



**KİTOSAN-GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL YÜKLÜ
DOKSORUBİSİN'İN KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ebru Başak BAŞBÜYÜK

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

2025

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİTOSAN-GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL YÜKLÜ DOKSORUBİSİN'İN
KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ebru Başak BAŞBÜYÜK

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

**KİTOSAN-GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL YÜKLÜ DOKSORUBİSİN'İN
KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Adem KARA danışmanlığında, Ebru Başak BAŞBÜYÜK tarafından hazırlanan bu çalışma 16 / 04 / 2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği (3/3)** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU	İmza:
Üye	: Prof. Dr. Adem KARA	İmza:
Üye	: Doç. Dr. Elif ERBAŞ	İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ
Enstitü Müdürü

*Bu tez çalışması TÜSEB tarafından 32453 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.

16 / 04 / 2025

İmzası

Ebru Başak BAŞBÜYÜK

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KITOSAN-GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL YÜKLÜ DOKSORUBİSİN'İN KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ebru Başak BAŞBÜYÜK

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Adem KARA

Nanobiyoteknoloji, antikanser ilaç dağıtımıyla ilgili sorunların çoğunun üstesinden gelmek için güvenilir bir yaklaşım olarak görülmektedir. Terapötiklerin ve terapötik nanoilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi, daha iyi bir tedavi ve ilaçların tek bir platformda verimli bir şekilde kontrollü salımı için çeşitli nanotaşıyıcılara ve aktif maddelere sahip olma gerekliliği olup, mevcut proje önerisinin araştırma konusudur. Terapötikler ve terapötik sistemler, ilaç yüklemenin yüksek etkinliği, yüksek hücresel alım, yüksek ilaç salımı ve minimum yan etkiler nedeniyle geleneksel kemoterapiye göre avantajlara sahiptir. Kitosan-Gümüş nanopartiküllerin (K-AgNP) sahip oldukları üstün özellikler sayesinde çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanımı araştırılmaktadır. Bu çalışma, K-AgNP yüklenmiş Doksorubisin'in (Dox) karaciğer kanseri hücreleri (HepG2) üzerindeki sitotoksik, proliferatif ve apoptotik etkilerinin araştırılmasını amaçlamaktadır.

Çalışmada, K-AgNP'nin sentezi ve karakterizasyonu sonrası, Dox yüklenmesi sağlanarak FITR, UV-Vis, XRD, SEM yöntemleri ile belirlenen yüklenmenin salınımı analiz edildi. Daha sonra elde edilen K-AgNP+Dox'un hücre canlılık analizi yapılarak inhibitör konsantrasyon belirlendi. Daha sonra IC50 değerinin altında iki tane (düşük ve yüksek) dozlarda terapötik doz belirlenerek uygulamalara başlandı. Tüm uygulamalar için 24 ve 48 saat süreli inkübasyon süreleri sağlandı ve elde edilen hücrelerden RT-PCR ve western blot yöntemiyle çeşitli gen ve protein ekspresyonları belirlendi.

Elde edilen verilerin incelemesinde, K-AgNP+Dox'un IC50 değerinin 24h için 50µg/mL ve 48h için 30 µg/mL olduğu belirlendi. Elde edilen RNA örneklerinde AKT, PI3K, EGFR, BAX ve Bcl2 gen ekspresyonları belirlendi. Western blot analizinde de NFKB-p65, LC3, Beclin1, Bcl-2 ve Kaspaz-3 proteinleri ekspresyon seviyeleri belirlendi.

Çalışmamızın bulgularında, K-AgNP yüklenmiş Dox uygulamasının karaciğer kanseri hücrelerinin (HEPG2) proliferasyonunu önemli ölçüde engellediğini ve apoptotik yanıtlarını artırdığını belirlendi. Bu, Dox'un K-AgNP aracılı iletiminin, potansiyel olarak ilacın hedeflenen iletimini ve hücresel alımını artırarak, terapötik etkinliğini etkili bir şekilde iyileştirdiğini göstermektedir.

2025, 57 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kanser, Kitosan, Doksorubisin, Gümüş nanopartikül, İlaç dağıtım sistemleri

ABSTRACT

MS. Thesis

INVESTIGATION OF THE THERAPEUTIC EFFICACY OF CHITOSAN-SILVER NANOPARTICLE-LOADED DOXORUBICIN ON LIVER CANCER CELLS

Ebru Başak BAŞBÜYÜK

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Adem KARA

Nanobiotechnology is seen as a reliable approach to overcome most of the problems related to anticancer drug delivery. The development of therapeutics and therapeutic nano-drug delivery systems is a necessity to have a variety of nanocarriers and active substances for better treatment and efficient controlled release of drugs on a single platform and is the research topic of the current project proposal. Therapeutics and therapeutic systems have advantages over conventional chemotherapy due to high efficiency of drug loading, high cellular uptake, high drug release and minimal side effects. The use of chitosan-silver nanoparticles (K-AgNPs) in the treatment of various cancer types is being investigated due to their superior properties. This study aims to investigate the cytotoxic, proliferative and apoptotic effects of K-AgNP loaded Doxorubicin (Dox) on liver cancer cells (HepG2).

In the study, after the synthesis and characterisation of K-AgNP, Dox loading was provided and the release of the loading determined by FITR, UV-Vis, XRD, SEM methods was analysed. Then, cell viability analysis of the obtained K-AgNP+Dox was performed and inhibitory concentration was determined. Then, two therapeutic doses (low and high) under the IC₅₀ value were determined and the applications were started. Incubation periods of 24 and 48 hours were provided for all applications and various gene and protein expressions were determined from the cells obtained by RT-PCR and western blot method.

In the analysis of the data obtained, it was determined that the IC₅₀ value of K-AgNP+Dox was 50 µg/mL for 24h and 30 µg/mL for 48h. AKT, PI3K, EGFR, BAX and Bcl2 gene expressions were determined in the obtained RNA samples. In Western blot analysis, the expression levels of NFκB-p65, LC3, Beclin1, Bcl-2 and Caspase-3 proteins were determined.

The findings of our study revealed that administration of K-AgNP-loaded Dox significantly inhibited the proliferation of liver cancer cells (HEPG2) and enhanced their apoptotic response. This suggests that K-AgNP-mediated delivery of Dox effectively improves its therapeutic efficacy, potentially by enhancing targeted delivery and cellular uptake of the drug.

2025, 57 page

Keywords: Chitosan, Doxorubicin, nanoparticle, Silver nanoparticle, Cancer, Anticancer agents, Drug delivery systems, Drug carriers

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana rehberlik ve önerilerde bulunan danışmanım Prof. Dr. Adem Kara'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Onun desteği bu sürecin başarıyla tamamlanmasında ve akademik gelişimimde etkili oldu.

Her zaman sevgi, sabır ve moral kaynağı olan anneme, kız kardeşime, dostlarıma ve çalışma arkadaşlarıma en derin şükranlarımı sunarım; onların sarsılmaz desteği sayesinde bu zorlu yolculukta kendimi yalnız hissetmedim.

Bu sürecin en verimli şekilde tamamlanarak bilim dünyasına önemli bir katkı sağlanmasında en büyük rolü olan Mustafa Kemal Atatürk'e, bilimin ve eğitimin ışığında bize sağladığı özgürlük ortamı için minnettarım. Onun vizyonu, hepimize doğruyu arama ve keşfetme gücü vermektedir. Türk ulusuna kazandırdığı çağdaş değerler, bilimsel özgürlük ve ilerlemeye yaptığı katkılardan dolayı şükranlarımı sunmayı da bir borç bilirim.

Ayrıca bu çalışmayı tamamlama sürecinde gösterdiğim azim, sabır ve kararlılık için kendime de teşekkür etmek istiyorum; her zorluğun üstesinden gelerek bu noktaya ulaştım.

Son olarak bu çalışma için, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-C Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında destek alınmıştır. TÜBİTAK'a, bu önemli çalışmayı sürdürebilmem için sağladığı burs desteği nedeniyle teşekkür ederim. Sağladığınız burs desteği, araştırmalarımın kesintisiz devam etmesine olanak tanıdı ve bilimsel kariyerimdeki adımlarımı sağlamlaştırdı. TÜBİTAK'ın katkısı, akademik hedeflerime ulaşmamda büyük bir motivasyon kaynağı olmuştur.

Ebru Başak BAŞBÜYÜK
Nisan 2025

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Karaciğer Kanseri.....	2
1.2. İnsan Hepatoma HepG2 Hücrelerinin Kültürü ve İşlevsel Karakterizasyonu	3
1.3. Karaciğer Kanseri Mortalitesi	3
1.4. Kanser Tedavisinde Nanotaşıyıcılar	4
1.5. Gümüş Nanopartiküller	6
1.6. Kitosan Kaplı Gümüş Nanopartiküller.....	7
1.7. Kanser Tedavisinde Kemoterapotikler.....	9
1.8. Doksorubisin	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM	18
3.1. Kitosan-Gümüş Nanopartiküllerin (K-AgNPs) Sentezi ve Karakterizasyonu.....	18
3.1.1. Gümüş nanopartikül sentezi (AgNP)	18
3.1.2. Kitosan kaplı gümüş nanopartikül sentezi (K-AgNP)	19
3.1.3. Kitosan-gümüş nanopartikül (K-AgNPs)- doksorubisin yapısının sentezi ve karakterizasyonu	19
3.2. Kültür Ortamının Hazırlanması ve Hücrelerin Pasajlanması.....	20
3.3. Hücre Canlılık Analizi	20
3.3.1. CVDK-8 testi	21
3.4. RT-PCR Analizi	21
3.4.1. RNA İzolasyonu.....	21
3.4.2. Revers transkriptaz reaksiyonu ve cDNA sentezi:.....	22
3.4.3. Real Time PCR ile mRNA ekspresyonunun kantitatif olarak belirlenmesi.....	23

3.5. Western Blot Analizi.....	24
3.5.1. Proteinlerin yüklemeye hazır hale getirilmesi.....	24
3.5.2. Proteinlerin western blot analizi.....	25
3.6. İstatistiksel Analiz.....	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	26
4.1. Karakterizasyon Analizleri ve Sonuçları	26
4.1.1. FTIR analizi	26
4.1.2. UV-Vis spektroskopik analiz	27
4.1.3. Zeta potansiyel analizi.....	29
4.1.4. X-Işını difraksiyon (XRD) analizi	31
4.1.5. SEM analizi.....	33
4.2. İlaç Kapsülasyon Verimliliği	36
4.3. İlaç Salınımı	37
4.4. Hücre Canlılığı Analizi (CVDK-8).....	38
4.5. RT-PCR Sonuçları	40
4.6. Western Blot Analizi Sonuçları	44
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

Derece	°
C	Çevrim zamanı (dakika)
L	Litre
mL	Mililitre

Kısaltmalar

Ag	Gümüş
AgNP	Gümüş Nanopartikül Doksorubisin
Dox	Doksorubisin
HCC	Hepatoselüler Karsinom
K	Kitosan
K-AgNP	Kitosan-Gümüş Nanopartikül
K-AgNP + Dox	Doksorubisin Yüklü Kitosan Gümüş Nanopartikül
NP	Nanopartikül

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. AgNP sentezi aşamaları, (a): AgNO_3 + distile su, (b): NaBH_4 eklendikten sonraki karışım görüntüsü, (c): AgNP oluşumu, (d): Kurutulmuş AgNP	18
Şekil 3.2. K-AgNP sentezi aşamaları, (a): AgNP + EtOH + Kitosan + distile su, (b): Santrifüjlenen pellet kısmı, (c): Kurutulmuş K-AgNP	19
Şekil 3.3. K-AgNP + Dox sentezi sonrası santrifüj sonucu elde edilen ilaçlı nanopartikül	20
Şekil 4.1. K-AgNP ve K-AgNP+Dox Karşılaştırmalı FTIR spektrumu	27
Şekil 4.2. K-AgNP ve K-AgNP+Dox Karşılaştırmalı FTIR spektrumu	27
Şekil 4.3. AgNP, K-AgNP ve K-AgNP+Dox Karşılaştırmalı Uv-Vis Spektrumu	28
Şekil 4.4. K-AgNP Zeta potansiyeli Analizi sonucu.....	30
Şekil 4.5. K-AgNP zeta sizer analizi sonucu	30
Şekil 4.6. K-AgNP'nin X ışını kırınımı (XRD).....	32
Şekil 4.7. K-AgNP SEM görüntüsü	33
Şekil 4.8. K-AgNP + Dox SEM görüntüsü	33
Şekil 4.9. Doksorubisin standart grafiği.....	36
Şekil 4.10. K-AgNP+Dox'un İlaç Salınım Sonucu.....	37
Şekil 4.11. HEPG2 hücrelerine uygulanan Dox ($\mu\text{g/mL}$) uygulamalarına ait 24 saatlik hücre canlılığı analizleri sonucu.....	38
Şekil 4.12. HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP uygulamalarına ait 24 saatlik hücre canlılığı analizleri sonucu.....	38
Şekil 4.13. HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox ($\mu\text{g/mL}$) uygulamalarına ait 24 saatlik hücre canlılığı analizleri sonucu	39
Şekil 4.14. 24 ve 48 saat boyunca HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox'un farklı koşullar altında AKT geninin ekspresyon seviyeleri	40
Şekil 4.15. 24 ve 48 saat boyunca HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox'un farklı koşullar altında PI3K geninin ekspresyon seviyeleri	41
Şekil 4.16. 24 ve 48 saat boyunca HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox'un farklı koşullar altında Bax geninin ekspresyon seviyeleri	41
Şekil 4.17. 24 ve 48 saat boyunca HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox'un farklı koşullar altında Bcl-2 geninin ekspresyon seviyeleri.....	42
Şekil 4.18. 24 ve 48 saat boyunca HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox'un farklı koşullar altında EGFR geninin ekspresyon seviyeleri	43

Şekil 4.19. 24 ve 48 saat boyunca HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox'un farklı koşullar altında mTOR geninin ekspresyon seviyeleri	44
Şekil 4.20. Tüm hücre gruplarına ait relative protein ekspresyon seviyeleri ile Western blot bantları. NFkB-p65, LC3, Beclin1, Bcl-2 ve Kaspaz-3'ün ekspresyon yoğunlukları ve değerleri. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Harflendirmeler (a,b) gruplar arasındaki protein ekspresyonundaki farklılıkları göstermektedir.....	45



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Primer assaylere ait sekans dizilimleri	23
Çizelge 3.2. Western blot analizinde kullanılan birincil antikorlar	24



1. GİRİŞ

Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüyerek vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır. Kanser gelişme potansiyeli, trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunun her yerinde kendini gösterebilir. Normal koşullar altında insan hücreleri, vücut tarafından ihtiyaç duyulduğunda yeni hücreler üretmek için bir büyüme ve çoğalma sürecinden ('hücre bölünmesi' olarak adlandırılan bir süreç) geçer. Bununla birlikte, hücreler yaşlandığında veya hasar gördüğünde, hücre ölümü sürecine girerler ve daha sonra yeni hücrelerle değiştirilirler. Bununla birlikte, bu sürecin bozulduğu ve anormal veya hasarlı hücrelerin düzensiz büyümesi ve çoğalmasıyla sonuçlanan durumlar vardır. Tümör olarak bilinen bu hücreler doku kümeleri oluşturabilir. Tümörler iyi huylu ya da kötü huylu olarak sınıflandırılabilir. Metastaz süreci, kanserli hücrelerin yakın dokulara yayılmasını, ardından bu dokuların istila edilmesini ve daha sonra yeni tümörlerin oluşabileceği vücudun uzak bölgelerine gitmesini ifade eder. Birçok kanser katı tümörler olarak ortaya çıkarken, lösemiler gibi kan kanserleri tipik olarak böyle değildir. Buna karşın iyi huylu tümörler yakındaki dokulara yayılmaz veya onları istila etmez. İyi huylu tümörler genellikle cerrahi olarak çıkarıldıktan sonra yeniden büyümeyen, kanserli tümörler büyüyebilir. Bazı kanserlerin ciddi semptomlarla ilişkili olabileceği ve hatta yaşamı tehdit edebileceği unutulmamalıdır (Vitale vd., 2024).

Streptomyces peucetius'tan elde edilen bir kemoterapi ilacı olan Doksorubisin (Dox) meme, safra kanalları, prostat, uterus, yumurtalık, özofagus, mide ve karaciğeri etkileyenler de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle Dox, karaciğer kanseri tedavisinde kullanılan en eski antitümör ajanlar arasındadır. Dox'un antitümör aktivitesinin, DNA sarmalına interkalate olma ve/veya DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda yer alan proteinlere kovalent olarak bağlanma yeteneğinden kaynaklandığı düşünülmektedir; bu da DNA, RNA ve protein sentezi üzerinde inhibe edici bir etki yaratarak hücre ölümüne yol açar. Bununla birlikte, Dox'un sınırlamaları, ilaç direnci ve esas olarak kanserli olmayan hücreler üzerindeki toksisitesi nedeniyle yan etkileridir. Ne yazık ki, Dox uygulamasının neden olduğu hücresel hasar kanser hücreleriyle sınırlı değildir; örneğin DNA'yı değiştirerek ve hücrelerin büyümesini yavaşlatarak veya durdurarak sağlıklı hücreleri de etkiler. Ayrıca, çalışmalar geleneksel kemoterapi rejimlerinde Dox uygulamasının oksidatif stresi

artırarak kardiyotoksisit yol açabileceğini, böylece kalp dokusunu etkileyerek kardiyomiyopatiyi tetikleyebileceğini göstermiştir (Radu vd., 2022).

1.1. Karaciğer Kanseri

Ağırlıklı olarak hepatoselüler karsinom olmak üzere primer karaciğer kanseri, önemli tedavi zorlukları sunmaya devam etmektedir. Karaciğer kanseri insidansının coğrafi dağılımı, viral hepatitin coğrafi dağılımını yansıtan varyasyonlarla karakterizedir. Primer karaciğer kanserinin heterojenliğini, bölgesel tercihleri ve farklı bölgelerdeki rezektabilite veya nakil uygunluğundaki varyasyonları yansıtmak için bir dizi evreleme sistemi geliştirilmiştir. Aynı zamanda, yeni terapötik yöntemlerin ortaya çıkmasıyla birlikte yeni tedavi stratejileri de geliştirilmektedir (Liu vd., 2015).

Karaciğer kanseri, karaciğerden kaynaklanan ve genellikle kronik karaciğer hastalığı ve siroz zemininde ortaya çıkan agresif bir tümördür. Hepatoselüler karsinom (HCC) olarak da adlandırılan primer karaciğer kanseri, erkek hastalarda en yaygın beşinci, kadın hastalarda ise en yaygın yedinci kanser türünü oluşturmaktadır. Küresel ölçekte kansere bağlı ölümlerin üçüncü en baskın nedenini temsil etmektedir (Jemal vd., 2011).

Tedavideki son gelişmelere rağmen, karaciğer kanseri tedavisi en zor kanserlerden biri olmaya devam etmektedir. HCC'si erken evrede olan hastalar için cerrahi, lokal yıkıcı tedaviler ve karaciğer nakli tedavi potansiyeli sunmaktadır; ancak, küratif tedaviyi takiben HCC nüksü önemli bir sorun olmaya devam etmektedir ve bu oran 5 yılda %70'i aşmaktadır. HCC'si erken, küçük (<3 cm) olan hastalarda bile, cerrahi müdahaleyi takiben 5 yıllık sağkalım oranı tatmin edici değildir (%47-%53). Tipik olarak, HCC genellikle ileri evrede teşhis edilir ve ileri evredeki birçok hasta küratif tedaviler için uygun değildir. Ayrıca, geleneksel sistemik kemoterapi düşük etkinlik ve çok az sağkalım yararı göstermektedir (Tan vd., 2024).

1.2. İnsan Hepatoma HepG2 Hücrelerinin Kültürü ve İşlevsel Karakterizasyonu

Hepatoma hücre hatları, primer insan hepatositlerine in vitro alternatifler olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu hücre dizileri, belirsiz ömürleri, stabil fenotipleri, yüksek bulunabilirlikleri ve kullanım kolaylıkları ile ayırt edilirler. Bununla birlikte, hepatositlere kıyasla belirli metabolik aktivitelerin daha düşük ekspresyonu başlıca sınırlamalarıdır. HepG2, ilaç metabolizması ve hepatotoksisite çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan bir insan hepatoma hücre hattıdır. Özellikle, HepG2 hücreleri tümörijenik değildir, yüksek proliferasyon oranlarına ve epitel benzeri bir morfolojiye sahiptir ve birçok farklılaşmış hepatik fonksiyonu yerine getirebilir (Fong vd., 2014).

In vitro karaciğer hücre kültürü modelleri farmakolojik ve toksikolojik araştırmalarda giderek daha önemli hale gelmektedir. Birincil insan hepatositleri (HCC), insan karaciğerinin spesifik metabolizmasını ve işlevselliğini doğrudan yansıttıkları için şu anda hepatik in vitro kültür modelleri için altın standart olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, HCC'nin azlığı ve zor lojistiği, araştırmacıları karaciğer hücre hatları ve pluripotent kök hücreler de dahil olmak üzere alternatif hücre kaynaklarını keşfetmeye yöneltmiştir. Hepatomlardan veya genetik manipülasyonla üretilen karaciğer hücre hatları, yüksek bulunabilirlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu hatlar sıklıkla belirli metabolik işlevlerde değişime uğramaktadır. Son yıllarda, yetişkin ve pluripotent kök hücreler, in vitro çoğalma ve hepatosit benzeri hücrelere farklılaşma kapasiteleri nedeniyle artan bir ilgi görmüştür. Bununla birlikte, bu hücrelerin farklılaşmasının kontrolü zorlu bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir (Donato vd., 2014).

