

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERLE ETKİLEŞEN BERBERİN, HONOKİOL VE
SİRREAL2 MOLEKÜLLERİNİN ANTI-KANSER ÖZELLİKLERİNİN
KANSER HÜCRE HATLARINDA ARAŞTIRILMASI**

**Meryem İÇEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Özkan ÖZDEN**

**HAZİRAN-2022
KARS**



T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI



**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERLE ETKİLEŞEN BERBERİN, HONOKİOL VE
SİRREAL2 MOLEKÜLLERİNİN ANTI-KANSER ÖZELLİKLERİNİN
KANSER HÜCRE HATLARINDA ARAŞTIRILMASI**

Meryem İÇEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Özkan ÖZDEN

Bu tez çalışması 2210-C burs programı dâhilinde TÜBİTAK BİDEB tarafından desteklenmiştir.

Bu tez KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Kordinatörlüğü tarafından 2021-FM-37 nolu proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Özkan ÖZDEN 120C117 proje numaralı TÜBİTAK BİDEB 2247-A Ulusal Lider Araştırmacı programıyla desteklenmiştir.

HAZİRAN-2022

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı Öğrencisi Meryem İÇEN'in Doç. Dr. Özkan ÖZDEN
danışmanlığında Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Gümüş Nanopartiküllerle
Etkileşen Berberin, Honokiol ve SirReal2 Moleküllerinin Anti-Kanser Özelliklerinin
Kanser Hücre Hatlarında Araştırılması" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı
sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca
değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

.. / .. / 20

	Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	:	
Üye	:	
Üye	:	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun. / / 20. .gün ve.
/ Sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fikret AKDENİZ
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

Bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza
Öğrencinin Adı Soyadı
Tarih

ÖZET

(Yüksek Lisans Tezi)

GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERLE ETKİLEŞEN BERBERİN, HONOKİOL VE SİRREAL2 MOLEKÜLLERİNİN KANSER HÜCRE HATLARINDA ARAŞTIRILMASI

Meryem İÇEN

Kafkas Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özkan ÖZDEN

Kanser dünya genelinde insanların ölümüne neden olan hem fizyolojik hem de psikolojik olarak insanı olumsuz etkileyen hastalık grubu olarak görülmektedir. Bu hastalığa karşı çeşitli tedavi yöntemleri olmasına rağmen gösterdikleri yan etki, maliyet gibi faktörler tedavileri olumsuz etkilemektedir. Son zamanlarda nanopartiküller, yapıları ve sahip oldukları çeşitli özellikler sayesinde birbirinden farklı alanlarda olduğu gibi kanser çalışmalarında da görülmektedir. Metabolizma, üreme, oksidatif stres, kardiyovasküler, nörodejeneratif gibi fizyolojik olaylar ve yaşlanmaya bağlı olan hastalıklarda aktif rol oynayan sirtuin (SIRT) proteinlerinin de kanser tedavileri için önemli katkılar sağlayabildiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada biyosentez yöntemi kullanılarak elde edilen düşük maliyetli, verimli, çevreye faydalı nanopartiküllerin çeşitli moleküllerle etkileştirilmesi sağlanılarak kolon ve meme kanserine karşı göstermiş olduğu etkileri incelemeyi potansiyel ilaç olabilme durumlarını araştırmayı amaçlamaktayız.

Çevreci, düşük maliyetli olarak bilinen yeşil sentez yöntemiyle gümüş nanopartikül (AgNP) eldesi sağlandı. Elde edilen AgNP, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi analizi (UV-vis), taramalı elektron

mikroskobu (SEM) ve enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi (EDX) yöntemleri kullanılarak karakterizasyon işlemleriyle tanımlandı. Bu çalışmada eski zamanlarda çeşitli hastalıklara karşı ilaç olarak kullanımı görülen Honokiol ve Berberin, SIRT inhibitörü olarak bilinen SirReal2 molekülleri ile elde edilen gümüş nanopartiküllerin etkileştirilmesi sağlanarak 48 saat uygulama süresince meme ve kolon kanserine karşı tekrarlı hücre canlılığı testleri yapıldı. Western blot analizi yapılarak PARP, SIRT2, SIRT3, LDHA ve PDH protein seviyelerine bakıldı. İlaveten akridin oranj boyama ile de apoptoz düzeyleri incelendi. Araştırmamıza göre Berberin (100 µM) dozu, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında canlılığı ~%74 oranında ($p<0,001$) düşürmektedir. Berberinin AgNP ile etkileştirilmiş hali ise (BAgNP), ~%88 ($p<0,001$) düzeyinde hücre sağkalımını şiddetli bir şekilde azalttığı görülmüştür. DLD-1 kolon kanseri hücresinde ise Honokiolün AgNP ile etkileştirilmiş hali (HAgNP), (25 µM) dozun, canlılığı ~%18 miktarında ($p<0,05$) azaltmıştır. Diğer kolon kanseri HCT-116 hücre hattında ise Honokiol (25 µM) canlılığı ~%43 ($p<0,001$), HAgNP (25 µM) ise ~%71 ($p<0,001$) seviyesinde kuvvetli düşüş göstererek hücre sağ kalımında önemli bir etki sağladığı görülmekte ve ayrıca hücrelere olan bu kuvvetli etkiler hücre morfolojileri ile de teyit edilmiştir.

DLD-1 protein ekspresyon bulgularına göre nanopartiküllerle etkileştirilmiş hallerinde cleaved PARP protein miktarlarında artış görüldü. SirReal2'in AgNP ile etkileştirilmiş hali (SAgNP) PDH proteininin miktarını arttırmıştır. HAgNP ve Berberin gruplarında SIRT3 proteinleri için kontrole kıyasla artışın olduğu görülmüştür. MDA-MB-231'in protein ekspresyon bulgularına göre cleaved PARP proteini için Berberine kıyasla BAgNP'de; SirReal2'ye göre de SAgNP'de cleaved PARP proteininde artış görülmektedir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre Berberin, Honokiol ve SirReal2 moleküllerin gümüş nanopartiküllerle kombinasyonu meme ve kolon kanserlerine karşı önemli derecede anti kanser özelliği taşıdığı görülmüştür. Bundan hareketle moleküllerin nanopartiküllerle etkileştirilmiş halleri kolon ve meme kanseri için potansiyel anti kanser ilaç olabilir düşüncesini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Nanopartiküller, AgNP, SIRT, Honokiol, Berberin, SirReal2

2022, 91 Sayfa



ABSTRACT

(M. Sc. Thesis)

INVESTIGATION OF BERBERINE, HONOKIOL AND SIRREAL2 MOLECULES
INTERACTING WITH SILVER NANOPARTICLES IN CANCER CELL LINES

Meryem İÇEN

Kafkas University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özkan ÖZDEN

Cancer is seen as a group of diseases that cause the death of people around the world and negatively affect people both physiologically and psychologically. Although there are various treatment methods against this disease, factors such as side effects and cost affect the treatments negatively. Recently, nanoparticles have been seen in cancer studies as well as in different fields, thanks to their structures and various properties. It has been reported that sirtuin (SIRT) proteins, which play an active role in diseases related to aging and physiological events such as metabolism, reproduction, oxidative stress, cardiovascular, neurodegenerative, can also make important contributions to cancer treatments. In this study, we aim to investigate the effects of low-cost, efficient, environmentally beneficial nanoparticles obtained by using the biosynthesis method against colon and breast cancer by activating them with various molecules and to investigate their potential drug status.

Silver nanoparticle (AgNP) was obtained by the green synthesis method known as environmentally friendly and low cost. The resulting AgNP was identified by characterization processes using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), visible spectroscopy analysis (UV-vis), scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) methods. In this study, Honokiol and Berberine,

which were used as drugs against various diseases in the past, and silver nanoparticles obtained with SirReal2 molecules known as SIRT inhibitors were activated, and repeated cell viability tests were performed against breast and colon cancer during 48 hours of application. Western blot analysis was performed and protein levels such as PARP, SIRT2, SIRT3, LDHA, PDH were checked. In addition, apoptosis levels were examined by acridine orange staining. According to our research, Berberine (100 μ M) dose reduces the viability of MDA-MB-231 breast cancer cell line by ~74% ($p < 0.001$). The AgNP-activated form of Berberine (BAgNP), on the other hand, was found to severely reduce cell survival by ~88% ($p < 0.001$). In DLD-1 colon cancer cell, the AgNP-activated form of Honokiol (HAgNP) reduced the viability of the (25 μ M) dose by ~18% ($p < 0.05$). In the other colon cancer HCT-116 cell line, it is seen that Honokiol (25 μ M) viability decreased by ~43% ($p < 0.001$) and HAgNP (25 μ M) decreased by ~71% ($p < 0.001$), thus providing a significant effect on cell survival. and also these strong effects on cells were confirmed by cell morphologies.

According to the DLD-1 protein expression findings, the amount of cleaved PARP protein increased when interacted with nanoparticles. AgNP-activated version of SirReal2 (SAgNP) increased the amount of PDH protein. There was an increase for SIRT3 proteins in the HAgNP and Berberine groups compared to the control. According to the protein expression findings of MDA-MB-231, there was an increase in cleaved PARP protein in BAgNP compared to Berberine for cleaved PARP protein and in SAgNP according to SirReal2.

According to the results we obtained, it was observed that the combination of Berberine, Honokiol and SirReal2 molecules with silver nanoparticles has significant anti-cancer properties against breast and colon cancers. From this point of view, the interaction of molecules with nanoparticles has revealed the idea that it can be a potential anti-cancer drug for colon and breast cancer.

Key Words: Cancer, Nanoparticles, AgNP, SIRT, Honokiol, Berberine, SirReal2

2022, 91 pages



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasını 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı dahilinde 1649B022011388 proje başvuru numarası ile destekleyen TÜBİTAK BİDEB'e, ayrıca 2021-FM-37 nolu proje ile çalışmanın malzeme ihtiyacı için destek sağlayan Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığına teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve lisansüstü eğitimlerimde desteklerini çokça gördüğüm bilgi ve birikimleri ile bana rehber olan tecrübelerinden faydalandığım çok kıymetli ve saygıdeğer hocam Doç. Dr. Özkan Özden'e tüm içtenliğimle teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Biyomühendislik Anabilim Dalında bulunan başta bütün hocalarım olmak üzere bu süreçte bana destek olan yardımlarını esirgemeyen saygı değer hocam Doç. Dr. Ali Yeşildağ'a tüm içtenliğimle teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, beni yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Barış Yıldız'a tüm içtenliğimle teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Dr. Öğr. Üyesi Cem Öziç'e, Doç. Dr. Musa Erdoğan'a, Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Arslan Omar'a, Arş. Gör. Muhammed Çil'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca laboratuvar arkadaşlarım Ramazan Demirel'e, Cansu Beytur'a, Damla Aydın'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman destekleri ve yardımlarını esirgemeyen üzerimde büyük emekleri olan çok kıymetli ablam Öğretim Görevlisi Elif İçen Kükürt ve değerli eşi abim Arş. Gör. Dr. Abdulsamed Kükürt'e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan ablam Yüksek Ziraat Mühendis Esra İçen'e, bu hayatta varlıkları ve destekleri ile hep arkamda olan beni yalnız bırakmayan başta değerli babam, annem ve abim olmak üzere tüm aile üyelerime saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Meryem İÇEN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	IV
ABSTRACT	VII
ÖNSÖZ	X
İÇİNDEKİLER	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
TABLolar DİZİNİ	XVI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XVII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Kanser	2
1.2.1. Kolon Kanseri	4
1.2.2. Meme Kanseri	5
1.3. Nanopartiküller	7
1.3.1. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları	7
1.4. Yeşil Sentezin Önemi	9
1.4.1. Nar Bitkisi (<i>Punica granatum L.</i>)	11
1.5. Gümüş Nanopartiküller	12
1.6. Berberin, Honokiol ve SirReal2'nin Biyolojik Aktiviteleri	14
1.7. Sirtuin Proteinleri	17
2. MATERYAL VE METHOD	19
2.1. Nar Kabuklarından Bitkisel Özüt Oluşturma	19
2.1.1. Gümüş NP'lerin Elde Edilmesi	19
2.1.2. Gümüş NP'lerin Karakterizasyonu	20

