SiO₂+CIS 100 µg/mL grubunun 75 µg/mL'ye göre $p < 0,01$; 50 µg/mL'ye göre $p < 0,001$ olarak rapor edilmesi, formülasyonun yüksek dozlarda bile canlılıkta ölçülebilir artış sağlayarak sistemin etkin sitotoksik kapasitesini ortaya koymaktadır. Bu bulgu, platinli NP'lerde doz artırımlarıyla hücre ölümü üzerine etkisinin önceki çalışmalarda da gösterildiği şekilde tutarlıdır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu veriler ışığında, ZnP+SiO₂ ve ZnP+SiO₂+CIS uygulamalarının FaDu hücre hattında hem konsantrasyona bağlı hem de doz-yanıt eğrisi çerçevesinde anlamlı sitotoksikite oluşturduğu, ZnP fonksiyonelleştirmesinin ve CIS yüklemesinin birleştirilmesinin terapötik etkiyi belirgin şekilde artırdığını göstermektedir. Bu da sistemin etkin kemoterapi taşıyıcı aday olarak potansiyelini güçlendirmektedir.

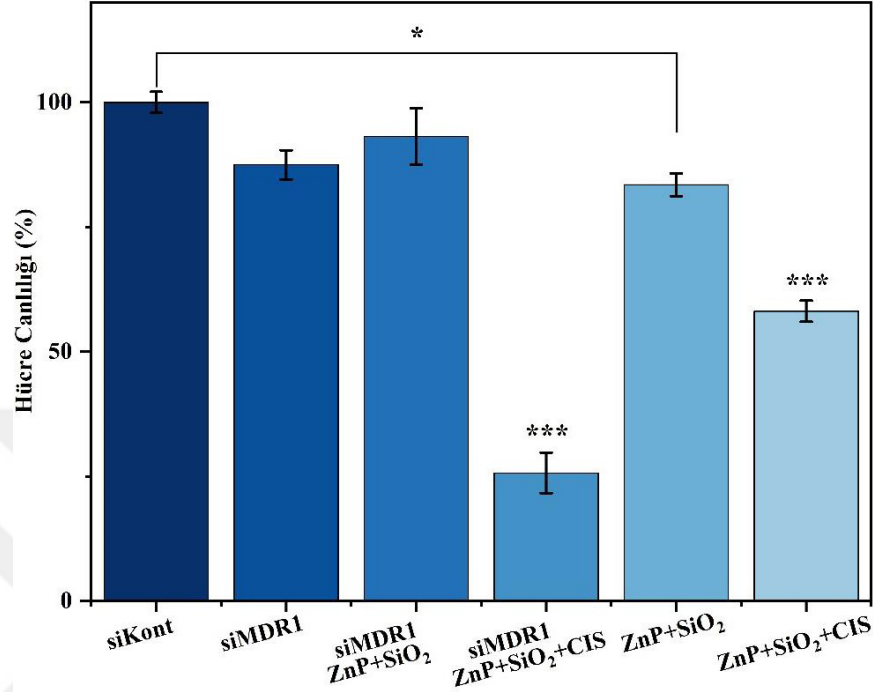


Şekil 4.15. FaDu hücrelerinde ZnP+SiO₂ ve ZnP+SiO₂+CIS 15 µg/mL (IC₅₀: 15 µg/mL) uygulamalarının 24 saat sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (Kontrol ve tüm uygulama grupları; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Şekil 4.16’da verilen canlılık analizi sonuçları, siMDR1 ile ZnP+SiO₂+CIS uygulaması, diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı farklılıklar göstermiştir (p < 0,001). Bu grup, siKontrol, siMDR1, siMDR1+ZnP+SiO₂, ZnP+SiO₂ ve ZnP+SiO₂+CIS gruplarına kıyasla hücre canlılığında belirgin bir azalma oluşturmuştur. Bu sonuç, *MDR1* gen susturulmasıyla birlikte ZnP+SiO₂ taşıyıcı sistemine yüklenen CIS uygulamasının, hücre proliferasyonunu baskılayarak anti-kanser etkisini önemli ölçüde artırdığını göstermektedir.

Ek olarak, ZnP+SiO₂+CIS uygulaması, aynı taşıyıcının ilaçsız hali olan ZnP+SiO₂ ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde farklılık sergilemiştir (p < 0,001). Bu durum, CIS

yüklemesinin tek başına taşıyıcıya göre hücre canlılığını daha fazla baskıladığını göstermektedir.



Şekil 4.16. FaDu hücrelerinde MDR1 gen susturmasaonrası ZnP+SiO₂ (15 µg/mL) ve ZnP+SiO₂+CIS (15 µg/mL) uygulamalarının 24 saat sonunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri (Kontrol ve tüm uygulama grupları; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.3.3. Apoptoz analizi

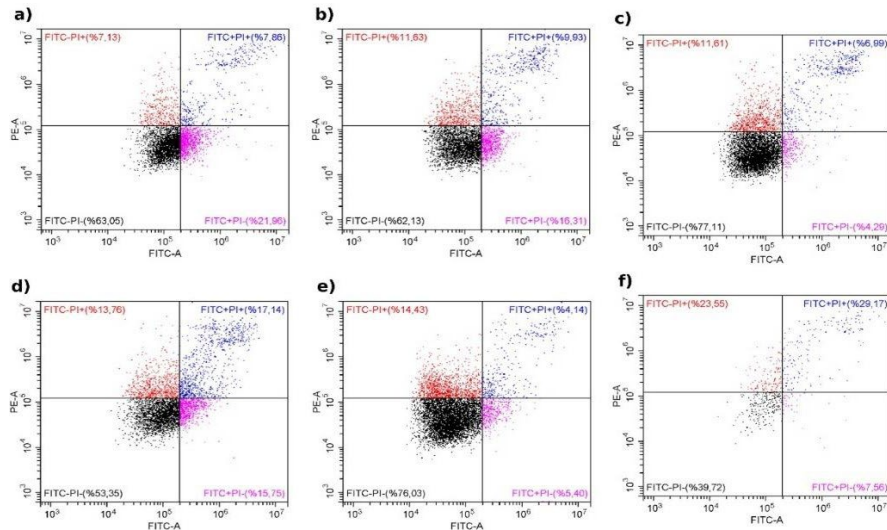
FaDu hücrelerinde Annexin V-FITC/PI analizine göre siKont grubunda %63,05 oranında canlılık, %21,96 erken apoptoz, %7,86 geç apoptoz ve %7,13 nekroz saptanmıştır; bu değerler bazal apoptotik aktiviteyi yansıtmaktadır. siMDR1 grubunda canlılık oranı %62,13 ile kontrol grubuna benzerken erken apoptoz %16,31 ve nekroz %11,63 olarak kaydedilmiştir. Bu durum, MDR1 gen susturulmasının tek başına sınırlı apoptotik etki yapmakla birlikte membran bütünlüğünde hafif bozulma ile nekrozun artabileceğini düşündürmektedir. Annexin-V/PI analizleri, erken apoptoz ile nekrozun ayırımında güvenilir araçlar olarak kabul edilmektedir (Crowley et al. 2016).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

siMDR1+ZnP+SiO₂ grubunda ise en yüksek canlılık oranı (%79,06) gözlemlenmiş; erken apoptoz %3,23, geç apoptoz %5,13 olmuştur. Bu, ZnP+SiO₂ taşıyıcı sistemin tek başına hücrede sitotoksik etki oluşturmadığını, biyoyum konusunda güvenilir olduğunu göstermektedir.

siMDR1+ZnP+ SiO₂+CIS uygulaması, canlılık oranını %53,35'e düşürmüş, erken apoptoz %15,75, geç apoptoz %17,14 şeklinde belirlenmiştir. Bu bulgular, *MDR1* gen susturulmuş zemin üzerinde CIS yüklü sistemin apoptotik hücre ölümünü kuvvetlendirdiğini göstermektedir; benzer MDR1-siRNA ile platin kombinasyonlarının apoptotik etkide sinerjik artış yarattığı literatürde rapor edilmiştir.

ZnP+SiO₂ uygulamasında canlılık %76,03, erken apoptoz %5,4, geç apoptoz %4,14 olarak saptanmış; bu da taşıyıcı sistemin kendi başına apoptotik bir etki üretmediğini doğrulamaktadır. Ancak, gen susturulması olmadan ZnP+SiO₂+CIS uygulandığında canlılık %39,72'ye düşmüş, toplam apoptoz oranı %36,73'e ulaşmış ve nekroz oranı da %23,55 olarak belirlenmiştir. Bu durum, MDR1 ekspresyonunun devam ettiği koşullarda CIS+SiO₂+ZnP, hem apoptoz hem de nekroz aracılığıyla belirgin bir hücre ölümü sağladığını ortaya koymaktadır. Benzer NP'ler sistemlerinde Annexin V/PI analizi ile CME-yüklemesi sonrası nekrotik süreçlerde artış gözlemlenmiştir.

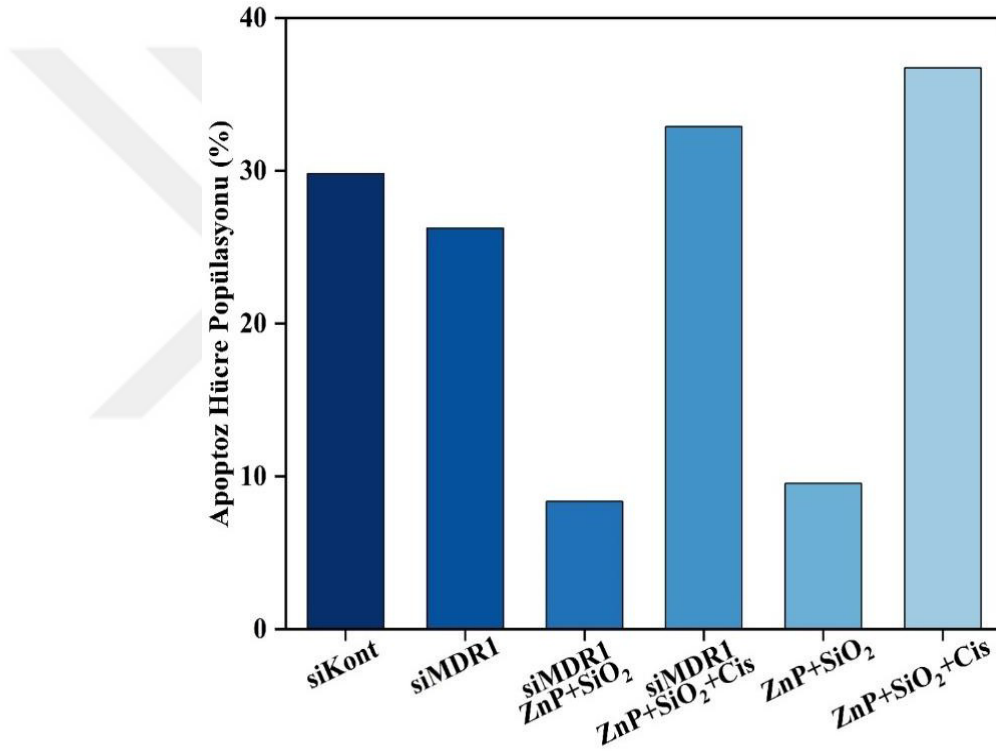


Şekil 4.17. FaDu hücre hattında 15 µg/mL dozunda farklı tedavi gruplarına ait flow sitometrisi analiz sonuçları. Her panelde hücrelerin Annexin V-FITC ve PI boyamaları ile apoptoz ve nekroz düzeyleri değerlendirilmiştir. a) Kontrol,

b) siMDR1, c) siMDR1 ZnP+SiO₂, d) siMDR1 ZnP+SiO₂+CIS, e) ZnP+SiO₂, f) ZnP+SiO₂+CIS.

MDR1 susturulması tek başına sınırlı apoptotik etki oluştururken, ZnP+SiO₂ taşıyıcılar toksik değildir. CIS yükü, özellikle *MDR1* susturulmuş hücrelerde apoptozu artırmaktadır. *MDR1* ekspresyonu devam eden hücrelerde ise CIS'e bağlı artan nekroz, ilaç direncinin etkisiyle farklı bir hücre ölüm yolunu tetiklediğini düşündürmektedir.

Ayrıca uygulamalar sonucu elde edilen apoptoz oranları Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18. FaDu hücre hattında 15 µg/mL dozunda farklı tedavi gruplarına uygulanan Annexin V-FITC/PI boyaması sonrası toplam apoptoz oranları.

4.3.4. Hücre döngüsü (cell cycle) analizi

Deneyssel veriler, farklı tedavi gruplarının FaDu hücre hattında hücre döngüsündeki faz dağılımını anlamlı şekilde etkilediğini göstermiştir. Özellikle CIS ve NP kombinasyonlarının, hücreleri belirli fazlarda duraklattıkları gözlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

1. G2/M Fazında Artış

5. grup (siMDR1 + ZnP+SiO₂+Cis) ve 7. grup (ZnP+SiO₂+Cis) örneklerinde G2/M fazında belirgin bir artış saptanmıştır. Bu durum, hücrelerin mitotik bölünmeden önce DNA hasarı nedeniyle durakladığını göstermektedir. CIS gibi DNA çapraz bağlayıcı ajanlar, DNA hasarına yanıt olarak G2/M arresti indükler; bu etki birçok hücre hattında daha önce rapor edilmiştir (Mueller et al. 2006).

2. G0/G1 Fazında Artış

6. grup (ZnP+SiO₂) hücrelerinde %70'i aşan bir G0/G1 fazı artışı gözlenmiştir. Bu sonuç, ZnP+SiO₂, hücre döngüsünü erken evre G1 fazında durdurarak hücre proliferasyonunu baskıladığına işaret eder. Benzer şekilde, SiO₂ NP'leri G1 fazında arrest oluştuğunu bildirmiştir (Edalatian et al. 2024).

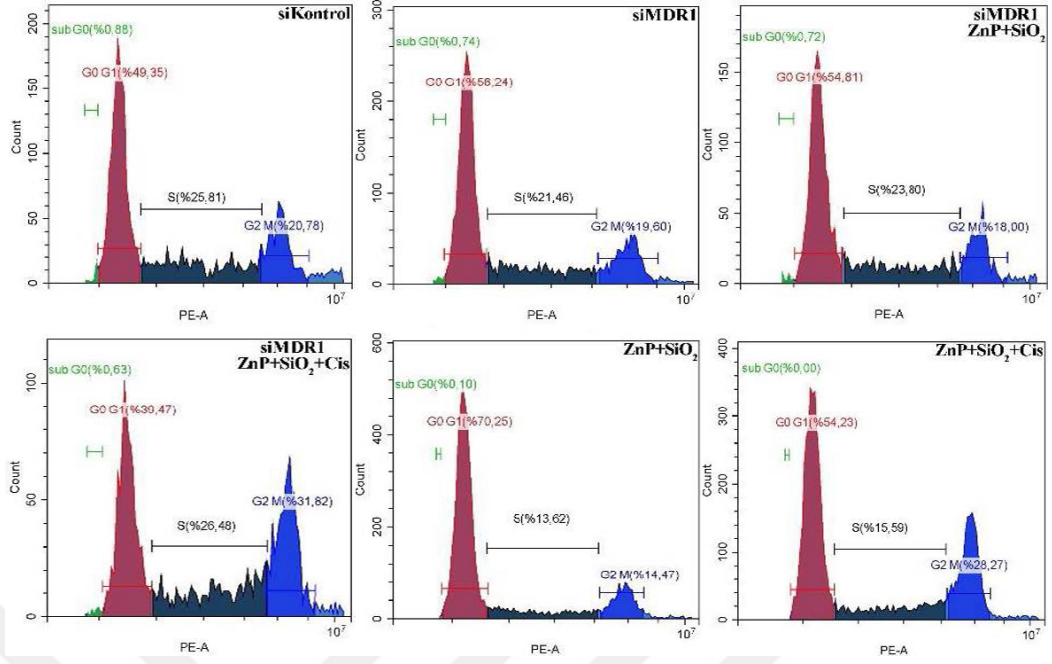
3. S Fazında Değişim

Gen susturulmuş gruplarda (örneğin siMDR1 ve siMDR1 + ZnP+SiO₂) S fazında artış eğilimi izlenmiştir. Bununla birlikte, CIS uygulaması bu artışı G2/M fazına aktarmıştır; bu da DNA sentezini tamamlayan hücrelerin, DNA hasarı nedeniyle G2 kontrol noktasında biriktiğini gösterir.