1.3. Karaciğer Kanseri Mortalitesi

Karaciğer kanseri en ölümcül ve hızla yayılan kanser türleri arasında yer almakta olup, son istatistiksel raporlara göre dünya genelinde en yaygın beşinci kanser türüdür. Karaciğer kanserinin klinik yönetimi, vakaların çoğunda standart tedavi olarak kabul edilen kemoterapi uygulamasını içermektedir. Ancak kemoterapinin etkinliği, ilaç toksisitesi, tümör hücreleri içinde zayıf emilim ve çoklu ilaç direnci gelişimi gibi faktörler tarafından engellenmekte ve böylece ilacın karaciğer kanseri hücrelerine erişimi

kısıtlanmaktadır. Kemoterapötik ilaçlar öncelikle karaciğer kanseri hücrelerini hedef alırken, saç folikülleri, kemik iliği ve gastrointestinal sistem hücreleri de dahil olmak üzere vücuttaki normal hücrelerin büyümesini de etkileyebileceklerini belirtmek önemlidir. Kemoterapötik ajanların toksisitesinin yarattığı zorlukları ele almak için, nanoteknoloji alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiş ve yenilikçi terapötik ve terapötik nanotaşıyıcı bazlı ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır (Wei vd., 2009).

Hepatoselüler karsinom (HCC) en yaygın kanser türü olarak tanımlanmıştır. Bu eğilimin, hepatotropik viral enfeksiyonların artan prevalansı ile uyumlu olduğu gözlenmektedir ve bu bulgular, HCC insidansının önümüzdeki yirmi yıl içinde en az iki katına çıkmasının beklendiğini göstermektedir. HCC'nin tedavisi için çok sayıda terapötik strateji önerilmiş olsa da, bu yaklaşımlar genellikle önemli maliyetleri, uzun süreleri ve yan etkilerinin varlığı ile karakterize edilmektedir. Sonuç olarak, bu son derece agresif kanser türüyle mücadele etmek için alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi bir zorunluluktur (Salama vd., 2010).

1.4. Kanser Tedavisinde Nanotaşıyıcılar

Kemoterapötik ilaçlar kanser hücrelerine karşı toksiktir, ancak düşük özgüllükleri ve yüksek toksisiteleri nedeniyle bu ilaçlar sağlıklı hücreler için de toksiktir. Bu toksik reaksiyon, ilaçların genel olarak sistematik uygulama sonrasında organizmanın neredeyse tüm bölgelerinde endotelden geçebilecek kadar küçük moleküller olmaları ve hedef bölgelere ve hastalıktan etkilenmeyen diğer bölgelere ulaşabilmeleri, dolayısıyla da ilaçla ilişkili bir dizi yan etkiye yol açmaları nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Kemoterapötik ajanların terapötik etkinliğini artırabilecek ve yan etkilerini azaltabilecek olası bir strateji olan kolloidal nanopartikül sistemlerinin kullanılmasını gerektirmektedir (Kulik vd., 2019). Bu ilaçlar 50-800nm'lik nanopartiküller içinde kapsüllendiğinden, organizmanın sağlıklı bölgelerinin damar duvarını geçmeleri mümkün değildir (bu hücreler arasındaki boşluk sadece 15-30nm'dir). Bu durum, iltihaplı bölgelerde ve hatta endotel hücrelerin sağlıklı bölgelere kıyasla kendi aralarında daha az paketlendiği tümörlerin bulunduğu bölgelerde meydana gelenden farklıdır ve bu da tümör dokusunda nanopartiküllerin birikmesine neden olur (Allen vd., 2004).

Nanopartiküllerin yüzeyi kolaylıkla modifiye edilerek nanotaşıyıcıların belirli kanser hücrelerine yönlendirilmesi sağlanabilir. Bu süreç, tümörün yüzeyinde moleküllerin ifadesine dayanır ve bu da bu partiküllerin aktif yönüyle sonuçlanır. Bu amaçla antikorlar, peptitler ve RNA aptamerleri de dahil olmak üzere çok çeşitli moleküller kullanılmaktadır. Bu nano yapıların kullanımı, ilaçların organizma içinde bozulmaya karşı korunması, tümör dokusunda gelişmiş ilaç Emilimi ve ilacın farmakokinetiğindeki değişiklikler de dahil olmak üzere geleneksel ilaç uygulamasına kıyasla çok sayıda avantaj sunmaktadır (Khawar vd., 2015).

Kanserle mücadelede hem sentetik hem de doğal yollarla elde edilen yeni ilaçların muazzam potansiyelini ortaya koyan çok sayıda epidemiyolojik çalışma ve klinik öncesi test yapılmıştır. Bu yeni makromoleküller peptidleri, proteinleri, oligonükleotidleri, plazmidleri ve en son olarak da RNA interferans yoluyla spesifik gen susturmanın inhibisyonunu kapsamaktadır. Bununla birlikte, yeni ilaçların geliştirilmesini sağlayan bilim ve teknolojiadaki önemli ilerlemelere rağmen, önde gelen ilaç şirketleri, özellikle patentlerinin sona ermesinin ardından, odak noktalarını jenerik ilaç üretimine kaydırmıştır. Yeni ilaçların geliştirilmesi, özellikle sentetik yollar söz konusu olduğunda maliyetlidir. Bu durum, geleneksel kemoterapi ilaçlarının yeni dağıtım sistemleri veya mevcut ilaçlar için yeni kullanımlar gibi yeni formülasyonlarda sunulması ihtiyacını doğurmaktadır (Pérez-Herrero vd., 2015).

Kitinin kısmi deasetilasyonu ile ticari olarak üretilen katyonik bir polisakkarit olan kitosan (K), biyotıp, farmasötikler, metal şelasyonu ve gıda katkı maddeleri dahil olmak üzere çeşitli uygulamalara sahip biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerdir. Ayrıca, kitosan üretim sürecinde sert kimyasalların bulunmaması, onu tümör aktivitesini artırmak için umut verici bir ilaç dağıtım sistemi olarak çekici kılmaktadır. Kitosan gümüş nanopartikül (K-AgNP) ilaçların varlığının neden olduğu gelişmiş permeasyon ve retansiyon etkisi, normal dokulardan ziyade tümör dokularında seçici birikime yol açar. kitosanın yüzey modifikasyonları K-AgNP sitotoksik profilinde ve hızlı bölünme ve agresif büyüme ile karakterize edilen kanserlerin hedeflenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. İn vitro çalışmalar, K-AgNP'lerin kolon kanseri (Calo320), mide kanseri (BGC823) ve karaciğer kanseri (HepG2) dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre hatlarına

karşı antitümör etkinliğini göstermiştir. Bu bulgular K-AgNP'lerin kansere karşı terapötik bir ajan olarak potansiyelinin güçlü bir göstergesidir (Loutfy vd., 2016).

1.5. Gümüş Nanopartiküller

Geleneksel antibiyotiklerin aşırı kullanımı, patojen mikroorganizmalar arasında antibiyotik direncinin artmasına yol açarak insan sağlığı ve tarım için bir tehdit oluşturmıştır. Bu sorunu ele almak için araştırmacılar, geleneksel antibiyotiklere alternatif olarak yeni ve etkili nanomalzemelerin sentezi gibi yeni çözümler ve yaklaşımlar araştırmaktadır. Gümüş nanopartiküller (Ag NP'ler), mantar, maya ve bakteriler de dahil olmak üzere çok çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle bu alanda umut verici bir seçenek olarak ortaya çıkmıştır (Zeilinger vd., 2016). Ag NP'lerin sentezi için her biri kendi avantaj ve dezavantajlarına sahip çeşitli yaklaşımlar vardır. Bazı standart sentez yöntemleri arasında kimyasal indirgeme, fiziksel buhar biriktirme ve şablon destekli yöntemler bulunmaktadır. Kimyasal indirgeme yöntemleri, gümüş iyonlarının bir indirgeyici madde kullanılarak gümüş atomlarına indirgenmesini içerir, bu da daha sonra çekirdeklenme olarak bilinen bir işlemle Ag NP'leri oluşturabilir. Bu yöntem basittir, ölçeklendirilmesi nispeten kolaydır ve yüksek kararlılığa ve tek dağılıma sahip Ag NP'ler üretir, ancak bertaraf edilmesi zor olabilen ve olumsuz bir çevresel etkiye sahip olan önemli miktarda kimyasal atık üretebilir. Fiziksel buhar biriktirme, Ag NP'leri oluşturmak için gümüş atomlarının bir substrat üzerine biriktirilmesini içerir (Shahryari vd., 2020).

Sodyum borohidrit, gümüş nitratin indirgenmesi ve gümüş nanopartiküllerin stabilizasyonu için fazla miktarda kullanılır. Sodyum borohidrit, ikincil reaksiyonları tetikleyebilen güçlü bir indirgeyici maddedir. Buz banyosu kullanımının hem reaksiyon hızını yavaşlattığı hem de ikincil reaksiyonları ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Kimyasal indirgeme, gümüş iyonlarının indirgeyici madde yardımıyla gümüş atomuna indirgenmesi süreciyle ilgilidir. Bu indirgeme süreci, daha sonrasında AgNP'lerin sentezlenmesinde rol alan bir dizi kimyasal reaksiyonun ilk basamağıdır. Bu metodun avantajları, basitleşmesi ve ölçeğine uyarlanabilmesi, yanı sıra, son üründe, istenen stabilitenin sağlandığıdır (Kanwar vd., 2022).

Son yıllarda nanoteknoloji, endüstriyel, tıbbi ve tüketici ürünleri de dahil olmak üzere multidisipliner alanlardaki geniş uygulaması nedeniyle öne çıkmıştır. Nanoteknolojideki son gelişmeler, gümüş nanopartiküllerin (AgNP) olası uygulamalarını genişletmiştir. Kanser tedavisi ve teşhisine yönelik çevre ve ekonomi dostu yaklaşımlar geliştirmeye duyulan temel ihtiyaç, biyosentezlenmiş AgNP'lerin onkoterapi için en umut verici araştırma yönelimlerinden biri olarak görülmesine yol açmıştır. AgNP'lerin benzersiz özellikleri hızlı bir ticarileşmeye yol açmış, bu da AgNP'lerin biyogüvenlik sorunlarını ortadan kaldırmak ve daha iyi bir antikanser terapötik strateji geliştirmek için teorik bir temel sağlamak amacıyla, özellikle hücresel yanıt üzerindeki biyolojik etkileri konusunda endişelere yol açmıştır. AgNP'lerin biyosentetik üretimi, daha çevre dostu, risksiz, kolay erişilebilir ve uygun maliyetli olmaları nedeniyle daha fazla fayda sunmaktadır (Khorrami vd., 2020).

Özellikle in vitro görüntülemeye odaklanarak, çeşitli uygulamalarda hücresel belirteçler için biyomedikal araçlar olarak AgNP'lerin incelenmesine yönelik önemli bir araştırma yapılmıştır. Bir hücre içinde Ag iyonlarının birikimini izleme ve düzenleme kapasitesi, biyolojik ve klinik uygulamalar için teşhis hassasiyetini ve tedavi etkinliğini artırma potansiyeline sahiptir. Hücresel alım ve etkileşimin altında yatan mekanizmalar, birkaç temel faktörün dikkatle değerlendirilmesini gerektirir. AgNP'lerin nano ölçekli boyutları nedeniyle biyolojik bariyerleri kolayca aşabildikleri ve hücreler tarafından emilebildikleri gösterilmiştir. AgNP'lerin hücre içi konumu, fiziksel ve kimyasal özellikleri tarafından belirlenen fagositoz, mikropinositoz, reseptör aracılı endositoz ve yapışkan etkileşimler dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalardan etkilenir (Loutfy vd., 2015). Hücresel alımın altında yatan mekanizmaların daha derinlemesine anlaşılması, AgNP'lerin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin daha incelikli bir şekilde anlaşılmasını kolaylaştıracaktır (Maduraiveeran vd., 2018).

1.6. Kitosan Kaplı Gümüş Nanopartiküller

Gümüşün antimikrobiyal bir ajan olarak kullanımı binlerce yıl öncesine dayansa da, son zamanlarda araştırma ilgisindeki yeniden canlanma özellikle antibiyotiklerin aşırı kullanımıyla ilişkili bir fenomen olan antibiyotik direncinin artan tehdidinde odaklanmıştır. Gümüş nanopartiküllerin hücre duvarına bağlanma kapasitesine sahip

olduğu ve böylece hücre duvarı geçirgenliğini ve hücresel solunumu bozduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, bu partiküllerin hücrelere nüfuz edebileceği, DNA ve proteinler gibi fosfor ve sülfür içeren bileşiklerle etkileşime girerek potansiyel olarak hasara neden olabileceği kabul edilmektedir. Gümüş nanopartiküllerin bakterisidal etkilerini gösterebilecekleri bir diğer potansiyel mekanizma da partiküllerden gümüş iyonlarının salınmasıdır (Hermosilla vd., 2023). Gümüşün genellikle canlı hücreler üzerinde zararlı bir etkiye sahip olmaması ve mikrobiyal direnci tetiklemeye eğilimli olmaması dikkat çekicidir. Sonuç olarak gümüş, mikrobiyal kontaminasyona karşı koruma sağlamak amacıyla çeşitli plastıklara (örneğin kateterler, diş malzemeleri, tıbbi cihazlar ve implantlar ve yanık sargıları) dahil edilmiştir (Brett vd., 2006).

Gümüş içeren malzemeler ayrıca tekstil kumaşlarında, gıda katkı maddesi olarak ve mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için ambalaj ve plastiklerde de kullanılmaktadır. Bu kadar geniş bir uygulama yelpazesi nedeniyle, gümüş nanopartiküllerin yanı sıra iyonik gümüş (Ag^+) veya metalik gümüş (Ag^0) içeren çeşitli gümüş bazlı bileşiklerin üretimine ilişkin çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Gümüş nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan sentetik yöntemler arasında en yaygın olarak $NaBH_4$, sitrat veya askorbat gibi bir indirgeyici madde ile gümüş tuzu çözeltisinde kimyasal indirgeme yöntemi kullanılmaktadır (Lou vd., 2006).

Doğal olarak oluşan kitinden türetilen bir polisakkarit biyopolimeri olan kitosan, aktif amino ve hidroksil fonksiyonel gruplarının varlığı nedeniyle benzersiz polikasyonik, şelatlama ve film oluşturma özelliklerine sahiptir. Kitosan ayrıca antimikrobiyal aktivite, bitkilerde indüklenmiş hastalık direnci ve bir dizi insan hücre tipine karşı çeşitli uyarıcı veya inhibe edici aktiviteler dahil olmak üzere bir dizi ilginç biyolojik aktivite sergilemektedir. Bu nedenlerden dolayı kitosan tıp, gıda ve kimya mühendisliği, ilaç, beslenme ve tarım dahil olmak üzere birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen vd., 2006). Gümüş içeren antimikrobiyallerin güçlü antibakteriyel etkinlik, çevresel güvenlik, düşük toksisite ve kolay üretim gibi arzu edilen özellikleri bir araya getirmesi özelliğinden dolayı, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen kitosan ile antibakteriyel gümüş nanopartiküller elde edilebilmektedir (Jin vd., 2009).

Kitosanın kendisinin, membran bozucu etkiye neden olan katyonik özellikleri nedeniyle antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belgelenmiştir. Bununla birlikte, gümüş içeren kitosan materyallerinin artan antimikrobiyal aktivitesine ilişkin daha fazla araştırma nadirdir ve bu konuda sadece birkaç çalışma rapor edilmiştir (Rhim vd., 2006).

1.7. Kanser Tedavisinde Kemoterapotikler

Kemoterapötikler, kanserlerin tedavisinde veya iyileştirilmesinde kullanılan kimyasal varlıklar olarak tanımlanmaktadır. Bu ajanlar, hızla büyüyen kanser hücrelerinde hücre bölünmesi için kritik süreçleri hedeflemek amacıyla geliştirilmiştir. Antineoplastik ajanların çoğunluğu bitkiler ve bakteriler gibi doğal kaynaklardan elde edilirken, diğerleri sentezlenmiş veya yarı sentetik olarak üretilmiştir. Kanserler vücudun hemen hemen tüm dokularında ortaya çıkma kapasitesine sahiptir, ancak bu tür hastalıkların görülme sıklığı genetik etki, diyet, yaşam tarzı ve çevresel maruziyetlere bağlı olarak değişir. Küresel ölçekte en yaygın kanserler akciğer, karaciğer, meme ve prostat kanserleri olup, teşhis ve tedavi seçeneklerindeki ilerlemelere paralel olarak hayatta kalma oranları da artmaktadır (Meredith vd.,2016).

Streptomyces peucetius'tan izole edilen bir kemoterapi ilacı olan Dox, meme, safra yolları, prostat, uterus, yumurtalık, özofagus, mide ve karaciğer kanseri dahil olmak üzere kanser tedavisinde en sık kullanılan ilaçlardan biridir. Dox, karaciğer kanseri tedavisinde kullanılan ilk antitümör ajanlar arasındadır. Doksorubisinin antitümör aktivitesinin, DNA sarmalına interkalate olma ve/veya DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda yer alan proteinlere kovalent olarak bağlanma kapasitesine atfedilebileceği ve böylece DNA, RNA ve protein sentezi üzerinde hücre ölümüyle sonuçlanan inhibitör bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, DOX'un sınırlamaları ilaç direnci ve öncelikle kanserli olmayan hücreler üzerindeki toksisitesinden kaynaklanan yan etkilerdir. İlaç taşıyıcı sistemler ile birlikte Dox ilacının karaciğer kanseri tedavisinde kullanılması öngörülmektedir (Radu vd., 2022).

1.8. Doksorubisin

Streptomyces peucetius bakterisinden elde edilen bir antibiyotik olan Dox, 1960'lardan beri kemoterapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır (Vieira vd., 2016). Yetişkin ve pediatrik hastalarda solid tümörlerin tedavisinde kullanımı, yumuşak doku ve kemik sarkomlarının yanı sıra meme, yumurtalık, mesane ve tiroid kanserlerinin tedavisindeki uygulaması gibi iyi belgelenmiştir. Ayrıca, Dox akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloblastik lösemi, Hodgkin lenfoma ve küçük hücreli akciğer kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Dox'un lipozomal formülasyonu, platin bazlı kemoterapi, ile ilişkili Kaposi sarkomu ve multipl miyelom tedavisinde başarısız olan hastalarda yumurtalık kanseri tedavisi için FDA onayına sahiptir (Yu vd., 2019).

Dox'un birincil etki mekanizması, ilacın DNA baz çiftleri içinde interkalasyon yeteneğini içerir, bu da DNA ipliklerinin kırılmasına ve hem DNA hem de RNA sentezinin inhibisyonuna neden olur. Dox ayrıca topoizomeraz II enzimini inhibe ederek DNA hasarına ve apoptozun indüklenmesine neden olur. Demir ile birleştirildiğinde, Dox ayrıca DNA'da serbest radikal aracılı oksidatif hasara neden olarak DNA sentezini daha da sınırlandırır. Deksrazoksan gibi demir şelatörlerinin kullanımı, Dox'un demire bağlanmasını sınırlandırarak serbest radikal oluşumunu önleyebilir (Koleini vd., 2019).

K-AgNP'lerin alım verimliliğinin boyuta bağlı olduğu düşünülmekle beraber 20 ila 100 nm arasındaki ortalama partikül boyutunun optimum hücresel alım verimliliği için ideal olduğu öne sürülmüştür. Bu toplu kanıt, bu boyut aralığındaki nano boyutlu partiküllerin üstün hücresel alım etkinliği sergilediğini göstermektedir. K-AgNP'lerin hücrelere dört farklı mekanizmayla gerçekleşebilen bir süreç olan endositoz yoluyla girdiği gözlemlenmiştir (Fröhlich vd., 2012).

Boyuta ek olarak, nanopartiküllerin yüzey yükünün de hücresel alımın verimliliğini etkilemede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu nedenle, negatif yüklü K-AgNP'lerimizin fagositik olmayan HepG2 hücrelerine optimum hücresel alım verimliliğinde endositoz yoluyla girdiğini varsayıyoruz. Birçok yazar tarafından endositozun nanopartiküllerin hücreler tarafından emildiği baskın yol olduğu, Ag'nin iyonik formunun ise hücre zarındaki taşıma proteinlerinin katılımıyla alındığı öne

sürülmüştür (Ghozali vd., 2015).

Nanoteknolojideki son gelişmeler, bir dizi hastalık için ilaçların çeşitli organlara ulaştırılması üzerinde derin bir etkiye sahip olmuştur. Geleneksel dozaj formlarıyla karşılaştırıldığında ilaç yüklü nanopartiküller, gelişmiş çözünürlük, ilacın korunması, ilacın sürekli salınımı ve ilaçların terapötik etkinliğini artırabilen hedefli dağıtım dahil olmak üzere çok sayıda farmasötik avantaj sunmaktadır. Nanopartiküller için yapılan çeşitli in vitro testler arasında, salım çalışması en önemli olanlardan biridir. Nanopartiküllerin in vitro salım kinetiği, ilaç salımını değiştirme yetenekleri hakkında kritik bilgiler sağlar, bu nedenle ürünlerin güvenliği, etkinliği ve kalitesinin değerlendirilmesinde dikkate alınması gereken önemli bir parametredir (Weng vd., 2020).

Bu çalışmada, K-AgNP yüklü doksorubisinin (Dox) karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiş; nano taşıyıcıya yüklenen Dox'un terapötik etkinliği belirlenerek, hücresel proliferasyon ve apoptoz gibi mekanizmalar üzerindeki potansiyel etkileri değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu tez çalışmasında kitosan kaplı gümüş nanopartiküle bağlanmış Dox (K-AgNP+Dox) ilacı ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte geliştirilen bu ilaç yüklü nanopartikülün karaciğer kanseri hücrelerine karşı etkileri ile ilgili günümüze kadar yapılan çalışmaların kısa bir özeti aşağıda sunulmuştur.

Jemal et al. (2011) yapmış olduğu Küresel Kanser İstatistikleri adlı çalışmalarında bahsettikleri üzere kanserin küresel yükü, büyük ölçüde dünya nüfusunun yaşlanması ve ekonomik olarak gelişmekte olan ülkelerde başta sigara olmak üzere kansere neden olan davranışların benimsenmesindeki artış nedeniyle artmaya devam etmektedir.

Benzer konulu Fong et al. (2014) yazmış oldukları Hepatoselüler Karsinomun Klinik Yönetimi adlı makalede belirttikleri gibi, gelişmekte olan ülkelerdeki genel kanser insidans oranları, her iki cinsiyette de gelişmiş ülkelerdekini yarısı kadar olmasına rağmen, genel kanser ölüm oranları genellikle benzerdir. Kanserden sağkalım, büyük olasılıkla tanıda geç kalınması ve zamanında ve standart tedaviye sınırlı erişim nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde daha kötü olma eğilimindedir. Küresel kanser yükünün önemli bir kısmı, fiziksel aktiviteyi ve daha sağlıklı beslenmeyi teşvik eden halk sağlığı kampanyalarına ek olarak, yerleşik kanser kontrol bilgilerinin uygulanması ve tütün kontrolü, aşılama (karaciğer ve rahim ağzı kanserleri için) ve erken teşhis ve tedavi programlarının başlatılması yoluyla hafifletilebilir.