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Stok ve Nanopartiküllerle Etkileştirilen Çözeltilerin Hazırlanışı	20
2.2. Hücre Kültürü İşlemleri	21
2.3. Protein Homejenizasyon İşlemleri	24
2.4. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Tayini	24
2.5. Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ve Western Blotlama	25
2.6. Akridin Orange ile Apoptozun Belirlenmesi	28
3. BULGULAR	29
3.1. Nanopartikül Eldesi ve Karakterizasyon Bulguları	29
3.2. Nanopartiküllerle Etkileştirilmiş Moleküllerin Hücre Sağkalım Bulguları	36
3.3. Nanopartiküllerle Etkileştirilmiş Moleküllerin Protein Ekspresyon Bulguları	47
3.4. Apoptoz Bulguları	49
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
5. KAYNAKLAR	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1: Kansere özgü özellikler	2
Şekil 1.2: Adenomatöz polip	4
Şekil 1.3: Çok fonksiyonlu nanoparçacıkların şematik gösterimi ve biyomedikal uygulamaları	8
Şekil 1.4: Nanopartiküllerin geleneksel sentez yöntemleri	9
Şekil 1.5: Kansere terapötik uygulamasından esinlenen çeşitli tipte nanoparçacık sentezinin tipik bir yönteminin şematik gösterimi ve bitki kullanımı	10
Şekil 1.6: Nar bitkisi	11
Şekil 1.7: Gümüş nanopartiküllerin çeşitli uygulamaları	13
Şekil 1.8: Berberinin yapısı	15
Şekil 1.9: Honokiolün yapısı	15
Şekil 1.10: SirReal2 yapısı	16
Şekil 1.11: SIRT proteinlerinin hücre içinde sıklıkla bulunduğu yerler	17
Şekil 2.1: Nar kabuğundan gümüş nanopartikül eldesi	19
Şekil 2.2: Nanopartiküllerle moleküllerin karanlık ortamda etkinleştirilmesi	21
Şekil 2.3: Sıvı azot tankından hücrelerin çıkarılması	21
Şekil 2.4: Hücrelerin toplanması	24
Şekil 2.5: Bradford Yöntemi İle Protein Miktar Tayini	25
Şekil 2.6: Running işlemi	26
Şekil 2.7: Transfer işlemi	27
Şekil 2.8: Çalışmada kullanılan tamponlar ve içerikleri	28
Şekil 3.1: Biyosentez yöntemiyle elde edilen gümüş nanopartikülün görüntüsü	29
Şekil 3.2: Nar Kabuğu Ekstraktı FT-IR görüntüsü	30
Şekil 3.3: Nar Kabuğundan Sentezlenen AgNP FT-IR görüntüsü	30
Şekil 3.4: DMSO'da çözünen Honokiolün FT-IR görüntüsü	30
Şekil 3.5: DMSO'da çözünen Berberinin FT-IR görüntüsü	31
Şekil 3.6: DMSO'da çözünen SirReal2'nin FT-IR görüntüsü	31
Şekil 3.7: HAgNP FT-IR görüntüsü	31

Şekil 3.8:	BAGNP FT-IR görüntüsü	32
Şekil 3.9:	SAGNP FT-IR görüntüsü	32
Şekil 3.10:	Nar ekstraktı UV-vis görüntüsü	33
Şekil 3.11:	PAGNP UV-vis görüntüsü	33
Şekil 3.12:	Moleküller ve AgNP ile etkileştirilmiş halleri UV-vis görüntüsü	34
Şekil 3.13:	AgNP ile etkileştirilmiş halleri UV-vis görüntüsü	34
Şekil 3.14:	Biyosentez yöntemiyle elde edilen gümüş nanopartikülün EDX görüntüsü	35
Şekil 3.15:	Nanopartiküllerin SEM görüntüsü	35
Şekil 3.16:	Nanopartiküllerin boyut analiz grafiği	36
Şekil 3.17:	Nanopartiküllerle etkileşen moleküllerin HUVEC hücre hattında 48 saat uygulama sonrası hücre sağkalım grafiği.	36
Şekil 3.18:	HUVEC hücre hattı Berberin ve BAGNP hücre morfolojik görüntüleri	38
Şekil 3.19:	HUVEC hücre hattındaki 48 saat doz uygulama görüntüleri	38
Şekil 3.20:	Nanopartiküllerle etkileşen moleküllerin MDA-MB-231 hücre hattında 48 saat uygulama sonrası hücre sağkalım grafiği	39
Şekil 3.21:	MDA-MB-231 hücre hattındaki 48 saat doz uygulama görüntüleri.	41
Şekil 3.22:	Berberin gruplarının MDA-MB-231 hücrelerde oluşturduğu hasar görüntüsü	41
Şekil 3.23:	Nanopartiküllerle etkileşen moleküllerin HCT-116 hücre hattında 48 saat uygulama sonrası hücre sağkalım grafiği	42
Şekil 3.24:	HCT-116 hücre hattındaki 48 saat doz uygulama görüntüleri	44
Şekil 3.25:	Honokiol ve HAGNP'nin HCT-116 hücre morfolojisindeki etkileri	44
Şekil 3.26:	Nanopartiküllerle etkileşen moleküllerin DLD-1 hücre hattında 48 saat uygulama sonrası hücre sağkalım grafiği	45
Şekil 3.27:	DLD-1 hücre hattındaki 48 saat doz uygulama görüntüleri	46
Şekil 3.28:	Honokiol gruplarının DLD hücre hattındaki morfolojik etkileri	47
Şekil 3.29:	Nanopartiküllerle ile etkileştirilmiş moleküllerin DLD-1 hücre hattındaki 48 saat uygulama sonrası protein ekspresyon düzeyleri	48

- Şekil 3.30:** Nanopartiküllerle ile etkileştirilmiş moleküllerin MDA-MB-231 hücre hattındaki 48 saat uygulama sonrası protein ekspresyon düzeyleri 49
- Şekil 3.31:** Kolon kanseri hücre hattında apoptoz oluşumlarının belirtildiği mikroskop görüntüleri 50
- Şekil 3.32:** Meme kanseri hücre hattında apoptoz oluşumlarının belirtildiği mikroskop görüntüleri 51



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1:	Biyosentez ile sentezlenen gümüş nanopartiküller ve araştırıldıkları kanser türleri	14
Tablo 2.1:	Çalışmada kullanılan moleküllerin ilk doz belirleme uygulaması	22
Tablo 2.2:	Çalışmadaki moleküllerin konsantrasyonları, uygulama zamanı ve kullanılan hücre hatları	23
Tablo 2.3:	BSA standart serileri	25



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AgNP	: Gümüş nanopartikül
APC	: Adenomatöz polipozis koli
BAGNP	: AgNP ile etkileştirilmiş Berberin molekülü
A2780	: Yumurtalık kanseri hücre hattı
A549	: Akciğer kanseri hücre hattı
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
FAP	: Familyal Adenomatöz Polipozis
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
HAGNP	: AgNP ile etkileştirilmiş Honokiol molekülü
HCT-116	: Kolon kanseri hücre hattı
HeLa	: Serviks kanseri hücre hattı
HePG-2	: Hepatosellüler karsinom
KRAS	: Kirsten sıçan sarkomaviral onkogen
LDHA	: Laktat dehidrogenaz A
MCF7	: Meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-231	: Meme kanseri hücre hattı
MOLT-4	: İnsan lösemi hücre hattı
NP	: Nanopartikül
PA-1	: İnsan yumurtalık teratokarsinom hücre çizgisi
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz protein
PDH	: Pirüvat dehidrogenaz
SAGNP	: AgNP ile etkileştirilmiş SirReal2 molekülü
SIRT2	: Sirtuin2 proteini
SIRT3	: Sirtuin3 proteini
TP53	: Tümör protein 53

1. GENEL BİLGİLER

1.1 Giriş

Dünya üzerinde insanların ölümüne neden olan birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerden kanser ikinci sırada yerini almakta ve ciddi bir hastalık olarak insanoğlunun karşısına çıkmaktadır. Anormal hücre büyümesi, düzensiz hücre proliferasyonun gen ekspresyonundaki sistemsiz birçok değişikliğe neden olması, dokuları istila etmesi ve bulunduğu bölgeden ilerleyerek başka yerlere yayılmasıyla beraber iyileştirilmesi mümkün olmadığında sahip olduğu konağın ölümüne neden olan hastalık türü olarak tanımlanmaktadır (Ruddon, 2007).

Gerçekleştiği doku ve organa göre isimlendirilmesi yapılan kanserin; mide, pankreas, meme, prostat, kolon gibi birden çok çeşitleri bulunmaktadır. Zamanla artış gösteren çocuk, yaşlı genç diye ayırmaksızın her yaş grubunda görülebilen bu hastalık sık görülmesi, hayat kalitesini düşürmesi akabinde artan ölüm oranlarıyla beraber daha iyi anlaşılması gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle araştırmacılar kanserin mekanizması, daha çabuk teşhisi, tedavisi gibi birçok alanıyla uğraşmıştır.

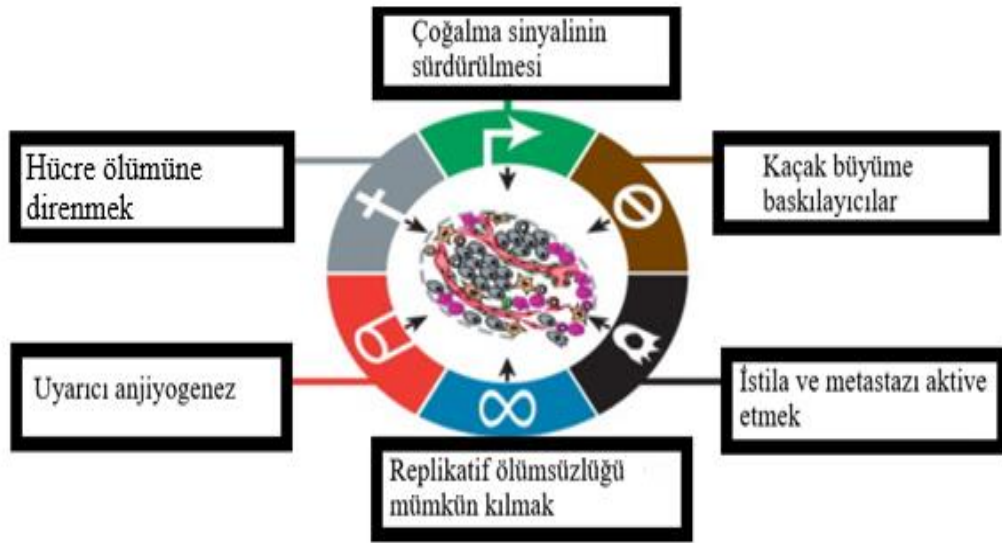
X-ışını, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), bilgisayarlı tomografi (BT), endoskopi ve ultrason gibi en sık kullanılan görüntüleme teknikleri dokuda gözle görülebilir farklılık olduğu zaman kanserin tespitini sağlayabilmekte ve tedaviye katkı sunabilmektedir. (Zhang vd., 2019). Nanopartiküller ise kanser teşhisinde, kanser biyobelirteçlerini, tümör DNA'sını, eksozomları, kanserle ilişkili proteinleri yakalarak daha erken teşhis imkanı sağlayabilmekte ve diğer malzemelere göre avantajlı olabilmektedir. (Jia vd., 2017; Song vd., 2010). Kişiselleştirilmiş tedavi, doğru ve erken teşhisin yanı sıra belirli kanserleri hedefleyerek akıllı tedaviler oluşturma gibi kavramları da sunabilmektedir (Cai ve Chen, 2007).