4. MDR1 Gen Susturmasının Etkisi

3. grup (siMDR1) ile 5. grup (siMDR1 + ZnP+SiO₂+Cis) karşılaştırması, MDR1 geninin susturulmasının tedaviye duyarlılığı artırdığını açıkça göstermektedir. Gen susturulması sonrası aynı doz NP ve CIS kombinasyonu, G2/M fazında anlamlı artışa neden olmuş ve bu da MDR1: ilaç dışı atımında anahtar rolü görüp birikimin artmasına sebep olmuştur. MDR1 susturulması ile hücre içi ilaç birikiminin arttığı daha önce rapor edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.19. FaDu hücre hattında 15 µg/mL dozunda uygulanan farklı tedavi gruplarına ait propidium iodide (PI) boyası ile elde edilen hücre döngüsü dağılımlarının flow sitometri histogramları.

Şekil 4.19’da elde edilen bulgular, *MDR1* gen susturmasının ZnP+SiO₂+CIS kombinasyonu ile uygulanan tedavinin etkinliğini artırdığını ve hücreleri G₂/M fazında duraklatarak proliferatif tümör hücrelerini baskıladığını göstermektedir. Bu analiz, CIS’in S ve G₂/M faz arresti oluşturduğunun literatürde desteklenmesiyle uyumludur (Ashoori et al. 2023).

Bu veriler, *MDR1*’in ilaç dışı atım mekanizmasındaki rolünü doğrular niteliktedir. ZnP+SiO₂+CIS, *MDR1* baskılandığında hücre içi birikimini artırarak G₂/M fazında daha güçlü duraklama oluşturmuş, bu da NP bazlı kemoterapi sistemlerinin mevcut direnç mekanizmalarına karşı daha etkili çözümler sunabileceğini göstermektedir.

4.3.5. Real time pcr analizi

MDR1 geninin FaDu hücrelerinde susturulmasının biyolojik etkilerini değerlendirmek amacıyla, hücre ölümü, proliferasyon ve sinyal iletim yollarında görev alan çeşitli genlerin ekspresyon düzeyleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu kapsamda, *MDR1*, *LRP*, *cMOAT*, *PTEN*, *ERK*, *AKT*, *Bax*, *Bcl-2*, *PARP*, *CDK2*, *CDK4* ve *CDK6* genlerinin ekspresyon profilleri analiz edilmiştir. Gerçekleştirilen bu analizler, siRNA aracılığıyla *MDR1* susturulmasının hücresel mekanizmalar üzerindeki etkilerini daha iyi anlamaya katkı sağlamıştır.

Gen ekspresyon analizleri, Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ yöntemi kullanılarak analiz edilmiş ve gen ekspresyon seviyelerindeki relatif değişimler belirlenmiştir. Bu analizlerde *beta-actin* geni iç referans olarak kullanılmış, hedef genlerin Ct (cycle threshold) değerleri *beta-actin*'e göre normalize edilerek farklı deney grupları arasında karşılaştırılabilir veri setleri oluşturulmuştur.

siRNA ile *MDR1* geninin susturulması sonucunda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0,001$). Bu, *MDR1* mRNA'sına yönelik siRNA tasarımlarının P-gp ekspresyonunu etkili şekilde azaltarak kemoterapi duyarlılığını artırdığını gösteren önceki çalışmalara paraleldir (Ganesh et al. 2013).

ZnP+SiO₂ uygulaması, siMDR1 grubunda *MDR1* ekspresyonunda kısmi bir geri dönüş sağlarken ($p < 0,05$), taşıyıcı üzerine yüklenen CIS ile oluşturulan siMDR1+ZnP+SiO₂+CIS grubunda bu geri dönüşün daha da belirginleştiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu gözlem, NP sistemlerin siRNA etkisini modüle edebileceğini, ancak ilacın eklenmesiyle gen ekspresyon dinamiklerinin değişebileceğini ortaya koymaktadır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

ZnP+SiO₂ grubu tek başına da *MDR1* ifadesini anlamlı biçimde baskılamış; CIS'in eklenmesi bu baskılayıcı etkiyi kısmen geri döndürmüştür ($p<0,05$) (Şekil 4.20a). Bu davranış, NP taşıyıcı sistemlerin gen düzeyinde değişiklik yapabileceğini gösteren yayınlarla uyumludur.

MDR1 mRNA'sına yönelik siRNA tasarımları, P-gp ekspresyonunu ve işlevini anlamlı şekilde baskılayarak dirençli kanser hücrelerinde kemoterapi duyarlılığını geri kazandırmıştır (Perez et al. 2011; Yang et al. 2016).

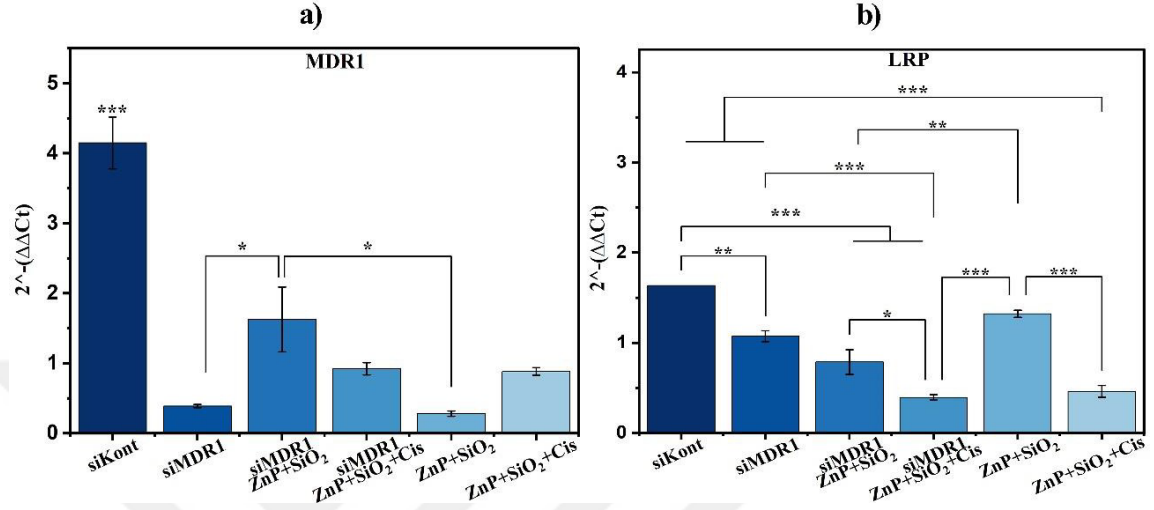
MDR1 susturulmasının, kontrol grubuna kıyasla *LRP* ekspresyonunda anlamlı bir azalma yarattığı gözlemlenmiştir ($p<0,01$). NP taşıyıcı ile birlikte siRNA uygulaması bu azalmayı derinleştirirken ($p<0,05$), CIS yüklü formülasyon *LRP* ifadesini en düşük seviyeye indirmiştir ($p<0,001$). Bu çıktı, siRNA müdahalesinin *LRP*'nin çoğalma, hücre yapışması ve migrasyon üzerindeki etkisini destekleyen literatürle tutarlıdır.

ZnP+SiO₂ tek başına orta düzeyde bir inhibisyon sağlarken, CIS'in eklenmesi bu inhibisyonadaki etkiyi belirgin biçimde güçlendirmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.20b). Bu durum, NP ile kemoterapi kombinasyonunun birden fazla direnç mekanizmasını eşzamanlı şekilde baskılayabildiğini göstermektedir.

Benzer literatürlerde *LRP/LR* (lung resistance-related protein) ekspresyonunun siRNA ile düşürülmesi hem akciğer kanseri hem de kolorektal kanser hücrelerinde hücre yapışmasını, invazyonu ve hayatta kalmayı anlamlı biçimde engellemiştir (Vania et al. 2018; Bignoux et al. 2023).

Elde edilen veriler, siRNA aracılığıyla *MDR1* geninin etkili biçimde susturulmasının hem *MDR1* hem de *LRP* genlerini eşzamanlı olarak baskıladığını göstermektedir. NP taşıyıcı sistemler ve özellikle CIS yüklü formülasyonlar, bu baskılayıcı etkiyi kademeli olarak gerçekleştirip hücre içi ilaç birikimini ve dolayısıyla

sitotoksik etkiyi artırma potansiyeline sahiptir. Bu stratejinin, MDR sorununu aşmaya yönelik yeni nesil ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde önemli bir rehber olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.20. *MDR1* geni susturulmuş FaDu hücre hattı üzerinde 15 µg/mL NP uygulamalarının *MDR1* (a) ve *LRP* (b) mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri. (Kontrol ve tüm uygulama grupları; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

cMOAT'ın ekspresyon seviyesinin siRNA ile *MDR1* susturulan hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenmiştir ($p<0,001$). Bu, *cMOAT* (*ABCC2/MRP2*) geninin *MDR1* baskılandığında hücrelerin platin atılımını dengelemeye yönelik kompansatuvar bir yanıt mekanizması olarak ifade artışına gidebileceğini düşündürmektedir. *cMOAT*'ın (*MRP2/ABCC2*) aşırı ekspresyonu, melanom ve yumurtalık karsinomu modellerinde platin DNA adüktlerinin oluşumunun azalması ve CIS'e karşı dirençle ilişkilendirilmiştir ve bu, telafi edici bir ilaç dışı atım tepkisine işaret etmektedir (Galluzzi et al. 2014).

siMDR1+ZnP+SiO₂ uygulaması bu artışı daha da derinleştirirken ($p<0,001$), CIS yüklü formülasyon siMDR1+ZnP+SiO₂+CIS *cMOAT* ifadesini anlamlı biçimde baskılamıştır ($p<0,05$). Bu sonuç, NP taşıyıcı ile birlikte uygulanan CIS, *ABC* taşıyıcı genlerinin ekspresyonunu dengeleyerek platin birikimini artırabileceğini düşündürmektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

ZnP+SiO₂ tek başına *cMOAT* ekspresyonunu anlamlı oranlarda düşürürken ($p<0,05$), üzerine eklenen CIS, ZnP+SiO₂'nin baskılayıcı etkisini kısmen geri döndürmüştür ($p<0,01$) (Şekil 4.21a). Bu gözlem, taşıyıcı sistemin *ABC* genleri üzerindeki modüle edici etkisinin ilacın varlığıyla değişebileceğini göstermektedir.

cMOAT, hücre içi platin bileşiklerinin atılımından sorumlu bir ATP-bağlı taşıyıcıdır. *MRP2*'nin aşırı eksprese edildiği hücrelerde CIS direncinin anlamlı şekilde yükseldiği gösterilmiştir (Guminski et al. 2006).

Klinik ve preklinik çalışmalarda ise nükleer membran lokalizasyonlu *ABCC2* ekspresyonunun platin bazlı tedaviye yanıtı öngördüğü rapor edilmiştir (Surowiak et al. 2006).

PTEN düzeylerinin siMDR1 grubunda kontrole göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,01$). *PTEN*, *PI3K/AKT* sinyal yolunu antagonize ederek hücre proliferasyonunu ve hayatta kalmayı düzenleyen kritik bir tümör süpresörüdür. *PTEN*'in azalışı, *PI3K/AKT* aktivasyonuna yol açarak platin direncini artırabilir (Surowiak et al. 2006).

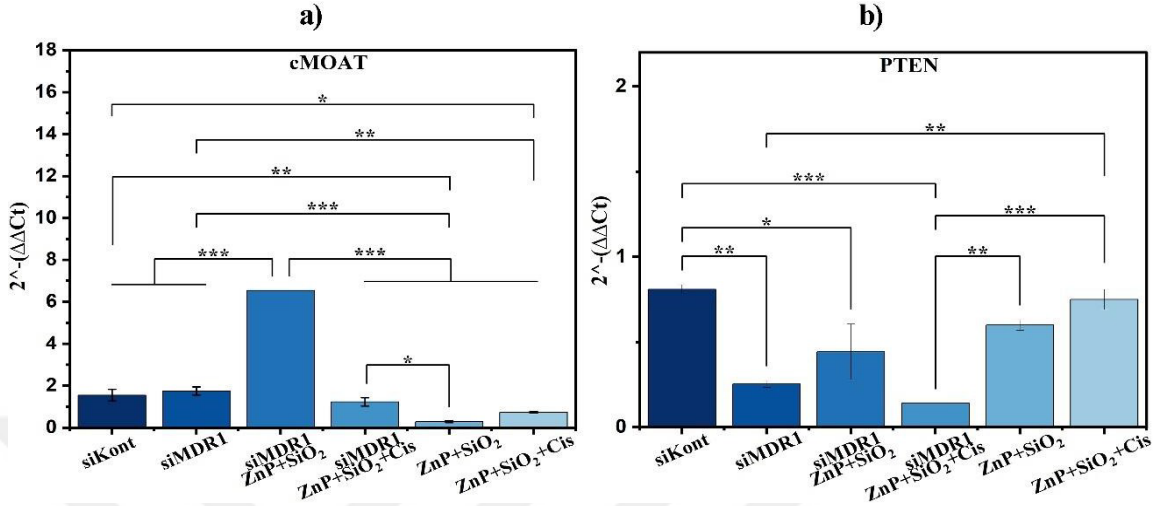
siMDR1+ZnP+SiO₂ grubunun ilavesi, *PTEN* ekspresyonunu kısmen geri kazandırırken ($p<0,05$), CIS yüklemesi (siMDR1+ZnP+SiO₂+CIS) bu artışı daha da belirginleştirmiştir ($p<0,001$). Bu davranış, NP + siRNA platformunun *PTEN-PI3K/AKT* ekseninde olumlu modülasyon sağladığını düşündürmektedir.

ZnP+SiO₂ tek başına *PTEN*'i anlamlı oranda yükseltmiş ($p<0,01$) ve CIS eklenmesi bu yükselişi derinleştirmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.21b). Bu sonuç, NP taşıyıcının tek başına bile tümör baskılayıcı genleri aktive edebildiğini ve CIS ile birlikte sinerjik etki gösterebildiğini ortaya koymuştur.

PTEN, *PI3K/AKT* sinyal yolunu antagonize ederek hücre proliferasyonunu ve hayatta kalmayı düzenleyen kritik bir tümör süpresörüdür. Humanos kökenli beyin, meme

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

ve prostat kanserlerinde *PTEN* genindeki mutasyonların yaygın olduğu bildirilmiş; bu mutasyonların tümör büyümesini serbest bıraktığı öne sürülmüştür (Li et al. 1997).



Şekil 4.21. *MDR1* geni susturulmuş FaDu hücre hattı üzerinde 15 µg/mL NP uygulamalarının *cMOAT* (a) ve *PTEN* (b) mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri. (Kontrol ve tüm uygulama grupları; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

siRNA ile *MDR1* geninin susturulması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *ERK* ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p < 0,01$). Bu gözlem, *MDR1*/P-gp silinmesinin MAPK/ERK yolunu baskılayarak hücre proliferasyonunu azaltabileceğini düşündürmektedir; benzer NP + siRNA sistemlerinde *ERK* düzeylerinde düşüş ve G₁ duraksaması rapor edilmiştir (Zheng et al. 2015).

ZnP+SiO₂ uygulaması *ERK* seviyelerini anlamlı biçimde artırırken ($p < 0,001$), üzerine yüklenen CIS bu aktivasyonu kısmen baskılamıştır ($p < 0,05$). Bu durum, NP'lerin *ERK* sinyalini tetikleyebildiğini, ancak CIS yüklemesiyle *ERK* aktivitesinin kontrol edilebildiğini göstermektedir; benzer Zn fonksiyonlu sistemlerde “nanopartiküller *ERK*-aktivasyonu artırırken platin birlikte verildiğinde bu etki zayıflamıştır” yönünde bulgular mevcuttur.

Tek başına ZnP+SiO₂ verildiğinde *ERK* ifadelerini anlamlı olarak bastırmış; CIS'in eklenmesi bu baskılayıcı etkiyi kısmen geri döndürmüştür ($p < 0,05$) (Şekil 4.22a).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu, NP taşıyıcıların *ERK* yolunu modüle ederek hücre döngüsünü etkileyebildiğini; CIS ilavesinin dengeleyici etkisi olduğunu göstermektedir.