Radu et al. (2022) yapmış oldukları Karaciğer Kanser Tedavisi için Uyarana Duyarlı Dox İletim Sistemlerindeki Son Gelişmeler adlı çalışmasında (Alsulays vd., 2024), Dox karaciğer kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir farmasötik ajan olduğundan bahsedilmiştir. Bununla birlikte, Dox içeren geleneksel kemoterapi, yaygın olarak yayılma eğilimi hem tümörün hem de sağlıklı dokunun maruz kalmasına neden olarak genellikle zararlı yan etkilere yol açması, çoklu ilaç direncinin (MDR) gelişmesi ve yetersiz suda çözünürlüğü dahil olmak üzere çok sayıda sınırlama ile karşı karşıyadır. Sonuç olarak, çeşitli iç ve dış uyarcıların terapötik ajanların etkinliği üzerindeki etkisine odaklanarak, ilaç dağıtım sistemleri alanına önemli bir ilgi gösterilmiştir. Bu derlemelerinde bizim çalışmamıza yakın olarak, karaciğer kanseri tedavisinde Dox'un

kontrollü salınımı için redoks, pH ve sıcaklık değişimi gibi hem iç uyarana duyarlı ilaç dağıtım sistemlerini hem de manyetik, foto-termal ve elektriksel uyarıların uygulanması gibi dış uyarana duyarlı ilaç dağıtım sistemlerini ve bu akıllı dağıtım sistemlerinin karaciğer kanseri tedavisindeki gelecek perspektifleri tartışılmıştır.

Liu et al. (2015) karaciğer kanserinin tedavisi üzerine yapmış oldukları bir çalışmada, primer karaciğer kanserinin, çoğunlukla hepatoselüler karsinomun, tedavisi zor bir kanser olmaya devam ettiğinden bahsetmişlerdir. Ayrıca bu heterojen malignite için multimodalite tedavilerinin mevcut olduğunu ve uzmanlık alanları ve coğrafi bölgeler arasında karaciğer kanserleri için yönetim önerilerinde farklılıklar olabileceğini söylemişlerdir. Yeni tedavi stratejileri, yeni tedavi modalitelerinin ilerlemesiyle birleşmiştir. Çalışmalarında karaciğer kanserinin insidansı, evrelendirilmesi ve tedavisinin gözden geçirilmesine odaklanmaktadırlar.

Donato et al. (2014) yapmış olduğu İnsan Hepatoma HepG2 Hücrelerinin Kültürü ve İşlevsel Karakterizasyonu adlı çalışmada, hepatoma hücre hatlarının, primer insan hepatositlerine in vitro alternatifler olarak sıklıkla kullanıldığını göstermişlerdir. Bu hücre dizileri, sınırsız yaşam süreleri, stabil fenotipleri, yüksek bulunabilirlikleri ve kullanım kolaylıkları ile ayırt edilirler. Bununla birlikte, hepatositlere kıyasla belirli metabolik aktivitelerin daha düşük ekspresyonu en önemli sınırlamalarıdır. HepG2, ilaç metabolizması ve hepatotoksisite çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan bir insan hepatoma hücresidir. Özellikle, HepG2 hücreleri tümörjenik değildir, yüksek proliferasyon oranlarına ve epitel benzeri bir morfolojiye sahiptir ve birçok farklılaşmış hepatik fonksiyonu yerine getirebilir.

Freyer et al. (2016) yapmış olduğu in vitro insan karaciğer hücre kültürü modelleri için hücre kaynakları konulu bir araştırma makalesinde, in vitro karaciğer hücre kültürü modellerinin farmakolojik ve toksikolojik araştırmalarda giderek önem kazandığından bahsedilmiştir. Kullanılan hücrelerin kaynağı, bu tür modellerin uygunluğu ve öngörücü değeri açısından kritik önem taşımaktadır. HepG2 hücre hattı, insan karaciğerinin spesifik metabolizmasını ve işlevselliğini doğrudan yansıttıkları için şu anda hepatik in vitro kültür modelleri için altın standart olarak kabul edilmektedir. Hepatomlardan veya

genetik manipölasyonla üretilen karaciğer hücre hatları, iyi kullanılabilirlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kanwar et al. (2022) yapmış oldukları bir incelemeye göre ise nanoteknolojinin popülaritesi, çeşitli alanlardaki geniş uygulaması nedeniyle artmaktadır. Bu teknoloji, nanopartiküllerin biyouyumluluk, boyut, şekil ve seçicilik gösterecek şekilde tasarlanabildiği tıp alanında sürekli ilerlemelere neden olmaktadır. Gümüş nanopartiküller, boyutları, şekilleri, elektriksel özellikleri ve antimikrobiyal özellikleri de dahil olmak üzere benzersiz ve çok yönlü özellikleri nedeniyle araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu özellikler, gümüş nanoparçacıkların mühendislikten kimyasal ve biyolojik uygulamalara kadar hemen her alanda kullanılmasına yol açmıştır. Bu partiküllerin sentezi, fiziksel (örn. gama ışınlama, lazer ablasyon, elektron ışınlama ve mikrodalga işleme), kimyasal (örn. kimyasal indirgeme ve fotokimyasal yöntem) ve biyolojik teknikleri kapsayan çeşitli metodolojiler aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Bu tip tedavi araştırmaları, insan nüfusunun yararına bireyselleştirilmiş tedavi ve sağlık tekniklerinin geliştirilmesine yardımcı olacağından yaşam bilimleri alanına fayda sağlayacaktır.

Jin et al. (2009) yapmış oldukları çalışmada biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen, toksik olmayan bir polimer olan kitosanın, selülozdan sonra en doğal yolla oluşan ikinci biyopolimer olan kitinden sentezlendiğini belirtmişlerdir.

Benzer şekilde, Alsulays et al (2004) yapmış oldukları çalışmada kitosan nanopartiküllerinin HepG2 hücrelerine karşı gelişmiş hücre canlılığı sergilediğini ve IC50 değerlerinin önemli ölçüde daha düşük olduğunu bildirmiştir (Sukumar vd., 2024). Sun et al. (2009) Kitosan bazlı gümüş nanopartiküllerin sentezi ve antibakteriyel aktiviteleri konulu makalesinde, indirgeyici ajan olarak toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen bir polisakkarit olan kitosan kullanarak gümüş nanopartiküller sentezlediklerinden ve elde edilen gümüş nanopartiküllerin, güçlü antibakteriyel aktivite sergilediğinden bahsetmişlerdir. Mevcut sistemde hazırlanan kitosan gümüş nanopartiküllerin, çok çeşitli antikanser ve genel uygulamalar için umut verici adaylar olduğunu söylemişlerdir.

Allen et al. (2004) yapmış oldukları bir araştırmada, nanopartiküller gibi ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımının, ilaçların farmakolojik ve terapötik özelliklerinin geliştirilmesini sağladığından bahsetmişlerdir. Partikül ilaç taşıma sistemlerinin klinik uygulamasını engelleyen başlangıçtaki zorlukların önemli bir kısmı aşılmış ve bunun sonucunda antikanser ilaçların çeşitli formülasyonları klinik kullanım için onaylanmıştır.

Sukumar et al. (2024) tarafından yapılan çalışmada Kitosan gümüş nanopartikülleri (K- AgNP'ler), biyouyumlulukları, biyobozunurlukları ve ilaçların çözünürlüğünü ve etkinliğini artırma yetenekleri nedeniyle karaciğer kanseri tedavisinde hedefli ilaç dağıtımı için umut verici bir taşıyıcı olarak ortaya çıkmıştır. Çok sayıda çalışma, K- AgNP'lerin antikanser ajanların verilmesindeki etkinliğini göstermiş ve böylece karaciğer kanserinden muzdarip hastalar için terapötik sonuçları iyileştirme potansiyellerini ortaya koymuştur. Hedefleme Mekanizmaları K-AgNP'lerin özellikle karaciğer kanseri hücrelerini hedefleyecek şekilde modifikasyonu aktif bir araştırma alanıdır (Wu vd., 2024).

Wang et al. (2024) yapmış oldukları çalışmada, rutin yüklü K-AgNP'lerin etki mekanizmalarının otofaji ve NF- κ B sinyal yollarının aktivasyonunu içerdiği ve böylece hepatoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu gözlem, K-AgNP'lerin antikanser etkiler gösterebileceği çok yönlü mekanizmaların altını çizmektedir. K-AgNP'ler karaciğer kanseri tedavisinde önemli bir umut vaat ederken, ilaç salım profillerinin optimizasyonu ve hedeflenen teslimatın güvence altına alınması gibi zorluklar klinik uygulamaları için ele alınmaya devam etmektedir. Bu sorunları ele almak ve K-AgNP'lerin karaciğer kanseri tedavisindeki terapötik etkinliğini artırmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Nasr vd., 2023).

Nasef et al. (2024) yaptıkları bir çalışmada, kitosan gümüş nanopartiküller (K-AgNP), karaciğer kanserinin, özellikle de hepatosellüler karsinomun (HCC) tedavisi için umut verici bir terapötik yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Biyouyumluluk ve hedefe yönelik dağıtım yetenekleri de dahil olmak üzere benzersiz özellikleri, kanser tedavisindeki potansiyellerini artırmaktadır. K-AgNP'lerin apoptoz gibi kritik yolları modüle ederek HCC hücrelerinde tümör büyümesinin azalmasına ve apoptozun artmasına

yol açtığı gösterilmiştir. K-AgNP'lerin HCC hücre hatları üzerinde seçici sitotoksik etkiler sergilediğini ve doza bağlı bir ilişki gözlemlendiğini göstermiştir.

Nasr et al. (2023) yapmış oldukları bir çalışmada, Kemoterapötik ajanların verilmesi, polimerin özellikleri ile kolaylaştırılır, biyoyararlanımlarını iyileştirir ve normal hücreler üzerindeki yan etkileri azaltır (Nasr vd., 2024).

Kara et al. (2024) yapmış oldukları çalışmada, kitosan gümüş nanopartiküller (K-AgNP), özellikle kanser tedavisi ve antimikrobiyal aktivite uygulamaları için hücre kültüründe umut verici bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmıştır. Bu nanopartiküller, kitosanın biyoyumluluğunu gümüş nanopartiküllerin güçlü özellikleriyle birleştirerek çeşitli biyolojik bağlamlarda etkinliklerini artırmaktadır (Kara vd., 2022).

Wang et al. (2022) yapmış oldukları çalışmada, kitosan-gümüş nanopartiküller (K-AgNP), hepatosellüler karsinom (HepG2) hücreleri için umut verici bir terapötik ajan olarak ortaya çıkmış, önemli sitotoksik etkiler ve potansiyel etki mekanizmaları göstermiştir. Bu nanopartiküller, kitosanın biyoyumluluğunu gümüşün antikanser özellikleriyle birleştirerek kanser hücrelerinde gelişmiş ilaç iletimi ve apoptoz indüksiyonuna yol açmaktadır. K-AgNP'lerin Wnt/ β -Catenin ve apoptoz sinyali gibi kritik yolları modüle ettiği, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltırken P53 gibi pro-apoptotik belirteçleri artırdığı gösterilmiştir. Gümüş nanopartiküllerin mitokondri ile doğrudan etkileşim yoluyla apoptozu indüklediği, mitokondriyal hasara ve ardından hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. K-AgNP'ler HepG2 hücrelerine karşı seçici toksisite sergiler ve çalışmalar zamana ve doza bağlı bir yanıt gösterir. Kitosan nanopartiküllerinin sorafenib gibi kemoterapötik ajanların iletimini arttırdığı ve böylece serbest ilaçlara kıyasla antikanser etkinliklerini arttırdığı gösterilmiştir (Azhar vd., 2023).

Azhar et al. (2023) yapmış oldukları bir çalışmaya göre, K-AgNP'lerin HepG2 hücreleri tarafından alımı, öncelikle endositoz yoluyla gerçekleşir ve bu da gümüş iyonlarının hücreler içinde birikmesini kolaylaştırır. K-AgNP'ler karaciğer kanserinin tedavisinde büyük umut vaat ederken, gümüş nanopartiküllerin uzun vadeli etkileri ve potansiyel toksisitesine ilişkin endişeler devam etmektedir. Güvenlik profillerini tam

olarak anlamak ve terapötik uygulamalarını optimize etmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Johnson vd., 2017).

Literatür araştırmalarından da gözlemlendiği gibi söz konusu kitosan kaplı gümüş nanopartiküle yüklenmiş Dox ilacının karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkisine yönelik çalışılması gerektiği araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır. Bu bağlamda tez çalışmasında; söz konusu nanopartikül ilacının çeşitli analizler yapılarak olumlu veya olumsuz etkilerini gözlemek hedeflenmiştir.

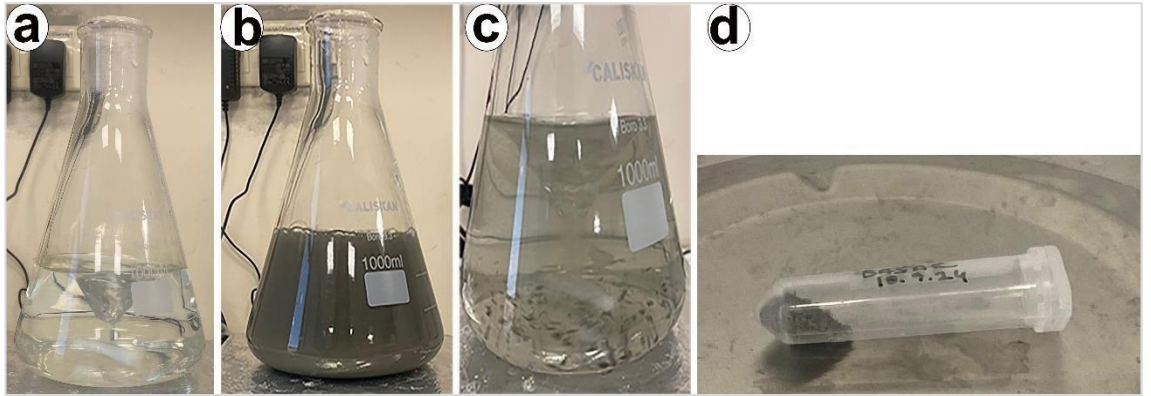


3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kitosan-Gümüş Nanopartiküllerin (K-AgNPs) Sentezi ve Karakterizasyonu

3.1.1. Gümüş nanopartikül sentezi (AgNP)

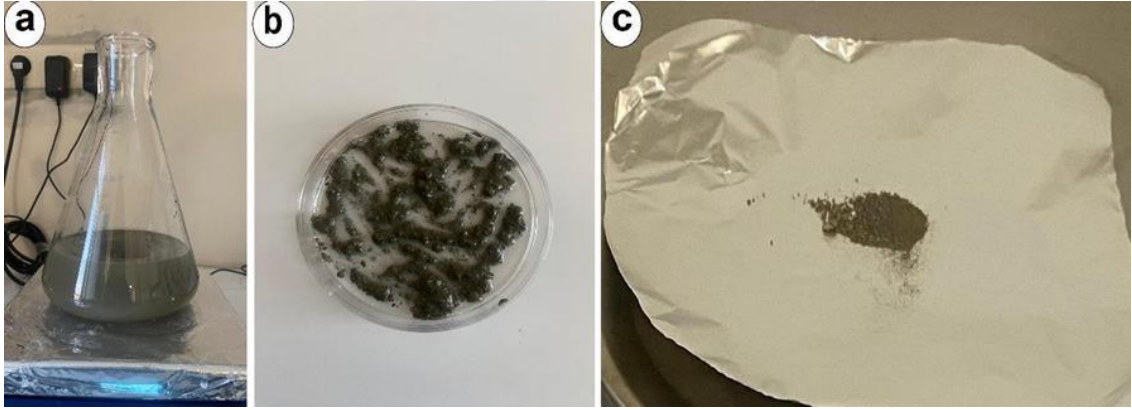
Bir erlen içerisinde 600 mL distile su koyuldu 240 mg Gümüş nitrat (AgNO_3) eklendi. İçerisine balık atılan erlen, sıcaklığı 100°C 'ye ayarlanmış karıştırıcı üzerine koyuldu. Bu çözelti, kaynama sıcaklığına gelinceye kadar ısıtıldı (Şekil 3.1.a). İçerisinde buhar oluşumu gözlemlendikten sonra öncesinde hazırlanmış olan, 120 mL suda çözülmüş 1.2 g Sodyum Borhidrür (NaBH_4) çözeltisi damla damla ve yavaşça eklendi (Şekil 3.1.b). Çözeltinin rengi sarıya döndüğünde AgNP (Gümüş nanopartikül) oluşumu gözlemlendi. Kararlı bir koyu kahve-yeşil renk elde edilene kadar çözelti sıcak tutuldu (Şekil 3.1.c). Ardından ısıtma durduruldu ve oda sıcaklığına ulaşana kadar 15 dk karıştırılmaya devam edildi. Karışım oda sıcaklığına eriştiğinde, 50 mL hacimli falkonlara bölüştürülüp 9000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet 2 kere etil alkol (EtOH) ile yıkandı. Yıkama işlemi 4000 rpm'de 5 dk boyunca yapıldı. Tekrar süpernatant uzaklaştırılıp falkonlar fırına/etüve koyuldu ve 5-10 dk boyunca kurumaya bırakıldı (Şekil 3.1.d) (Berridge vd., 2017).



Şekil 3.1. AgNP sentezi aşamaları, (a): AgNO_3 + distile su, (b): NaBH_4 eklendikten sonraki karışım görüntüsü, (c): AgNP oluşumu, (d): Kurutulmuş AgNP

3.1.2. Kitosan kaplı gümüş nanopartikül sentezi (K-AgNP)

Kitosan 0.6 gr tartılıp 300 mL %2'lik asetik asit içeren distile su çözeltisi içerisinde çözdürüldü. Çözünme işlemleri için sonikatör cihazı kullanıldı. Ardından bu çözeltiye yavaşça 150 mL EtOH içerisinde çözülmüş olan 240 mg AgNP ilave edildi. Bu karışım 30 dk boyunca oda sıcaklığında karıştırıcıda bırakıldı (Şekil 3.2.a). Süre sonunda 6 mg Sodyum Hidroksit (NaOH) 150 mL distile suda çözdürülüp karışıma yavaşça eklendi. 20 dk. boyunca karıştırılmaya devam edildi ve ardından 10 dk. 9000 rpm'de santrifüjlendi (Şekil 3.2.b). Süpernatant uzaklaştırılıp pellet distile su ile yıkandı ve 24 saat etüvde kurumaya bırakıldı (Şekil 3.2.c). Elde edilen K-AgNP süre sonunda +4°C'de 1 yıl boyunca muhafaza edilebilir (Ateş vd., 2021).



Şekil 3.2. K-AgNP sentezi aşamaları, (a): AgNP + EtOH + Kitosan + distile su, (b): Santrifüjlenen pellet kısmı, (c): Kurutulmuş K-AgNP

3.1.3. Kitosan-gümüş nanopartikül (K-AgNPs)- doksorubisin yapısının sentezi ve karakterizasyonu

5 mg K-AgNP 5 mL %2'lik asetik asit çözeltisinde çözdürüldü (1mg/mL). Bu aşamada sonikatör cihazı kullanıldı. Dox ilacının konsantrasyonu 2 mg/mL olduğu için, bu karışım üzerine 4750 µL distile suda çözülmüş 250 µL Dox ilacı yavaşça eklendi. Ardından pH metre ile PH'ı 7.4'e ayarlandı ve 48 saat boyunca 37°C'de karışıma bırakıldı. 48 saatin ardından karışım 4000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilip süpernatant atıldı (Şekil 3.3). Pellet kısmı etüvde kurutuldu. Elde edilen K-AgNP+Dox maddesi +4°C'de muhafaza edildi (Kumar-Krishnan vd., 2015).



Şekil 3.3. K-AgNP + Dox sentezi sonrası santrifüj sonucu elde edilen ilaçlı nanopartikül

3.2. Kültür Ortamının Hazırlanması ve Hücrelerin Pasajlanması

Deneyde kullanılan karaciğer kanseri hücre hattı (HEPG2) laboratuvarında 196°C'de bir azot tankında saklanmaktaydı. Hücreler, hücre kültürü laboratuvarında %10 FBS (fetal sıgır serumu), %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM ortamında 37°C, %65 nem ve %5 CO₂'de kültürlenip çoğaltıldı. Hücreler %70-80 doygunluğa ulaştığında, ters mikroskopla görüntülenerek ve flasklardaki ortam atıldıktan sonra kalan ortamı uzaklaştırmak için 5 mL steril PBS ile yıkandı. Bu hücreler yüzeye yapışma özelliğine sahip olduğundan, plakalara ekim sırasında taze hazırlanmış %0,25 tripsine maruz bırakıldı. Bunu takiben, hücreler plaka haline getirilip pasajlandı ve ilaç tedavisi gerçekleştirildi. K-AgNP dozu 5 µg/mL konsantrasyonunda uygulanırken, Dox 3 µM konsantrasyonda kullanıldı. Akabinde hücrelere kullanılan konsantrasyonlardaki maddelere 24 ve 48 saat süreli uygulamaları sağlandı (Faedmaleki vd., 2014).

3.3. Hücre Canlılık Analizi

HEPG2 hücreleri 200 µl/kuyu son hacim içeren 96 kuyucuklu plakalarda ekildi. 24 saat inkübasyondan sonra ilaç uygulamasına geçildi. Uygulamalar 5 tekrar olmak üzere şu şekildedir:

- K-AgNP; 5 µg/mL konsantrasyonda uygulandı.
- K-AgNP+Dox; 15 ve 25 µg/mL konsantrasyonlarda uygulandı.

- Dox; 3 μ M konsantrasyonda uygulandı.
- Ayrıca negatif kontrol için hiçbir uygulama yapılmayan grup oluşturuldu.
- Pozitif kontrol için %50 oranında DMSO+Medyum uygulandı (Lan vd., 2010).