Göstermiş oldukları davranışlardan dolayı çok fonksiyonlu olan nanopartiküller birbirinden farklı alanlarda kullanılmakta ve insan hayatında önemli bir konuma sahip olmaktadır. Nanoteknolojinin gelişmesi nanoparçacıklara olan talebin giderek artmasına neden olmaktadır. Üstelik 2025 yılına kadar küresel pazarda nanoparçacık talebinin 98 milyar dolara ulaşması beklenilmektedir (Jeyaraj vd., 2019). Bu çok amaçlı

nanopartiküller birbirinden farklı alanlarda kullanılmakta ve insan hayatında önemli bir konuma sahip olmaktadır. Kanser teşhisi ve tedavilerinde de kullanımı görülmekte ve umut vaat etmektedir. Bu çalışma biyosentez yöntemi kullanılarak elde edilen düşük maliyetli, verimli, çevreye faydalı nanopartiküllerin çeşitli moleküllerle etkinleştirilmesi sağlanarak kolon ve meme kanserine karşı göstermiş olduğu etkileri incelemeyi potansiyel ilaç olabilme durumlarını araştırmayı ve literatüre önemli katkılar sağlamayı amaçlamaktadır.

1.2. Kanser

Kanser geçmişten günümüze bir merak konusu olmakla beraber isminin ise bu hastalığı meme tümöründen yayılan uzun şişmiş damarların yengeç uzuvlarına benzeten Hipokrat'ın gözlemleriyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Yunanca karkinoma Latince de kanser kelimesi olarak karşımıza çıkmaktadır (NIH, 2007).



Şekil 1.1: Kansere özgü özellikler (Hanahan ve Weinberg, 2011).

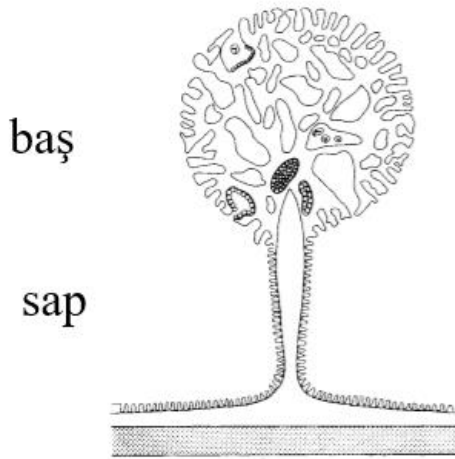
Sağlıklı hücreler aldıkları sinyallerle sürekli olarak bölünebilir. Ancak bu sinyalleri dikkate almayan kanser hücreleri sonsuz bir şekilde büyümeye ve gelişmeye devam eder. Hücre bölünmesinin önüne geçilmediği takdirde yayılım sonucu bu hastalığa bağlı ölüm gerçekleşir. Çoğalma sinyalinin sürdürülmesi, kaçak büyüme baskılayıcılar, istila ve metastazı aktive etmek, replikatif ölümsüzlüğü mümkün kılmak, uyarıcı anjiyogenez, hücre ölümüne direnmek gibi kavramlar (Şekil 1.1) kanserin ayırt edici özellikleri olarak ifade edilmekte, tümör büyümesi ve yayılmasının daha iyi anlaşılmasını sağlayabilmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Vücutta bulunan farklı hücre türlerinden birisinin anormal bir şekilde çoğalmasından dolayı kanser oluşabilmektedir. Bundan dolayıdır ki göstermiş olduğu davranışlar ve tedaviye cevap verme gibi durumlardan kaynaklanan birbirinden farklı yüzden fazla kanser türü bulunmaktadır. Normal hücre davranışını kontrol eden sinyallere uygun yanıt vermek yerine doku ve organa yayılım göstererek kontrolsüz bir şekilde büyüme ve çoğalma hali söz konusudur. Kanser için tümör ayırımını da kavramak kanseri daha iyi inceleme açısından çok önemlidir. İyi huylu ve kötü huylu tümör olarak ikiye ayrılırlar. İyi huylu tümör bulunduğu doku ve vücuda yayılım göstermez ancak kötü huylu tümörler de bu durumun tersi söz konusudur. Kötü huylu (malign) tümörler doku ve vücuda dolaşım ile birlikte metastaz yoluyla yayılabilmekte ve buldukları yerleri istila edebilen bu tümörler kanser olarak isimlendirilir (Cooper, 2000). Kanser genetik ve epigenetik değişikliklerin dokuda birikmesi, vücudun tüm organ ve sistemini kapsadığından dolayı kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar gibi ciddi hastalıklardan daha karmaşık olarak görülmektedir (Dean ve Moitra, 2017).

Hem kadınlarda hem de erkeklerde görülebilen kanserin cinsiyete göre farklılıkları söz konusudur. Bu kanserlerin öncü, görülme sıklığı, ölüm hızı olarak sınıflandırılması yapıldığında; erkeklerde ölümün görüldüğü öncü kanser türü akciğer kanseri olmakla beraber bunu görülme sıklığı olarak prostat ve kolorektal kanseri, ölüm hızı olarak da, karaciğer ve mide kanseri takip etmektedir. En sık teşhisi yapılan ve ölüm nedeni olarak kadınlarda birinci sıra da yer alan kanser türü ise meme kanseridir. Ardından görülme sıklığı kolorektal ve akciğer kanseri kadınlarda birbirini izleyen kanser türleri olmaktadır. Ölüm oranı ve görülme sıklığı olarak da serviks kanseri kadınlarda görülen kanser çeşidi olarak dördüncü sırada yer almaktadır (Bray vd., 2018). Karsinomlar, sarkomlar, lösemi veya lenfomalar diye kanserin görüldüğü yere göre temel sınıflandırması yapılır. Epitel

hücrelerin maligniteleri karsinomlar, kas, kemik, kıkırdak ve lifli doku gibi bağ dokuların katı tümörleri de sarkomlar, kan veya bağışıklık sisteminden kaynaklanan malignite ise lösemi ve lenfoma grubuna dâhil olur. Ancak insanlarda en sık rastlanan kanser türlerini karsinomlar oluşturmaktadır. Sarkomlar ise nadir görülmektedir (Cooper, 2000). Kolon kanseri de karsinom grubuna dâhil her iki cinsiyette de görülebilen kanser türü olmakla beraber dünya çapında en sık görülebilen kanserler arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Genetik değişkenlerin yanı sıra beslenme alışkanlıklardan dolayı ortaya çıkan bir kanser çeşitidir.

1.2.1. Kolon Kanseri

Bu kanser türü vücudun boşaltımında görevli organlarından biri olan kalın bağırsakta gerçekleşir. Bu kansere kolon, kalın bağırsak veya kolorektal kanser de denebilmektedir.



Şekil 1.2: Adenomatöz polip (Shamsuddin, 1990).

Kanserin öncüsü olarak görülebilen polip, kolon veya rektumun mukozal yüzeyi üzerinde büyümeye başlayıp daha sonra kötü huylu bir tümöre dönüşerek kolon kanserini oluşturabilmektedir (Stryker vd., 1987). Tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerde mutasyon oluşumunda kolon kanserinin oluşmasına katkı sağlayan gen olarak ilk sırada APC geni (adenomatöz polipozis koli) yer alır (Şekil 1.2). Eğer ki bu gende mutasyon oluşursa kolon kanserinin oluşumu daha yüksektir. Ardından KRAS geni ve TP53 genleri gelir ve bu genlerde oluşacak herhangi bir mutasyon durumunda kolon kanserinin oluşumu önemli ölçüde ortaya çıkar (Robles vd., 2016). İlerleyen yaş, dışkıda görülebilen

kan ve değişen bağırsak alışkanlıkları kolon kanser tanısında rol alan önemli etkenlerdir (Fijten vd., 2015).

Kolon kanseri oluşumu iki ana etmenden dolayı ortaya çıkar bunlardan birincisi kalıtsal, ikincisi çevresel değişkenlerdir. Çevresel etmenler kontrol altına alınabilinen alışkanlıklar diye bilinmekte, örnek olarak vücut kitle endeksi, fiziksel hareketsizlik, aşırı alkol tüketimi, beslenme tarzı kolon kanseri ile bağlantılı olarak değişebilen durumlar arasında gösterilebilir. Kolon kanser riskinin azaltılması genetik durumlar dışında kişinin elinde olup sağlıklı yaşayışla bu kanser riski azaltılabilir (Cho vd., 2019). Ancak kalıtsal etmenler için aynı durum söz konusu olmamaktadır. Bu kalıtsal etmenlerden biri olan FAP (ailesel adenomatöz polizis) yeni teşhis edilen kolon kanseri vakalarının %1'lik kısmını oluşturmakla birlikte ilerleyen yıllara göre kolon adenomu geliştirebilmektedir (Stoffel ve Kastrinos, 2014).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar kolon kanserini önlemek ve kontrol altına almak için DNA metilasyonu ve kodlanmayan RNA'larda kolon polipleri kolon kanseri hastaları için bir biyobelirteç görevi görebilme ihtimalinden dolayı bu biyobelirteç sınıfının kolon kanseri hastalığı için kullanılacak yüksek performanslı bir tahlil olanağı gibi çeşitli araştırmalar yapılmaktadır (Okugawa vd., 2015).

Kolon kanserinin teşhis ve tedavilerinde kullanılabilen çeşitli yöntemler bulunmaktadır. En çok bilinen yöntemlerden biri ise kolonoskobidir. Kolonoskopi kolon tümörleri, polipler ve gastrointestinal kanama gibi hastalıkların tanı ve tedavilerinde yaygın kullanımı görülmektedir. Esnek yapıda olup uç bölgesinde kamera ve ışıktan oluşan cihazdır. Tecrübeli kişilerce tanı tedavi uygulamalarında kullanılmalıdır. Çift kontrastlı baryum lavman, sanal kolonoskopi, bilgisayarlı tomografi gibi yöntemler ile tümör ve polipler için belirleyici rol oynamaktadır (Engin vd., 2015).

1.2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri memede veya çevresinde, bir takım değişiklikler sonucu meydana gelen kanser türüdür. Memede veya koltuk altı bölgesinde yumru, anne sütü dışında akıntı, kan akıntısı, memenin kendi şeklinde, boyutunda ve cilt dokusunda anormallikler, kırmızı ya da şişmiş cilt gibi durumlar meme kanseri semptomları diye sıralanır. Meme kanser tespitleri kişilerin kendilerini gözlemlemesi, elle muayene yolu ile ardından klinik

muayeneler ve mamografiyle tespiti sağlanılmaktadır (Bever vd., 2009). Meme kanseri teşhisi konan kişilerin %75'ini süt kanallarından ve lobüllerden kaynaklanan duktal karsinom tümörünün oluşturduğu bilinmektedir (Li vd., 2005).