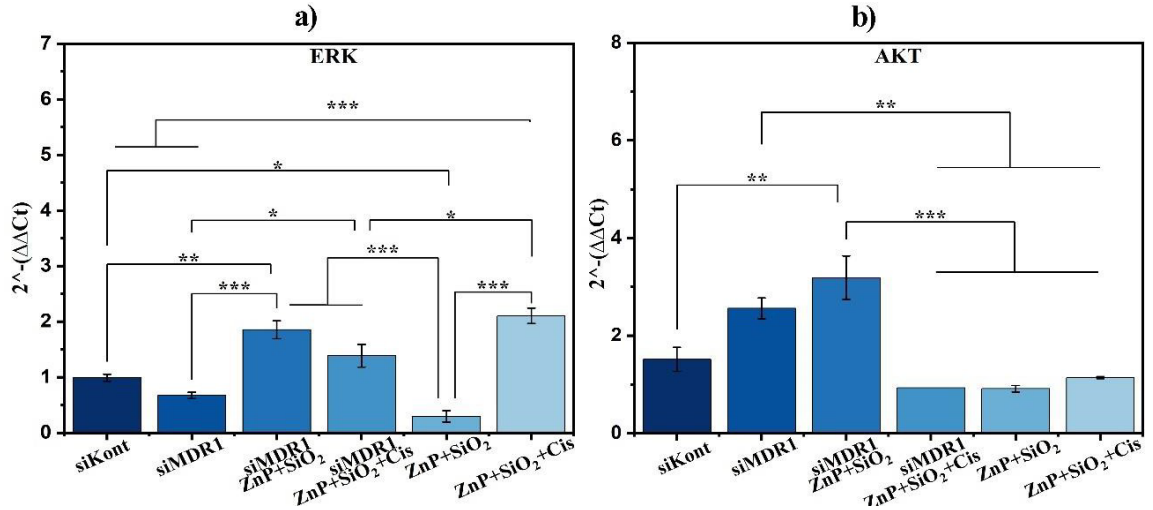
ERK kinazları, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve hayatta kalma süreçlerinde merkezi roller üstlenir (Yoon and Seger 2006).

MDR1 geninin siRNA ile susturulması *AKT* ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artırmıştır ($p < 0,01$). Bu, *MDR1* baskısının *PI3K/AKT* sinyal yolunu negatif regülasyondan pozitive kaydırarak hücre içi hayatta kalma sinyalini artırabileceğini düşündürmektedir; *MDR1*-siRNA uygulamalarında *p-AKT* artışı ve sitotoksosite ile ters korelasyon gösterilmiştir.

ZnP+SiO₂ uygulaması *AKT* seviyelerini daha da yükseltirken ($p < 0,001$), CIS yüklü grup bu artışı tersine çevirerek *AKT* seviyelerinde anlamlı bir düşüşe yol açmıştır ($p < 0,01$). Bu durum, NP taşıyıcıların pro-süvival *AKT* aktivitesini artırırken, CIS yüklemesiyle bu sinyalin geriletilmesini kontrol edilen anti-proliferatif etki olarak ortaya koymaktadır; benzer platin-siRNA NP sistemlerinde *AKT* sinyalinde gerileme bildirilmiştir.

ZnP+SiO₂ ve ZnP+SiO₂+CIS grupları arasında fark anlamlı bulunmamıştır ($p < 0,05$) (Şekil 4.22b), bu da CIS eklendiğinde *AKT* seviyesinin istikrarlı bir şekilde kontrol edildiğini göstermektedir.

AKT serin/treonin kinazı, hücre metabolizması, büyüme ve apoptoz regülasyonunda kritik düzenleyici işlevler taşır (Manning and Cantley 2007).



Şekil 4.22. *MDR1* geni susturulmuş FaDu hücre hattı üzerinde 15 µg/mL NP uygulamalarının *ERK* (a) ve *AKT* (b) mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri. (Kontrol ve tüm uygulama grupları; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

siRNA ile *MDR1* geninin susturulması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *BAX* ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p < 0,001$). Bu bulgu, *MDR1* bastırıldığında pro-apoptotik *BAX* düzeylerinin yükseldiğini gösteren NP + siRNA sistemlerine ilişkin çalışmaları desteklemektedir (Risnayani et al. 2018).

ZnP+SiO₂ uygulaması, siMDR1 grubunda *BAX* düzeylerinde anlamlı bir azalma oluştururken ($p < 0,01$), siMDR1+ZnP+SiO₂+CIS grubunda *BAX* ekspresyonunda tekrar anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bu değişim, CIS yüklemesinin pro-apoptotik sinyal yollarını yeniden aktive ederek *BAX* seviyelerini yükseltebildiğini göstermektedir; nabız NP ile CIS kombinasyonlarının *BAX/Bcl-2* oranını artırdığı ve mitokondriyal yolağı tetiklediği literatürde sıkça rapor edilmiştir.

ZnP+SiO₂ tek başına da *BAX* ifadesini anlamlı olarak artırmış; CIS'in eklenmesi bu artışı kısmen baskılamıştır ($p < 0,05$) (Şekil 4.23a). Bu bulgu, Zn içerikli NP'lerin *Bax* düzeylerinde değişiklik yaptığına dair prelinik kanıtlarla uyumludur (Wang et al. 2020).

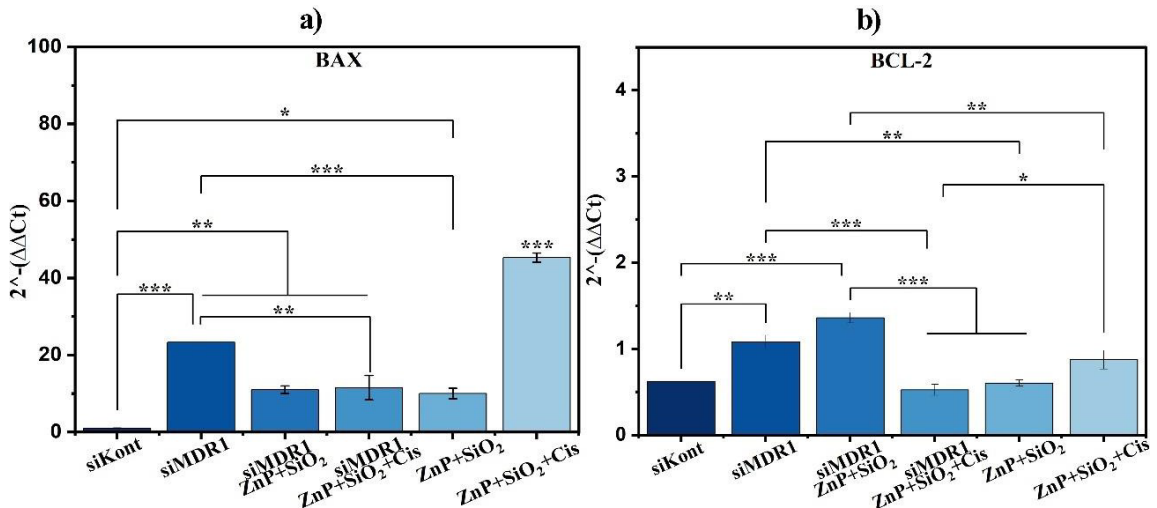
BAX, mitokondriyal permeabilitenin artması ve sitokrom c salınımı yoluyla programlanmış hücre ölümünü tetikleyen pro-apoptotik bir *Bcl-2* ailesi üyesidir (Reed 2006).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

siRNA ile *MDR1* geninin susturulması sonucunda *Bcl-2* ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p < 0,01$). Bu azalma, *MDR1* baskılanması ile birlikte anti-apoptotik savunmada gerileme yaşandığını, hücrenin ölümü yönünde daha duyarlı hale geldiğini göstermektedir; NP + siRNA sistemlerinde *Bcl-2* baskısının apoptotik yanıtı güçlendirdiği rapor edilmiştir. ZnP+SiO₂ NP uygulaması, siMDR1 grubunda *Bcl-2* seviyelerinde anlamlı bir artışa neden olurken ($p < 0,001$), siMDR1+ZnP+SiO₂+CIS formülasyonunda bu artış tersine çevrilerek anlamlı bir azalma kaydedilmiştir ($p < 0,01$). Bu sonuç, CIS yüklemesinin anti-apoptotik *Bcl-2* sinyalini zayıflatarak hücre ölümüne yönlendirdiğini düşündürmektedir; benzer NP + CIS sistemlerinde *Bcl-2*'de düşüş ve *Bax/Bcl-2* oranında artış gözlemlenmiştir (McFadden et al. 2021).

ZnP+SiO₂ ve ZnP+SiO₂+CIS grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.23b). Bu fark, NP ve CIS kombinasyonunun anti-apoptotik savunma mekanizmalarını etkili şekilde baskılayarak programlanmış hücre ölümünü desteklediğini göstermektedir.

Bcl-2, mitokondriyal dış membran bütünlüğünü koruyarak hücre hayatta kalmayı destekleyen anti-apoptotik bir *Bcl-2* ailesi üyesidir (Youle and Strasser 2008).



Şekil 4.23. *MDR1* geni susturulmuş FaDu hücre hattı üzerinde 15 µg/mL NP uygulamalarının *BAX* (a) ve *Bcl-2* (b) mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri. (Kontrol ve tüm uygulama grupları; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

siRNA ile *MDR1* geninin susturulması sonucunda kontrol grubuna kıyasla *PARP* ekspresyonunda anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p < 0,001$). Bu, DNA hasarına yanıt veren *PARP-1* aktivitesinde azalmaya yol açarak apoptoz yerine gençleştirme yolunu destekleyen hücrel bir tepkidir. NP üzerinden *MDR1* baskılandığında *PARP* sinyalinin zayıfladığına dair preklinik çalışmalarda mevcuttur (Ashrafizadeh et al. 2020).

ZnP+SiO₂ NP ile birlikte *MDR1* susturma, *PARP* seviyelerinde daha derin bir baskılamaya yol açarken ($p < 0,001$), NP'e yüklenen CIS bu baskılayıcı etkiyi kısmen geri çevirerek ekspresyonu kontrol seviyelerine yakınlaştırmıştır ($p < 0,05$). Bu durum, CIS'in DNA hasar sinyalini yeniden etkinleştiriyor olabileceğini düşündürmektedir; NP+CIS sistemlerinde *PARP* üzerinde böyle bir dengeleyici etki bildirilen bir sonuçtur.

NP taşıyıcı tek başına *PARP* ifadesini anlamlı biçimde azaltmış; CIS'in eklenmesi bu düşüşü hafifletmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.24a). Bu gözlem, NP uygulamalarının hasar-yanıt sinyallerini modüle edebildiğini göstermektedir.

PARP-1 (Poly [ADP-ribose] polymerase-1), DNA tek zincir kırıklarını algılayıp onarım süreçlerini başlatan kritik bir enzimdir. *PARP* inhibitörlerinin, *BRCA* mutasyonu taşıyan kanser hücrelerinde sentetik letalite yoluyla yüksek seçicilikle apoptozu tetiklediği ve klinik olarak umut verici sonuçlar doğurduğu gösterilmiştir (Lord and Ashworth 2017).

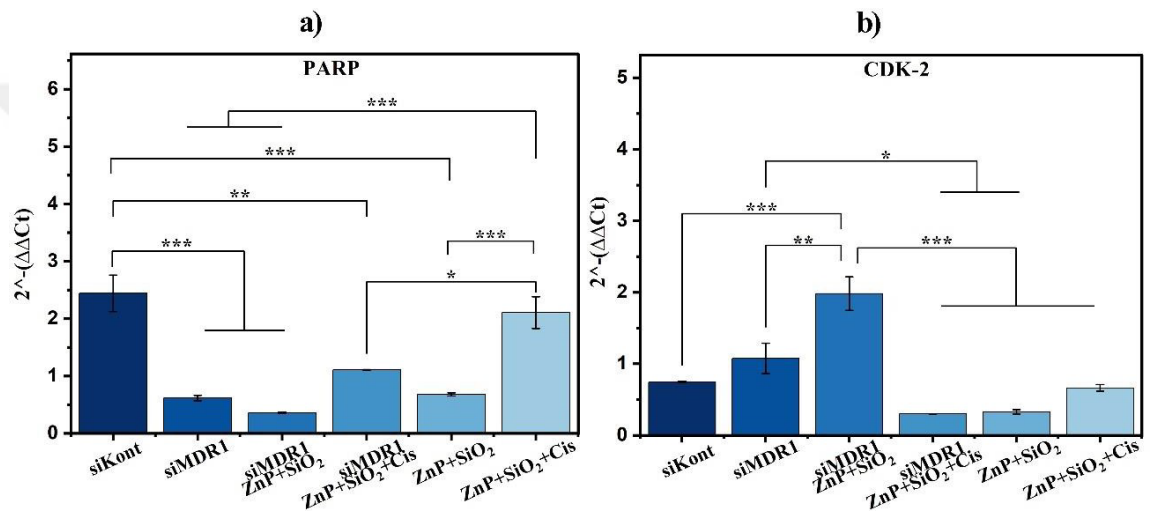
MDR1 geninin siRNA ile susturulması, kontrol grubuna kıyasla *CDK-2* ekspresyonunda anlamlı bir artışa yol açmıştır ($p < 0,001$). Bu, hücre döngüsü ilerlemesi için önemli olan *CDK-2* mekanizmasının, *MDR1* baskısı sonrası kompensatuvar biçimde uyarılabileceğini göstermektedir. *CDK-2*'nin CIS'e bağlı sitotoksitede kritik rol oynadığı da yine literatürde belgelenmiştir.

ZnP+SiO₂ NP uygulaması bu artışı daha da derinleştirirken ($p < 0,01$), taşıyıcı üzerine yüklenen CIS *CDK-2* seviyelerini kontrol düzeylerine yakın bir şekilde baskılamıştır ($p < 0,05$). Taşıyıcı tek başına da *CDK-2* ekspresyonunu anlamlı biçimde artırmış; CIS'in eklenmesi bu indüksiyonu kısmen geri döndürmüştür ($p < 0,05$)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

(Şekil 4.24b). Bu dinamik, NP + CIS kombinasyonunun hücre döngüsü kontrol mekanizmalarını dengede tutabildiğine işaret etmektedir.

CDK-2, Cyclin E/A ile kompleks oluşturarak G_1 'den S fazına geçişi yöneten temel bir serin/treonin kinazdır. *CDK-2*'ye özgü inhibitörlerin, çeşitli tümör modellerinde hücre döngüsü duraklaması ve proliferasyon inhibisyonu sağladığı; bu sayede kanser terapilerinde önemli bir hedef oluşturduğu kapsamlı şekilde gözlemlenmiştir (Asghar et al. 2015).



Şekil 4.24. *MDR1* geni susturulmuş FaDu hücre hattı üzerinde 15 µg/mL NP uygulamalarının *PARP* (a) ve *CDK-2* (b) mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri. (Kontrol ve tüm uygulama grupları; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

siRNA ile *MDR1* geninin susturulması sonucunda, kontrol grubuna kıyasla *CDK-4* düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p < 0,001$). Bu artış, *MDR1* baskısı sonrası G_1/S kontrolünde bir geri bildirim mekanizmasının tetiklenmesiyle *CDK-4* ekspresyonunun hücresel düzeyde telafi edici şekilde yükselmesiyle uyumludur; benzer fenomen *CDK-4* üzerinden proliferasyon düzeni içeren NP + siRNA sistemlerinde rapor edilmiştir.