İşlem sonunda 96 kuyucuklu plakalarda istenilen inkübasyon süresi (24 ve 48 saat) boyunca boyunca bekletildi. İnkübasyon süreleri dolunca CVDK-8 kiti ile üretici firmanın (Ecotech Biotechnology, Türkiye) protokolü doğrultusunda uygulamalar yapıldı.

3.3.1. CVDK-8 testi

Her bir kuyuda kuyu başı total hacim %10 oranında CVDK-8 (Ecotech Biotech., Türkiye) içeren medyum uygulandı. Daha sonra 37°C’de 3 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından 450 nm’de absorbansda ölçüm alındı.

3.4. RT-PCR Analizi

Önceden 6 kuyucuklu plakaya ekilen 350.000 hücre 24 saatlik inkubasyondan sonra K-AgNP (5 μ g/mL), K-AgNP+Dox (15 ve 25 μ g/mL) ve Dox (3 μ M) uygulamaları yapıldı. Daha sonra 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılarak bu süre sonunda tripsinize edilen hücreler toplandı.

3.4.1. RNA İzolasyonu

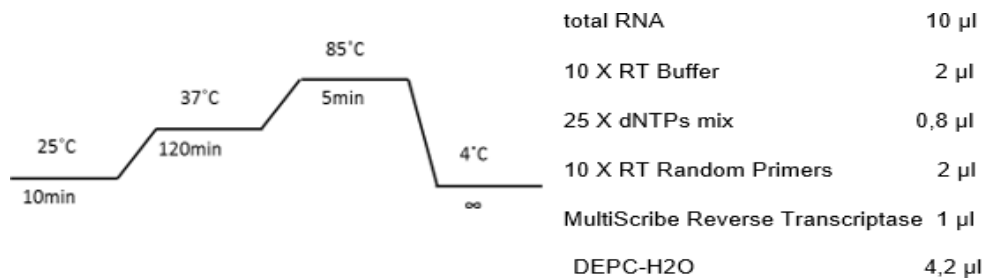
24 ve 48 saat süreleri dolduğunda 6 kuyucuklu plakalardaki hücreler 500 μ L PBS ile yıkanıp %0,25 tripsin ile kaldırıldı. 3500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak RNA izolasyonu aşamasına geçildi. RNA izolasyonunda Ecotech Total RNA izolasyon kiti (Cat No: E2075) kullanıldı.

1. Her örnek başına 400 µL EcoPure lizis buffer ve 4 µL β-merkaptoetanol solüsyonu hazırlandı.
2. İçerisinde pelletlerin olduğu her bir ependorf tüpe, hazırlanan bu solüsyondan 400 µL eklendikten sonra üzerine 400 µL de EtOH koyuldu.
3. Her bir tüpten 700 µL alınıp kolonlara koyuldu.
4. Oda sıcaklığında 30 sn max hızda santrifüj edildi.
5. Ardından kolon kaldırılıp altı dökülür ve kolon tekrar yerine yerleştirildi.
6. Her birinin üzerine 400 µL wash buffer 1 eklenip 30 sn maksimum hızda santrifüj edildi.
7. Tekrar kolon kaldırılıp altı boşaltıldıktan sonra kolon yerine yerleştirilip 500 µL wash buffer 2 eklenir ve 30 sn maksimum hızda santrifüj edildi.
8. Santrifüjün ardından tekrar boşaltma işlemi gerçekleştirilip bu defa wash buffer 2 solüsyonundan 200 µL eklenip 2 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
9. Her bir tüpe 50 µL elution buffer eklendikten sonra 1 dk oda sıcaklığında bekletilip 30 saniye maksimum hızda santrifüj edildi.
10. Kolonlar atılır, altta kalan kısım RNA'nın kendisidir.
11. +4°C'de 15 dakika bekletildikten sonra Epoch cihazında ölçüme gidildi.
12. Ardından cDNA sentez aşamasına geçildi (Maeda vd., 2003).

3.4.2. Revers transkriptaz reaksiyonu ve cDNA sentezi:

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific) enzimi kullanımı ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. Her reaksiyon 10µl RNA ile gerçekleştirilerek cDNA sentezi aşağıdaki sıcaklık değerlerine göre Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystem) ile sağlandı. cDNA miktarı nano drop spektrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek) ile ölçüm belirlendi ve -20°C'de saklandı.

cDNA sentez reaksiyonu:



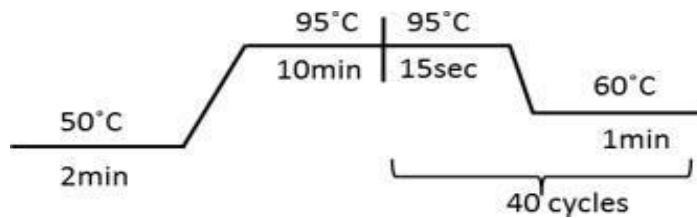
3.4.3. Real Time PCR ile mRNA ekspresyonunun kantitatif olarak belirlenmesi

HEPG2 hücre örneklerinde, mTOR, AKT, PI3K, Bax, Bcl-2, EGFR ve GAPDH (Tablo 3.1.) mRNA ekspresyonu seviyeleri, SYBR green Master Mix (ClearPeak SYBR Green, Ecothech) kullanılarak kantifiye edildi. Amplifikasyon ve kantifikasyon işlemi Qiagen Rotor Gene 5 (Qiagen Inc. USA) cihazında yapılacak. Referans gen

(Housekeeping) olarak GAPDH kullanıldı ve aşağıdaki gibi pipetlenerek ve 40 siklus ile yürütüldü. Ct değerleri cihazda otomatik olarak delta delta Ct'ye çevrildi.

Çizelge 3.1. Primer assaylere ait sekans dizilimleri

Gen	Sekans
AKT	FORWARD: GGAAGAATGGACAGAAGCTATCCA REVERSE: TCCACTTGCCTTCTCTCGAAC
EGFR	FORWARD: TCGTTGGACAGCCTTCAAGACC REVERSE: AACACCCTGGTCTGGAAGTACG
PI3K	FORWARD: TGGATGCTCTACAGGGCTTTCT REVERSE: TATCTTGCCGTAAATCATCCCCA
Bcl-2	FORWARD: CGCATCCTGAGGCACCG REVERSE: TTTCATCCAGGATCGAGCAGGG
BAX	FORWARD: CGCATCCTGAGGCACCG REVERSE: TTTCATCCAGGATCGAGCAGGG
Caspase 3	FORWARD: TGGAATTGATGCGTGATGTT REVERSE: ACACCACTGTCTGTCTAAT
mTOR	FORWARD: GTCAGTGGGACAGCATGGAAG REVERSE: CCCATATGCCCGACTGTAACTC
GAPDH	FORWARD: GGTCAATGAAGGGGTCATTGATGG REVERSE: ATTTGGTCGTATTGGGCGCCT



cDNA (100ng)	X µl
Master Mix	10 µl
Primer Assay	1 µl
RNase free H ₂ O ile	20 µl'ye tamamlandı.

3.5. Western Blot Analizi

Çalışmada Caspase-3, Bcl-2, Beclin-1, LC3, Nfkb-65 ve Beta Actin (internal kontrol) (Çizelge 3.2.) gen bölgeleri protein oranlarına bakmak için western blot analizi gerçekleştirildi. Ardından her birini internal kontrol ile karşılaştırıp, protein ifadelerinde artış veya azalış olma durumuna bakıldı. Çalışmada, protein grupları ependorf tüplere dağıtıldı. İçerisine sample buffer eklendikten sonra, istenen total hacme tamamlandı. Ardından 5 dk inkübasyon yapıp örnekler yüklenmeye hazır hale getirildi (Kruger vd., 2009).

Çizelge 3.2. Western blot analizinde kullanılan birincil antikorlar

Antikor	Üretici	Dilusyon oranı
Caspase-3	Santa Cruz, sc- 56053	1/1000
LC3	Affinity Biotech, AF4650	1/1000
Beclin1	Affinity Biotech, AF5128	1/1000
NF-κB-p65	Santa Cruz, sc-109	1/1000
Bcl-2	Santa Cruz ScXXX	1/1000
Beta-actin	Santa Cruz, sc-47778	1/2000
Secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG-HRP)	Santa Cruz, sc-2004	1/2000
Secondary antibody (Mouse anti-rabbit IgG- HRP)	Santa Cruz, sc-2357	1/2000

3.5.1. Proteinlerin yüklemeye hazır hale getirilmesi

Ependorf tüplerdeki her bir örneğe belirlenen miktarca mikropipet ile distile su eklendi. Buffer eklendikten sonra, proteinler 100° C’de 5 dk boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından mini santrifüjde 1500 rpm’de 5 saniye spin yapıp proteinler yüklemeye hazır hale getirildi. Bu aşamada son olarak, jel elektroforezi yapıp proteinler western blot analizine hazır hale getirildi.

3.5.2. Proteinlerin western blot analizi

Jel elektroforezinden sonra elde edilen proteinler, jelden membrana transfer edildi. Membranlar metanol ile 1 dk hidrate edilip, distile sudan geçirildi. Sonrasında membranlar kullanılana kadar daha önce hazırlamış olduğumuz transfer bufferın içerisine bırakıldı. Filtre kâğıdı, jel ve membran aparat vasıtasıyla tost yapıp tank içerisine yerleştirilmek üzere yürütülen jel çıkarılıp distile su ile yıkandı. Kasetler arasına yerleştirme işleminden sonra membran kapatıldı. Blotlama cihazına yerleştirildikten sonra akımla beraber proteinler, jelden membrana transfer oldu. Bu transfer işlemi, +4° C’de gerçekleştirdi. Transfer için kullanılacak 120 voltta yürütme yapıldı. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra, membranlar çıkarılıp transfer işleminin gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi. Marker membrana geçmişse transfer gerçekleşmiş kabul edildi ve ardından membran süt tozuna koyulup shaker üzerinde 1 saat bloklama yapıldı. Daha sonra Caspase-3, Bcl-2, Beclin-1, LC3 ve Nfkb-65 ile 1 gece inkübasyon sağlandıktan sonra ECL kemoluminesans solüsyonu (Ecotech) ile membranlardaki bantlar görüntülendi. Daha sonra elde edile band görüntüleri Image J programı ile bant yoğunlukları ölçülerek β -actin ile normalize edildi (Ji vd., 2008).

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışma verileri ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunuldu. Yapılacak analizler, verilerin parametrik olup olmama durumuna göre yapıldı. Veri dağılımlarının normalliğini belirlemek için Shapiro-Wilk testi kullanılırken, grupların varyans homojenliği Levene testi ile tespit edildi. Parametrik varsayımları karşılayan veriler için tek yönlü varyans analizi, karşılamayan veriler için Kruskal Wallis testinin anlamlı çıkması durumunda çoklu karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi yapıldı. Testleri yaparken SPSS (IBM SPSS Statistics Desktop 20.0) programından yararlanıldı.

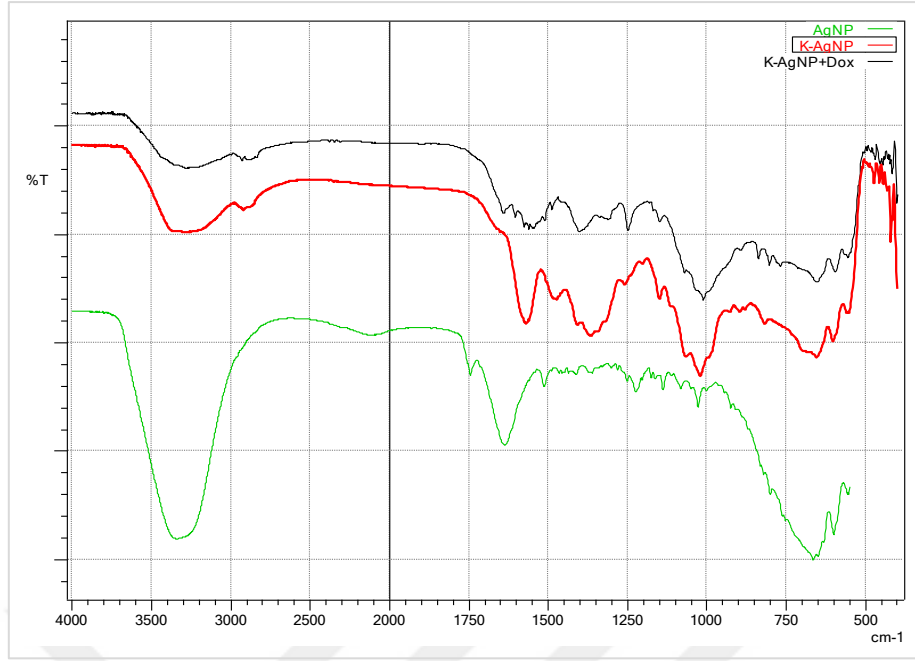
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Karakterizasyon Analizleri ve Sonuçları

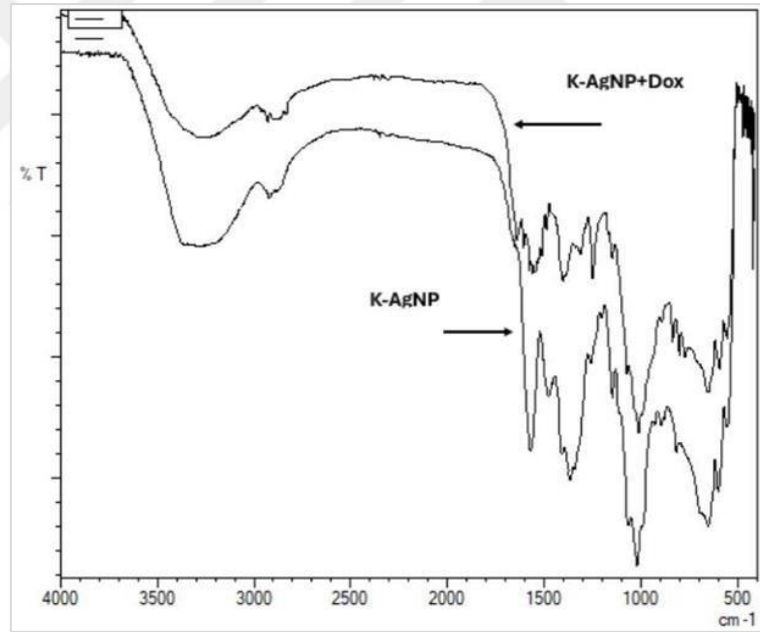
4.1.1. FTIR analizi

FTIR, K-AgNP ve K-AgNP+Dox'ların kimyasal yapısının ve yüzey modifikasyonlarının analizinde sıkça tercih edilen bir tekniktir. Bu yöntem, moleküllerin titreşimsel ve dönme hareketlerini inceleyerek kimyasal bileşimleri hakkında ayrıntılı bilgi sunar (Faghihzadeh et al. 2016). FTIR analizi, özellikle K-AgNP ve K-AgNP+Dox yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupların tanımlanmasını sağlamaktadır. Bu durum, K-AgNP ve K-AgNP+Dox'lerin sentezi sırasında veya sonrasında meydana gelen kimyasal değişimlerin izlenmesinde önemli bir rol oynar.

Hidroksil grubu için 3400 cm⁻¹ civarında geniş bir pik gözlenir (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.) Buna ek olarak, karbonil grupları için karakteristik pik yaklaşık 1650 cm⁻¹'de ortaya çıkar. Bu bulgu, polisakkaritin nanopartikül yüzeyine bağlanma sürecinin etkili bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Söz konusu bileşik, doksorubisin bağlı form olarak tanımlanan K-AgNP+Dox'tur. Doksorubisin bağlandıktan sonra hidroksil pikinde bir yer değiştirme veya kayma gözlemlenebilir. Ayrıca, aromatik gruplara atfedilebilen pikler 1500-1600 cm⁻¹ aralığında belirgindir, böylece doksorubisinin K-AgNP'ye bağlandığı doğrulanır. Piklerde gözlenen kayma, doksorubisinin nanopartikül yüzeyine bağlanmasından kaynaklanan kimyasal etkileşimlerin bir göstergesi olarak yorumlanabilir.



Şekil 4.1. K-AgNP ve K-AgNP+Dox Karşılaştırmalı FTIR spektrumu

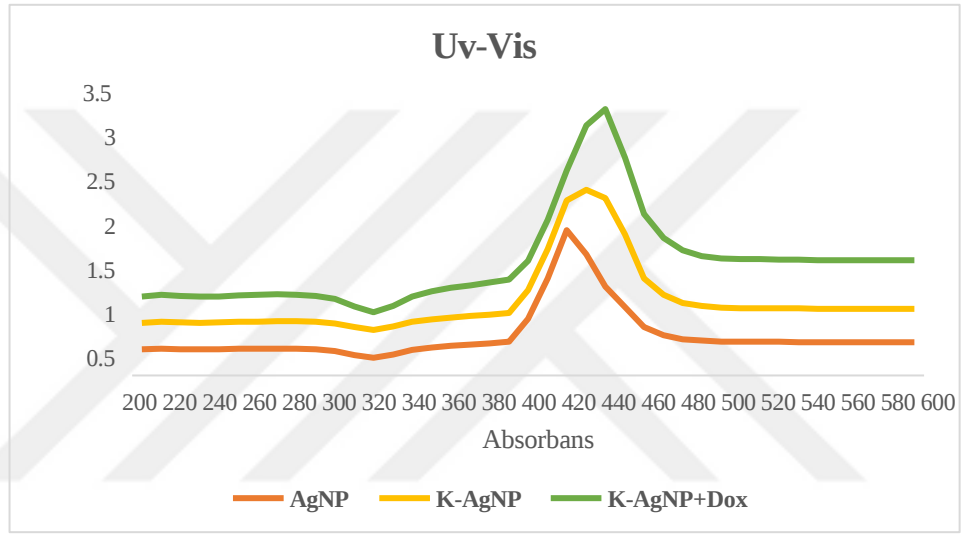


Şekil 4.2. K-AgNP ve K-AgNP+Dox Karşılaştırmalı FTIR spektrumu

4.1.2. UV-Vis spektroskopik analiz

UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi, kararlı AgNP'lerin oluşumunu değerlendirmek için hayati bir tekniktir. AgNP'lerin genellikle yüzey plazmon rezonans fenomeni (yüzey elektronlarının birlikte salınımı) nedeniyle 390-425 nm'de yoğun bir absorpsiyon piki sergilediği gözlemlenmiştir. Mie teorisine göre (Raut vd., 2009) metal

küresel NP'lerin absorpsiyon spektrumu sırasında sadece bir yüzey plazmon rezonans bandı beklenir. Buna karşılık, anizotropik NP'ler, farklı morfolojilerine bağlı olarak birden fazla yüzey plazmon rezonans bandı sergiler. Yüzey plazmon rezonans piklerinin artmasının, NP'lerin simetrisindeki bir düşüşle eşzamanlı olduğu gözlemlenmiştir (Ramteke vd., 2013) 395 ila 420 nm arasında değişen kimyasal olarak sentezlenmiş AgNP'lerin maksimum absorpsiyon pikleri Şekil 4.3.'te gösterilmektedir. Ölçülen absorbans değerlerine bağlı olarak, sonuçlar dar boyut dağılımlarına sahip nispeten küçük NP'lerin (<80 nm) oluşumunu göstermektedir (Jyoti vd., 2016).



Şekil 4.3. AgNP, K-AgNP ve K-AgNP+Dox Karşılaştırmalı Uv-Vis Spektrumu

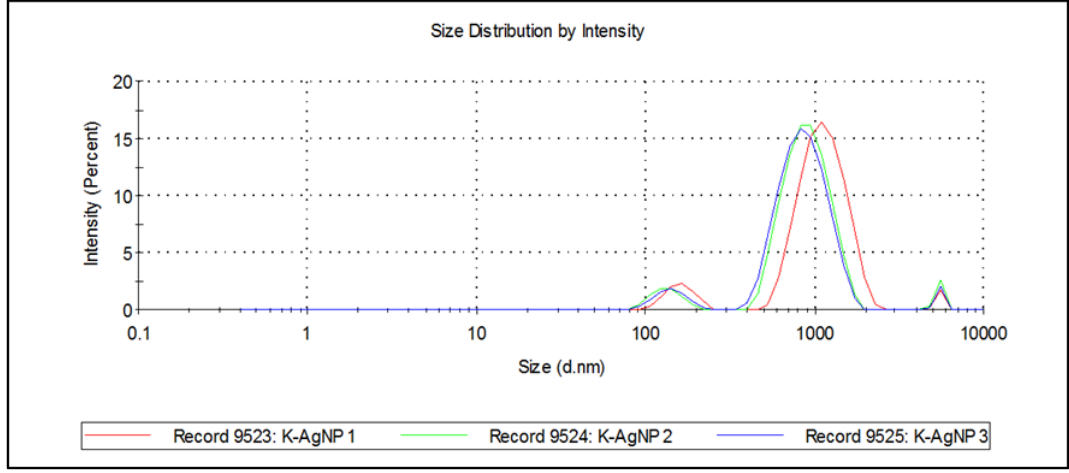
AgNP'nin yaklaşık 450 nm'de pik gösterdiği ve böylece AgNP varlığını doğruladığı gösterilmiştir. K-AgNP durumunda, bu pikte hafif bir kırmızı kayma gözlenir, bu da nanopartikül yüzeyinde bir kaplamanın başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini ve çevresel değişikliklerin optik özellikleri üzerindeki potansiyel etkisini gösterir. K-AgNP+Dox durumunda, pik daha da genişleyebilir ve hafifçe kayabilir, bu da Doxorubicin'in nanopartiküllere bağlandığını ve çevresel değişikliklere neden olduğunu düşündürür. Bununla birlikte, K-AgNP ve K-AgNP+Dox'un absorbans değerleri AgNP'den daha yüksekti, bu da kaplama ve ilaç yüklemesinden sonra partiküllerin optik yoğunluğunun arttığını ve muhtemelen partikül agregasyonunun da değiştiğini gösterebilir. Gözlenen en yüksek absorpsiyon K-AgNP+Dox için kaydedilmiştir, bu da Dox yüklemesinin optik özellikleri önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. 200-350 nm aralığında önemli bir fark gözlenmemiştir; ancak 400-500 nm aralığında gruplar

arasındaki farklar belirginleşmiştir. 450 nm civarındaki pikleri metal nanopartiküllerin karakteristik optik özelliklerini yansıtmaktadır.