İleri yaş, ailede meme kanseri öyküsü, hormonal dengesizlik, meme yoğunluğu, alkol alımı, aşırı kilo, hareketsizlik, DNA onarım mekanizmalarıyla ilişkili ve tümör baskılayıcı olarak rol oynayan BRCA1 veya BRCA2 genlerindeki mutasyonlar meme kanserine neden olan risk faktörleridir (Kamińska vd., 2015; Venkitaraman, 2002).

Meme kanseri TNM özelliklerine göre incelendiğinde; T tümör boyutu, N lenf düğümlerindeki kanser varlığını, son olarakta M metastazı ifade eder. Bu bilgilere göre kanserin sınıflandırılması yapıldığında kanserin evreleri 4 kategoriye ayrılmaktadır. Birinci evre kanserin başlangıç seviyesinde olup en erken seviye olarak tanımlanmaktadır. Elde edilen verilere göre bu evrede kansere müdahale edildiğinde meme kanseri tedavisinde sağ kalım oranı %99 olduğu görülmektedir. İkinci evrede lenf düğümleri görülebilir ancak kanser küçük lezyonlarıyla beraber memede bulunur. Üçüncü evrede ise tümör bulunduğu bölgeden uzaklaşarak diğer yakın olmayan yerlerde lenf düğümleriyle beraber yayılım göstermektedir. Son olarak dördüncü evrede ise bu yayılım sadece lenf düğümleriyle sınırlı kalmayıp diğer organlara da bulaşmasıyla karaciğer, akciğer, beyin, kemik gibi organ ve dokuları işgal eden meme kanseri o organlara da ciddi tahribat vermektedir. Kısacası metastaz olayı bu evre de görülmektedir. Ancak evreler ne kadar ilerledikçe kanserin tedavisi ve sağ kalım oranlarını artırmak o kadar zorlaşır (Benson, 2003; Cianfrocca ve Goldstein, 2004; Meade ve Dowling, 2012; Singletary ve Greene, 2003).

Cerrahi, radyasyon, kemoterapi gibi yöntemler yaygın kanser tedavi yöntemleri olarak bilinmektedir. Cerrahi yöntem ile tümörün bulunduğu doku alınır. Ancak gerekli olan durumlarda mastektomi yani bütün meme dokusu cerrahi yöntem ile çıkarılabilir. Radyasyon tedavisi ise tümör ya da ameliyat sonrası tümör bölgesini hedefleyen yüksek enerjili x ve gama ışınlarının kullanımıyla yapılmaktadır. Ameliyat sonrası ortaya çıkan kanserli hücreleri öldürmede etkili olabilmekte ancak kullanılan doz kanser hücrelerini öldürebilecek düzeyde güçlü olmalıdır. Kemoterapide kanserin türü, evresi, tıbbi geçmiş vesaire etkenler göz önüne alınarak, döngüler halinde kanserli hücreleri önleyici ilaçların

yüksek doz kullanımıyla olan diğer tedavi yöntemlerindedir (Sharma vd., 2010). Bu tedavi yöntemleri sıkça kullanılmakta ancak alınan yüksek dozlardan dolayı akabinde olumsuz etkileri de beraberinde getirebilmektedir. Bilhassa kemoterapi ve hormon tedavilerinde; bulantı, saç dökülmesi, kasta oluşan ağrılar, ağız iltihabı, kısırlık, kilo alımı, erken menopoz, nörotoksisite, kardiyotoksisite, uyku güçlüğü gibi uzun veya kısa süreli ciddi yan etkiler oluşabilmektedir (Azim vd., 2011; Bovelli vd., 2010; Kayl ve Meyers, 2006; Patridge vd., 2001; Sitzia ve Huggins, 1998). Bu yüzden araştırmacılar son zamanlarda kemoterapiden oluşan yan etkileri azaltmak, yüksek doz alımını düşürmek ve kemoterapik ilaçların anti-kanser özelliğini artırıp ilaç dağıtım sistemiyle yani bir vektör aracılığıyla sadece hedefe yönelik tedavi alanıyla ilgilenmektedir, bu da nanopartiküller ile mümkün olmaktadır (Kundranda ve Niu, 2015).

1.3. Nanopartiküller

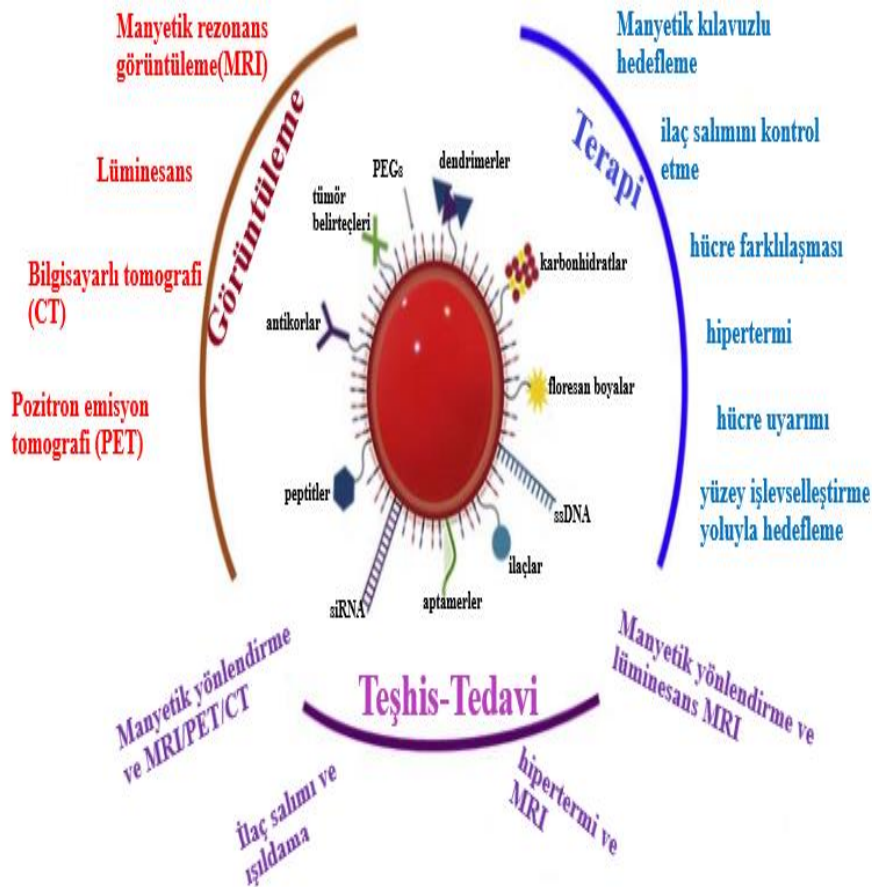
Eski zamandan günümüze kadar uzanan kapsamlı bir alana sahip olan nanoteknoloji ilk olarak Nobel ödüllüne sahip bir bilim insanı olan Richard P. Feynman'ın “ *Altta Çok Yer Var* ” dersinde bu alanın varlığından bahsedilmiş bunun akabinde zamanla bu alanla ilgili çokça çalışmalar ortaya çıkmıştır (Feynman, 1960).

1.3.1. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

- ❖ Elektronik malzemelerde
- ❖ Nano kumaşlarda
- ❖ Biyomühendislik alanında
- ❖ Yarı iletkenlerde
- ❖ Boyalarda
- ❖ Paketlemelerde
- ❖ Kozmetik ürünlerde
- ❖ Otomotiv sanayisi
- ❖ İlaç teslimi
- ❖ Sağlık alanı ve ilaç yapımı
- ❖ Biyosensörlerde
- ❖ Katalizör gibi alanlarda nanopartiküllerin faaliyetlerini genel olarak görülebilmek mümkündür (Kavitha vd., 2013).

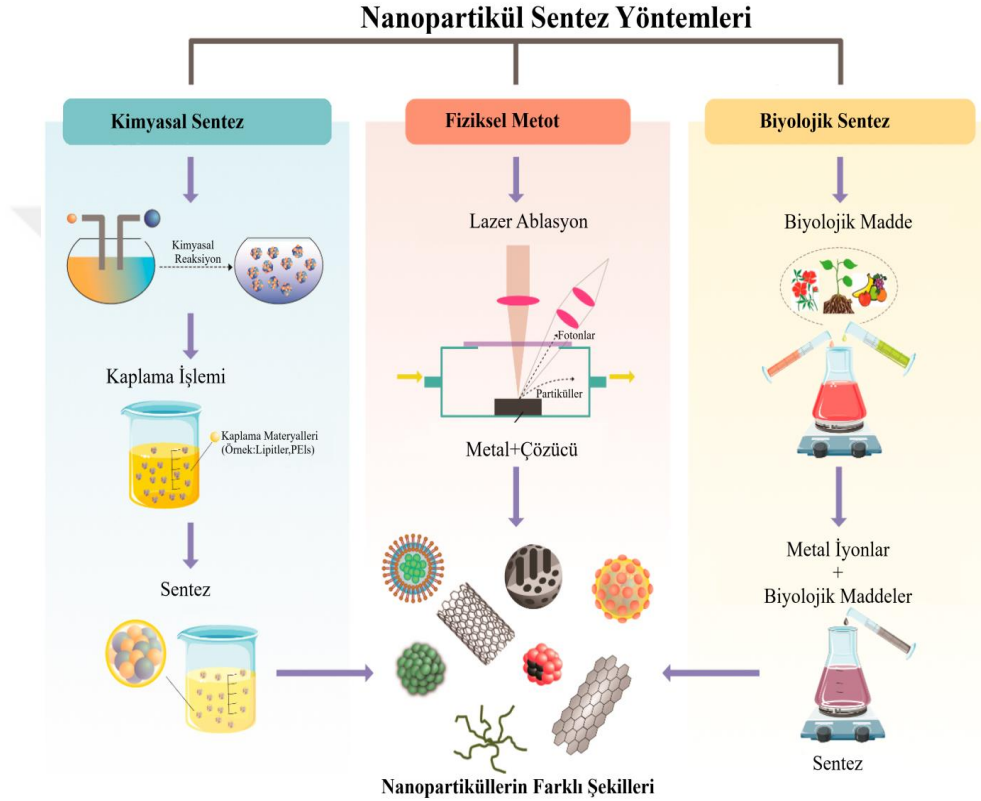
Mega boyutlardan mikroya bununla birlikte mikrodan koloidal ardından nano'ya kadar uzanabilen geleneksel ilaç büyüklükleri ilerde pikozlara kadar da olabilir. Aslında parçacıkların boyutları nonoterapötiklerin ortaya çıkışını sağlamakla beraber nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır. Kronik hastalıklar ve kanser gibi hastalıklar için parçacık boyutları üzerine yapılan araştırmalar bulunmakta ve bu alanlar için de araştırmalar hala gelişmektedir. Aşağıdan yukarıya veya yukarıdan aşağıya gibi çeşitli sentez metodu kullanılarak hazırlanan nanopartiküller nano parçacıkların boyut geçişi için kullanılabilen yaklaşımlar olarak gösterilir (Patravale vd., 2004; Rainbow, 2004).

Birbirinden farklı türde nano boyuta sahip ilaç taşıyıcıları kanser tedavi uygulamaları için araştırılmıştır (Şekil 1.3). Bunlara örnek olarak lipozomlar, polimerik miseller, dendrimerler, süper manyetik demir oksit kristalleri, kolloidal altın vb. gösterilebilir (Wang vd., 2010).



Şekil 1.3: Çok fonksiyonlu nanoparçacıkların şematik gösterimi ve biyomedikal uygulamaları (Roome ve Razzak, 2020).