ZnP+SiO₂ uygulaması *CDK-4* artışını kontrol seviyelerine geri çevirirken ($p < 0,001$), NP'e yüklenen CIS bu baskılayıcı etkiyi korumuştur ($p < 0,001$) (Şekil 4.25a). Bu, NP taşıyıcıların *CDK-4* düzenleyici etkisinin CIS ile pekiştirildiğini

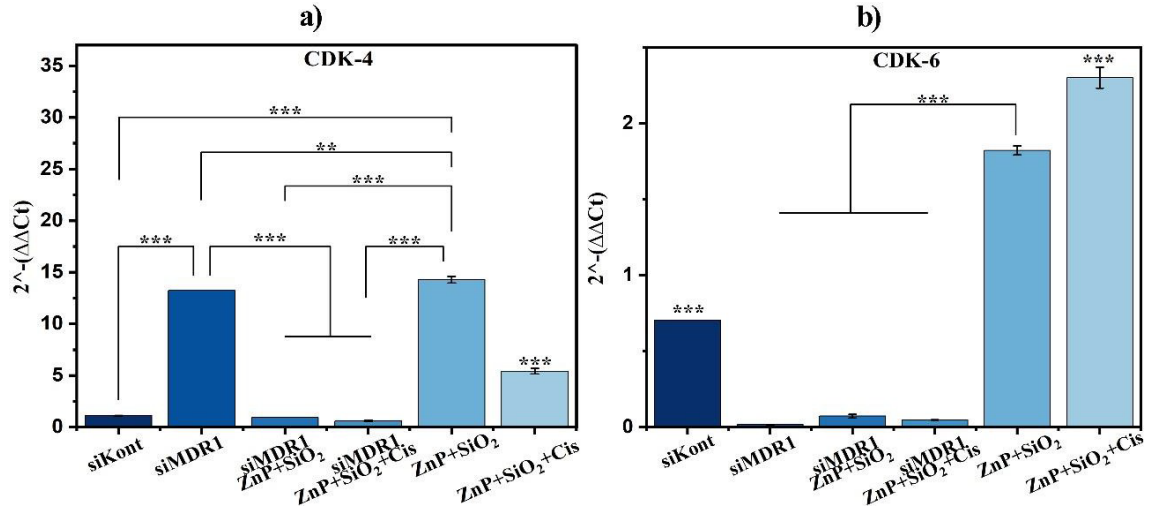
göstermektedir; CIS içeren sistemlerde *CDK-4*'un hedef alındığı ve düşürüldüğü literatürde desteklenmektedir.

CDK-4, D-siklini bağlayarak Rb proteininin fosforilasyonunu gerçekleştirir ve G₁'den S fazına geçişi tetikler; birçok tümör tipinde aşırı eksprese edilmesi, malign proliferasyon ve direnç mekanizmalarına katkıda bulunur (Malumbres and Barbacid 2009; Musgrove et al. 2011).

MDR1 geninin siRNA ile susturulması *CDK-6* ekspresyonunda belirgin bir azalmaya yol açmıştır ($p < 0,001$), bu da G₁ fazı kontrol noktasında bir duraklamaya katkıda bulunabilir. Bu gözlem, NP+siRNA sistemlerinde *CDK-6* baskısının hücresel proliferasyonu yavaşlatmaya yönelik bir yanıt olduğuna dair literatürle paralelliktedir.

ZnP+SiO₂ NP uygulaması *CDK-6* düzeylerini anlamlı biçimde yükseltirken ($p < 0,001$), CIS yüklü NP bu uyarıyı daha da güçlendirmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.25b). Bu, *CDK-6*'nın hücre döngüsü kontrolü üzerindeki NP etkisinin CIS ile sinerjik şekilde hızlandığını göstermektedir; *CDK4/6* inhibitörlerinin özellikle ER-pozitif tümörlerde etkili olması da bu mekanizmayı destekler.

CDK-6, D-siklini bağlayarak G₁/S geçişini düzenleyen bir diğer kritik kinazdır ve özellikle ER-pozitif meme kanserinde *CDK4/6* inhibitörleri klinikte önemli antitümör etkiler göstermiştir (O'Leary et al. 2016).



Şekil 4.25. *MDR1* geni susturulmuş FaDu hücre hattı üzerinde 15 µg/mL NP uygulamalarının *CDK-4* (a) ve *CDK-6* (b) mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri.

4.3.6. Western blotlama analizi

MDR1 geninin FaDu hücrelerinde susturulmasının biyolojik etkilerini değerlendirmek amacıyla, hücre ölüm mekanizmaları, proliferasyon, ilaç direnci ve sinyal iletim yollarında görev alan çeşitli genlerin ekspresyon düzeyleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu kapsamda, *MDR1*, Kaspaz-3, Bcl-2, Beta-actin, NF-κB p65, mTOR, AKT, PI3K ve p38 MAPK protein ekspresyon profilleri analiz edilmiştir. Gerçekleştirilen bu analizler, siRNA aracılığıyla *MDR1* gen inhibisyonunun hücresel mekanizmalar üzerindeki etkilerini daha iyi anlamaya katkı sağlamıştır.

Bulgularımıza göre, *MDR1* geninin siRNA ile susturulması, kontrol grubuna kıyasla *MDR1* protein düzeyini anlamlı biçimde azaltmıştır ($p < 0,001$) (Şekil 4.26a). Bu sonuç, NP taşıyıcı sistemlerle *MDR1*/P-gp ekspresyonunun baskılandığını gösteren önceki çalışmaları destekler; örneğin, curcumin yüklü NP CIS dirençli oral kanser hücrelerinde *MDR1* düzeylerini azaltarak apoptotik yanıtı artırdığı rapor edilmiştir (Chang et al. 2013).

ZnP+SiO₂ NP'leri, *MDR1*'in susturulmuş hücrelerde *MDR1* ifadesini kontrol düzeylerinin üzerine çıkarmış ($p < 0,05$); *MDR1* susturulmuş hücrelerde ZnP+SiO₂ uygulaması, *MDR1* düzeyini *MDR1* susturulmuş grubuna göre güçlü şekilde geri

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

kazandırmış ($p < 0,001$) ve ZnP+SiO₂+CIS grubunda bu geri kazanım daha da artmıştır ($p < 0,01$). Bu bulgu, NP taşıyıcının siRNA etkisine karşı ilaca bağlı bir geri tepme etkisi gösterebileceğini düşündürmektedir; kinetik ve ekspresyon bazlı modülasyona dair benzer örnekler literatürde yer almaktadır.

MDR1 susturulmamış hücrelerde ZnP+SiO₂+CIS formülasyonu, ZnP+SiO₂'ye göre *MDR1* ifadesini anlamlı biçimde yükseltmiştir ($p < 0,05$). Bu durum, NP taşıyıcının ilaç yüklemesiyle bile *MDR1* düzeylerini hassas şekilde modüle edebildiğini göstermektedir; liposomal CIS sistemlerinde benzer *MDR1* uyarımı da rapor edilmiştir.

Bulgularımızda, *MDR1* susturulan grup, kontrol grubuna kıyasla Bcl-2 ifadesini ciddi ölçüde düşürmüştür ($p < 0,001$) (Şekil 4.26b). Bu, çift hedefli NP+siRNA sistemlerinin anti-apoptotik Bcl-2 seviyelerini azalttığı PLGA NP çalışmalarıyla uyumludur (Risnayanti et al. 2018).

ZnP+SiO₂ NP'leri, hem *MDR1* susturulmamış ($p < 0,01$) hem de *MDR1* susturulmuş hücrelerde ($p < 0,001$) Bcl-2 düzeyini anlamlı biçimde artırmıştır. Bu çıktı, NP'lerin kazandığı anti-apoptotik koruma sinyalini yansıtabilir; Bcl-2 ve *MDR1* birlikteliğinin platin direnç mekanizmalarına katkı sağladığı da bildirilmiştir.

Ancak, yüksek Bcl-2 ifadesine sahip *MDR1* susturulmuş ZnP+SiO₂ grubuna kıyasla, ZnP+SiO₂+CIS formülasyonu bu anti-apoptotik proteini anlamlı biçimde baskılayarak ($p < 0,001$) en düşük seviyeye indirmiştir. Bu sinerjik etkinin, NP + CIS kombinasyonunun apoptotik yanıtı en üst düzeye çıkarmada etkili olduğunu gösterdiği PLGA NP sistemleriyle tutarlıdır.

Protein ekspresyon seviyeleri analiz edilen *MDR1* ve Bcl-2 proteinleri, kemoresistans ve hücre ölüm mekanizmalarının izlenmesinde temel biyo belirteçlerdir.

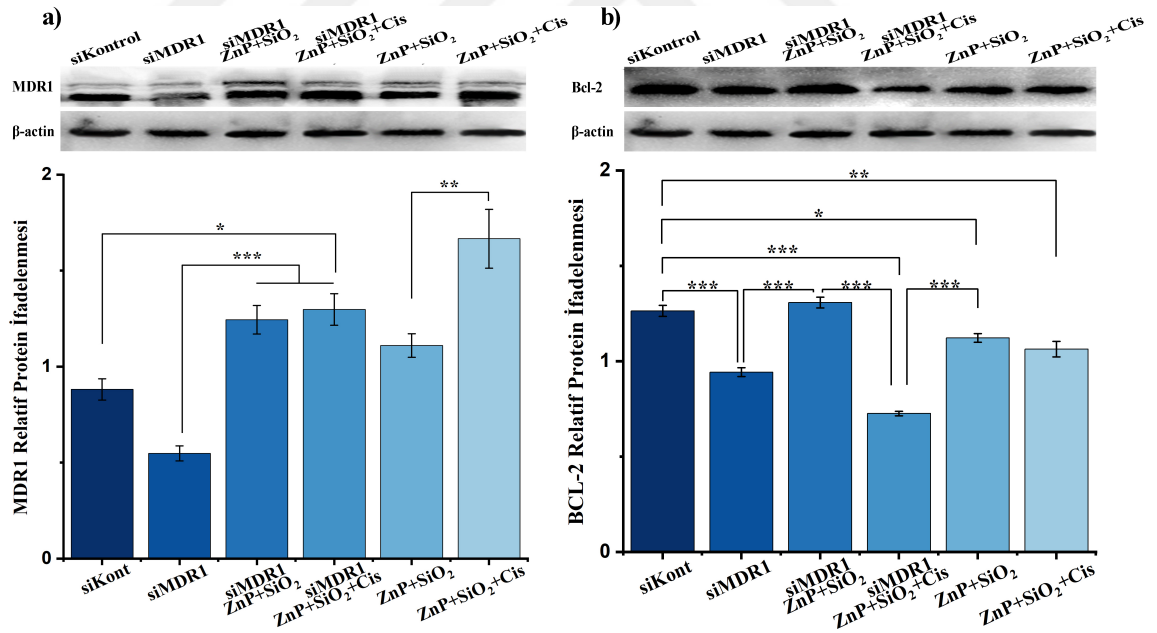
MDR1 inhibisyonunun ilaç alımını artırma ve Bcl-2 baskılanmasının apoptotik yanıtı tetikleme potansiyeli, çok sayıda literatür çalışmasıyla desteklenmektedir

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

(Risnayani et al. 2018). Örneğin, MDR1 ve Bcl-2 siRNA'larını birlikte taşıyan PLGA NP'ler, tekli inhibitörden daha güçlü sitotoksik etki göstermiştir.

Bu çalışmada gözlenen etkiler, NP taşıma sistemlerinin ilaç etkinliğini artırma ve hücre yanıtını çok boyutlu olarak düzenleme potansiyelini açıkça ortaya koymaktadır.

Bu veriler, *MDR1* gen susturmasının FaDu hücrelerinde hem MDR1 hem de Bcl-2 protein düzeylerini anlamlı biçimde azalttığını ve hücrelerin apoptotik yanıtı daha duyarlı hâle geldiğini göstermektedir. ZnP+SiO₂ NP'leri, ilacın hücre içine taşınmasını kolaylaştırarak MDR1 ve Bcl-2 ifadelerini yeniden artırıp bir tür koruyucu etki sağlarken, ZnP+SiO₂+CIS NP'ler, *MDR1* susturulmuş hücrelerde bile anti-apoptotik Bcl-2 düzeyini güçlü biçimde baskılayarak tedavi etkinliğini en üst düzeye çıkarmıştır. Bu sonuçlar, *MDR1* aracılı kemoresistansın NP temelli CIS taşıma sistemiyle aşılabileceğine dair güçlü bir kanıt sunmaktadır (Xiao et al. 2015).



Şekil 4.26 FaDu hücrelerinde *MDR1* susturma ve 15 μ g/mL NPugulamalarının MDR1 (a) ve Bcl-2 (b) protein seviyesi üzerindeki etkileri.

PI3K (fosfatidil inositol 3-kinaz) ve AKT (protein kinaz B), hücre proliferasyonu, büyüme ve hayatta kalma süreçlerinde kilit rol oynayan moleküler sinyal yollarıdır (Manning and Cantley 2007).

Çalışmamızda, *MDR1* geninin siRNA ile susturulması, PI3K yolunu anlamlı biçimde baskılamış; bu durum, hücrelerin kemoterapiye direnç geliştirme kapasitesinde azalma olduğunu düşündürmektedir ($p < 0,001$). Bu bulgu, PI3K/AKT ekseninde sinyal düşüşünün platin ilaçlara karşı duyarlılığı artırdığı yönündeki kapsamlı prelinik çalışmaları desteklemektedir (Chen et al. 2018).

ZnP+SiO₂ NP'leri, bu baskıyı kısmen geri kazandırsa da istatistiksel olarak anlamlı bir artış sağlamamıştır. Bu, NP taşıyıcıların hücresel sinyal dengesinde hafif modülasyon yaratabileceğini, ancak tek başına geri dönüş sağlamanın sınırlı olabileceğini göstermektedir.

Buna karşın, *MDR1* susturularak verilen ZnP+SiO₂+CIS grubu, PI3K sinyalini tekrar baskılamış ($p < 0,001$); bu da ilacın hücresel hedefe erişim ve etkinliğini artırdığını göstermektedir (Şekil 4.27a). Bu etki, susturma ile ZnP+SiO₂+CIS kombinasyonlarının PI3K/AKT/mTOR eksenini etkili şekilde inhibe ederek sitotoksiteyi artırdığı literatürde bildirilen sonuçlarla paraleldir.

Benzer şekilde, AKT sinyal yolunda da *MDR1* susturulması belirgin bir baskı oluşturmuş; ZnP+SiO₂ NP'leri bu baskıyı hafifletmiş ($p < 0,05$), ZnP+SiO₂+CIS grubunda ise *MDR1* susturulmuş grupta ve *MDR1* susturulmamış NP uygulamalarına kıyasla AKT aktivasyonu en üst düzeye ulaşmıştır (Şekil 4.27b). Bu model, NP'lerin AKT aktivitesini desteklediğini, fakat CIS yüklemesiyle sinyalin yeniden gerilediğini ortaya koymaktadır. Benzer NP+CIS sistemlerinde AKT aktivasyonunun kontrollü olarak düzenlendiği daha önce rapor edilmiştir.

Bu sonuçlar, *MDR1* inhibitörleriyle kombine edilen NP bazlı kemoterapi sistemlerinin kanserde kemoresistansı kırabileceğine dair literatürde bildirilen bulgularla uyumludur (Xiao et al. 2015).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Ayrıca, PI3K/AKT yolunun kemoresistans mekanizmalarında merkezi rolü güçlü şekilde gösterilmiştir.

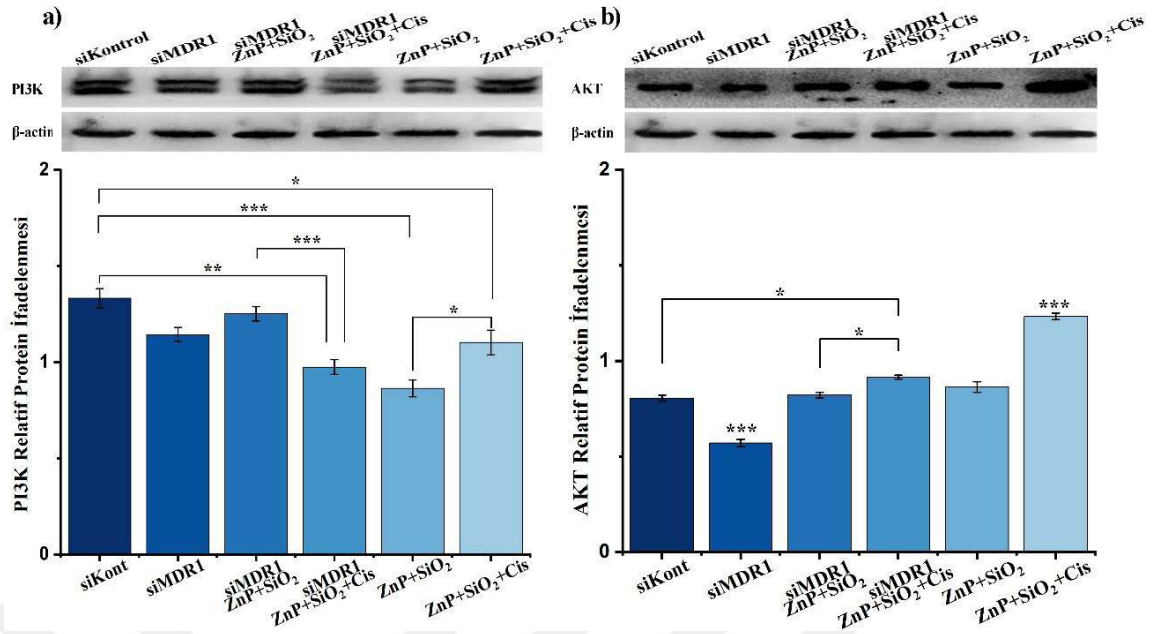
Western blotlamada analiz edilen PI3K ve AKT proteinleri, hücre büyümesi ve hayatta kalma sinyallerinin belirlenmesinde yaygın olarak tercih edilen monoklonal antikorlardır.