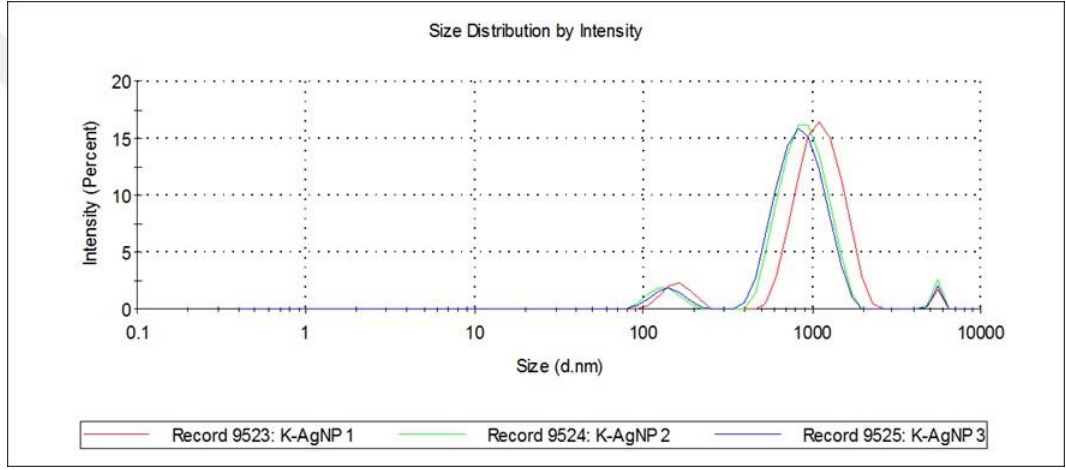
Bulgular, AgNP, Dox ile başarılı bir şekilde kaplandığını ve etkileşime girdiğini göstermektedir. K-AgNP ve K-AgNP+Dox arasındaki farklılık, ilaç yüklemesinin NP optik özelliklerini değiştirdiğini göstermektedir. Kırmızıya kayma ve emilimdeki değişim, yüzey modifikasyonlarının etkinliğini ve Dox'un bağlanmasını doğrulamaktadır. Bu sonuçlar, absorbans piklerinin de gösterdiği gibi, Dox'un kaplanmış AgNP ile başarıyla yüklendiğini göstermektedir.

4.1.3. Zeta potansiyel analizi

Zeta potansiyeli, AgNP'lerin sulu süspansiyonlardaki kararlılığını değerlendirmek için önemli bir parametredir. Kimyasal olarak sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyel analizi sonuçları, yüzey yükü (-/+) ve değerleri (mV) Şekil 4.4'de verilmiştir. Zeta potansiyel analizi sonuçları incelendiğinde AgNP'lerin negatif (-) yüzey yüküne sahip olduğu görülmektedir. Pozitif zeta potansiyeline sahip partiküller negatif yüklü yüzeylere bağlanabilir ve bunun tersi de geçerlidir. Zeta potansiyelinin büyüklüğü partiküllerin kararlılığının bir göstergesidir, potansiyel ne kadar yüksek olursa elektrostatik itme o kadar büyük olur ve dolayısıyla kararlılık da o kadar artar. Örneğin, 0-5 mV partiküller toplanma eğilimi gösterirken, 5-20 mV partiküller minimum düzeyde kararlı ve 20-40 mV partiküller orta düzeyde kararlıdır. +40 mV'nin üzerinde partiküller son derece kararlıdır. Buna göre, bu çalışmada üretilen AgNP'lerin zeta potansiyel değeri $30,1 \pm 6,8$ (mV)'dir, dolayısıyla orta derecede kararlıdır. Elde edilen sonuçlar literatürde bildirilenlere çok yakındır (Meléndrez vd., 2010). AgNP'lerin sitotoksitesinin NP'lerin yüzey potansiyeli tarafından değiştirildiği ve pozitif yüklü olanların en biyouyumlu, negatif yüklü olanların ise en toksik olduğu öne sürülmüştür (Lee vd., 2011).



Şekil 4.4. K-AgNP Zeta potansiyeli Analizi sonucu



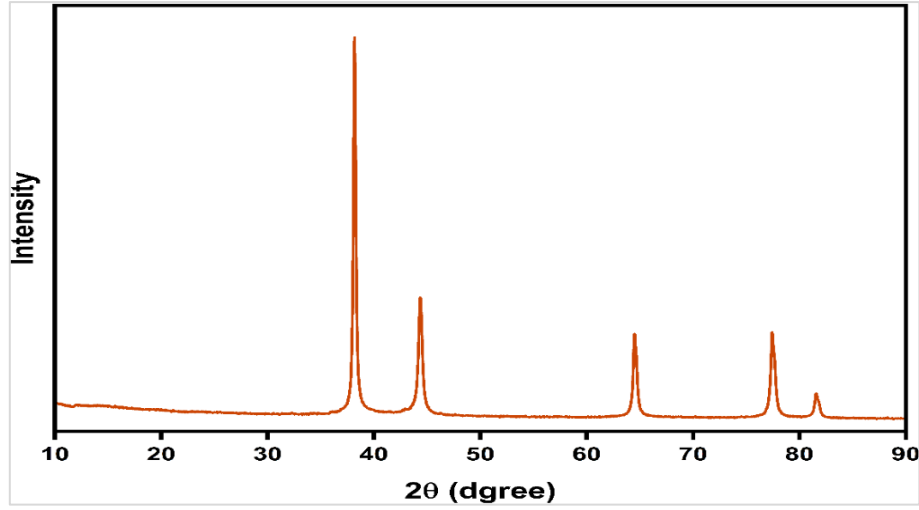
Şekil 4.5. K-AgNP zeta sizer analizi sonucu

Şekil 4.5.'te gösterildiği gibi, K-AgNP'lerin hidrodinamik boyut dağılımı ve zeta potansiyel dağılımı sunulmuştur. Partiküllerin baskın boyut dağılımı 500-1500 nm civarında yoğunlaşmakta olup, 100 nm civarında küçük bir ikincil pik muhtemelen daha küçük NP varlığının göstergesidir. Daha büyük boyutlardaki küçük pik, partiküllerin bir miktar agregasyonuna atfedilebilir. Örnekler arasındaki küçük farklılıklara rağmen, genel dağılım karşılaştırılabilir kalmaktadır, bu da sentez yönteminin güvenilir olduğunu göstermektedir. Zeta potansiyeli dağılımı, partiküllerin yüzey yükünü ve kolloidal stabilitesini anlamak için çok önemlidir. Grafik, tüm örneklerin zeta potansiyelinin ağırlıklı olarak yaklaşık +30 ve +50 mV arasında yoğunlaştığını göstermektedir. Pozitif zeta potansiyeli, partikül yüzeyinde katyonik bir kaplama veya pozitif yüklü grupların varlığını göstermektedir. Ayrıca, +30 mV'u aşan zeta potansiyelleri kararlı bir süspansiyonun göstergesidir, yani partiküller elektrostatik itme kuvvetleri nedeniyle

toplanma için minimum eğilim gösterir (Mohamed vd., 2020). Boyut dağılımı, partiküllerin nispeten geniş bir aralıkta dağıldığını ve popülasyonun çoğunluğunun 500-1500 nm aralığında olduğunu göstermektedir. İhmal edilebilir miktarlarda küçük ve büyük agregatların varlığı da gözlemlenmiştir. Zeta potansiyeli, partiküllerin pozitif bir yüke sahip olduğunu ve K-AgNP'leri özellikle biyolojik ve kimyasal uygulamalar için çok uygun hale getiren bir özellik olan stabil bir süspansiyon oluşturabildiğini göstermektedir (Patra vd., 2015). Zeta potansiyelindeki bu kararlılığın, bu partiküllerin çeşitli uygulamalarda etkin kullanımı için çok önemli bir faktör olan partiküllerin çökmesini önlemesi muhtemeldir. Örnekler arasında gözlemlenen küçük farklılıklara rağmen, zeta potansiyel değerleri genellikle farklı örnekler arasında yakınlık göstermektedir.

4.1.4. X-Işını difraksiyon (XRD) analizi

AgNP'lerin ve kitosan ile kaplanmış AgNP'lerin XRD analizi sonuçları Şekil 4.6'da verilmiştir. Buna göre, XRD sonuçları incelendiğinde, her iki örneğin de 10 ila 80 2 θ derecede dört pik noktası gösterdiği ve bunların konumlarının literatürde rapor edilen bilgilerle çok yakından ilişkili olduğu görülmektedir (Jyoti vd., 2016). Her iki spektrumda da 38.1°, 44.2°, 64.3° ve 77.3°de gözlenen dört yüksek saçılma piki sırasıyla (111), (200), (220) ve (311) olarak indekslenmiştir. Bu indisler Bragg saçılma yüzeylerinin ve altta yatan gümüş merkezli kübik kristal yapının varlığını doğrulamaya hizmet etmektedir. Örneklerin X-ışını spektrumunun oldukça benzer olması, AgNP'lerin kitosan ile kaplanmasının kristal yapıda herhangi bir değişikliğe yol açmadığını göstermektedir (Venkatesan vd., 2017).



Şekil 4.6. K-AgNP'nin X ışını kırınımı (XRD)

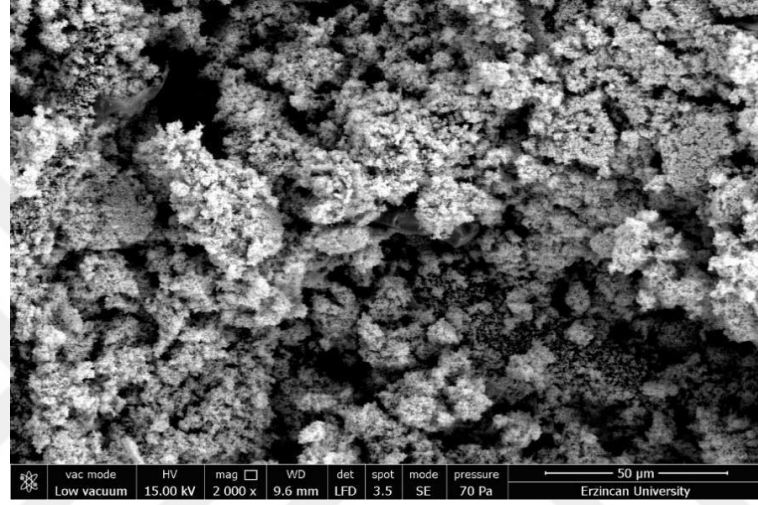
XRD (X-ışını Kırınımı) sonucu, K-AgNP (Kaplanmış Gümüş Nanopartiküller) numunesinin kristal yapısının kapsamlı bir analizi, gümüş nanopartiküllerin kristal yapısını sunan farklı pikler göstermektedir. Keskin tepelerin varlığı K-AgNP'nin kristal bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

$2\theta = 38^\circ, 44^\circ, 64^\circ$ ve 77° 'de bulunan pikler, Yüz Merkezli Kübik (FCC) bir yapı sergileyen metalik gümüş (Ag) fazına karşılık gelmektedir. Bu piklerin keskin ve yoğun yapısı, yüksek derecede kristallığe işaret etmektedir. Kaplama işleminin amorf bir yapıyla sonuçlanması durumunda, geniş ve düşük yoğunluklu pikler gözlemlenecektir. Keskin piklerin varlığı, gümüşün kaplama işleminin ardından kristal yapısını koruduğunu göstermektedir (Govindan vd., 2012).

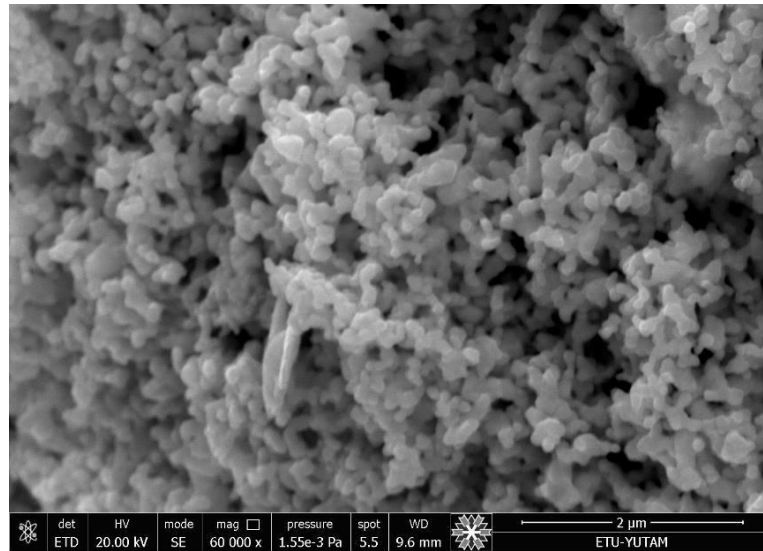
XRD analizi, K-AgNP'nin kristal bir yapı sergilediğini ve gümüş nanopartiküllerin FCC yapısını koruduğunu göstermektedir. Keskin piklerin varlığı, numunenin yüksek saflığının ve önemli ölçüde kristalleşme derecesinin göstergesidir. XRD analizi, K-AgNP kristal yapısını koruduğunu ve metalik gümüşün FCC faz karakteristiğine uyduğunu göstermektedir. Belirgin pikler yüksek kristallik derecesini ve AgNP'lerin saflığını doğrulamaktadır (Albeladi vd., 2020).

4.1.5. SEM analizi

K-AgNP ile K-AgNP + Dox'un yapı morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (JEOL JSM-5800 LV, Tokyo, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. 3-5 mm kalınlığındaki kitosan ve K-AgNP kompozit örnekleri 0,2 M fosfat tamponunda (pH 7,2) %2,5 (v/v) çözündürülmüştür. Örnekler daha sonra bronz bir saplama üzerinde biriktirilmiş ve hızlandırılmış 20 kV voltajda gözlemlenmiştir (Dara vd., 2020).



Şekil 4.7. K-AgNP SEM görüntüsü



Şekil 4.8. K-AgNP + Dox SEM görüntüsü

Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de gösterildiği gibi, K-AgNP ve Dox bağlı K-AgNP'nin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri NP yüzey morfolojisini ortaya

koymaktadır. Şekil 4.6, K-AgNP yapısının belirgin bir toplanma eğilimi ve gözenekli bir yapı sergilediğini göstermektedir. Böyle bir yüzey morfolojisi, yüksek yüzey alanı nedeniyle ilaç dağıtım ve biyomedikal uygulamalar için avantajlı olabilir. Kitosan kaplamanın NP stabilizasyonuna katkıda bulunduğu ve yüzey özelliklerini değiştirdiği düşünülmektedir. Şekil 4.7’de gösterildiği gibi, Dox’un K-AgNP’ye bağlanması, ilacın NP yüzeyi boyunca heterojen bir dağılımını ortaya çıkarmakta ve yüzey morfolojisinde önemli değişikliklere neden olmaktadır. Dox’un K-AgNP yüzeyine bağlanması NP’lerin yüzey topografisini değiştirerek daha düzensiz bir morfolojik yapının ortaya çıkmasına neden olur. Bu bulgu, ilacın K-AgNP yüzeyine başarılı bir şekilde yüklendiğini göstermektedir. K-AgNP’nin bir ilaç taşıyıcı sistem olarak etkinliğini değerlendirmek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, SEM görüntülerinden elde edilen sonuçlar K-AgNP’nin başarılı sentezini ve Dox yüklemesini göstermektedir. Bu bulgular, nanopartiküllerin ilaç dağıtım sistemleri için uygun bir aday olabileceğini ve biyomedikal uygulamalarda potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, sistemin etkinliği ilaç salım kinetiği, biyoyumumluluk ve hücrel etkileşimler gibi ek analizlerle daha ayrıntılı olarak değerlendirilmelidir.

Hepatosit karsinogeneze yol açan adımları anlamamızdaki ilerlemeler, mevcut tedavi yöntemlerinin tedavisi de dahil olmak üzere çok sayıda yeni tedavi stratejisinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Karaciğer kanserinin tedavisi, hasta bazında seçilen seçeneklerle multidisipliner ve multimodel bir terapötik yaklaşımdır. Bu seçimler genellikle tümör evresi ile altta yatan karaciğer hastalığının derecesi ve hastanın performans durumu arasındaki karmaşık etkileşime göre bireyselleştirilir. HCC ve moleküler hedefli tedavinin gelişmiş öngörücü, tanısal ve prognostik biyobelirteçlerinin geliştirilmesi, HCC’li hastaların genel sağkalımında evreler arasında iyileşmelere yol açabilir (Zhonghao vd., 2024).

Nanotaşıyıcıların toksikolojik özelliklerini değerlendirmek için biyolojik temelli testler yapmak çok önemlidir. Buna ek olarak, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve kullanım amacına uygunluğunun tespit edilmesi de çok önemlidir. NP’lerin toksik etkisini azaltmak için ya uygun bir sentez yöntemi uygulanmalı ya da

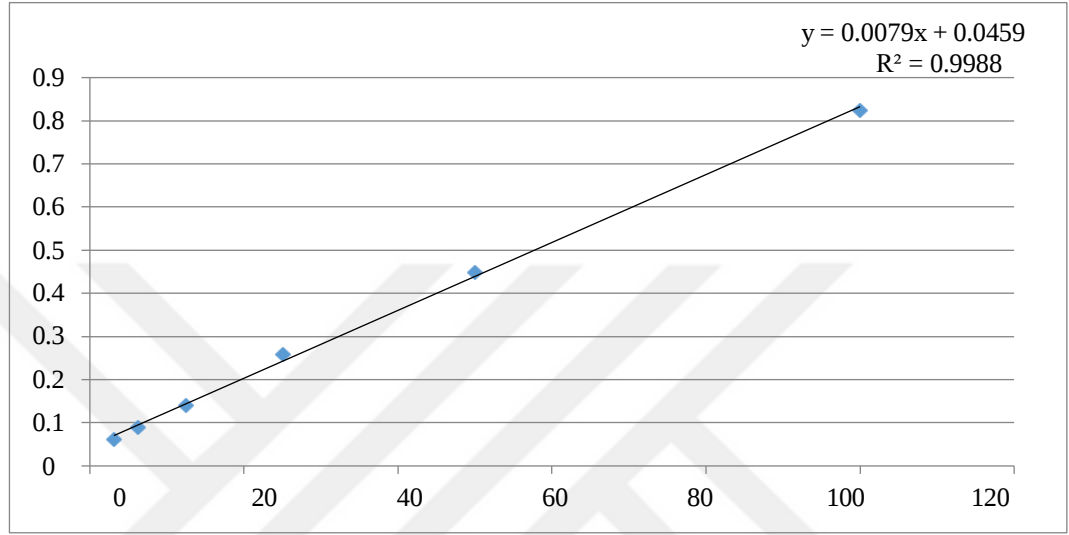
biyoyumluluğu yüksek uygun doğal kaplayıcılar kullanılarak NP'ler modifiye edilmelidir. Bu bağlamda, kaplama ajanlarının AgNP'lerin bakteri hücreleriyle etkileşiminde ve bakteri hücrelerinin gingival fibroblast toksisitesi ile etkilenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Liu vd., 2013).

Son yıllarda AgNP'lerin oral ilaç olarak kullanımının artmasına rağmen, ksenobiyotiklerin yerel hücrelere ve dokulara maruz kalmasıyla ilişkili potansiyel risklere ilişkin endişeler devam etmektedir (Besinis vd., 2015). Kaplama maddelerinin AgNP'lerin toksisitesi üzerindeki etkisini araştıran ve özellikle kaplama maddelerinin NP'lerin toksisite profilini değiştirmedeki rolüne odaklanan bir araştırma grubu ortaya çıkmıştır. Bu araştırmanın bulguları, kaplama maddesinin AgNP'lerin toksisitesini belirlemede çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca, çalışmalar belirli kaplama maddelerinin NP'lerin toksisitesini azaltma kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, kitosan kaplı NP'lerin, kaplanmamış NP'lere kıyasla endotel hücreleri için önemli ölçüde daha az toksik olduğu gözlemlenmiştir (Azadpour vd., 2022). Bu çalışmalar toplu olarak, doğal toksisiteye sahip AgNP'lerin uygun kaplama maddeleriyle kapsüllenebileceğini ve kemoterapötik bir ilaç olan Dox ile bağlandığında karaciğer kanseri hücreleri üzerine etkisini göstermektedir ki bu, NP'lerin biyolojik ve mühendislik alanlarındaki geniş kapsamlı uygulamaları göz önüne alındığında büyük önem taşıyan bir gelişmedir.

Bu çalışmada AgNP'ler sentezlenmiş ve daha sonra 'kitosan' olarak bilinen bir kitin biyopolimeri ile kaplanmıştır. AgNP'lerin sentezi, X-ışını saçılma spektrumunda dört karakteristik pikin (111), (200), (220) ve (311) varlığı ve UV-Vis spektrometresinde 395 ila 420 nm arasında gözlenen bir absorpsiyon ile doğrulanmıştır. Zeta potansiyel analizi, üretilen gümüş nanopartiküllerin kararlılığını göstermiş, TEM analizi ise nano ölçekte partiküllerin sentezlendiğini doğrulamıştır. XRD analizi, AgNP'lerin kitosan ile kaplanmasının yapıdan ödün vermeden gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Toksik özellikli AgNP'lerin yapılarından ödün vermeden biyoyumlu kitosan polimeri ile kaplanması önemlidir. Sonuç olarak, AgNP'lerin özellikle canlı organizmalarda potansiyel uygulamalarının önemli ölçüde genişlemesi beklenmektedir. Bu çalışma, nano boyutlu Ag partiküllerinin bir kitosan tabakası ile kaplanmasının biyoyumluluk alanında yeni araştırmaları teşvik edeceğini göstermektedir. Bu bağlamda, metal bazlı nanotaşıyıcıların

toksik özelliklerini hafifleten yeni sentez yöntemlerinin belirlenmesi ve özellikle biyomühendislik alanlarında insan hayatını etkileyen alanlarda tasarlanmış nanotaşıyıcıların kullanılması için yeni yolların keşfedilmesi zorunludur (Jing vd., 2023).