Yapısı ve eşsiz özelliklerinden dolayı nanomateryaller birçok alanda görev almaktadırlar. Bunlara örnek olarak; doku mühendisliği, DNA modifikasyonu, ilaç dağıtım sistemi, kozmetik ürünler, tıbbi aletler ve biyosensörler geniş kapsamlı olduklarından büyük uygulama alanlarında görmek mümkün olmaktadır (Arokiyaraj vd., 2014). Nanopartiküller (Şekil 1.4’de) görüldüğü gibi çeşitli yöntemler ile sentezlenip farklı alanlarda kullanılabilir.

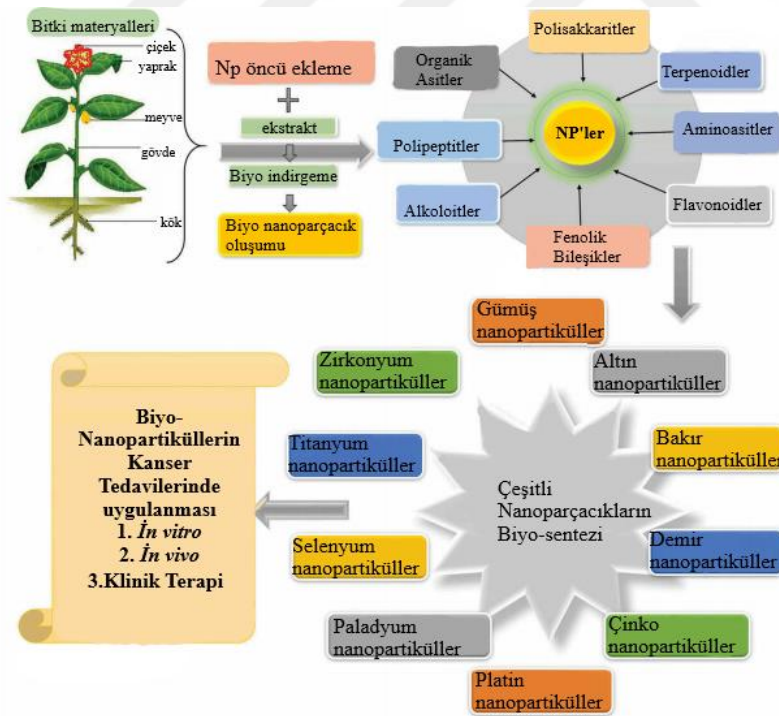


Şekil 1.4: Nanopartiküllerin geleneksel sentez yöntemleri (Jeyaraj vd., 2019).

4. Yeşil Sentezin Önemi

Çeşitli organizmalar, prokaryotlar, ökaryotik mantarlar ve bitkiler gibi materyalleri kullanarak nanopartikül elde etme yöntemine yeşil sentez yöntemi denilmektedir. Yeşil sentez için toksik kimyasallar kullanılmadığından çoğunlukla bu yöntem çevre dostu ve ekonomik olarak onaylanmaktadır (Mohanpuria vd., 2008). Endüstriyel üretimlerde daha basit ve daha emniyetli olduğundan kullanılabilir (Iravani, 2011). Bu biyotemelli yaklaşım sayesinde sentezlenen yeni malzeme kaynakları, uygun maliyetli, çevreye karşı duyarlı, toksik olmayan özelliklere sahip olabilmektedir. Bitki materyali kullanılarak

yapılan nanopartikül sentezlerinde, mantar ve bakteri temelli tekniklerde olan zahmetli uygulamalar söz konusu olmamaktadır. Yani özel kültür hazırlama ve izolasyon gibi durumlara gerek duyulmadan kolay, temiz ve toksik olmayan, kuvvetli bir yaklaşım sunar. Çevre için oldukça dostça davranış sergileyen yeşil yöntem bilhassa bitki ekstraktlarından nanopartikül sentezlenmesi, hem basitçe ölçeklendirilebilir hem de düşük maliyetlidir. Bu bitki özlü partiküllerin tıp alanı içinde kullanımı sıkça görülebilmektedir (Şekil 1.5). Şöyle ki; terapötik ilaçların hedefli verilmesi, ısıtma yöntemi ile tümör imhası ayrıca anti bakteriyel ajan gibi alanlarda genişçe kullanabilme davranışlarına sahiptir (Shah vd., 2015). Yakın zamanlarda bitki türleri kullanılarak metal nanopartiküllerin sentezlenmesi popüler alanlardan biri haline gelmiştir. Bu nanopartiküllere ilginin ana nedenlerinden biri sağlayabildikleri çok yönlü avantajlarındanadır. Teşhis tedavi gibi alanların yanı sıra çevreci, sürdürülebilir ve yenilenebilir enerji, terapötik, atık su arıtma, gıda endüstrisi, kozmetik gibi çeşitli alanlarda bitki temelli nanopartiküller görülebilmektedir (Arya vd., 2019). Yapısı ve özelliklerinden dolayı bu çalışmada partikül sentezi için bitki materyali olarak nar kullanılmıştır.



Şekil 1.5: Kanser terapötik uygulamasından esinlenen çeşitli tipte nanoparçacık sentezinin tipik bir yönteminin şematik gösterimi ve bitki kullanımı (Yasoathamani ve Vivek, 2020).

1.4.1. Nar Bitkisi (*Punica granatum L.*)

Nar Latince adı (*Punica granatum L.*) olup yaklaşık 200-1400 beyaz ile koyu kırmızı veya mor tohumları bulunan kalın kırmızımsı bir kabuğa sahip yuvarlak bir meyvedir (Şekil 1.6). Farklı ülkelerde yetiştirilicği görülmektedir. Ayrıca antosiyanin içeriği nedeniyle güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip zengin içerikli meyvedir (Sharma vd., 2017). Fruktöz, sukroz ve glukoz bakımından zengin olan nar suyu askorbik asit, sitrik asit, fumarik asit ve malik asit gibi bazı basit organik asitleri de içermektedir. Bunlara ilaveten düşük miktarda tüm amino asitleri, özellikle de prolin, metiyonin ve valin bulundurabilmektedir. Kabuğunun ve suyunun da polifenol açısından zengin oluşu antioksidatif ve koruyucu özelliklerinden dolayı farmakolojik etkisinin varlığını göstermektedir (Newman vd., 2007). Birbirinden çeşitli özellikleri olan bu bitkinin çoğu inançlarda da önemli bir yeri olduğunu görebilmek mümkündür. Aynı şekilde farklı toplum ve kültürlerde de ona birbirinden farklı manalar yüklenerek sembol olarak kullanılmıştır. Örneğin Babiller nar tohumlarını; diriliş aracı, Persler yenilmezlik, eski Çinlilerde uzun ömürlülüğü ve ölümsüzlüğü simgelediğine inanılıyordu (Aviram vd., 2000; Langley, 2000).



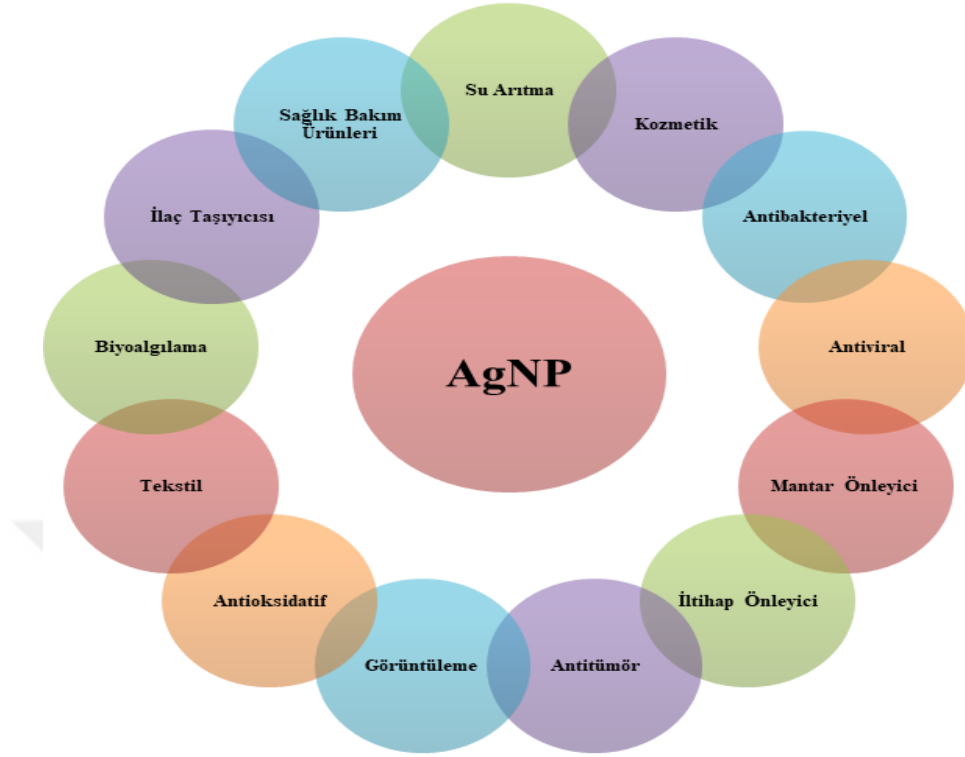
Şekil 1.6: Nar bitkisi.

Avrupa'da ortaçağ zamanında nar kabuğunun özlerinden faydalanılarak tekstil boyası ve mürekkep üretilmiştir. Bunlar gibi narın kullanıldığı birçok uygulamalar bulunmaktadır (Stover ve Mercure, 2007). Çeşitli tıp sistemlerinde çok sayıda hastalığın tedavisinde narın kullanımı görülmektedir. Narı bir eczane gibi gören eski Hint tıp sistemi buna örnek gösterilebilir. Narın ishal ve ülser tedavileri için birde antiparaziter ajan olarak kullanılması tavsiye edilmiştir (Cáceres vd., 1987). Nar suyunun kalp hastalıkları riskini düşürücü ve kanseri yavaşlatabilen etkisi olduğu belirtilmektedir (Adams vd., 2006;

Aviram vd., 2004). Ağız ve boğaz iltihabını hafifletmek için Meksika'da ezilmiş nar çiçek tomurcuklarını bronşite faydalı bir çay haline getirilerek gargara şeklinde kullanılmıştır (Morton, 1987). Farelere ağız yoluyla nar meyve ekstralarının verilmesi birincil akciğer tümörlerinin gelişmesini ve yayılmasını engelleyebilmekte aynı şekilde akciğer kanseri hücrelerine de nar kabuğundan izole edilen punikalajin ile ellagik asit kuvvetli antioksidan etkiye sahip olup akciğer kanseri hücre hatlarına karşı kuvvetli anti-proliferatif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Aqil vd., 2012; Khan vd., 2007; Zahin vd., 2014). Günümüzde Dünya genelini kapsayan küresel salgın olarak bilinen Covid-19 virüsüne karşı araştırmacılar narın etkisini raporlandırmıştır. Şöyle ki nar kabuğundan elde edilen özütün *in vitro* uygulama olarak virüse karşı etkinliği gözlemlenilmiş olup bu bitkisel özütün Covid-19 virüs replikasyonunu engelleyebileceği belirtilmiştir (Mosa ve Mohamed, 2021). Nar suyu da influenza ile SARS-CoV-2 virüslerine karşı hem bulaşıcı kapasitelerini düşürmede hem de bu virüslere karşı antiviral etkinlik gösterebilir kanısına varılmıştır (Frank vd., 2020).