MDR1 proteini (P-gp olarak da bilinir), çoklu ilaç direncinde görev alır ve kemoterapötik ajanların hücre dışına atılmasını sağlayarak tedavi etkinliğini düşürür (Roninson 1992).

MDR1'in susturulması, kemoterapi etkinliğini artırma açısından avantaj sunarken, PI3K/AKT yolunun baskılanması, hücre hayatta kalma sinyallerinin kırılmasını kolaylaştırmıştır.

Ayrıca, NP taşıyıcılarının bu yollardaki dengeyi modüle edebilmesi, sistemin çok boyutlu bir terapötik potansiyel sunduğunu göstermektedir.

Elde edilen bulgular, *MDR1* geninin inhibisyonunun PI3K/AKT hücre hayatta kalım yollarını baskılayarak kemoresistansı azaltabileceğini; ZnP+SiO₂ NP'lerin ise bu sinyal eksenini kısmen geri kazandırarak hücre yanıtını modüle edebileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle ZnP+SiO₂+CIS kombinasyonu hem PI3K hem de AKT ekspresyonunu yeniden aktive ederek hedeflenen hücre ölüm mekanizmalarını güçlendirmiştir. Bu veriler, *MDR1* gen susturmasıyla kombine edilen ZnP+SiO₂+CIS sisteminin FaDu hücrelerinde üstün terapötik potansiyel taşıdığını ve literatürde bildirilen çoklu mekanizma temelli tedavi yaklaşımlarını desteklediğini göstermektedir (Xiao et al. 2015).



Şekil 4.27. FaDu hücrelerinde *MDR1* susturma ve 15 µg/mL NP uygulamalarının PI3K (a) ve AKT (b) protein seviyesi üzerindeki etkileri.

mTOR (mammalian target of rapamycin), hücre büyümesi, metabolizma, otofaji ve protein sentezi gibi süreçlerde görev alan bir serin/treonin kinazdır (Saxton and Sabatini 2017).

Bulgularımızda, *MDR1* geninin siRNA ile susturulması, mTOR yolunu belirgin biçimde aktive etmiştir ($p < 0,001$); bu durum, hücrelerin alternatif hayatta kalma sinyallerini devreye sokarak kompensatuvar bir yanıt geliştirdiğini düşündürmektedir. *MDR1*-siRNA uygulamalarında mTOR aktivasyonunda yükselme gözlenmiş, bu da hücrenin direnç karşısında hayatta kalma sinyallerini devreye soktuğunu düşündüren mekanizmalarla literatürde rapor edilmiştir (Magaway et al. 2019).

ZnP+SiO₂ NP'leri ise bu aktivasyonu güçlü biçimde baskılamış ($p < 0,001$), ZnP+SiO₂+CIS formülasyonu mTOR aktivitesini bir miktar toparlamış olsa da eski düzeye ulaşamamıştır. NP'lerin özellikle siRNA-mTOR etkileşimlerinde düzenleyici rol oynadığı, ancak platin yüklemesiyle kombinasyonun dengeleyici etkisinin literatürde bildirildiği seriler bulunmaktadır.

İlginç şekilde, ZnP+SiO₂ NP'leri tek başına da mTOR'u anlamlı biçimde düşürmüştür ($p < 0,01$), ancak CIS yüklenmesiyle bu baskı kısmen dengelenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.28a). Bu, NP bazlı mTOR modülasyonunun hem sinyal baskılayıcı hem de direnç karşıt etkileri olabileceğini gösterir.

NF-κB p65, hücrel inflamasyon, bağışıklık yanıtı ve anti-apoptotik sinyal iletiminde kilit rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (Hoesel and Schmid 2013).

MDR1 susturulması, NF-κB p65 aktivitesini anlamlı biçimde düşürmüştür ($p < 0,05$); ZnP+SiO₂ NP'leri bu baskıyı daha da artırmıştır ($p < 0,001$). ZnP+SiO₂+CIS formülasyonu, NF-κB p65 seviyesini en düşük değere indirerek maksimum düzeyde baskı sağlamıştır ($p < 0,001$). Bu sonuç, NP+CIS kombinasyonunun NF-κB yolunu güçlü bir şekilde inhibe ettiğini, anti-apoptotik sinyalin zayıflatıldığını desteklemektedir.

Buna karşın, *MDR1* susturulmuş hücrelerde ZnP+SiO₂+CIS kombinasyonunun uygulanması NF-κB p65'i tersine aktive ederek ($p < 0,001$), muhtemelen stres kaynaklı kompensatuvar bir hücrel yanıt başlatmıştır. Kontrendiktoryal bu tür davranışlar, çoklu ilaç uygulamalarından sonra görülebilen direnç geliştirme mekanizmalarına işaret edebilir (Hoesel and Schmid 2013). Benzer şekilde, nanopartikül + siRNA + kemoterapi sistemlerinde NF-κB aktivitesinin ilk baskı sonrasında geri döndüğü, bu durumun kısa vadeli adaptasyonları yansıttığı çalışmalarda gözlemlenmiştir (Mainini and Eccles 2020).

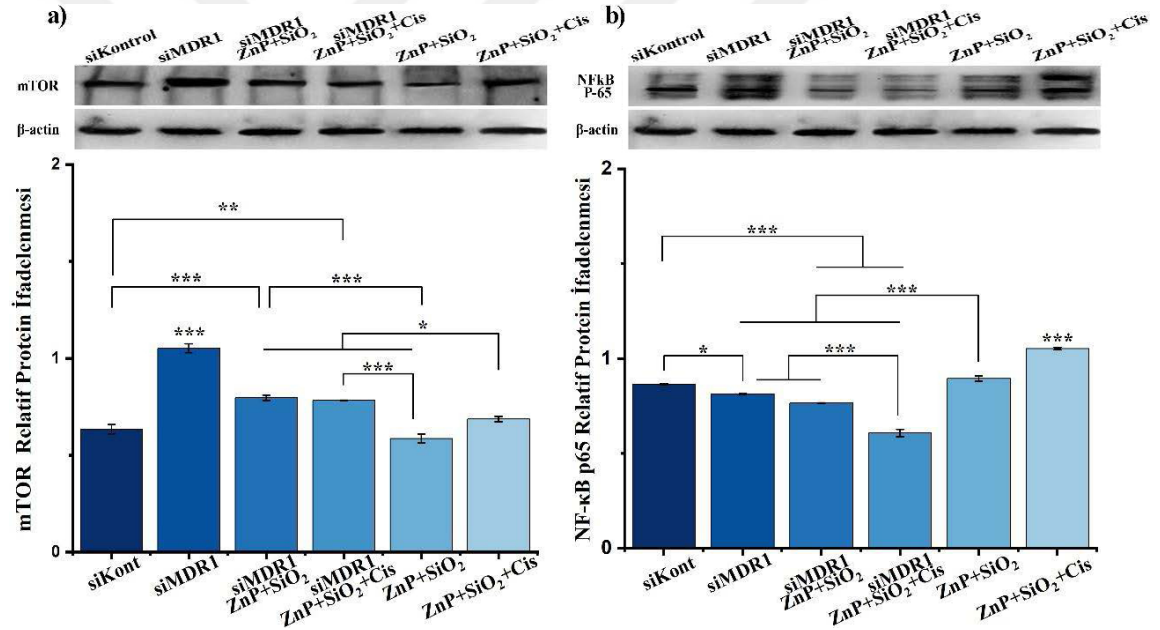
Western blotlama analizlerinde kullanılan mTOR ve NF-κB p65 proteinleri, bu yolların toplam protein seviyelerini izleyerek hücrelerin tedaviye verdiği yanıtların çözümlenmesinde standart olarak tercih edilmektedir.

mTOR yolunun kemoterapiye direnç geliştirme ve hücre büyümesi üzerindeki etkileri, kanser biyolojisini ele alan literatürlerde belirtilmiştir (Lapante and Sabatini 2012). NF-κB p65 aktivasyonu da anti-apoptotik sinyaller ve kemoresistans süreçleriyle doğrudan ilişkilidir (Hoesel and Schmid 2013).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu bağlamda, *MDR1* susturmasıyla kombine edilen NP bazlı tedavinin bu iki ana sinyal yolunu modüle etmesi, çoklu mekanizma temelli terapötik potansiyelin altını çizmektedir.

Elde edilen protein ekspresyonu verilerinin değerlendirilmesinde, *MDR1* gen susturması ile kombine edilen ZnP+SiO₂+CIS NP formülasyonlarının mTOR ve NF-κB aracılı hayatta kalma sinyallerini güçlü biçimde modüle ederek FaDu hücrelerinde terapötik etkinliği maksimum seviyelere çıkarabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, literatürde çoklu yolak hedeflemeye dayalı kanser tedavi yaklaşımlarını destekleyen çalışmalara uyumlu olup (Xiao et al. 2015), bu stratejinin MDR1 pozitif tümörlerde yenilebilir bir çözüm sunduğunu düşündürmektedir.



Şekil 4.28. FaDu hücrelerinde *MDR1* susturma ve 15 µg/mL NP uygulamalarının mTOR (a) ve NF-κB p65 (b) protein seviyesi üzerindeki etkileri.

Kaspaz-3, hücre içi ölüm (apoptoz) sürecinin kritik yürütücü kaspaz enzimidir; DNA parçalanması ve hücrel komponentlerin kontrollü yıkımında görev alır (Enari et al. 1998).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bulgularımıza göre, sadece *MDR1* susturulması Kaspaz-3 seviyesinde anlamlı bir değişim yaratmamıştır (n.s.). *MDR1*-siRNA tek başına düşük apoptotik uyarı ile sınırlı değişiklikler gösterir, bu da literatürde rastlanan bir durumdur.

Ancak ZnP+SiO₂ NP, *MDR1* susturulmuş koşullarda Kaspaz-3 düzeyini anlamlı biçimde yükseltmiştir ($p < 0,001$) ve ZnP+SiO₂+CIS grubunda bu artış daha da belirginleşmiştir ($p < 0,01$). CIS yüklü NP'lerin kaspaz-3 aktivasyonunu artırdığı rapor edilmiştir, bu da apoptotik hücre ölümünü desteklemektedir (Pandey et al. 2014).

ZnP+SiO₂ grubu tek başına Kaspaz-3'ü baskımlarken ($p < 0,001$), CIS yüklemesi bu baskıyı ortadan kaldırmış ve protein seviyesini artırmıştır ($p < 0,01$) (Şekil 4.29a). Bu sonuç, NP taşıyıcının ilaca bağlı olarak kaspaz-3 sinyalinde çift yönlü modülasyon yapabildiğini düşündürmektedir.

p38 MAPK, hücrelerin stres, inflamasyon ve DNA hasarı gibi uyaranlara verdiği yanıtları düzenleyen bir mitojenle ilişkili protein kinazdır (Canovas and Nebreda 2021).

MDR1 susturulması, p38 MAPK'yi baskılamış ($p < 0,05$); ZnP+SiO₂ NP'leri bu düşüşü kısmen geri çevirmiştir ($p < 0,05$). ZnP+SiO₂+CIS grubu ise, hem *MDR1* susturulmuş ZnP+SiO₂ grubuna ($p < 0,001$) hem de *MDR1* susturulması ZnP+SiO₂ grubuna ($p < 0,01$) kıyasla p38 MAPK aktivasyonunu belirgin biçimde artırmıştır (Şekil 4.29b). Bu, CIS yüklü np'lerin p38 MAPK yolunu güçlü şekilde aktive ederek stres ve apoptotik yanıtı tetiklediğini göstermektedir. CIS'in p38 aktivasyonuna özgü uyarı oluşturduğu literatürde net bir şekilde yer almıştır

Analiz edilen Kaspaz-3 ve p38 MAPK proteinleri, apoptotik ve stres yanıt yollarının izlenmesinde yaygın olarak kullanılan biyo belirteçlerdir.

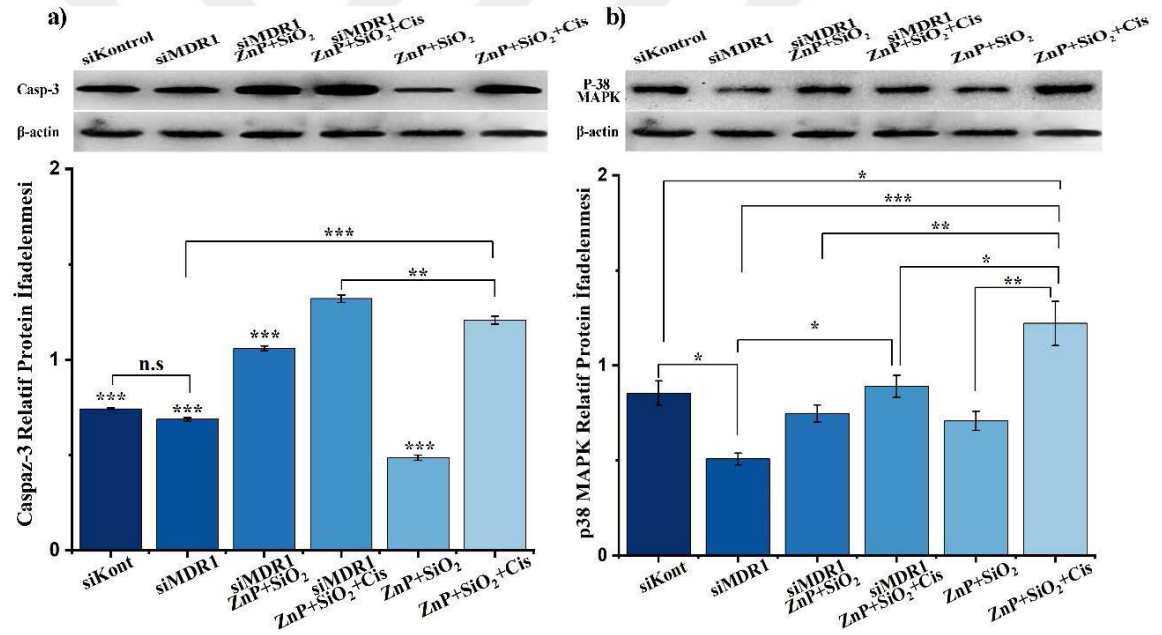
MDR1 susturulmasının tek başına apoptotik yanıtı tetiklemediği, ancak ZnP+SiO₂+CIS formülasyonlarının bu sinyal eksenini kuvvetli şekilde aktive ettiği, literatürde çok sayıda çalışmada rapor edilmiştir (Chen et al. 2012). Örneğin, NP+CIS

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

kombinasyonlarının kaspaz-3 prosesi ve p38 aktivasyonunu artırdığı cell line çalışmalarda gösterilmiştir (Losa et al. 2003).

Bu veriler, *MDR1* susturmanın tek başına apoptotik işaretleyiciler üzerinde sınırlı etkisi olduğunu, ancak $\text{ZnP}+\text{SiO}_2+\text{CIS}$ kombinasyonunun hem Kaspaz-3 hem de p38 MAPK yollarını kuvvetli şekilde aktive ederek hücre ölüm ve stres yanıtını artırdığını göstermektedir.

MDR1 gen susturmasıyla kombine edilen $\text{ZnP}+\text{SiO}_2+\text{CIS}$ NP grubu, FaDu hücrelerinde terapötik etkinliği maksimum seviyeye çıkararak çoklu sinyal yollarını eşzamanlı olarak modüle etmektedir (Xiao et al. 2015).