4.2. İlaç Kapsülasyon Verimliliği



Şekil 4.9. Dokсорubisin standart grafiği

Farklı konsantrasyonlarda ve 4 tekerrür olacak şekilde hazırlanan ilaç dozlarının 480 nm dalga boyunda absorbans değerleri alınıp aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Bu değerler sırasıyla;

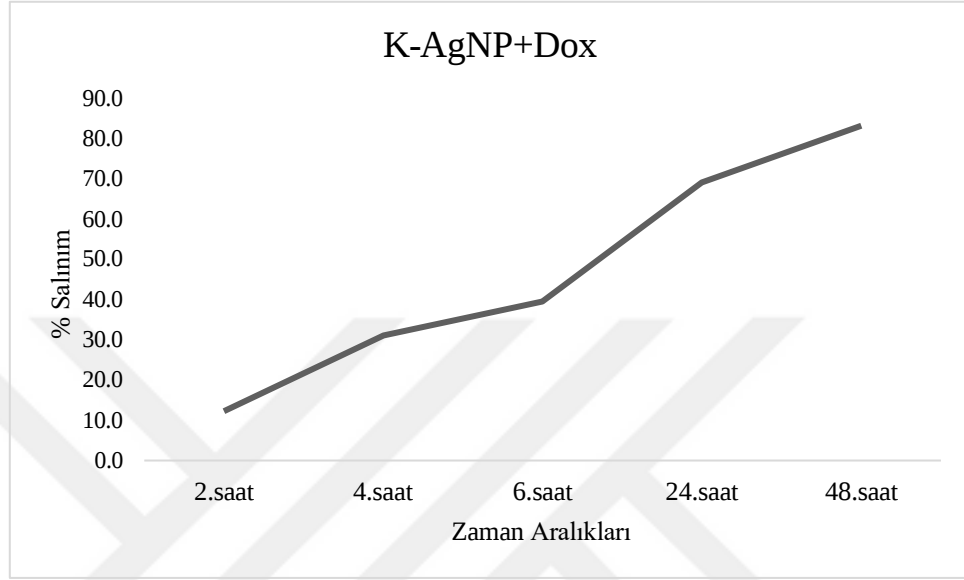
1. Tekerrür: 0,107
2. Tekerrür: 0,113
3. Tekerrür: 0,108
4. Tekerrür: 0,117

olarak gözlemlendi. Bu hesaplama yapılırken yukarıdaki Şekil 4.9'da yer alan $y=mx+b$ formülü kullanıldı. Buna göre x: bilinmeyen konsantrasyon ve y: süpernatandaki absorbans değeridir. Bu şekilde x değeri bulunarak yüzde kapsülasyon oranı (EE) aşağıdaki formüle göre %91,72 olarak belirlendi.

$$\%EE = \frac{\text{İlacın başlangıç miktarı} - \text{İlacın süpernatandaki serbest miktarı (y = mx + b)}}{\text{ilacın başlangıç miktarı}} \times 100$$

4.3. İlaç Salınımı

Salınım için 7.4 pH; 2, 4, 6, 24 ve 48 saat olmak üzere 5 farklı saat aralığı ve 37°C sıcaklık olmak üzere farklı parametreler kullanılmıştır.

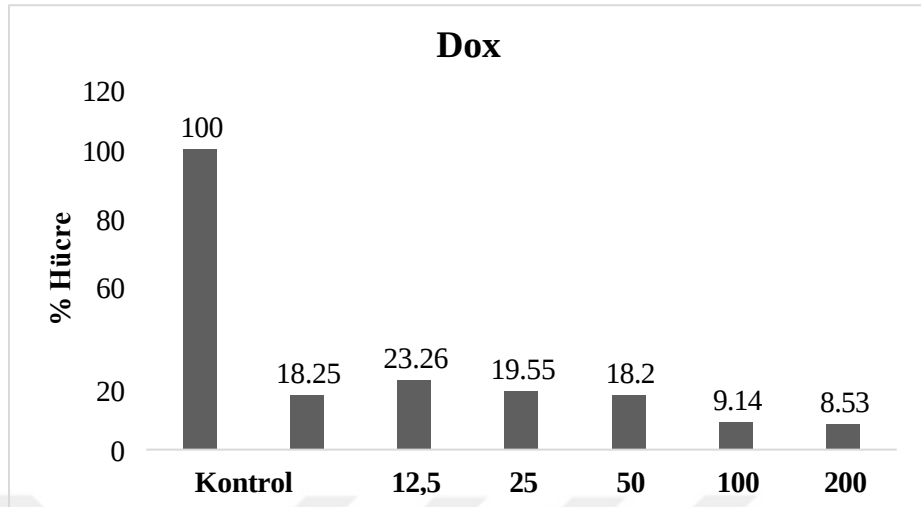


Şekil 4.10. K-AgNP+Dox'un İlaç Salınım Sonucu

Şekil 4.10'da gösterildiği gibi, K-AgNP'ler ile kapsüllenmiş Dox salınım profili başlangıçta hızlı bir artış göstermekte ve bunu zaman içinde kademeli bir artış izlemektedir. Grafiğin analizi, salım oranının ilk 2 saatte yaklaşık %20'den 6. saatte maksimum yaklaşık %80'e çıktığını ortaya koymaktadır. 24. saatte ilacın salınımında belirgin bir hızlanma gözlenmiş ve 48. saatin sonunda %80'in üzerinde bir salınım oranına ulaşılmıştır. Bu da ilacın kitosan kaplı gümüş nanopartikül yüzeyine başarılı bir şekilde yüklendiğini ve kontrollü bir şekilde salındığını göstermektedir. Kitosan kaplamanın ilaç salınım süreci üzerindeki etkisi, başlangıçta hızlı bir salınım, ardından stabilizasyon ve sonraki saatlerde sürekli bir salınım profili ile önemli bulunmuştur. Bu sonuç, kitosanın biyopolimer yapısının ve gümüş nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin salım kinetiği üzerindeki etkinliğini göstermektedir.

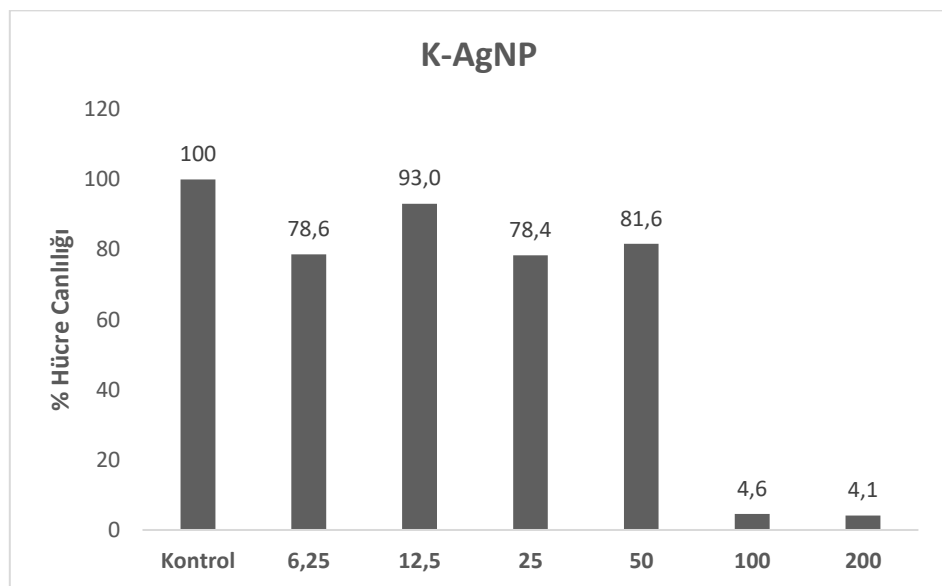
Elde edilen sonuçlar, K-AgNP'nin bir ilaç taşıyıcı sistem olarak etkili bir platform sunduğunu ve kontrollü bir salım mekanizması ile Dox'un uzun vadeli terapötik etkilerini sağlayabileceğini göstermektedir, ancak salım kinetiğinin daha eksiksiz bir şekilde anlaşılması için daha fazla mekanistik çalışma yapılması gerekmektedir.

4.4. Hücre Canlılığı Analizi (CVDK-8)



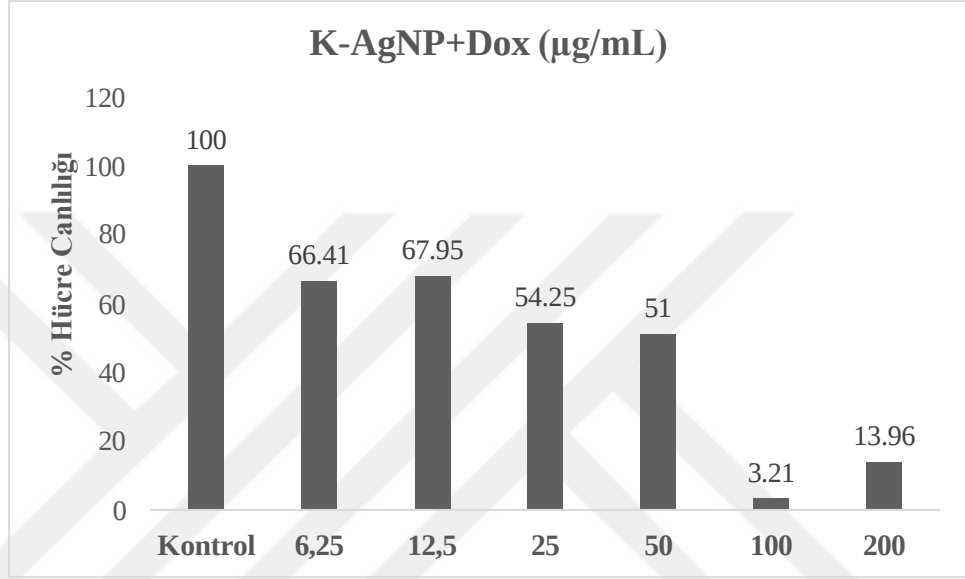
Şekil 4.11. HEPG2 hücrelerine uygulanan Dox (µg/mL) uygulamalarına ait 24 saatlik hücre canlılığı analizleri sonucu

Şekil 4.11’de yüksek Dox’un konsantrasyonlarının hücre canlılığında belirgin bir düşüşe yol açtığını göstermektedir. Hücre canlılığındaki azalma Dox konsantrasyonundaki artışla orantılıdır; 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarda önemli bir düşüş gözlemlendi ve bu da hücre canlılığının neredeyse ihmal edilebilir bir düzeye inmesine yol açmaktadır. Bu bulgular Dox’un HepG2 hücreleri üzerinde önemli bir sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.12. HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP uygulamalarına ait 24 saatlik hücre canlılığı analizleri sonucu.

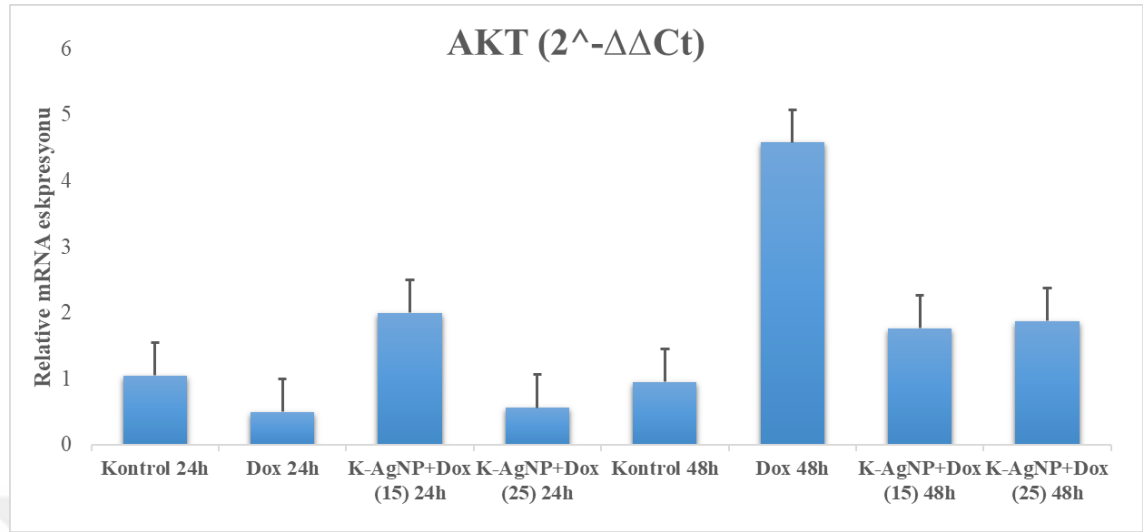
Şekil 4.12’de K-AgNP yüksek konsantrasyonlarının hücre canlılığında önemli bir düşüşe neden olduğunu göstermektedir. Düşük konsantrasyonlarda (%6,25 - 50 $\mu\text{g/mL}$) hücre canlılığı %80-90 aralığında kalırken, yüksek konsantrasyonlarda (100 ve 200 $\mu\text{g/mL}$) hücre canlılığında önemli bir düşüş gözlenmiştir. Bu bulgular K-AgNP’nin yüksek dozlarının HEPG2 hücreleri üzerinde belirgin bir sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.13. HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox ($\mu\text{g/mL}$) uygulamalarına ait 24 saatlik hücre canlılığı analizleri sonucu.

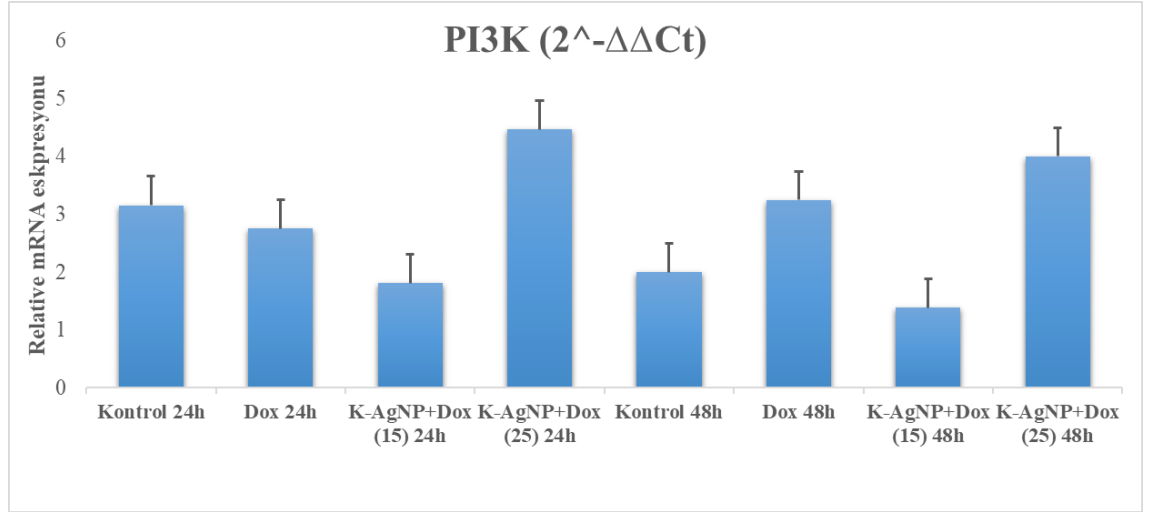
Şekil 4.13’de K-AgNP+Dox konsantrasyonundaki artışın hücre canlılığında önemli bir düşüşe yol açtığını göstermektedir. Düşük ve orta konsantrasyonlarda (6,25 - 50 $\mu\text{g/mL}$), hücre canlılığı yaklaşık %50-70 aralığında kalırken, yüksek konsantrasyonlarda (100 ve 200 $\mu\text{g/mL}$) hücre canlılığı önemli ölçüde azalmıştır. Özellikle 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu, sadece %3,21 hücre canlılığı ile sonuçlandığından, bu konsantrasyonda yüksek derecede hücrel toksisiteye işaret ettiğinden özellikle ilgi çekicidir. Bu bulgular K-AgNP+Dox’un HEPG2 hücrelerine karşı etkili bir bileşik olduğunu ve hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir.

4.5. RT-PCR Sonuçları



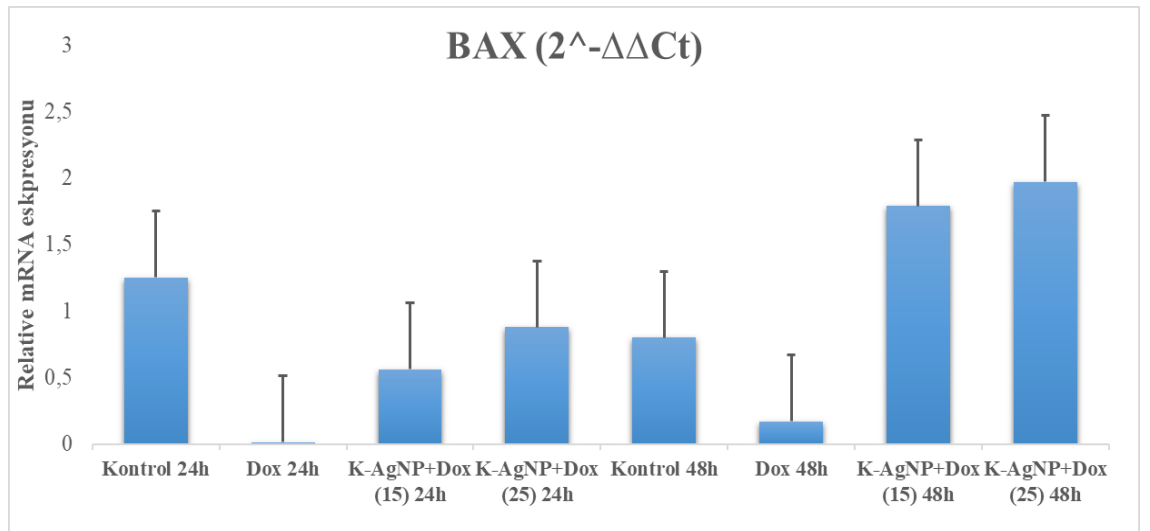
Şekil 4.14. 24 ve 48 saat boyunca HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox'un farklı koşullar altında AKT geninin ekspresyon seviyeleri.

Bu sonuçlar, farklı konsantrasyonlar ve süreler için Dox ve K-AgNP'nin AKT gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmektedir (Şekil 4.14). 24 saatlik sonuçlarda, K- 15µg/mL K-AgNP+Dox konsantrasyonunun, AKT ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığını, 25µg/mL K-AgNP+Dox konsantrasyonunun ise ekspresyonda azalmaya neden olduğunu göstermektedir. 48 saatlik sonuçlar hem Dox hem de K-AgNP+Dox uygulamalarının, özellikle yüksek doz uygulamalarında AKT gen ekspresyonunu artırdığını göstermektedir. Bu bulgular, Dox ve K-AgNP'nin hücreler üzerindeki etkilerinin anlaşılması ve bu bileşiklerin hücre içi sinyal yollarındaki rollerinin incelenmesi açısından önemlidir (Mishra vd., 2009). HEPG2 hücrelerine uygulamalar sonrası AKT mRNA ifadenmesindeki değişim Şekil 4.14'de sunulmuştur.



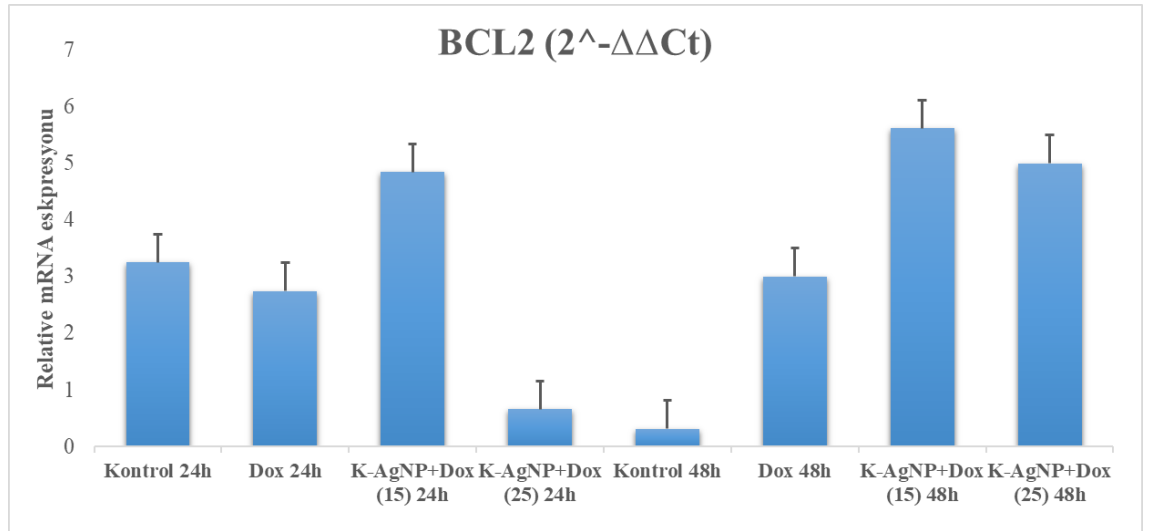
Şekil 4.15. 24 ve 48 saat boyunca HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox'un farklı koşullar altında PI3K geninin ekspresyon seviyeleri.

PI3K ekspresyon seviyesi 24 saatlik Dox uygulaması grubunda PI3K ekspresyonunda düşüşe neden olurken, 48 saatlik Dox uygulaması grubunda ekspresyonda artışa yol açmıştır. 15 µg/mL K-AgNP+Dox konsantrasyonu 24 saatte PI3K ifadesini artırırken, 25 µg/mL konsantrasyonlu 24 saatte ifadeyi hafifçe azaltmıştır. 48 saatte, her iki konsantrasyon da PI3K ifadesinde önemli bir artış sergilemiştir. HEPG2 hücrelerine uygulamalar sonrası PI3K mRNA ifadenmesindeki değişim Şekil 4.15.'te sunulmuştur.



Şekil 4.16. 24 ve 48 saat boyunca HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox'un farklı koşullar altında Bax geninin ekspresyon seviyeleri.