1.5. Gümüş Nanopartiküller

Yapısı ve eşsiz özelliklerinden dolayı birçok alanda kullanımı görülen nanomateriyallerden biri olan gümüş nanopartikül, çeşitli alanlarda görmek mümkündür. Doku mühendisliği, DNA modifikasyonu, ilaç salınım sistemi, kozmetik ürünler, tıbbi aletler ve biyosensörler gibi büyük uygulama alanları gümüş nanopartikülün kullanıldığı alanlara örnek verilebilir (Arokiyaraj vd., 2014). Manyetik alan, çevresel iyileştirme, farmakoloji, biyoteknoloji, tıp ve sağlık cihazları, enerji ve elektronik, mühendislik gibi diğer alanlarda da sıklıkla gümüş nanopartiküllerin kullanımı söz konusudur (Şekil 1.7). Bunlara ilaveten hem çözelti hem de bileşenlerde son derece etkili antibakteriyel aktivitesi nedeniyle, tekstil, gıda, tüketici ürünleri ve endüstriyel sektörlerde de oldukça popülerdir (Yu vd., 2013; Naidu vd., 2015). Yeşil sentez ile elde edilen gümüş nanopartiküllerin kanser alanında da kullanımı oldukça görülmektedir.



Şekil 1.7: Gümüş nanopartiküllerin çeşitli uygulamaları (Zhang vd., 2016).

Bello ve arkadaşlarının 2017’de yaptıkları çalışmada bitki olarak *H.thebaica* meyvesinin sulu çözeltilisi ve $AgNO_3$ (gümüş nitrat) kullanarak biyosentez yöntemi ile AgNP’nin sentezi sağlanılmıştır. Fonksiyonel grupları, parçacık boyutları, morfolojileri, elementel bileşimi incelenen AgNP, küresel şekle ve yaklaşık 20 nm boyutlu olarak bulunmuştur. İnsan prostat (PC3), meme (MCF7) ve karaciğer (HepG2) kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferasyon tahlili MTT testi ile gerçekleştirilmiştir. Bu gümüş nanopartiküllerin doza bağlı bir şekilde hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe ettiği ve etkisi prostat kanseri üzerinde daha belirgin olduğu birde 24 saatlik inkübasyondan sonra kullanılan hemen hemen tüm patojenik bakterileri öldürmeyi başarabildiği rapor edilmiştir (Bello vd., 2017).

Lakshmanan ve diğerlerinin 2018’deki yaptıkları bir araştırmada ise *Cleomeviscosa* bitki özü kullanılarak yeşil sentez yoluyla gümüş nanopartikülleri sentezlenilmiştir, bunların hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilere karşı iyi bir anti bakteriyel aktivite

sergilediğini, AgNP'lerin akciğer (A549) ve yumurtalık (PA1) kanser hücre hatlarına da güvenilir antikanser aktivitesi sergilediği görülmüştür (Lakshmanan vd., 2018). Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin biyosentezinde kullanılan canlı materyaller ve hangi kanser hücrelerini etkilediğini Tablo 1.1 de özetlenmiştir.

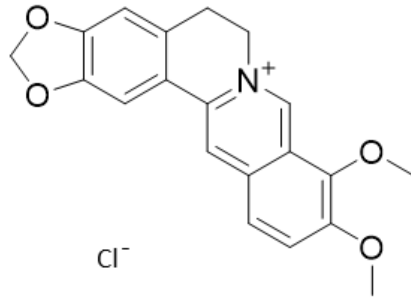
Tablo 1.1: Biyosentez ile sentezlenen gümüş nanopartiküller ve araştırıldıkları kanser türleri.

Biyosentezde Kullanılan Materyal	Cinsi	Kanser Türü	Referanslar
<i>Butea monosperma</i>	Bitki	Akciğer, Meme, Melanoma, Glioblastoma	(Patra vd., 2015)
<i>Sargassum vulgare</i>	Deniz yosunu	Lösemi, Serviks Kanseri	(Govindaraju vd., 2015)
<i>Ganoderma neojaponicum</i>	Mantar	Meme	(Gurunathan vd., 2015)
<i>Escherichia fergusonii</i>	Bakteri	Meme	(Gurunathan vd., 2013)
<i>Trapa natans</i>	Bitki	Cilt	(Saber vd., 2018)
<i>Saccharina japonica</i>	Bitki	Serviks	(Sreekanth vd., 2016)
<i>Teucrium polium</i>	Bitki	Mide	(Hashemi vd., 2020)
<i>Argemone mexicana</i>	Bitki	Serviks	(Jha ve Prasad, 2014)
<i>Pimpinella anisum</i>	Bitki	Kolon	(Alsali vd., 2016)
<i>Artemisia turcomanica</i>	Bitki	Mide	(Mousavi vd., 2018)
<i>Punica granatum</i>	Bitki	Serviks	(Sarkar ve Kotteeswaran, 2018)
<i>Bacillus cereus</i>	Bakteri	Kolon, Meme, Kemik	(Majeed vd., 2019)

1.6. Berberin, Honokiol ve SirReal2'nin Biyolojik Aktiviteleri

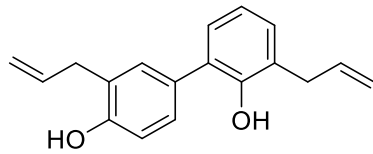
Berberin ve bazı Berberin içeren bitkiler, Çinli doktorların eski tarihten beri hastalara tavsiye ettiği zehirden arındırıcı gibi etkilerinden dolayı geleneksel ilaç olarak yaygın şekilde kullanılmıştır (Şekil 1.8). Yakın tarihte de berberinin geniş kapsamlı bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Örnek olarak; antimikrobiyal, antihelmintik, antiinflamatuvar ve antioksidatif gibi birden fazla farmakolojik ve biyolojik aktiviteler sergileyebilmektedir (Kuo vd., 2004; Singhal, 1976). Ayrıca insülin direncini ve

yumurtlama indüksiyonunu iyileştirmek için polikistikover hastalarında, insanlar üzerinde diyabet, hiperlipidemi, kanser, hipertansiyon, felç, metabolik sendrom ve karaciğer hastalığı gibi farklı hastalıkların tedavisinde berberinin önemli terapötik aktivite sergileyebildiği yapılan çalışmalar doğrultusunda gösterebilmektedir (Imenshahidi ve Hosseinzadeh, 2019; Wu vd., 2015).



Şekil 1.8: Berberinin yapısı.

Polifenoller bitkilerde olan biyolojik olarak nörodejeneratif, antiinflamatuvar, anti kanser gibi özellikleri olan aktif bileşikler grubudur (Dragovic-Uzelac vd., 2007; Gelen vd., 2021; Scalbert vd., 2005). Küçük molekülü bir polifenol olan Honokiol ($C_{18}H_{18}O_2$) ise manolya ağaçlarının köklerinden ve kabuğundan ekstrakte edilmesiyle elde edilir (Şekil 1.9). Antiinflamatuvar, antioksidan, analjezik ve nöroprotektif etkiler dâhil olmak üzere birçok farmasötik özelliğe sahiptir (Fried ve Arbiser, 2009; Lin vd., 2007; Rickert vd., 2018; Tang vd., 2018).

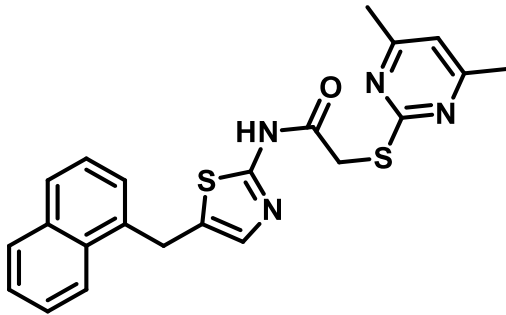


Şekil 1.9: Honokiölün yapısı.

Çin'in geleneksel otundan elde edilen Honokiol apoptozu indüklemeye ve çeşitli kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etme aktivitesine sahip güçlü bir anti kanser ilaç olduğu gösterilen biyoaktif bir bileşen olarak da bilinmektedir (Averett vd., 2016; Q. Zhang vd., 2015; Y. Zhang vd., 2015).

Buna örnek olarak yapılan bir çalışma Honokiol uygulaması aşırı seviyede invaziv MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde apoptozu ve artırılmış DNA parçalanmasını indüklediği sonucuna varılmıştır (Alonso-Castro vd., 2014). Liu ve diğerlerinin 2015'de yaptıkları çalışmada honkiolun etkisini hem *in vivo* hem de *in vitro* şeklinde incelemesi yapıldığında Honokiol endoplazmik retikulum (ER) stresini teşvik ettiğini ve sonunda tümör ilerlemesinin ve metastazının gerilemesine neden olan kalretikülünün azalmış ekspresyonuna yol açtığını göstermiştir (Liu vd., 2015).

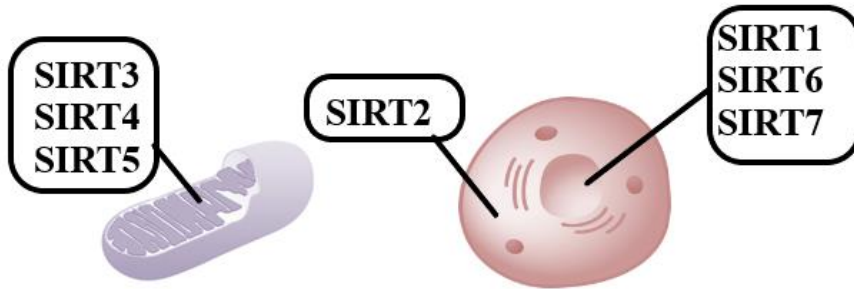
Yaşlanma, antikanser, nörolojik hastalıklar, oksidatif stres, üreme gibi birçok olaylarda, memeli sirtuin protein ailesinin rol aldığı ve etkileri yapılan araştırmalarla teyit edilmiştir. Bununla birlikte kanser tedavilerine uygun antikanser ilaç gelişimi için sirtuin inhibitörlerinden elde edilen sonuçlar, SIRT inhibisyon mekanizmasının ilaç gelişimine katkı sağlayabildiği ayrıca kişiye özgü tedaviler için sirtuin proteinlerine özel hedeflenmiş SIRT inhibitörleri sayesinde tedavi kolaylaştırıcı amaç ortaya koyabilmektedir (Choi vd. 2013; Park vd. 2016). Bu nedenle yapılan çalışmalar terapötik etkileri artırmak için güçlü ve seçici SIRT inhibitörlerin geliştirilmesi yönündedir (Spiegelman vd., 2018). Bunlardan biri olan SirReal2 SIRT2 inhibitörü olarak bilinmektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.10: SirReal2 yapısı.

1.7. Sirtuin Proteinleri

Sir2 ailesi veya sirtuin üyeleri hakkında çeşitli araştırmalar sayesinde sirtuin ailesinin üyeleri büyük ilgi görmektedir. Kurucu olarak bilinen Sir2p maya, ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de çiftleşme eksikliğinin kurtarılmasında rol oynayan bir faktör olarak karşımıza çıkmakta ve tanımlanabilmektedir (Shore vd., 1984). Sessiz bilgi düzenleyici 2 (Sir2) ailesinin üyeleri bakterilerden insana kadar çeşitli organizmalarda yaşam süresini düzenlemektedir (Longo ve Kennedy, 2006). SIRT proteinleri birçok alanda araştırılmaları yapılan çok işlevselli proteinler olmalarıyla tanınabilmekte ve yaşa bağlı hastalık türleri başta olmak üzere, kalp hastalıkları, nörodejenerasyon, kanser ve inflamasyon gibi bir birbirinden farklı hastalıklarda görülebilmektedir (Milne ve Denu, 2008). Ayrıca mitokondriyal aktivite, lipoliz, glukoneogenez ve yağ asidi oksidasyonu gibi metabolik süreçlerin düzenleyicisi gibi rolleri dikkate alındığında yaşın sebep olduğu hastalıkların tedavisi için güçlü bir ilaç hedefi oluşturabilmektedir (Chalkiadaki ve Guarente, 2012). Çeşitli fizyolojik, DNA hasarı onarımı, hücresel stres gibi birçok mühim olaylarda rol oynayan sirtuin ailesi metabolizma ve gen ifadesinin düzenlenmesi gibi durumlarda da görülmektedir. Yedi üyesi bulunan bu proteinlerin buldukları bölgeler de şu şekildedir; SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 mitokondriye lokalize edilirken SIRT2 genellikle sitoplazma da bulunur. SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 esas olarak nükleoprotein olarak konumlandırılabilirler (Şekil 1.11). (Sarikhani vd., 2018).