Şekil 4.29. FaDu hücrelerinde *MDR1* susturma ve 15 $\mu\text{g/mL}$ NP uygulamalarının Kaspaz-3 (a) ve p38 MAPK (b) protein seviyesi üzerindeki etkileri.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Sonuç

Bu tez çalışması, *MDRI* geninin susturulmuş olduğu FaDu hücre hattında, yeşil sentez yöntemiyle üretilen ZnP NP'ler ve yüksek yüzey alanlı gözenekli SiO₂ taşıyıcılarının CIS yüklenmesiyle oluşturulan çok bileşenli bir ilaç taşıma sisteminin terapötik etkinliğini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Çalışmada hem sentezlenen NP'lerin karakterizasyonu hem de biyolojik sistemler üzerindeki etkileri ayrıntılı bir şekilde ortaya konmuştur.

Sentezlenen ZnP NP'ler, UV-Vis, XRD, TEM, SEM, FTIR ve zeta potansiyel analizleri ile kapsamlı biçimde karakterize edilmiştir. Yapılan karakterizasyon analizlerinde, ZnP NP'ler UV-Vis spektroskopisinde 205 nm ve 250 nm absorbans pikleriyle tanımlanırken, SiO₂ NP'ler 210 nm'deki karakteristik pikleriyle doğrulanmıştır. CIS'in yüklenmesi sonrası ise, 203-205 nm ve 280-300 nm bölgelerinde özgün absorpsiyon bantları gözlenmiş; bu sonuçlar, yükleme işleminin başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir. XRD analizlerinde elde edilen kırınım desenleri, ZnP NP'lerin triklinik kristal sisteme sahip olduğunu kanıtlamış, TEM ve SEM analizleri ise yaklaşık 22 nm boyutlu NP'lerin SiO₂ ile kaplandığını ve birleşik yapıların oluştuğunu boyutunun ise belirlenen NP (1-100nm) aralığında olduğu net biçimde ortaya koymuştur. FTIR analizleri, yüzeyde adsorbe olmuş su molekülleri, amin grupları, metal-ligand bağları ve silika matrisi içindeki Si-O-Si bağlantılarının doğruluğunu göstermiştir. Zeta potansiyel analizlerinde, SiO₂ kaplamanın negatif yüzey yükünü artırarak ZnP NP'lerinin kolloidal stabilitesini önemli ölçüde yükselttiği belirlenmiştir.

HPLC analizlerinde, ZnP immobilizasyonunun CIS yükleme veriminde anlamlı bir artış sağladığı, retansiyon zamanında gözlemlenen küçük kaymaların ise sistemin spesifik bağlanma etkileşimlerinden kaynaklandığı belirlenmiştir. İlaç yükleme ve salım analizlerinde, yalnızca SiO₂ NP'leriyle yüklenen CIS'in salım profili iki evreli bir yapı göstermiş; ilk hızlı salım 0-2 saat aralığında gerçekleşirken, 2-24 saatlik periyotta daha yavaş ve kararlı bir salım profili izlenmiştir. ZnP kaplaması eklenen ZnP+SiO₂+CIS NP'lerde ise, pH 6 ve 7,4 ortamlarında salım profili anlamlı biçimde değişmiş, özellikle

pH 7,4 koşullarında kontrollü ve daha yüksek miktarda (0,65 µg/mL) ilaç salımı gerçekleşmiştir. Ayrıca ZnP+SiO₂+CIS formülasyonlarının özellikle fizyolojik pH (7,4) koşullarında daha yüksek ilaç salımı gerçekleştirmesi, bu sistemin biyolojik ortamlarda kullanılabilirliğine işaret etmektedir. Bu, ZnP kaplamasının ilaç taşıma sistemine pH duyarlılığı kazandırdığını ve hedeflenen salımı optimize ettiğini göstermektedir.

Hücre kültürü çalışmaları, geliştirilen NP sistemlerinin biyolojik etkinliğini doğrudan ortaya koymuştur. Hücresel alım testlerinde, ZnP'nin FaDu hücrelerine etkin biçimde alındığı, PGSK floresan şiddeti azalması ile doğrulanmıştır. Hücre canlılık analizleri, ZnP+SiO₂+CIS kombinasyonlarının, yalnızca NP veya yalnızca *MDR1* susturması uygulamalarına kıyasla IC₅₀ değerini belirgin biçimde düşürdüğünü (15 µg/mL) ve sitotoksik etkinliği maksimum seviyeye çıkardığını göstermiştir. Bu sonuçlar, SiO₂+ZnP ve CIS'in sinerjik bir etki oluşturarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu güçlü şekilde baskıladığını ve *MDR1* susturması ile kombine edildiğinde çok daha etkin bir tedavi yanıtı sağladığını kanıtlamaktadır.

Moleküler düzeyde elde edilen bulgular, çalışma başlığı ve tez önerisinde ortaya konulan hipotezle yüksek oranda tutarlılık göstermiştir. Real-time PCR analizleri sonucunda, *MDR1* geninin susturulması çoklu ilaç direnci mekanizmalarının baskılanmasına katkı sağlamış ve böylece hücrelerin kemoterapiye duyarlılığını artırmıştır. *PTEN* gen ekspresyonunda gözlemlenen azalma, tümör baskılayıcı sinyallerin zayıflamasına yol açarken, *Bax* genindeki artış, apoptoz (programlanmış hücre ölümü) süreçlerinin aktive olduğunu göstermektedir. *PARP* genindeki azalma, DNA hasarı onarım mekanizmalarının baskılandığını ve hücrelerin onarım yerine ölüme yönlendirildiğini işaret etmektedir. *Bcl-2* genindeki azalma, anti-apoptotik (hücreyi ölümden koruyan) sinyallerin zayıfladığını ve hücrelerin apoptoza daha açık hale geldiğini göstermektedir. *CDK-2* ve *CDK-4* genlerinde tespit edilen artış, hücre döngüsünün G1/S geçişinde artışa işaret ederken, *CDK-6* geninde gözlemlenen baskılanma, hücre döngüsünün ilerlemesinin engellendiğini ve proliferasyon kapasitesinin sınırlanmaya çalışıldığını düşündürmektedir. ZnP+SiO₂+CIS kombinasyonu, bu moleküler belirteçlerde en güçlü regülasyon etkisini oluşturarak hem hücrelerin çoğalma yeteneğini azaltma hem de çoklu ilaç direnci mekanizmalarını kırma potansiyeline ulaşmıştır.

Western blot analizleri, *MDR1* geninin inhibisyonunun PI3K/AKT ve NF- κ B sinyal yollarında belirgin baskı yarattığını ve mTOR yolunda ise artış sağladığını ortaya koymuştur. PI3K/AKT yollarındaki baskılanma, hücre çoğalması, hayatta kalım ve metabolik aktiviteyi destekleyen sinyallerin zayıfladığını göstermektedir. NF- κ B yolunun baskılanması, inflamasyonun ve hücreyi anti-apoptotik mekanizmalarla koruyan süreçlerin engellendiğini işaret etmektedir. Buna karşın mTOR yolundaki artış, hücre büyümesi, protein sentezi ve enerji metabolizmasının kısmen aktif kaldığını düşündürmektedir. ZnP+SiO₂ NP uygulamaları, bu baskıları kısmen geri çevirerek sinyal yollarında bir denge oluşturmuş; ancak CIS yüklemesi ile bu yolların yeniden baskılandığı ve özellikle AKT aktivitesinde bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Ek olarak, Kaspaz-3 ve p38 MAPK yollarının aktivasyonu, hücrelerde apoptoz (programlanmış hücre ölümü) ve stres yanıtlarının güçlü şekilde tetiklendiğini göstermektedir. ZnP+SiO₂+CIS kombinasyonlarının bu yolları eşzamanlı olarak hedeflemesi, sadece direnç kırma değil, aynı zamanda hücre ölüm mekanizmalarını da aktive eden çok boyutlu ve sinerjik bir terapötik etki yaratmıştır. Bu sonuçlar, *MDR1* gen susturmasının NP tabanlı ilaç taşıyıcı sistemlerle birleştirildiğinde kanser hücrelerinde hem direnç mekanizmalarının baskılanmasını hem de apoptoz sinyallerinin güçlendirilmesini sağladığını ortaya koymaktadır.

Çalışmanın moleküler düzeyde daha derinlemesine incelenmesi için fosfo-protein düzeyi analizleri, mitokondriyal membran potansiyeli ölçümleri, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, lizozomal stabilite testleri ve otofaji belirteçleri (LC3B, Beclin-1) değerlendirilmelidir. Bu mekanistik analizler, NP sisteminin hücresel düzeyde tetiklediği çoklu biyolojik etkilerin kapsamını netleştirmede önemli katkı sağlayacaktır.

Elde edilen güçlü in vitro bulgular, in vivo hayvan modellerinde farmakokinetik, farmakodinamik, biyoyararlanım ve doku dağılımı analizleri ile desteklenmelidir. Ayrıca, biyouyumluluk ve toksisite profilleri, sistemin klinik uygulamaya geçişi için kritik önemdedir. Hayvan modellerinde tümör gerilemesi, hayatta kalma oranları ve sistemik toksisite analizleri yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Aagaard, L., and Rossi, J. J. 2007. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(2-3), 75-86.
- Aksoy E. 2021. Led tabanlı fotodinamik tedavide ışık dozu etkisinin kolorektal kanser hücreleri için in vitro olarak belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği anabilim Dalı, 85, Sakarya.
- Alotaibi, H. G., Al-Abbad, E., Almohazey, D., Ravinayagam, V., Akhtar, S., Dafalla, H., & Jermy, B. R. (2024). Zeolitic Imidazole Framework/Silica nanocomposite for targeted cancer therapeutics: comparative study of chemo-drug cisplatin (CPT) and Green Platinum (GPt) efficacy. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6), 3157.
- Anees, L. M., Abdel-Hamid, G. R., and Elkady, A. A. 2021. A nano based approach to alleviate cisplatin induced nephrotoxicity. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 35.
- Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D., and Ferris, R. L. 2008. Head and neck cancer. *The Lancet*, 371(9625), 1695-1709.
- Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C., and Knudsen, E. S. 2015. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 2015 14:2, 14(2), 130-146.
- Ashoori, F., Hajipour-Verdom, B., Satari, M., & Abdolmaleki, P. (2023). Polyethylenimine-based iron oxide nanoparticles enhance cisplatin toxicity in ovarian cancer cells in the presence of a static magnetic field. *Frontiers in Oncology*, 13, 1217800.
- Ashrafizadeh, M., Zarrabi, A., Hushmandi, K., Hashemi, F., Rahmani Moghadam, E., Raei, M., ... & Makvandi, P. (2020). Progress in natural compounds/siRNA co-delivery employing nanovehicles for cancer therapy. *ACS combinatorial science*, 22(12), 669-700.
- Azhar, F. F., Shahbazpour, E., and Olad, A. 2017. pH sensitive and controlled release system based on cellulose nanofibers-poly vinyl alcohol hydrogels for cisplatin delivery. *Fibers and Polymers*, 18(3), 416-423.
- Bader, A. G., Brown, D., Stoudemire, J., and Lammers, P. 2011. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Therapy* 2011, 18(12), 1121-1126.
- Basnayake, B. W. M. T. J., Leo, P., Rao, S., Vasani, S., Kenny, L., Haass, N. K., and Punyadeera, C. 2023. Head and neck cancer patient-derived tumouroid cultures: opportunities and challenges. *British Journal of Cancer* 2023 128:10, 128(10), 1807-1818.

- Bauman, J. E., Cohen, E., Ferris, R. L., Adelstein, D. J., Brizel, D. M., Ridge, J. A., O'Sullivan, B., Burtneess, B. A., Butterfield, L. H., Carson, W. E., Disis, M. L., Fox, B. A., Gajewski, T. F., Gillison, M. L., Hodge, J. W., Le, Q. T., Raben, D., Strome, S. E., Lynn, J., and Malik, S. 2017. Immunotherapy of head and neck cancer: Emerging clinical trials from a National Cancer Institute Head and Neck Cancer Steering Committee Planning Meeting. *Cancer*, 123(7), 1259-1271.
- Beckett, K. R., Moriarity, A. K., and Langer, J. M. 2015. Safe use of contrast media: What the radiologist needs to know. *Radiographics*, 35(6), 1738-1750.
- Behlke, M. A. 2006. Progress towards in Vivo Use of siRNAs. *Molecular Therapy*, 13(4), 644-670.
- Bellon, S. F., Coleman, J. H., and Lippard, S. J. 1991. DNA Unwinding Produced by Site-Specific Intrastrand Cross-Links of the Antitumor Drug cis-Diamminedichloroplatinum (II). *Biochemistry*, 30(32), 8026-8035.
- Ben Said, R., Moutia, N., Louati, B., Guidara, K., and Khirouni, K. 2022. UV-visible characterization of zinc and potassium zinc pyrophosphate. *Optical and Quantum Electronics*, 54(1), 1-10.
- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., and Farokhzad, O. C. 2014. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2-25.
- Bhattacharjee, S. 2016. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 235, 337-351.
- Bignoux, M. J., Otgaar, T. C., Bernert, M., Weiss, S. F. T., and Ferreira, E. 2023. Downregulation of LRP/LR with siRNA inhibits several cancer hallmarks in lung cancer cells. *FEBS Open Bio*, 13(2), 323.
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M. S., Baselga, J., Youssoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E. K., and Ang, K. K. 2006. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England Journal of Medicine*, 354(6), 567-578.
- Bosetti, C., Carioli, G., Santucci, C., Bertuccio, P., Gallus, S., Garavello, W., Negri, E., and La Vecchia, C. 2020. Global trends in oral and pharyngeal cancer incidence and mortality. *International Journal of Cancer*, 147(4), 1040-1049.
- Bunaciu, A. A., Udriștioiu, E. gabriela, and Aboul-Enein, H. Y. 2015. X-ray diffraction: instrumentation and applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(4), 289-299.

- Burtneß, B., Harrington, K. J., Greil, R., Soulières, D., Tahara, M., de Castro, G., Psyrri, A., Basté, N., Neupane, P., Bratland, Å., Fuereder, T., Hughes, B. G. M., Mesía, R., Ngamphaiboon, N., Rordorf, T., Wan Ishak, W. Z., Hong, R. L., González Mendoza, R., Roy, A., Yorio, J. 2019. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*, 394 (10212), 1915-1928.
- Camacho, C., Maciel, D., Tomás, H., and Rodrigues, J. 2023. Biological Effects in Cancer Cells of Mono- and Bidentate Conjugation of Cisplatin on PAMAM Dendrimers: A Comparative Study. *Pharmaceutics*, 15(2), 689.
- Campbell, R., Shim, H., Choi, J., Park, M., Byun, E., Islam, S., Song, H., and Kim, A. 2020. Implantable Cisplatin Synthesis Microdevice for Regional Chemotherapy.
- Canovas, B., and Nebreda, A. R. 2021. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021, 22(5), 346–366.
- Carter, K. P., Young, A. M., & Palmer, A. E. (2014). Fluorescent sensors for measuring metal ions in living systems. *Chemical reviews*, 114(8), 4564-4601.
- Castellsagué, X., Quintana, M. J., Martínez, M. C., Nieto, A., Sánchez, M. J., Juan, A., Monner, A., Carrera, M., Agudo, A., Quer, M., Muñoz, N., Herrero, R., Franceschi, S., and Bosch, F. X. 2004. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 108(5), 741–749.
- Cha, W., Fan, R., Miao, Y., Zhou, Y., Qin, C., Shan, X., Wan, X., and Li, J. 2017. Mesoporous Silica Nanoparticles as Carriers for Intracellular Delivery of Nucleic Acids and Subsequent Therapeutic Applications. *Molecules* 2017, 22(5), 782.
- Chandra, P. K., Kundu, A. K., Hazari, S., Chandra, S., Bao, L., Ooms, T., Morris, G. F., Wu, T., Mandal, T. K., and Dash, S. 2012. Inhibition of hepatitis C virus replication by intracellular delivery of multiple siRNAs by nanosomes. *Molecular Therapy*, 20(9), 1724-1736.
- Chang, P. Y., Peng, S. F., Lee, C. Y., Lu, C. C., Tsai, S. C., Shieh, T. M., ... & Yang, J. S. (2013). Curcumin-loaded nanoparticles induce apoptotic cell death through regulation of the function of MDR1 and reactive oxygen species in cisplatin-resistant CAR human oral cancer cells. *International journal of oncology*, 43(4), 1141-1150.
- Chauhan, V. P., and Jain, R. K. 2013. Strategies for advancing cancer nanomedicine. *Nature Materials* 2013, 12(11), 958-962.
- Chen, F. F., Lv, X., Zhao, Q. F., Xu, Y. Z., Song, S. S., Yu, W., & Li, X. J. (2018). Inhibitor of DNA binding 3 reverses cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells by regulating the PI3K/Akt pathway. *Oncology letters*, 16(2), 1634-1640.