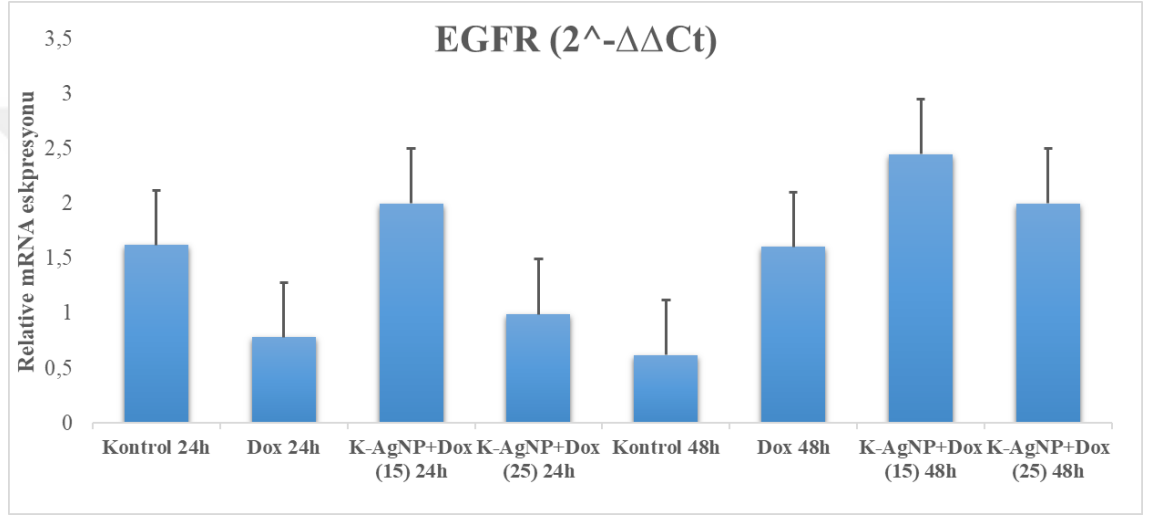
Bu şekilde, HEPG2 hücrelerinde değişen koşulların BAX gen ekspresyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için PCR tabanlı bir yaklaşım kullanılmıştır. Bulgular, kitosan kaplı gümüş nanopartiküller (K-AgNP) ve Dox uygulamasının BAX geninin mRNA ifadesini önemli ölçüde etkilediğini ortaya koymaktadır. 24 saatlik tedavi süresi, Dox tedavisinin kontrol grubuna kıyasla BAX gen ifadesinde bir azalmaya yol açtığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, düşük konsantrasyonlarda K-AgNP+Dox uygulamasını BAX gen ifadesini neredeyse kontrol seviyesine getirmiştir. Tersine, yüksek konsantrasyonlarda (25 µg/mL) K-AgNP+Dox uygulaması BAX gen ifadesinde kontrol seviyesine kıyasla bir azalma ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, hem 15 µg/mL hem de 25 µg/mL konsantrasyonlarda K-AgNP+Dox uygulamasının BAX gen ekspresyonunu, özellikle BAX gen ekspresyonunun maksimuma ulaştığı 25 µg/mL konsantrasyonda, önemli ölçüde yüksek bir seviyeye çıkardığı dikkat çekmektedir. Bu bulgular, Dox ve K- AgNP uygulamasının HEPG2 hücrelerinde apoptozun (programlı hücre ölümü) indüklenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini ve BAX gen ekspresyonunu artırarak hücre ölümünü teşvik edebileceğini göstermektedir. HEPG2 hücrelerine uygulamalar sonrası Bax mRNA ifadenmesindeki değişim Şekil 4.16.'da sunulmuştur.



Şekil 4.17. 24 ve 48 saat boyunca HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox'un farklı koşullar altında Bcl-2 geninin ekspresyon seviyeleri.

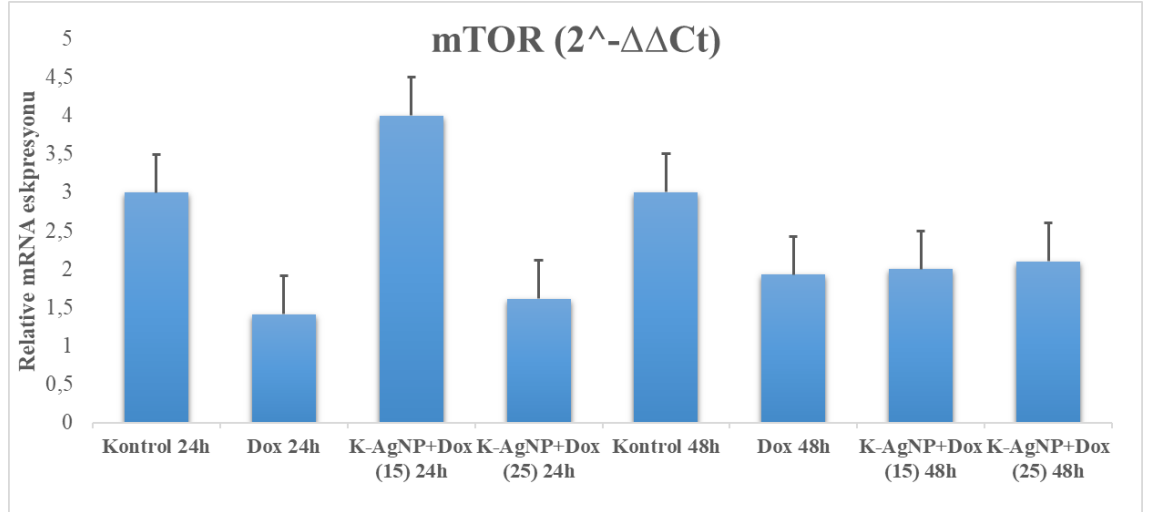
Elde edilen bu veri, K-AgNP'e yüklenmiş Dox uygulamalarının BCL2 geninin mRNA seviyelerini etkileyebildiğini göstermiştir. Dox uygulamasının BCL2 gen ifadesinde önemli bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. K-AgNP+Dox uygulamasının

düşük konsantrasyonlarda BCL2 ekspresyonunda artışa sebep olurken, daha yüksek konsantrasyonlarda bu artış azalmıştır. 48 saat sonra, Dox uygulamasının BCL2 gen ekspresyonunda önemli bir artışa yol açtığı görülmüştür. Düşük konsantrasyonlarda K-AgNP+Dox uygulaması yüksek BCL2 ekspresyonu ile sonuçlanmışken, daha yüksek konsantrasyonlarda BCL2 gen ekspresyonu yükselmiştir. Bu bulgular, BCL2 gen ekspresyonunun farklı konsantrasyonlarda K-AgNP+Dox uygulamalarının varlığında önemli değişikliklere uğradığını göstermektedir. HEPG2 hücrelerine uygulamalar sonrası Bcl-2 mRNA ifadenmesindeki değişim Şekil 4.17.'de sunulmuştur.



Şekil 4.18. 24 ve 48 saat boyunca HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox'un farklı koşullar altında EGFR geninin ekspresyon seviyeleri.

HEPG2 hücrelerinde EGFR geninin ifade seviyelerini değerlendirme analizimizde, K-AgNP+Dox uygulamasının EGFR geninin ifade seviyelerini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Dox uygulaması, 24 saat sonra EGFR geninin ifadesinde bir düşüşe neden olmuştur, ancak düşük konsantrasyonlarda K-AgNP+Dox uygulaması ifadeyi artırmıştır. Yüksek konsantrasyonda (25 µg/mL) ise K-AgNP+Dox uygulaması ifadeyi daha da azaltmıştır. 48 saat sonra, Dox tedavisi EGFR geninin ifadesinde artışa neden olmuştur. Düşük konsantrasyonlarda K-AgNP+Dox uygulaması önemli bir ifade artışı gösterirken, yüksek konsantrasyonda en yüksek ifade seviyeleri görülmüştür. HEPG2 hücrelerine uygulamalar sonrası EGFR mRNA ifadenmesindeki değişim Şekil 4.18.'de sunulmuştur.



Şekil 4.19. 24 ve 48 saat boyunca HEPG2 hücrelerine uygulanan K-AgNP+Dox'un farklı koşullar altında mTOR geninin ekspresyon seviyeleri.

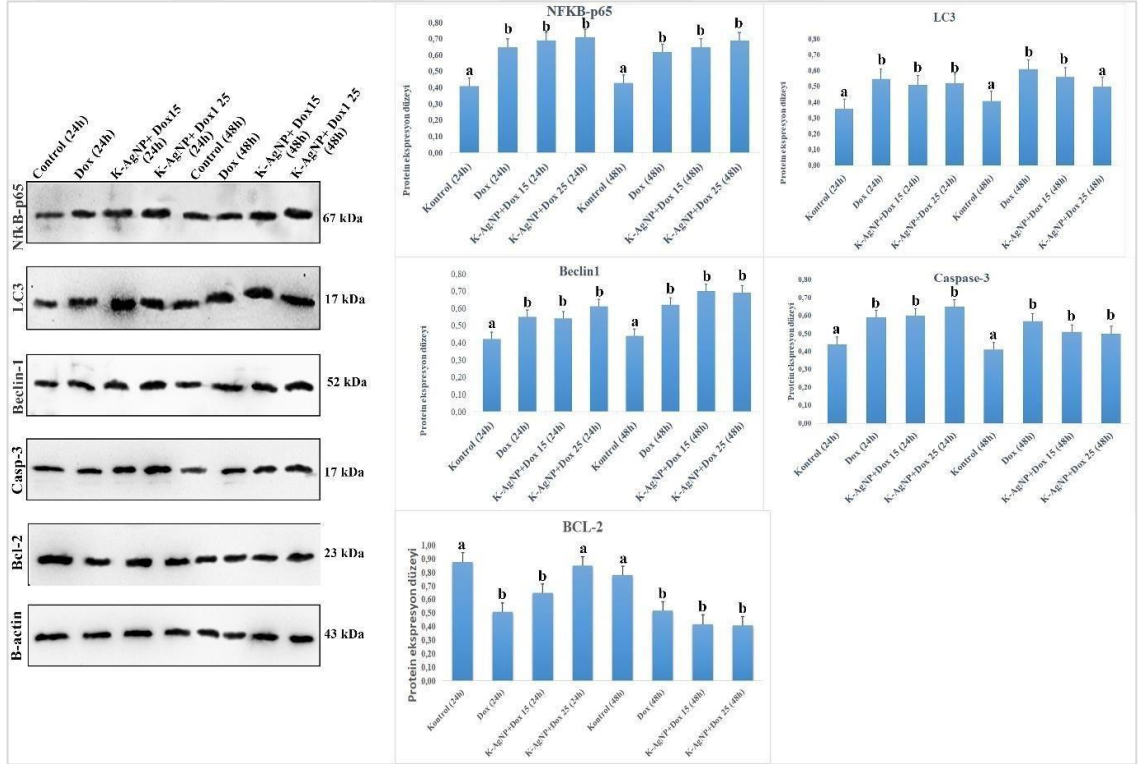
RT-PCR analizinde, Dox uygulamasının mTOR gen ifadesinde önemli bir düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. K-AgNP+Dox uygulaması düşük konsantrasyonda uygulandığında mTOR ekspresyonu artarken, yüksek konsantrasyonda ise azalmıştır. 48 saatte, Dox uygulaması mTOR gen ekspresyonunu artırmıştır. Düşük konsantrasyonlarda K-AgNP+Dox uygulaması mTOR gen ekspresyonunu önemli ölçüde artırmışken, yüksek konsantrasyonlarda çok yüksek seviyelere çıkmıştır. Bu bulgular, K-AgNP+Dox uygulamalarının belirli konsantrasyonlarda ve zaman dilimlerinde mTOR gen ekspresyonunu etkileyebileceğini göstermektedir. Özellikle düşük konsantrasyonlarda uygulamaları, mTOR geninin ekspresyonunu artırarak önemli biyolojik etkiler yapabilir. HEPG2 hücrelerine uygulamalar sonrası mTOR mRNA ifadenmesindeki değişim Şekil 4.19.'da sunulmuştur.

4.6. Western Blot Analizi Sonuçları

Tüm hücre gruplarına ait protein ekspresyonu analizinde, NFκB-p65 protein seviyeleri incelendiğinde, Dox grubu kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış göstermiştir ($p < 0.05$). K-AgNP+Dox (15 μ M ve 25 μ M) grupları NFκB-p65 ekspresyonunda anlamlı bir azalma sağlamıştır ($p < 0.05$), bu durum her iki grupta da Dox'un inflamatuvar etkilerinin baskılandığını göstermektedir. LC3 seviyeleri Dox grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artmış ($p < 0.05$), K-AgNP+Dox (15 μ M ve 25 μ M) gruplarında ise LC3 seviyeleri Dox grubuna benzer düzeylerde kalmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Beclin1 protein ekspresyonu, Dox ve K-AgNP+Dox (15 μ M ve 25 μ M) gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0.05$); bu artış, otofaji aktivitesindeki yükselmeye işaret etmektedir. Caspase-3 seviyeleri Dox grubunda kontrol grubuna kıyasla artmış ($p < 0.05$), ancak K-AgNP+Dox (15 μ M ve 25 μ M) gruplarında anlamlı şekilde azalmıştır ($p < 0.05$), bu da K-AgNP'nin apoptotik süreçleri baskılama potansiyelini göstermektedir. Son olarak, BCL-2 seviyeleri DOX grubunda kontrol grubuna göre azalmış ($p < 0.05$), ancak K-AgNP+Dox (15 μ M ve 25 μ M) gruplarında kontrol seviyelerine yakın düzeylere ulaşmıştır ($p < 0.05$). Bu sonuçlar, K-AgNP+Dox'un hücre hasarı azalttığını ve koruyucu bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Tüm hücre uygulama gruplarına ait western blot bant görüntüleri, bant yoğunlukları değerleri ve karşılaştırmaları Şekil 4.20.'de sunulmuştur.



Şekil 4.20. Tüm hücre gruplarına ait relative protein ekspresyon seviyeleri ile Western blot bantları. NFKB-p65, LC3, Beclin1, Bcl-2 ve Kaspaz-3'ün ekspresyon yoğunlukları ve değerleri. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Harflendirmeler (a,b) gruplar arasındaki protein ekspresyonundaki farklılıkları göstermektedir.

Kitosan, ilaçların yavaş ve kontrollü salım preparatlarının geliştirilmesinde ve tümörler için hedefe yönelik tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır. Kendine özgü fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik karakteristikleri nedeniyle, yavaş ve kontrollü

salım ajanı, mukozal adsorban, emici ve penetrasyon artırıcı, makromoleküler ajan, parçalayıcı, kaplama malzemesi ve diğer ilaçların (veya proteinlerin, peptitlerin, genlerin) taşıyıcısı olarak hedefli ilaç dağıtım sistemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Çeşitli lokal veya bölgeye özgü uygulama yöntemleriyle, maruz kalma süresinin uzatılabileceği, ilaç emiliminin artırılabilceği, etkinliğin iyileştirilebileceği ve advers reaksiyonların azaltılabileceği gösterilmiştir. Bilimsel ve teknolojik araçların artan kullanımı ve fiziksel ve kimyasal yöntemlerin sürekli gelişimi göz önüne alındığında, kitosan preparatlarının kalitesinin ve gelişiminin artmaya devam edeceği tahmin edilmektedir (Illum vd., 1994).

Biyouyumlu K-AgNP'ler Dox için bir iletim sistemi geliştirmek üzere kullanılmıştır. Nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin hücresel alım ve içselleştirme üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Dox yüklü K-AgNP'ler, yüksek kapsülleme etkinliği, küresel partiküllerin agregasyonunun olmaması, 100 nm'den küçük tek tip partikül boyutu ve pozitif zeta potansiyeli gibi olumlu özellikler sergilemiştir. Pozitif yüklü partiküller ve negatif yüklü hücre membranları arasındaki elektrostatik etkileşimler iyi belirlenmiştir. Serbest Dox ve K-AgNP + Dox'un FTIR spektrumlarının benzerliği ve bir fosfat pikinin varlığı, Dox'un K-AgNP'lere başarılı bir şekilde yüklendiğini göstermektedir. K-AgNP + Dox'un FTIR spektrumunda geniş bir hidroksil grubu pikinin varlığı Dox'un K-AgNP'ye yüklendiğini doğrulamaktadır. Bu kimyasal kayma, ilaç, kitosan polimeri arasındaki iyonik etkileşimden kaynaklanıyor olabilir.

Gümüş nanopartiküller, çeşitli terapötik uygulamalar için yüksek potansiyele sahip bir inorganik nanoilaç sınıfıdır. Önceki çalışmaların çoğu AgNP'lerin ilaç taşıyıcıları olarak uygulanmasına odaklanmıştır (Gomes vd., 2021). Bununla birlikte, AgNP'lerin ilaç aktivitelerinin araştırılması için hala erkendir. Daha önceki bazı raporlar, AgNP'lerin hücresel DNA ile etkileşim yoluyla genotoksitenin indüklenmesi ve ardından apoptozun başlatılması için bir katalizör olarak hareket etme potansiyeline değinmiştir (Gomathi vd., 2020). Aynı zamanda AgNP'lerin hücresel alımını takiben mitokondri ve çekirdeklerde maksimum Ag⁺ birikimi olduğu bildirilmiştir (Buttacavoli vd., 2017). Bununla birlikte, seçici olmayan AgNP'lerden kaynaklanan hedef dışı toksite potansiyeli bir endişe kaynağı olmaya devam ettiğinden, bu bulguların klinik düzeye

aktarılması belirsizliğini korumaktadır.

K-AgNP'nin hem ortam sıcaklığında hem de 4°C'de uzun süreli depolama sırasında dikkate değer bir fiziksel stabilite sergilemesi dikkat çekicidir. Bu yüksek stabilite, nanopartiküller arasındaki etkileşimleri en aza indiren ve agregat oluşumunu engelleyen kitosan ile kaplamanın sağladığı yüksek zeta potansiyeline bağlanabilir (Kaufman vd., 2007). K-AgNP'nin oda sıcaklığında uzun süreli depolamadan sonra stabilitesini ve fizikokimyasal özelliklerini koruyabilmesi, nanomedikallerin çoğunda eksik olan bir özellik olan klinik potansiyellerini artıran önemli bir avantajdır (Younis vd., 2022).

Daha önce belirtildiği gibi Dox, DNA ile ilişkili enzimlere bağlanarak işlev görür ve DNA'nın çift sarmal yapısına nüfuz edebilir. Dox, topoizomeras I ve II enzimleri gibi çoklu moleküler hedeflere bağlanarak, anti-proliferasyon ile birlikte ortaya çıkan ve DNA hasarı ile sonuçlanan çeşitli sitotoksik etkilere neden olur. Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü süreci, DNA hasarının onarımı başarısız olduğunda ve hücre proliferasyonu G1 ve G2 fazlarında durdurulduğunda başlatılır. Ayrıca, Dox'un hem DNA hem de RNA polimerazı inhibe ederek DNA'ya interkalate olduğu ve sonuçta DNA replikasyonunu ve RNA transkripsiyonunu durdurduğu bilinmektedir (Gewirtz vd., 1999).

Dox'un etkileri arasında serbest radikallerin üretimi de yer alır ve bu da daha fazla DNA hasarına yol açabilir. Ayrıca, Dox'un makromolekül üretimini inhibe ettiği, DNA'yı ayrıştırdığı veya ayırdığı ve alkilasyonu artırdığı gösterilmiştir. DOX'un sadece nükleer DNA'nın değil aynı zamanda mitokondriyal DNA'nın yapısına da katılabildiği gösterilmiştir. Ayrıca Dox, plazma proteinlerine bağlanarak hücre membranını doğrudan etkiler ve Dox'un enzimatik elektronlarında azalmaya neden olur. Bu süreç, hidroksil serbest radikallerinin oldukça reaktif türlerinin oluşmasıyla sonuçlanır. Bu serbest radikaller ilacın kullanımıyla ilişkili zararlı yan etkilerden sorumlu olmakla birlikte, Dox'u güçlü bir anti-kanser ilacı haline getiren aynı mekanizmalar onu çeşitli kanser türlerine karşı da etkili kılar (Ashley vd., 2009).

Kitosan kaplı gümüş nanopartiküllerin hücresel alım mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalar, bu nanopartiküllerin sitotoksik etkilerini ve hücre içi dağılımını

incelemiştir. Örneğin, kitosan kaplamanın, nanopartiküllerin hücre zarına yapışma kapasitesini artırarak endositoz sürecini hızlandırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, nanopartiküllerin yüzey yükü, hücre zarındaki negatif yüklerle etkileşime girerek hücre alımı kolaylaştırabilir. Bu nanopartiküllerin, parçalandıkları ve aktif bileşenlerini serbest bıraktıkları lizozomlara hücre içi taşınımı da gösterilmiştir (Atar vd., 2021).

Dox'un kitosan ile kaplanmış gümüş nanopartiküller ile kombinasyonu hücre canlılığı ve toksisite açısından önemli avantajlar sunmaktadır. Bu kombinasyon, Dox'un tek başına kullanımına kıyasla daha etkili bir tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir. K- AgNP'nin Dox ile birlikte kullanılması, hücre membranına gelişmiş bağlanma, kolaylaştırılmış hücre alım mekanizmaları ve hedeflenen tedavi etkinliğinin artırılması gibi çeşitli faydalar sağlar. Dox yüklü nanopartiküllerin kontrollü salınımı, toksisiteyi en aza indirerek sağlıklı hücrelere zarar verme riskini daha da azaltır (Jabar vd., 2022).

Doksorubisin, kanser tedavisinde kullanılan farmasötik bir ajandır. Dox'un oksidatif strese ek olarak mitokondriyal bozulma, apoptoz, otofaji ve fibrozis katkıda bulunan faktörler olarak tanımlanmıştır. Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK) bu süreçlerde merkezi bir oyuncu olarak tanımlanmıştır. AMPK, mitokondriyal biyogenezin düzenlenmesi, apoptozun azaltılması, otofajinin artırılması ve fibrozun azaltılması gibi mekanizmalarda yer almaktadır. Dox'un apoptotik etkisine adenozin monofosfat protein kinaz yolunun aktivasyonu aracılık etmiştir (Timm vd., 2020). K- AgNP + Dox uygulaması, apoptotik gen ekspresyonunda artış ile sonuçlanmıştır. Dox uygulaması ile K-AgNP+Dox uygulamalarının hücre apoptoz mekanizması üzerinde uyarıcı etkilerinin olduğu ve bunun 24 saatte nispeten arttığı, 48 saatlik uygulamada ise belirgin bir artışın gerçekleştiği görülmüştür. Bu etkiler nanopartikül ile yüklenmiş Dox'un Hepg2 hücre hattında etkin bir tedavi ajanı olabileceğini göstermektedir.