Şekil 1.11: SIRT proteinlerin hücre içinde sıklıkla bulunduğu yerler.

Sirtuin çok yönlü protein ailesinin üyelerinin özellikleri çok kapsamlı olduklarından çeşitli olaylarda kendilerini göstermektedirler. Bunlardan SIRT1'in aşırı ekspresyonu yaşlanma üzerinde olumlu etki gösterebilmekte ayrıca apoptozu da durdurarak kanser gelişimini de sağlayabilmektedir. SIRT1'i aşırı eksprese eden transgenik farelerde ise kalori kısıtlaması ile bağlantılı düşük kan kolesterolü, metabolik hız artışı, azalmış vücut yağı gibi fiziksel özellikler sergiledikleri görülmektedir (Bordone vd., 2007; Sebastián vd., 2012). SIRT2 geninden mahrum olacak şekilde genetik olarak modifiye edilen farelerin yaşlanmasıyla beraber tümör geliştirmesi görüldüğünden SIRT2 geni tümör baskılayıcı gen olarak ifade edilmektedir. Buna zıt olarak ise bu SIRT2 nakavt farelerde eşeye has tümör profili de oluşabilmektedir. Yani SIRT2 kansere karşı iki taraflı engelleyici veya destekleyici etkisi bulunabilmektedir (Park vd., 2012; Park vd., 2016).

Karsinogeneze onay verebilen etkiler arasında SIRT3'ün işlev kaybı görülebilmektedir. SIRT3 metabolizma ve mitokondriyal bütünlüğü muhafaza ederek tümör engelleyici olabilir (Kim vd., 2010; Park vd., 2011). SIRT3 bulunan fareler ile genetik işleme SIRT3'ü silinen farelerin karşılaştırılması yapıldığında SIRT3'ün olmadığı farelerin meme tümörü geliştirebildiği sonuç olarak bu eksikliğin karsinogeneze izin veren hücre ortamı oluşturduğu görülmektedir (Tao vd., 2015). Dünya genelinde ileriki yaşlar kanserin yanı sıra kalp ve damar hastalıklarının da ortak nedeni olarak gösterilebilmektedir. Sirtuin ailesinin üyelerinin de uzun ömür, yaşlanma gibi durumlarda da ciddi bir şekilde rol aldıkları bilinmekte SIRT3'ün kalp damar hastalıklarına da katkıları bulunmaktadır (Ozden ve Tural, 2018). Glukoza cevaben değişik mekanizma ile insülin salgısını SIRT4 düzenleyebilir. Ayrıca hücrelerin gelişmesini ve çoğalmasını sınırlandırabilen yani tümör engelleyici işlev de görebilmektedir (Ahuja vd., 2007; Q. Hu vd., 2019; Y. Hu vd., 2019; Huang ve Zhu, 2018; Jeong vd., 2013). SIRT5 ise üre döngüsü düzenlenmesinde görülebilmektedir (Nakagawa vd., 2009). Fetal insan ve yetişkin dokularında bilhassa kalp, iskelet kası, böbrek ve testiste sıklıkla SIRT5 ifade edilir (Frye, 1999). Güçlü onkogenik özelliklere sahip sirtuinlerden SIRT6'da nöroblastomun tedavilerini ilerletmek adına yeni bir odak olunabilir (Song vd., 2018). Promotor sekansları ile rDNA'nın kodlaması SIRT7 ile alakalandırılmıştır (Ford vd., 2006). Sirtuin ailesi proteinlerinin metabolizma, iltihaplanma, nörodejenerasyon, tümör oluşumu, DNA onarımı, rDNA transkripsiyonu gibi biyolojik olaylarda da işlevsellikleri bulunmaktadır (Yamamoto vd., 2007).

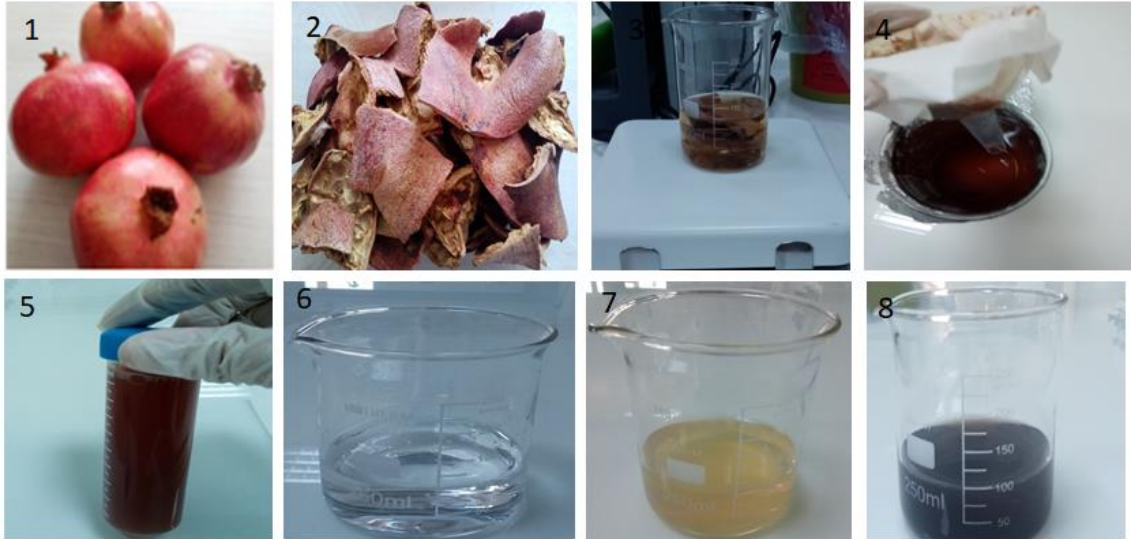
2. MATERYAL VE METOD

2.1. Nar Kabuklarından Bitkisel Özüt Oluşturma

Literatürde yer alan Shanmugavadivu vd. 2014'deki çalışmaları bitkisel özüt ve nanopartikül oluşturmak için deneysel prosedür olarak örnek alındı. Narlar deiyonize su ile yıkanarak kabuklarından ayrıldı. Kabukların hava alarak kurutulması sağlandı. Hassas terazide 20 gr kurutulmuş nar kabukları tartıldı. Ardından 250 ml behere konuldu. Üzerine 100 ml distile su ilave edilerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcı cihazı ile (Velp Scientifica, İtalya) 150-200 °C 40 dakika kaynatıldı. Hazırlanan bu meyve kabuğu özütü filtre kâğıtları kullanılarak süzüldü.

2.1.1. Gümüş NP'lerin Elde Edilmesi

AgNP'lerin eldesi için 1 mM'lık sulu gümüş nitrat çözeltisi hazırlandı. 0,0169 gr AgNO₃ (Merck, Almanya) tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Nar kabuklarından elde edilen ve filtrelenen kabuk süzıntüsünden 5 ml eklenildi ve aralıklı çalkalama ile 24 saat inkübasyon için tutuldu (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Nar kabuğundan gümüş nanopartikül eldesi.

2.1.2. Gümüş NP'lerin Karakterizasyonu

AgNP'lerin varlıkları ve karakterizasyon işlemleri ile tanımlanabilmesi için (UV) görünür spektroskopisi analizi, taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi (EDX) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) kullanılarak karakterize edildi. SEM ve EDX analizleri Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi (DAYTAM)'dan hizmet alımı olarak yapıldı.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Stok ve Nanopartiküllerle Etkileştirilen Çözeltilerin Hazırlanışı

- ❖ Berberin klorür (MW: 371.82) ana stoğu hazırlamak için, 10 mg Berberin klorür (Cat no:275920 J&K Scientific, U.S.A) hassas terazide tartılarak 896.5µL DMSO (BioShop, Kanada) içerisinde çözdürüldü ve 30 mM'lık ana stok elde edildi.
- ❖ Honokiol (MW: 266.334) ana stoğu hazırlamak için, Honokiol 10 mg Honokiol (Cas no: 35354-74-6 TCI, Japonya) hassas terazide tartılarak 250.3 µL DMSO (BioShop, Kanada) içerisinde çözdürüldü ve 150mM'lık ana stok elde edildi.
- ❖ SirReal2 (MW: 420.55) ana stoğu hazırlamak için 5 mg SirReal2 (item no:18116 Cayman Chemical, U.S.A) 198.2 µL DMSO (BioShop, Kanada) içerisinde çözdürüldü ve 60mM'lık ana stok elde edildi. Son olarak hazırlanan tüm ana stok çözeltiler aligotlara ayrılarak -80°C'de (Panasonic, Japonya) muhafaza edildi.
- ❖ AgNP ana stoğu için önceden elde edilen sıvı formda bulunan gümüş nanopartiküller 5 dk. 10000 rpm'de (Hermle, Almanya) santrifüj edilerek etüvde (Nüve Fn 500), 80 °C'de kurutulmuş nanopartiküllerin 10 mg hassas terazide tartılmasının ardından 1ml distile su içerisinde çözdürülerek 10 mg/ml AgNP ana stok çözeltisi hazırlandı.
- ❖ Berberin+AgNP için Berberin (30mM) ana stoğundan 100µl, AgNPs 10 mg /ml ana stoğundan 15 µl eklendi. Honokiol+AgNP için Honokiol (150 mM) ana stoktan 85 µl, AgNPs 10 mg /ml ana stoğundan 62,5 µl eklendi. SirReal2+AgNP de ise 60 mM ana stoktan 42 µl, AgNPs 10 mg /ml ana stoğundan 12.5 µl eklenerek bir gece 16 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda (BioSan, Letonya)

thermoshaker ile çalkalanarak nanopartiküllerle moleküllerin etkinleştirilmesi sağlandı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Nanopartiküllerle moleküllerin karanlık ortamda etkinleştirilmesi.

2.2. Hücre Kültürü İşlemleri

DLD (Kolon kanseri hücre hattı, ATTC) ve MDA-MB-231 (Meme kanseri hücre hattı, ATTC), HCT-116 (Kolon kanseri hücre hattı, ATTC), HUVEC (Sağlıklı insan hücre hattı, ATTC) bu hücre hatları kyro tüplerde $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı azot tankında saklanan bu hücre hatları çalışma için çıkartıldı (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Sıvı azot tankından hücrelerin çıkarılması.

Çıkartılan bu hücrelerin buldukları tüplerin kapakları biraz açılarak çözünmeleri beklenildi. Ardından her hücre için falkon tüplerine 5 ml %10'luk FBS (fetal bovine serum Sigma, U.S.A) ve %1 penisilin/streptomisin (Gibco Thermofisher Scientific, U.S.A) antibiyotik içeren DMEM (Dulbecco's modified eagle medium Sigma, U.S.A) konuldu. Ardından hücreler medyum içeren falkonlara aktarıldı ve 1100 RPM'de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında dibe çöken pelet bırakılır önceki medyum atılarak yeni 5ml DMEM falkonlara ve hücre adları ve pasaj numaraları yazılan petri kaplarına konuldu. Ve falkonda birkaç kere pipetaj yapılarak hücrelerin çözünmeleri sağlanılarak bütün medyumla beraber hücreler çekildi ve petriye aktarıldı. Hücreler yeni ortama

adapte olabilmeleri için iki gün boyunca 37 °C ve %5'lik CO₂ içeren inkübatöre (Panasonic, Japonya) bırakıldı.