- Chen, S. F., Nieh, S., Jao, S. W., Liu, C. L., Wu, C. H., Chang, Y. C., Yang, C. Y., and Lin, Y. S. 2012. Quercetin Suppresses Drug-Resistant Spheres via the p38 MAPK–Hsp27 Apoptotic Pathway in Oral Cancer Cells. *PLOS ONE*, 7(11), e49275.
- Cheong, S. C., Vatanasapt, P., Yi-Hsin, Y., Zain, R. B., Kerr, A. R., and Johnson, N. W. 2017. Oral cancer in South East Asia. *Translational Research in Oral Oncology*, 2, 2057178X1770292.
- Chiou, S. H., Yu, C. C., Lo, W. L., Chen, Y. W., Huang, P. I., Hsu, H. S., Tseng, L. M., Hung, S. C., Kao, S. Y., and Chang, C. J. 2011. Bmi-1 Regulates Snail Expression and Promotes Metastasis Ability in Head and Neck Squamous Cancer-Derived ALDH1 Positive Cells. *Journal of Oncology*, 2011(1), 609259.
- Chitgupi, U., Qin, Y., and Lovell, J. F. 2017. Targeted Nanomaterials for Phototherapy. *Nanotheranostics*, 1(1), 38.
- Chow, L. Q. M. 2020. Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(1), 60-72.
- Chvátlová, K., Brabec, V., and Kašpárková, J. 2007. Mechanism of the formation of DNA–protein cross-links by antitumor cisplatin. *Nucleic Acids Research*, 35(6), 1812-1821.
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11), pdb-prot087288.
- Cunha, S. I., and Pietras, K. 2011. ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer. *Blood*, 117(26), 6999-7006.
- Daka, A., and Peer, D. 2012. RNAi-based nanomedicines for targeted personalized therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(13), 1508-1521.
- Danhier, F., Feron, O., and Préat, V. 2010. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 148(2), 135-146.
- Dantzig, A. H., De Alwis, D. P., and Burgess, M. 2003. Considerations in the design and development of transport inhibitors as adjuncts to drug therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(1), 133-150.
- Dasari, S., and Bernard Tchounwou, P. 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378.
- De Biasi, A. R., Villena-Vargas, J., and Adusumilli, P. S. 2014. Cisplatin-induced antitumor immunomodulation: a review of preclinical and clinical evidence. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(21), 5384-5391.

- De Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., and Plummer, M. 2012. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*, 13(6), 607-615.
- DeVincenzo, J., Lambkin-Williams, R., Wilkinson, T., Cehelsky, J., Nochur, S., Walsh, E., Meyers, R., Gollob, J., and Vaishnav, A. 2010. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8800-8805.
- Dilruba, S., and Kalayda, G. V. 2016. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(6), 1103-1124.
- Dlamini, Z., Alaouna, M., Mbatha, S., Bhayat, A., Mabongo, M., Chatziioannou, A., and Hull, R. 2021. Genetic Drivers of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Aberrant Splicing Events, Mutational Burden, HPV Infection and Future Targets. *Genes*, 12(3), 422.
- Dmytriw, A. A., El Beltagi, A., Bartlett, E., Sahgal, A., Poon, C. S., Forghani, R., Fatterpekar, G., and Yu, E. 2014. CRISPS: A pictorial essay of an acronym to interpreting metastatic head and neck lymphadenopathy. *Canadian Association of Radiologists Journal*, 65(3), 232-241.
- Doğan, E. 2023. Baş boyun kanserleri ve tedavi stratejilerinin hpv ile ilişkisinin in vitro araştırılması. Doktora tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Onkoloji Anabilim Dalı, 93, İzmir.
- Du, J., Wagner, B. A., Buettner, G. R., and Cullen, J. J. 2015. The Role of Labile Iron in the Toxicity of Pharmacological Ascorbate. *Free Radical Biology & Medicine*, 84, 289.
- Edalatian Tavakoli, S., Motavalizadehkakhky, A., Homayouni Tabrizi, M., Mehrzad, J., & Zhiani, R. (2024). Study of the anti-cancer activity of a mesoporous silica nanoparticle surface coated with polydopamine loaded with umbelliprenin. *Scientific Reports*, 14(1), 11450.
- Ekin, Z. Y. 2021. Kanser Hücresinin Temel Özellikleri. *Türkiye Klinikleri Medical Oncology- Special Topics*, 14(4), 41-44.
- Elmorsy, E. A., Saber, S., Hamad, R. S., Abdel-Reheim, M. A., El-kott, A. F., AlShehri, M. A., Morsy, K., Salama, S. A., and Youssef, M. E. 2024. Advances in understanding cisplatin-induced toxicity: Molecular mechanisms and protective strategies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 203, 106939.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. 1998. A caspaz-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), 43-50.

- Essex, S., Navarro, G., Sabhachandani, P., Chordia, A., Trivedi, M., Movassaghian, S., and Torchilin, V. P. 2014. Phospholipid-modified PEI-based nanocarriers for in vivo siRNA therapeutics against multidrug-resistant tumors. *Gene Therapy* 2015, 22(3), 257-266.
- Fernández-Castané, A., Li, H., Thomas, O. R. T., and Overton, T. W. 2017. Flow cytometry as a rapid analytical tool to determine physiological responses to changing O₂ and iron concentration by *Magnetospirillum gryphiswaldense* strain MSR-1. *Scientific Reports*, 7(1), 13118.
- Ferris, R. L., Blumenschein, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., Harrington, K., Kasper, S., Vokes, E. E., Even, C., Worden, F., Saba, N. F., Iglesias Docampo, L. C., Haddad, R., Rordorf, T., Kiyota, N., Tahara, M., Monga, M., Lynch, M., Gillison, M. L. 2016. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *The New England Journal of Medicine*, 375 (19), 1856-1867.
- Filipowicz, W., and Paszkowski, J. 2013. Gene Silencing. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 221-222.
- Frezza, M., Hindo, S., Chen, D., Davenport, A., Schmitt, S., Tomco, D., and Ping Dou, Q. 2010. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 16(16), 1813-1825.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., ... & Kroemer, G. J. C. D. (2014). Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell death & disease*, 5(5), e1257-e1257.
- Ganesh, S., Iyer, A. K., Weiler, J., Morrissey, D. V., & Amiji, M. M. (2013). Combination of siRNA-directed gene silencing with cisplatin reverses drug resistance in human non-small cell lung cancer. *Molecular therapy Nucleic acids*, 2.
- Gelbard, A. (2024). Zinc Nanoparticles as a Cancer Therapeutic. *Int J Biomed Res Prac*, 4(3), 1-10.
- Goel, B., Tiwari, A. K., Pandey, R. K., Singh, A. P., Kumar, S., Sinha, A., Jain, S. K., and Khattri, A. 2022. Therapeutic approaches for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma—An update on clinical trials. *Translational Oncology*, 21, 101426.
- Goel, B., Tripathi, N., Bhardwaj, N., and Jain, S. K. 2020. Small Molecule CDK Inhibitors for the Therapeutic Management of Cancer. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20(17), 1535-1563.
- Goerner, M., Seiwert, T. Y., and Sudhoff, H. 2010. Molecular targeted therapies in head and neck cancer- An update of recent developments- An u. *Head and Neck Oncology*, 2(1), 1-5.

- Gormley, M., Creaney, G., Schache, A., Ingarfield, K., and Conway, D. I. 2022. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. *British Dental Journal*, 233(9), 780-786.
- Guminski, A. D., Balleine, R. L., Chiew, Y. E., Webster, L. R., Tapner, M., Farrell, G. C., Harnett, P. R., and DeFazio, A. 2006. MRP2 (ABCC2) and cisplatin sensitivity in hepatocytes and human ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 100(2), 239-246.
- Gupta, R. B., and Kompella, U. B. 2006. *Fundamentals of Drug Nanoparticles*. 25-44.
- Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Maso, L. D., Daudt, A. W., Fabianova, E., Wünsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Mates, D., Matos, E., Boffetta, P. 2007. Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 99(10), 777-789.
- Hausman, D. M. 2019. What Is Cancer? *Perspectives in Biology and Medicine*, 62(4), 778-784.
- Heck, J. E., Berthiller, J., Vaccarella, S., Winn, D. M., Smith, E. M., Shan'gina, O., Schwartz, S. M., Purdue, M. P., Pilarska, A., Eluf-Neto, J. E., Menezes, A., McClean, M. D., Matos, E., Koifman, S., Kelsey, K. T., Herrero, R., Hayes, R. B., Franceschi, S., Wünsch-Filho, V. W., Hashibe, M. 2010. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *International Journal of Epidemiology*, 39(1), 166-181.
- Herrmann, R., García-García, F. J., and Reller, A. 2014. Rapid degradation of zinc oxide nanoparticles by phosphate ions. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5(1), 2007.
- Hinerman, R. W., Mendenhall, W. M., Morris, C. G., Amdur, R. J., Werning, J. W., and Villaret, D. B. 2004. Postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity: 35-year experience. *Head & Neck*, 26(11), 984-994.
- Hoesel, B., and Schmid, J. A. 2013. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer* 2013, 12(1), 1-15.
- Huang, H., Zhang, P., Chen, Y., Ji, L., and Chao, H. 2015. Labile ruthenium (II) complexes with extended phenyl-substituted terpyridyl ligands: synthesis, aquation and anticancer evaluation. *Dalton Transactions*, 44(35), 15602-15610.
- Hunter, R. J. 1981. *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. Academic Press, 391, London.
- Innocenzi, P. 2003. Infrared spectroscopy of sol-gel derived silica-based films: a spectral-microstructure overview.

- Jadvar, H., Colletti, P. M., Delgado-Bolton, R., Esposito, G., Krause, B. J., Iagaru, A. H., Nadel, H., Quinn, D. I., Rohren, E., Subramaniam, R. M., Zukotynski, K., Kauffman, J., Ahuja, S., and Griffeth, L. 2017. Appropriate Use Criteria for 18F-FDG PET/CT in Restaging and Treatment Response Assessment of Malignant Disease. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 58(12), 2026-2037.
- Jain, R. K., and Stylianopoulos, T. 2010. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2010, 7(11), 653-664.
- Jastrzbski, W., Sitarz, M., Rokita, M., and Bułat, K. 2011. Infrared spectroscopy of different phosphates structures. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(4), 722-727.
- Jian Dong, W., Da, L., Jin Ku, L., Xiao Hong, Y., Jia Luo, H., and Yi, L. 2011. One-Step Preparation and Characterization of Zinc Phosphate Nanocrystals with Modified Surface. *Soft Nanoscience Letters*, 2011(03), 81-85.
- Johnstone, T. C., Wilson, J. J., and Lippard, S. J. 2013. Monofunctional and higher-valent platinum anticancer agents. *Inorganic Chemistry*, 52(21), 12234-12249.
- Kang, H., Kennedy, T. A., and Yu, E. 2024. Head and Neck Squamous Cell Cancer: Approach to Staging and Surveillance. *IDKD Springer Series*, 251-264.
- Kato, Y., Maeda, T., Suzuki, A., and Baba, Y. 2018. Cancer metabolism: New insights into classic characteristics. *Japanese Dental Science Review*, 54(1), 8-21.
- Kelland, L. 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 7(8), 573-584.
- Konukoğlu, D., ve Turhan, M. 2014. Anjiyogenezin Temel Moleküler Mekanizmaları ve Tümör Anjiyogenezi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 36(1), 42-48.
- Lai, Y.-L., Lin, C.-C., Hsu, S.-R., and Yen, S.-K. 2018. Electrochemical Deposition of Cisplatin on Pure Magnesium. *Journal of The Electrochemical Society*, 165(5), D196-D205.
- Laplane, M., and Sabatini, D. M. 2012. MTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., and Parsons, R. 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275(5308), 1943-1947.

- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., and Zhao, J. J. 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 8(8), 627-644.
- LoPiccolo, J., Blumenthal, G. M., Bernstein, W. B., & Dennis, P. A. (2008). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resistance Updates*, 11(1-2), 32–50.
- Lord, C. J., and Ashworth, A. 2017. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, 355(6330), 1152-1158.
- Lugones, Y., Loren, P., and Salazar, L. A. 2022. Cisplatin resistance: genetic and epigenetic factors involved. *Biomolecules*, 12(10), 1365.
- Maeda, H., Nakamura, H., and Fang, J. 2013. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (1), 71-79.
- Magaway, C., Kim, E., & Jacinto, E. (2019). Targeting mTOR and metabolism in cancer: lessons and innovations. *Cells*, 8(12), 1584.
- Mainini, F., & Eccles, M. R. (2020). Lipid and polymer-based nanoparticle siRNA delivery systems for cancer therapy. *Molecules*, 25(11), 2692.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9 (3), 153-166.
- Manning, B. D., and Cantley, L. C. 2007. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, 129 (7), 1261-1274.
- Marur, S., and Forastiere, A. A. 2008. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(4), 489-501.
- Marur, S., and Forastiere, A. A. 2016. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(3), 386-396.
- Mauter, M. S., Zucker, I., Perreault, F., Werber, J. R., Kim, J. H., and Elimelech, M. 2018. The role of nanotechnology in tackling global water challenges. *Nature Sustainability*, 1(4), 166-175.
- McCarter, K., Martínez, Ú., Britton, B., Baker, A., Bonevski, B., Carter, G. and Wolfenden, L. 2016. Smoking cessation care among patients with head and neck cancer: a systematic review. *BMJ open*, 6 (9), e012296.
- McFadden, M., Singh, S. K., Oprea-Ilie, G., & Singh, R. (2021). Nano-based drug delivery and targeting to overcome drug resistance of ovarian cancers. *Cancers*, 13(21), 5480.

- Minchenko, A., Bauer, T., Salceda, S., and Caro, J. 1994. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Laboratory Investigation*, 71(3), 374-379.
- Möller, K., Müller, K., Engelke, H., Bräuchle, C., Wagner, E., and Bein, T. 2016. Highly efficient siRNA delivery from core-shell mesoporous silica nanoparticles with multifunctional polymer caps. *Nanoscale*, 8 (7), 4007-4019.
- Morita, S., Yano, M., Tsujinaka, T., Akiyama, Y., Taniguchi, M., Kaneko, K., Miki, H., Fujii, T., Yoshino, K., Kusuoka, H., and Monden, M. 1999. Genetic Polymorphisms Of Drug-Metabolizing Enzymes And Susceptibility To Head-And-Neck Squamous-Cell Carcinoma. *J. Cancer*, 80, 685-688.
- Moustafa, Y. M., and El-Egili, K. 1998. Infrared spectra of sodium phosphate glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 240 (1-3), 144-153.
- Mout, R., Moyano, D. F., Rana, S., and Rotello, V. M. 2012. Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chemical Society Reviews*, 41 (7), 2539-2544.
- Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., Saginala, K., and Barsouk, A. 2023. Epidemiology, risk factors, and prevention of head and neck squamous cell carcinoma. *Medical Sciences*, 11(2), 42.
- Mueller, S., Schittenhelm, M., Honecker, F., Malenke, E., Lauber, K., Wesselborg, S., ... & Mayer, F. (2006). Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin in vitro. *International journal of oncology*, 29(2), 471-479.)
- Musgrove, E. A., Caldon, C. E., Barraclough, J., Stone, A., and Sutherland, R. L. 2011. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(8), 558-572.
- Narayan, R., Nayak, U. Y., Raichur, A. M., and Garg, S. 2018. Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances. *Pharmaceutics*, 10 (3), 118.
- Navya, P. N., Kaphle, A., Srinivas, S. P., Bhargava, S. K., Rotello, V. M., and Daima, H. K. 2019. Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials. *Nano Convergence* 2019 6:1, 6 (1), 1-30.
- Ni, L. N., Li, J. Y., Miao, K. R., Qiao, C., Zhang, S. J., Qiu, H. R., and Qian, S. X. 2011. Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms correlate with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Medical Oncology*, 28 (1), 265-269.
- Nikolin, B., Imamović, B., Medanhodžić-Vuk, S., and Sober, M. 2004. High Performance Liquid Chromatography In Pharmaceutical Analyses. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 4 (2), 5.