PI3K/mTOR/Akt yolu, hücre büyüme, farklılaşma ve hayatta kalmayı düzenleyen çok önemli bir sinyal yoludur. Kanser gibi kontrolsüz hücre büyüme ile işaretlenen hastalıklarda, bu yol sıklıkla aşırı aktive olur ve böylece kanser hücrelerinin hayatta kalmasını teşvik eder. Sonuç olarak, bu yolu hedeflemeyi amaçlayan terapötik

stratejilerin geliştirilmesi, kanser tedavisinde önemli bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmıştır. Dikkate değer bir yaklaşım, K-AgNP ile yüklenmiş Dox kombinasyonunu içerir; bu kombinasyon, kanser hücrelerinde apoptozu artırırken sağlıklı hücelere toksisiteyi en aza indirme kabiliyetiyle dikkat çekmiştir ve bu spesifik yolu modüle ederek başarılmıştır. Dox'un klasik mekanizmaları arasında DNA'ya bağlanarak hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozun tetiklenmesi yer alır. Bununla birlikte, Dox'un tek başına uygulanması sağlıklı hücrelerde ciddi yan etkilere neden olma potansiyeline sahiptir (Xia vd., 2015).

Bu bağlamda, K-AgNP kullanımı çok önemli bir unsur olarak ortaya çıkmaktadır. Kitosan kaplamanın sağladığı biyouyumluluk ve nanopartiküllerin sağladığı hedefleme kapasitesi Dox'un terapötik indeksini artırmaktadır. K-AgNP, Dox'un hücresel alımını artırarak kanser hücrelerinde birikmesini kolaylaştırır ve PI3K/mTOR/Akt yolunu hedefleyerek yaşam döngülerini etkiler. Sonuç olarak, sağlıklı hücreler minimum düzeyde etkilenirken, kanser hücrelerine daha kesin ve etkili bir tedavi uygulanmaktadır. Araştırma bulguları, K-AgNP+Dox kombinasyonunun diğer kanser tedavi rejimlerine göre daha etkili olduğunu göstermektedir. Bu kombinasyonun apoptotik mekanizmaları tetiklediği ve 24 saatlik uygulamadan sonra gen ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu etkiler 48 saatlik uygulamada daha da artmış ve kanser hücrelerinin hayatta kalma oranını önemli ölçüde azaltmıştır. Bu bulgular, K-AgNP+Dox kombinasyonunun tek başına Dox kullanımına kıyasla daha etkili bir tedavi olduğunu göstermektedir. Dox yüklü nanopartiküllerin kontrollü salımının, ilacın etkisini uzun bir süre boyunca sürdürmesini sağlayarak hedefe yönelik tedavi potansiyelini artırdığı gösterilmiştir (Bhanumathi vd., 2018). Bu çalışma, nanoteknolojinin antikanser tedaviyi hedeflemek için geliştirmekte olan bir strateji olduğu hipotezini ortaya koymaktadır. Elde edilen sonuçlar, K-AgNP'ye Dox yüklenmesinin HCC'li hücrelerde apoptozu yol açtığını göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız, K-AgNP ile yüklenmiş Dox tedavisinin, karaciğer kanseri hücre hattı (HEPG2) üzerinde güçlü antiproliferatif ve proapoptotik etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur.

- K-AgNP ile yüklenmiş Dox, HEPG2 hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı derecede baskılamıştır.
- Bu tedavi, karaciğer kanseri hücrelerinde apoptotik yanıtların belirgin şekilde artmasını sağlamıştır.
- K-AgNP'nin hedefe yönelik ilaç iletimi ve hücre alımı artırarak Dox'un terapötik etkinliğini önemli ölçüde iyileştirdiği görülmüştür.

Bu çalışma, K-AgNP+Dox'un fonksiyonel kaplamasının karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki terapötik performansları üzerindeki etkisini araştırmaktadır. AgNP'lerin kitosan ile kaplanması, fizikokimyasal özelliklerin artmasıyla sonuçlanmıştır. Spektroskopik analizler K-AgNP'lerin başarılı fonksiyonel kaplamasını doğrulamıştır. K-AgNP'ler, oda sıcaklığında veya 4°C'de saklandığında üç aya kadar bir süre boyunca yüksek derecede fiziksel stabilite sergilemiştir. K-AgNP'ler, normal insan hücrelerine kıyasla karaciğer kanseri hücreleri üzerinde güçlü ve seçici bir antikanser aktivitesi sergilemiş, seçici olmayan toksisite ve ilgili tümör belirteçleri üzerinde daha düşük etkilerle sonuçlanan önemli bir inhibitör etki göstermiştir. Bu çalışmada sunulan terapötik yöntem yeni, ölçeklenebilir, istikrarlı, ekonomik ve seçicidir. Mevcut kemoterapötiklerin eksikliklerinin üstesinden gelme potansiyeli ile karaciğer kanseri tedavisinde potansiyel klinik uygulamalar için oldukça umut vericidir. Araştırma programının bir sonraki aşaması, in vivo uygulanabilirliğini değerlendirmek olacaktır.

Öneriler

Bu bulgular doğrultusunda, K-AgNP'nin karaciğer kanser hücreleri üzerindeki terapötik etkinliğinin in vivo modellerde detaylı olarak incelenmesi önerilmektedir. Bu tür çalışmalar, klinik uygulamalara geçiş sürecinde daha kapsamlı ve güvenilir veriler sunarken, nanoteknoloji destekli ilaç taşıma sistemleri üzerine gelecekteki araştırmalar için de temel oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Albeladi, S. S. R., Malik, M. A., and Al-thabaiti, S. A. 2020. Facile biofabrication of silver nanoparticles using *Salvia officinalis* leaf extract and its catalytic activity towards Congo red dye degradation. *Journal of Materials Research and Technology*, 9(5), 10031-10044.
- Allen TM and Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*. 2004;303(5665):1818–1822. doi: 10.1126/science.1095833.
- Alsulays, B. B., Aodah, A. H., Ahmed, M. M., and Anwer, M. K. 2024. Preparation and Evaluation of Chitosan Coated PLGA Nanoparticles Encapsulating Ivosidenib with Enhanced Cytotoxicity Against Human Liver Cancer Cells. *International Journal of Nanomedicine*, 3461-3473.
- Ashley, N. and Poulton, J. 2009. Mitochondrial DNA is a direct target of anticancer anthracycline drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378 (3), 450-455.
- Atar, H., ve Çölgeçen, H. 2021. Gümüş Nanopartiküllerinin Biyosentezi ve Biyosensör Materyali Olarak Kullanımı. *Commagene Journal of Biology*, 5(2), 214-221.
- Ateş, M., Yılmaz, E., Kar, B., ve Durukan, İ. K. 2021. Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles and Coating with Chitosan. *Politeknik Dergisi*, 24(4), 1401-1408.
- Azadpour, A., Hajrasouliha, S., and Khaleghi, S. 2022. Green synthesized-silver nanoparticles coated with targeted chitosan nanoparticles for smart drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 74, 103554.
- Azhar, N. A., Bakar, S. A. A., Ngali, S. H., and Ahmad, N. H. 2023. Cellular Uptake of *Catharanthus roseus*-Silver Nanoparticles in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. *Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences*, 19(4).
- Berridge M ve Tan A. 1993. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromürün (MTT) Hücresel İndirgenmesinin Karakterizasyonu: Hücre Altı Lokalizasyon, Substrat Bağımlılığı ve MTT İndirgemesinde Mitokondriyal Elektron Taşımalarının Katılımı. *Biyokimya ve Biyofizik Arşivleri*. 303(2):474-482.
- Besinis A., De Peralta T., Tredwin C.J. and Handy R.D., ‘‘Review of Nanomaterials in Dentistry: Interactions With the Oral Microenvironment, Clinical Applications, Hazards, and Benefits’’, *ACS nano*. 9, 2255-2289, 2015.
- Bhanumathi, R., Manivannan, M., Thangaraj, R., and Kannan, S. 2018. Drug-carrying capacity and anticancer effect of the folic acid-and berberine-loaded silver nanomaterial to regulate the AKT-ERK pathway in breast cancer. *ACS omega*, 3(7), 8317-8328.

- Buttacavoli M, Albanese NN, Di Cara G, Alduina R, Faleri C and Gallo M, et al. Anticancer activity of biogenerated silver nanoparticles: an integrated proteomic investigation. *Oncotarget*. 2017;9:9685–705.
- D.W. Brett Ostomy Wound Manag., 52 2006, pp. 34-41
- Dara, P. K., Mahadevan, R., Digita, P. A., Visnuvinayagam, S., Kumar, L. R., Mathew, S., ... and Anandan, R. J. S. A. S. 2020. Synthesis and biochemical characterization of silver nanoparticles grafted chitosan (Chi-Ag-NPs): In vitro studies on antioxidant and antibacterial applications. *SN Applied Sciences*, 2, 1-12.
- Donato, M. T., Tolosa, L., and Gómez-Lechón, M. J. 2014. Culture and functional characterization of human hepatoma HEPG2 cells. *Methods in Molecular Biology*, 77–93.
- F Jemal A , Bray F , Center MM , Ferlay J , Ward E and Forman D. 2011. Küresel kanser istatistikleri. *CA Cancer J Clin* 6: 69 –90.
- Faedmaleki, F., Shirazi, F. H., Salarian, A. A., Ashtiani, H. A., and Rastegar, H. 2014. Toxicity effect of silver nanoparticles on mice liver primary cell culture and HepG2 cell line. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 13(1), 235.
- Fong ZV and Tanabe KK. 2014. The clinical management of hepatocellular carcinoma in the United States, Europe, and Asia: A comprehensive and evidence-based comparison and review. *Cancer* 120: 2824–2838.
- Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. Vol. 7, *International Journal of Nanomedicine*. Dove Press; 2012 [cited 2022 Sep 18]. p. 5577–91. Available from: /pmc/articles/ PMC3493258/
- Gewirtz, D.A. 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57 (7), 727-741.
- Ghozali SZ and Vuanghao L NA. Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles using Catharanthus roseus Leaf Extract and its Proliferative Effects on Cancer Cell Lines. *J Nanomed Nanotechnol*. 2015;06(04):1–10.
- Gomathi AC, Xavier Rajarathinam SR, Mohammed Sadiq A and Rajeshkumar S. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized using aqueous fruit shell extract of Tamarindus indica on MCF-7 human breast cancer cell line. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020.
- Gomes HIO, Martins CSM and Prior JAV. Silver nanoparticles as carriers of anticancer drugs for efficient target treatment of cancer cells. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11:964.
- Govindan, S., Nivethaa, E. A. K., Saravanan, R., Narayanan, V., and Stephen, A. (2012). Synthesis and characterization of chitosan–silver nanocomposite. *Applied Nanoscience*, 2, 299-303.

- Hermosilla, E., Díaz, M., Vera, J., Contreras, M. J., Leal, K., Salazar, R., ... and Rubilar, O. 2023. Synthesis of Antimicrobial Chitosan-Silver Nanoparticles Mediated by Reusable Chitosan Fungal Beads. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2318.
- Illum L , Farraj N F and Davis S S . Chitosan as a Novel Nasal Delivery System for
- J.W. Rhim, S.I. Hong, H.M. Park and P.K.W. Ng *J. Agric. Food Chem.*, 54 2006, pp. 5814-5822
- Jabar, M. S., and AL-Shammaree, S. A. W. 2022. Doxorubicin Immobilization on Chitosan-modified Silver Nanoparticles as a Drug Delivery Method for Effective Anticancer Treatment. *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 8(2).
- Ji, Y. B., Gao, S. Y., Ji, C. F., and Zou, X. 2008. Induction of apoptosis in HepG2 cells by solanine and Bcl-2 protein. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(2), 194-202.
- Jin X.X. and Wang J.T., *J. Bai Carbohydr. Res.*, 344 2009, pp. 825-829.
- Jing, X., Zhang, Y., Li, M., Zuo, X., Fan, C., and Zheng, J. 2023. Surface engineering of colloidal nanoparticles. *Materials Horizons*, 10(4), 1185-1209.
- Johnson-Arbor K and Dubey R. Doxorubicin. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2025.
- Jyoti K., Baunthiyal M. and Singh A., “Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics”, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 9, 217-227 2016.
- Jyoti K., Baunthiyal M. and Singh A., “Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics”, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 9, 217-227 2016.
- Kanwar, R., Fatima, R., Kanwar, R., Javid, M. T., Muhammad, U. W., Ashraf, Z., and Khalid, A. 2021. 2. Biological, physical and chemical synthesis of silver nanoparticles and their non-toxic bio-chemical application: A brief review. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 11(2), 421-438.
- Kara, A., ve Özçelik, B. 2024. Green Synthesis of Chitosan-Coated Silver Nanoparticles (Ch-AgNPs): Harnessing Nature for Sustainable and Safe Nanomaterial Production. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(3), 1319-1341.
- Kashid Sahebrao B., “ Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Gliricidia sepium* (Jacq.)”, *Current Nanoscience*. 5, 117-122 2009.
- Kaufman ED, Belyea J, Johnson MC, Nicholson ZM, Ricks JL and Shah PK, et al. Probing protein adsorption onto mercaptoundecanoic acid stabilized gold nanoparticles and surfaces by quartz crystal microbalance and zeta-potential measurements. *Langmuir ACS J Surf Colloids*. 2007.

- Khalid, A. and Tariq Javid, M.; Biological, A.K. Biological, Physical and Chemical Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Non-Toxic Bio-Chemical Application: A Brief Review. *Pure Appl. Biol.* 2022, 11, 421–438.
- Khawar IA, Kim JH and Kuh HJ. Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment. *J Control Release.* 2015;201:78–89.
- Khorrami S, Zarrabi A, Khaleghi M, Danaei M and Mozafari MR. Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. *Int J Nanomedicine*, 2018. 2020 Sep 1;13:8013–24. Available from: /pmc/articles/ PMC6267361
- Koleini N, Nickel BE, Edel AL, Fandrich RR, Ravandi A and Kardami E. Oxidized phospholipids in Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Chem Biol Interact.* 2019 Apr 25; 303:35-39
- Kruger, N. J. 2009. The Bradford method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, 17-24.
- Kulik, L., and El-Serag, H. B. 2019. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 156(2), 477-491.
- Kumar-Krishnan, S., Prokhorov, E., Hernández-Iturriaga, M., Mota-Morales, J. D. and Lan, S. F., Safiejko-Mrocza, B., & Starly, B. 2010. Long-term cultivation of HepG2 liver cells encapsulated in alginate hydrogels: a study of cell viability, morphology and drug metabolism. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1314-1323.
- Lee H.J., Lee S.G., Oh E.J., Chung H.Y., Han S.I., Kim E.J., Seo S.Y., Ghim H.D., Yeum J.H. and Choi J.H., ‘Antimicrobial Polyethyleneimine-Silver Nanoparticles in a Stable Colloidal Dispersion’, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 88, 505-511 2011.
- Liu X., Huang H., Liu G., Zhou W., Chen Y., Jin Q. and Ji J., ‘Multidentate zwitterionic chitosan oligosaccharide modified gold nanoparticles: stability, biocompatibility and cell interactions’, *Nanoscale*. 5, 3982-3991 2013
- Liu, C., Chen, K., and Chen, P. 2015c). Treatment of liver cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(9), a021535.
- Lou X.W., Yuan, C.L. and Archer L.A. *Chem. Mater.*, 18 2006, pp. 3921-3923
- Loutfy SA, Al-Ansary NA, Abdel-Ghani NT, Hamed AR, Mohamed MB and Craik JD, et al. Antiproliferative activities of metallic nanoparticles in an in vitro breast cancer model. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2015;16(14):6039–46. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.14.6039.
- Loutfy, S. A., El-Din, H. M. A., Elberry, M. H., Allam, N. G., Hasanin, M. T. M., and Abdellah, A. M. 2016. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(3), 035008.

- M. Chen, L.Y. Wang, J.T. Han, J.Y. Zhang, Z.Y. Li, D.J. and Qian J. *Phys. Chem. B*, 110 2006, pp. 11224-11231
- Maduraiveeran G, Sasidharan M and Ganesan V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. Vol. 103, *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier Ltd; 2018. p. 113–29.
- Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Koikeguchi, S., Petelin, M. and Takashiba, S. 2003. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 39(1), 81-86.
- Meléndrez M.F., Cárdenas G. and Arbiol J., ‘‘ Synthesis and characterization of gallium colloidal nanoparticles’’, *Journal of Colloid and Interface Science*. 346, 279-287 2010.
- Meredith, A. M., & Dass, C. R. (2016). Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(6), 729-741.
- Mishra, R. 2009. Biological evaluation of novel peptidic vectors for transmembrane delivery of intracellularly targeted probes for molecular imaging (Doctoral dissertation, Universität Tübingen).
- Mohamed, N. 2020. Synthesis of hybrid chitosan silver nanoparticles loaded with doxorubicin with promising anti-cancer activity. *BioNanoScience*, 10(3), 758-765.
- Nasr, M., Kira, A. Y., Saber, S., Essa, E. A., and El-Gizawy, S. A. 2023. Lactosylated chitosan nanoparticles potentiate the anticancer effects of telmisartan in vitro and in a N-Nitrosodiethylamine-Induced mice model of hepatocellular carcinoma. *Molecular Pharmaceutics*, 20(9), 4758-4769.
- Patra, S.; Mukherjee, S.; Barui, A.K.; Ganguly, A.; Sreedhar, B. and Patra, C.R. Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. *Mater. Sci.* **2015**, 53, 298–309.
- Peptide Drugs[J]. *Pharmaceutical Research* (New York), 1994, 11(8):1186-1189.
- Pérez-Herrero E and Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;93:52–79.
- Radu, E. R., Semenescu, A., and Voicu, S. I. 2022. Recent advances in stimuli-responsive doxorubicin delivery systems for liver cancer therapy. *Polymers*, 14(23), 5249.
- Ramteke C., Chakrabarti T., Sarangi B.K. and Pandey R.A., ‘‘Synthesis of Silver Nanoparticles from the Aqueous Extract of Leaves of *Ocimum sanctum* for Enhanced Antibacterial Activity’’, *Journal of chemistry*, Article ID 278925, 2013.

- Raut Rajesh W., Lakkakula Jaya R., Kolekar Niranjana S., Mendhulkar Vijay D., and Rhim, J. W., Wang, L. F., and Hong, S. I. 2013. Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 327-335.
- Salama, H., Zekri, A. R., Zern, M., Bahnassy, A., Loutfy, S., Shalaby, S. and Huttinger, E. 2010. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in 48 patients with end-stage chronic liver diseases. *Cell transplantation*, 19(11), 1475-1486.
- Shahryari, F., Rabiei, Z. and Sadighian S. Antibacterial Activity of Synthesized Silver Nanoparticles by Sumac Aqueous Extract and Silver-Chitosan Nanocomposite against *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Plant Pathol.* 2020, 102, 469–475.
- Sukumar, K., Bharathi, M., Hirad, A. H., Alarfaj, A. A., Hussein-Al-Ali, S. H., and Surya, P. Development of Chitosan-Coated Graphene Oxide and Iron Oxide Nanocomposites for Targeted Delivery of Camptothecin to Liver Cancer Cells. *Chemistry & Biodiversity*, e202401817.
- Tan, E. Y., Danpanichkul, P., Yong, J. N., Yu, Z., Tan, D. J. H., Lim, W. H. and Huang, D. Q. 2024. Liver cancer in 2021: Global burden of disease study. *Journal of Hepatology*.
- Timm, K. N. and Tyler, D. J. 2020. The role of AMPK activation for cardioprotection in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cardiovascular drugs and therapy*, 34(2), 255-269.
- Vázquez-Lepe, M., Kovalenko, Y. and Luna-Bárcenas, G. 2015. Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. *European Polymer Journal*, 67, 242-251.
- Venkatesan J, Lee JY, Kang DS, Anil S, Kim SK, Shim MS and Kim DG 2017 Antimicrobial and anticancer activities of porous chitosan-alginate biosynthesized silver nanoparticles. *Int J Biol Macromol* 98:515–525
- Vieira DB and Gamarra LF. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. *Einstein (Sao Paulo)*. 2016 Jan-Mar;14(1):99-103. doi: 10.1590/S1679-45082016RB3475. PMID: 27074238; PMCID: PMC4872924.
- Vitale, A., Angelico, R., Sensi, B., Lai, Q., Kauffmann, E., Scalera, I. and D'Amico, F. 2024. What is the role of minimally invasive liver surgery in treating patients with hepatocellular carcinoma on cirrhosis?. *Cancers*, 16(5), 966.
- Wang, F., Chen, Z., Wang, Y., Ma, C., Bi, L., Song, M. and Jiang, G. 2022. Silver nanoparticles induce apoptosis in HepG2 cells through particle-specific effects on mitochondria. *Environmental science & technology*, 56(9), 5706-5713.
- Wei, D., Sun, W., Qian, W., Ye, Y. and Ma, X. 2009. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate research*, 344(17), 2375-2382.

- Weng, J., Tong, H. H. and Chow, S. F. 2020. In vitro release study of the polymeric drug nanoparticles: development and validation of a novel method. *Pharmaceutics*, 12(8), 732.
- Wu, P., Wang, X., Yin, M., Zhu, W., Chen, Z., Zhang, Y. and Zhu, Q. 2024. ULK1 Mediated Autophagy-Promoting Effects of Rutin-Loaded Chitosan Nanoparticles Contribute to the Activation of NF- κ B Signaling Besides Inhibiting EMT in Hep3B Hepatoma Cells. *International Journal of Nanomedicine*, 4465-4493
- Xia, P. and Xu, X. Y. 2015. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *American journal of cancer research*, 5(5), 1602.
- Younis MA, Tawfeek HM, Abdellatif AAH, Abdel-Aleem JA and Harashima H. Clinical translation of nanomedicines: Challenges, opportunities, and keys. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022.
- Yu AF, Chan AT and Steingart RM. Cardiac Magnetic Resonance and Cardio-Oncology: Does T2 Signal the End of Anthracycline Cardiotoxicity? *J Am Coll Cardiol*. 2019 Feb 26;73(7):792-794
- Zeilinger, K., Freyer, N., Damm, G., Seehofer, D. and Knöspel, F. 2016. Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Experimental Biology and Medicine*, 241(15), 1684–1698.
- Zhonghao, J. and Fan, Y. 2024. New advances in the treatment of intermediate and advanced hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 14, 1430991.