- Ojima, I., Geng, X., Wu, X., Qu, C., Borella, C. P., Xie, H., Wilhelm, S. D., Leece, B. A., Bartle, L. M., Goldmacher, V. S., and Chari, R. V. J. 2002. Tumor-specific novel taxoid-monoclonal antibody conjugates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (26), 5620-5623.
- O'Leary, B., Finn, R. S., and Turner, N. C. 2016. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2016, 13 (7), 417-430.
- Pandey, A., Kulkarni, A., Roy, B., Goldman, A., Sarangi, S., Sengupta, P., ... & Sengupta, S. (2014). Sequential application of a cytotoxic nanoparticle and a PI3K inhibitor enhances antitumor efficacy. *Cancer research*, 74(3), 675-685.
- Parkin, D. M. 2011. 2. Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. *British Journal of Cancer* 2011, 105 (2), S6-S13.
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., and Langer, R. 2020. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nano-Enabled Medical Applications*, 61-91.
- Perez, J., Bardin, C., Rigal, C., Anthony, B., Rousseau, R., and Dutour, A. 2011. Anti-MDR1 siRNA Restores Chemosensitivity in Chemosensitive Breast Carcinoma and Osteosarcoma Cell Lines. *Anticancer Research*, 31 (9).
- Pfister, D. G., Ang, K. K., Brizel, D. M., Burtness, B. A., Busse, P. M., Caudell, J. J., Cmelak, A. J., Colevas, A. D., Dunphy, F., Eisele, D. W., Gilbert, J., Gillison, M. L., Haddad, R. I., Haughey, B. H., Hicks, W. L., Hitchcock, Y. J., Kies, M. S., Lydiatt, W. M., Maghami, E., Hughes, M. 2013. Head and neck cancers, version 2.2013. Featured updates to the NCCN guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 11 (8), 917-923.
- Pignon, J. P., Maître, A. le, Maillard, E., and Bourhis, J. 2009. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and Oncology : Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 92 (1), 4-14.
- Priori, S. G., Denegri, M., Bongianino, R., and Napolitano, C. 2018. Gene Therapy to Treat Cardiac Arrhythmias. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside: Seventh Edition*, 531-540.
- Ramesh, S. and Narayanan, V. 2013. Synthesis and Characterisation of Zinc Phosphate Nanoparticles by Precipitation Method. *International Journal of Innovative Research in Science & Engineering*, 2347-3207.
- Rascio, F., Spadaccino, F., Rocchetti, M. T., Castellano, G., Stallone, G., Netti, G. S., and Ranieri, E. 2021. The Pathogenic Role of PI3K/AKT Pathway in Cancer Onset and Drug Resistance: An Updated Review. *Cancers*, 13 (16), 3949.

- Reed, J. C. 2006. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: Mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death and Differentiation*, 13 (8), 1378-1386.
- Risnayanti, C., Jang, Y. S., Lee, J., and Ahn, H. J. 2018. PLGA nanoparticles co-delivering MDR1 and BCL2 siRNA for overcoming resistance of paclitaxel and cisplatin in recurrent or advanced ovarian cancer. *Scientific Reports* 2018, 8 (1), 1-12.
- Roninson, I. B. 1992. The role of the MDR1 (p-glycoprotein) gene in multidrug resistance in vitro and in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 43 (1), 95-102.
- Rosenblum, D., Joshi, N., Tao, W., Karp, J. M., and Peer, D. 2018. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nature Communications* 2018 9:1, 9 (1), 1-12.
- Rumgay, H., Murphy, N., Ferrari, P., and Soerjomataram, I. 2021. Alcohol and Cancer: Epidemiology and Biological Mechanisms. *Nutrients* 2021, 13 (9), 3173.
- Saxton, R. A., and Sabatini, D. M. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168 (6), 960-976.
- Schultheis, B., Strumberg, D., Santel, A., Vank, C., Gebhardt, F., Keil, O., Lange, C., Giese, K., Kaufmann, J., Khan, M., and Drevs, J. 2014. First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 32 (36), 4141-4148.
- Seiwert, T. Y., Burtneess, B., Mehra, R., Weiss, J., Berger, R., Eder, J. P., Heath, K., McClanahan, T., Lunceford, J., Gause, C., Cheng, J. D., and Chow, L. Q. 2016. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *The Lancet. Oncology*, 17 (7), 956-965.
- Sendi, H., Mehrab-Mohseni, M., Foureau, D. M., Ghosh, S., Walling, T. L., Steuerwald, N., Zamor, P. J., Kaplan, K. J., Jacobs, C., Ahrens, W. A., Russo, M. W., Clemens, M. G., Schrum, L. W., and Bonkovsky, H. L. 2015. miR-122 decreases HCV entry into hepatocytes through binding to the 3' UTR of OCLN mRNA. *Liver International*, 35 (4), 1315-1323.
- Shakir, S., and Hammadi, M. 2022. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of Zinc phosphate nanoparticles on the HL-60 human leukemia cell line. *HIV Nursing*, 22 (2), 3287-3292.
- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., and Farokhzad, O. C. 2016. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer* 2016, 17 (1), 20-37.
- Shirazi, N. H., and Rajabi, M. R. 2023. Spectroscopic Analysis of the Zinc Ion Interaction with Horseradish Peroxidase. *Journal of Applied Spectroscopy*, 90 (1), 101-107.

- Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. 2018. Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68 (1), 7-30.
- Slowing, I. I., Trewyn, B. G., and Lin, V. S. Y. 2007. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 129 (28),
- Solak, K., Aysin, F., Özek, N. Ş., Polat, E., Ghosigharehagaji, A., and Mavi, A. 2025. Mitoxantrone Delivery to Brain Cancer Cells via Advanced Silica Nanoparticle Systems.
- Solak, K., Mavi, A., and Yılmaz, B. 2021. Disulfiram-loaded functionalized magnetic nanoparticles combined with copper and sodium nitroprusside in breast cancer cells. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 119.
- Song, J., Chen, C., and Raben, D. 2004. Emerging role of EGFR-targeted therapies and radiation in head and neck cancer. *Oncology (Williston Park, NY)*, 18 (14), 1757-67.
- Song, K. 2017. Interphase characterization in rubber nanocomposites. *Progress in Rubber Nanocomposites*, 115-152.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71 (3), 209-249.
- Surowiak, P., Materna, V., Kaplenko, I., Spaczynski, M., Dolinska-Krajewska, B., Gebarowska, E., Dietel, M., Zabel, M., and Lage, H. 2006. ABCC2 (MRP2, cMOAT) can be localized in the nuclear membrane of ovarian carcinomas and correlates with resistance to cisplatin and clinical outcome. *Clinical Cancer Research*, 12 (23), 7149-7158.
- Tabernero, J., Shapiro, G. I., LoRusso, P. M., Cervantes, A., Schwartz, G. K., Weiss, G. J., Paz-Ares, L., Cho, D. C., Infante, J. R., Alsina, M., Gounder, M. M., Falzone, R., Harrop, J., White, A. C. S., Toudjarska, I., Bumcrot, D., Meyers, R. E., Hinkle, G., Svrzikapa, N., Burris, H. A. 2013. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discovery*, 3(4), 406-417.
- Tai, T. S., Lin, P. M., Wu, C. F., Hung, S. K., Huang, C. I., Wang, C. C., and Su, Y. C. 2019. CDK4/6 Inhibitor LEE011 Is a Potential Radiation-sensitizer in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: An In Vitro Study. *Anticancer Research*, 39(2), 713-720.
- Tan, L., Yang, M. Y., Wu, H. X., Tang, Z. W., Xiao, J. Y., Liu, C. J., and Zhuo, R. X. 2015. Glucose- and pH-responsive nanogated ensemble based on polymeric network capped mesoporous silica. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(11), 6310-6316.

- Tariq, I., Ali, M. Y., Janga, H., Ali, S., Amin, M. U., Ambreen, G., Ali, U., Pinnapireddy, S. R., Schäfer, J., Schulte, L. N., and Bakowsky, U. 2020. Downregulation of MDR 1 gene contributes to tyrosine kinase inhibitor induce apoptosis and reduction in tumor metastasis: A gravity to space investigation. *International Journal of Pharmaceutics*, 591, 119993.
- Theophanides, T. 1981. Fourier Transform Infrared Spectra of Calf Thymus DNA and its Reactions with the Anticancer Drug Cisplatin. *Applied Spectroscopy*, 35(5), 461-465.
- Tobelem, G. 2007. VEGF: A key therapeutic target for the treatment of cancer-insights into its role and pharmacological inhibition. *Targeted Oncology*, 2(3), 153-164.
- Tsuruo, T., Naito, M., Tomida, A., Fujita, N., Mashima, T., Sakamoto, H., and Haga, N. 2003. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Science*, 94(1), 15-21.
- Tüylek, Z. 2017. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Nanoteknolojik Etkileşim. *Bozok Medical Journal*, 7(3), 89-98.
- Tuyns, A. -J, Esteve, J., Raymond, L., Berrino, F., Benhamou, E., Blanchet, F., Boffetta, P., Crosignani, P., Morai, A. Del, Lehmann, W., Merletti, F., Pequignot, G., Rreou, E., Sancho-Garnier, H., Terracini, B., Zubiri, A., and Zubiri, L. 1988. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: Iarc international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *International Journal of Cancer*, 41(4), 483-491.
- Vafaei, S., Sadat Shandiz, S. A., and Piravar, Z. 2020. Zinc-Phosphate Nanoparticles as a Novel Anticancer Agent: An In Vitro Evaluation of Their Ability to Induce Apoptosis. *Biological Trace Element Research*, 198(1), 109-117.
- van Caloen, G., Schmitz, S., Baroudi, M. El, Caignet, X., Pyr dit Ruys, S., Roger, P. P., Vertommen, D., and Machiels, J. P. 2020. Preclinical Activity of Ribociclib in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Molecular Cancer Therapeutics*, 19(3), 777-789.
- Vania, L., Rebelo, T. M., Ferreira, E., and Weiss, S. F. T. 2018. Knock-down of LRP/LR promotes apoptosis in early and late stage colorectal carcinoma cells via kaspaz activation. *BMC Cancer*, 18(1), 1-11.
- Varier, I., Keeley, B. R., Krupar, R., Patsias, A., Dong, J., Gupta, N., Parasher, A. K., Genden, E. M., Miles, B. A., Teng, M., Bakst, R. L., Gupta, V., Misiukiewicz, K. J., Chiao, E. Y., Scheurer, M. E., Laban, S., Zhang, D., Ye, F., Cui, M., ... Sikora, A. G. 2016. Clinical characteristics and outcomes of oropharyngeal carcinoma related to high-risk non-human papillomavirus16 viral subtypes. *Head & Neck*, 38(9), 1330-1337.
- Verma, A., and Stellacci, F. 2010. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small*, 6(1), 12-21.

- Wang, D., Zhu, G., Huang, X., and Lippard, S. J. 2010. X-ray structure and mechanism of RNA polymerase II stalled at an antineoplastic monofunctional platinum-DNA adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(21), 9584-9589.
- Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N., and Shin, Y. K. 2019. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6), 2647-2693.
- Wang, N., Hsu, C., Zhu, L., Tseng, S., and Hsu, J. P. 2013. Influence of metal oxide nanoparticles concentration on their zeta potential. *Journal of Colloid and Interface Science*, 407, 22-28.
- Wang, S. W., Lee, C. H., Lin, M. S., Chi, C. W., Chen, Y. J., Wang, G. S., ... & Shen, Y. S. (2020). ZnO nanoparticles induced kaspaz-dependent apoptosis in gingival squamous cell carcinoma through mitochondrial dysfunction and p70S6K signaling pathway. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1612.
- Wang, Y., Wang, M., Tang, Y., Sun, B., Wang, K., and Zhu, F. 2021. Perioperative mortality of head and neck cancers. *BMC Cancer*, 21(1), 256.
- Wiggins, R. H., Hoffman, J. M., Fine, G. C., Covington, M. F., Salem, A. E., Koppula, B. R., and Morton, K. A. 2022. PET-CT in clinical adult oncology-V. head and neck and neuro oncology. *Cancers*, 14(11), 2726.
- Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D., Fields, P., Marshall, G., Narod, S., Lenoir, G. M., Lynch, H., Feunteun, J., Devilee, P., Cornelisse, C. J., Menko, F. H., Stratton, M. R. 1994. Localization of a Breast Cancer Susceptibility Gene, BRCA2, to Chromosome 13q12-13. *Science*, 265(5181), 2088-2090.
- Xiao, B., Zhang, M., Viennois, E., Zhang, Y., Wei, N., Baker, M. T., Jung, Y., and Merlin, D. 2015. Inhibition of MDR1 gene expression and enhancing cellular uptake for effective colon cancer treatment using dual-surface-functionalized nanoparticles. *Biomaterials*, 48, 147-160.
- Xu, D., Kang, H., Fisher, M., and Juliano, R. L. 2004. Strategies for inhibition of MDR1 gene expression. *Molecular Pharmacology*, 66(2), 268-275.
- Yadav, P., Ambudkar, S. V., and Rajendra Prasad, N. 2022. Emerging nanotechnology-based therapeutics to combat multidrug-resistant cancer. *Journal of Nanobiotechnology* 2022, 20(1), 1-35.
- Yang, H., Ding, R., Tong, Z., Huang, J., Shen, L., Sun, Y., Liao, J., Yang, Z., Hoffman, R. M., Wang, C., and Meng, X. 2016. siRNA Targeting of MDR1 Reverses Multidrug Resistance in a Nude Mouse Model of Doxorubicin-resistant Human Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Research*, 36(6).

- Yao, Y., Zhou, Y., Liu, L., Xu, Y., Chen, Q., Wang, Y., Wu, S., Deng, Y., Zhang, J., and Shao, A. 2020. Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 558493.
- Yavuz, O., and Marangöz, Ö. 2018. Farmakoloji ve Toksikolojide İn Siliko Yöntemlerin Kullanımı. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, 4(3), 35-42.
- Yoon, S., and Seger, R. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, 24(1), 21-44.
- Youle, R. J., and Strasser, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008 9:1, 9(1), 47-59.
- Yusof, Y., and Johan, M. R. 2014. Concentration-dependent properties of amorphous carbon nanotube/silica composites via the sol-gel technique. *CrystEngComm*, 16(36), 8570–8575.
- Zakeri, N., Rezaie, H. R., Javadpour, J., & Kharaziha, M. (2021). Effect of pH on cisplatin encapsulated zeolite nanoparticles: Release mechanism and cytotoxicity. *Materials Chemistry and Physics*, 273, 124964.
- Zandberg, D. P., Liu, S., Goloubeva, O., Ord, R., Strome, S. E., Suntharalingam, M., Taylor, R., Morales, R. E., Wolf, J. S., Zimrin, A., Lubek, J. E., Schumaker, L. M., and Cullen, K. J. 2016. Oropharyngeal cancer as a driver of racial outcome disparities in squamous cell carcinoma of the head and neck: 10-year experience at the University of Maryland Greenebaum Cancer Center. *Head & Neck*, 38(4), 564-572.
- Zerek, A. 2024. Biyoterapi Uygulaması: Tıbbi Sülük Tedavisi (Hirudoterapi). *BİDGE Yayınları*, 193-212, Istanbul.
- Zhang, S., Wang, B., Ma, F., Tong, F., Yan, B., Liu, T., Xie, H., Song, L., Yu, S., and Wei, L. 2021. Characteristics of B lymphocyte infiltration in HPV+ head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, 112(4), 1402-1416.
- Zhang, Y., Dong, P., and Yang, L. 2023. The role of nanotherapy in head and neck squamous cell carcinoma by targeting tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 14, 1189323.
- Zheng, W., Cao, C., Liu, Y., Yu, Q., Zheng, C., Sun, D., ... & Liu, J. (2015). Multifunctional polyamidoamine-modified selenium nanoparticles dual-delivering siRNA and cisplatin to A549/DDP cells for reversal multidrug resistance. *Acta biomaterialia*, 11, 368-380.
- Zhou, J. 2014. Advances and Prospects in Cancer Immunotherapy. *New Journal of Science*, 2014(1), 745808.

Zou, S., Tong, Q., Liu, B., Huang, W., Tian, Y., and Fu, X. 2020. Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy. *Molecular Cancer* 2020, 19(1), 1-19.