İnkübatörden çıkarılan petriyerler %70'lik alkolle sterilizasyonu yapılan invert mikroskopta (Evos, U.S.A.) sırasıyla incelendi. Hücre yoğunluğu ~%70'e ulaştığı gözlemlendiğinde pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Eski medyum atılarak petriye 3 ml PBS (fosfat tamponu, Sigma-Aldrich, U.S.A.) eklenerek yıkama işlemi yapıldı. PBS 'de atılarak üzerine 2 ml tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, U.S.A.) eklenildi. 5 dakika inkübatörde hücreler inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin kalktığı görülmesinin ardından tripsinin aktivitesini durdurmak için 5 ml DMEM petriye eklenilerek birkaç defa pipetaj yapıldı. Ve tek kullanımlık steril küvete 15 ml DMEM konuldu ve petriyelerden 0.5 ml hücre çekilerek küvete bırakıldı. Çoklu pipet yardımıyla 96'lık platlara 100 µl olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.

Daha önceden hücre ekimi yapılan 96 kuyucuklu platelerin belirli yoğunluğa ulaştığı görüldüğünde maddeler belirlenen dozlarda hücrelere uygulanmaktadır. İlk olarak çalışmada kullanılacak olan moleküllerin ilk doz deneme uygulaması Tablo 2.1'deki gibi yapıldı.

Tablo 2.1: Çalışmada kullanılan moleküllerin ilk doz belirleme uygulaması.

Molekül	Dozlar	Hücre Hatları	Uygulama Zamanı	Referanslar
Berberin	25 µM, 50 µM, 100 µM	MDA-MB-231, DLD-1	48 saat	(La vd., 2017; Yao vd., 2019)
Honokiol	40 µM, 60 µM, 80 µM	MDA-MB-231, DLD-1	48 saat	(F. Chen vd., 2004; E.-J. Park vd., 2009; Wolf vd., 2007)
SirReal2	10 µM, 20 µM, 30 µM	MDA-MB-231, DLD-1	48 saat	(Rumpf vd., 2015)

Literatürden faydalanılarak MDA-MB-231 ve DLD-1 hücre hatlarına tablo 2'de belirlenen konsantrasyonlarda 96'lık mikroplatelere ilk doz denemeleri yapıldı. Bu denemelerin ardından çalışmada kullanılacak olan moleküllerin doz konsantrasyonları belirlenerek tablo 2.2'deki gibi uygulama yapıldı.

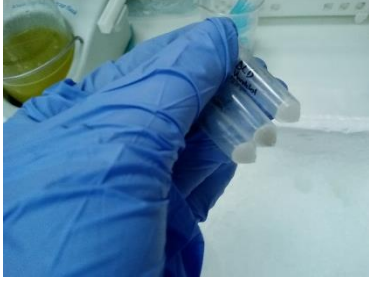
Tablo 2.2: Çalışmadaki moleküllerin konsantrasyonları, uygulama zamanı ve kullanılan hücre hatları.

Grup	Konsantrasyon	Hücre Hatları	Uygulama Zamanı
Kontrol		MDA-MB-231,DLD-1,HUVEC, HCT-116	48 Saat
AgNP	5 ug/ml	MDA-MB-231,DLD-1,HUVEC, HCT-116	48 Saat
Honokiol	25 µM	MDA-MB-231,DLD-1,HUVEC, HCT-116	48 Saat
Honokiol+AgNP	25 µM	MDA-MB-231,DLD-1,HUVEC, HCT-116	48 Saat
Berberin	100 µM	MDA-MB-231,DLD-1,HUVEC, HCT-116	48 Saat
Berberin+AgNP	100 µM	MDA-MB-231,DLD-1,HUVEC, HCT-116	48 Saat
SirReal2	25 µM	MDA-MB-231,DLD-1,HUVEC, HCT-116	48 Saat
SirReal2+AgNP	25 µM	MDA-MB-231,DLD-1,HUVEC, HCT-116	48 Saat

Belirlenen konsantrasyonlarda planelere madde veriliminin ardından 48 saat inkübasyona bırakılan hücrelerin bulunduğu her bir kuyucuğa 10 µl CVDK-8 (EcoTech, Türkiye) hücre sağkalım kiti verilerek bir saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda spektrofotometre cihazında (Thermofisher Scientific, U.S.A) 450 nm absorbansın da hücre sağkalım oranları ölçüldü (Ozden vd., 2014). Excel programıyla alınan verilerden hücre sağkalım grafikleri elde edildi. Bu elde edilen verilerin SPSS Statistic 26 programında One–Way ANOVA testi uygulanarak istatistiksel analizi gerçekleştirildi.

Western Blot yöntemi için kullanılacak hücrelerin petrilere ekimi ise normal pasajlama işleminin ardından her petriye 500 µl olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Ardından ~%70'lik yoğunluğa gelindiğinde petrilere belirlenen konsantrasyonlarda madde verildi. 48 saat inkübasyonun ardından hücreler western blot işlemi için toplandı. Uygulama süresinin dolmasının ardından buz üzerinde işlemler yapılmaya başlandı. Petrideki medyumun aspire edilmesinin akabinde üzerine 3 ml soğuk PBS eklenerek yıkama işlemi yapıldı. Yıkama PBS'ide de aspire edilerek petriye 1,5 ml PBS eklenildi kazımak için plastik aparat kullanılarak perilerdeki hücrelerin kazıtılarak çıkarılması sağlandı. Alınan bu hücreler endorf tüplerine otomatik pipet yardımıyla aktarıldı. 5 dakika 4 °C'de 1200

RPM’de santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve hücre topluluğu homejenizasyon işlemi için -80 °C’ye bırakıldı (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Hücrelerin toplanması.

2.3. Protein Homejenizasyon İşlemleri

Daha önceden toplanılan ve -80 °C’de saklanan hücreler homejenizasyon işlemi için çıkarıldı. Öncelikli olarak buz makinesinden (Hermlle, Almanya) buz temin edildi. Getirilen hücreler buz dolu kabın içine konuldu. -20 °C’de muhafaza edilen TNN buffer (TNN+NP40, Sigma-Aldrich, U.S.A) ve PMSF’inde (Sigma-Aldrich, U.S.A) çözünmesi beklenildi. TNN buffer içerisine (1:1000) oranında PMSF eklenildi. Oluşan bu karışımından 100 µl alınarak hücrelerin her birine konuldu. Hücreler bu işlemin ardından 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Akabinde 3 dakika vorteks, 3 dakika buz da bekletme şeklinde 7 döngü halinde hücrelere uygulandı. Bu uygulamadan sonra hücreler 30 dakika buz içeren kaptaki inkübasyona bırakıldı. Ardından hücreler 10,000 RPM’de 5 dakika 4 °C’de santrifüj edildi. Hücrelerin süpernatant ve peleti ayrıldıktan sonra yeni ependorfların içerisine süpernatantlar otomatik pipet yardımıyla alındı.

2.4. Bradford Yöntemi İle Protein Miktar Tayini

Protein saflaştırma işlemlerinin ardından hücrelerin protein miktar tayini yapılabilmesi için BSA (Sigma-Aldrich, U.S.A.) standartları Tablo 2.3’deki gibi hazırlandı. Elde edilen örnekler 20 kat sulandırılarak, sırasıyla distile su, BSA standartları, sulandırılmış örnekler üç tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu mikro plakaya 10 µl olarak yüklenildi. Ardından üzerlerine 190 µl Bradford reaktifi (Ecotech, Türkiye) eklenerek 10 dakika karanlık ortamda bekletilmesinin ardından 595 nm dalga boyunda (ThermoFisher Scientific, U.S.A) spektrofotometre cihazında ölçümü yapılarak elde edilen eğri kullanımıyla protein miktar tayini yapıldı (Şekil 2.5).

Tablo 2.3: BSA standart serileri.

	6 1500µg/ml	5 1000ug/ml	4 750ug/ml	3 500ug/ml	2 250ug/ml	1 125ug/ml
BSA	30 µl	20 µl	15 µl	10 µl	5 µl	2,5 µl
SU	10 µl	20 µl	25 µl	30 µl	35 µl	37,5 µl



Şekil 2.5: Bradford Yöntemi İle Protein Miktar Tayini.

2.5. Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ve Western Blotlama

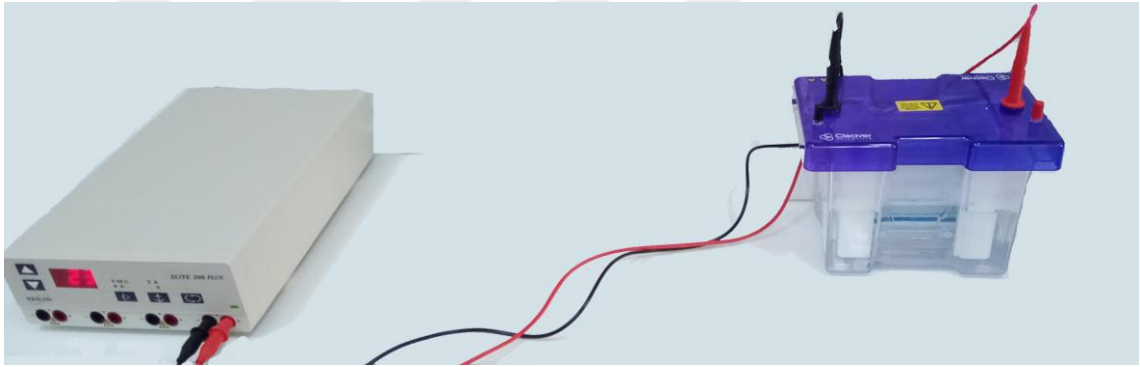
Western Blot için cam malzemelerden oluşan jel hazırlama düzeneği kuruldu. Tedarik edilen firmanın Serva Acrylamid-SDS jel (10687.01) standart protokolü ile %10'luk jel hazırlama protokolü oluşturuldu;

- ❖ Akrilamid solüsyon 2,33 ml (Serva, U.S.A.)
- ❖ Separating buffer 1,75 ml (Serva, U.S.A.)
- ❖ Ultra saf su 2,82 ml
- ❖ SDS 0,07 ml (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- ❖ TEMED 0,011 ml (Merck, Almanya)
- ❖ APS 0,021 ml (Sigma-Aldrich, U.S.A.)

Yukarıda listelenen maddeler kullanılarak 50 ml'lik falkon tüpte jel hazırlandı. Tüp birkaç defa alt üst edilerek hazırlanan jel düzeneğe otomatik pipet yardımıyla konuldu. Yükleme kuyucuklarının oluşmasını sağlayan tarak aparatı yerleştirilerek 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sürenin sonunda donan jel düzeneğinden ayrılarak elektrofrez tankına yerleştirildi ve tankın içerisine running işlemi için 4 °C 'den çıkarılan running buffer (Bio-Rad, U.S.A.) dolduruldu Ardından kaynatma işlemi için homejenije olan

hücreler -80 °C ‘den çıkartıldı. Buz makinesinden temin edilen buz içerisinde tutularak işlem devam edildi. Steril PCR tüplerine hücrelerin adları yazılarak protein ölçüm sonuçlarına göre otomatik pipetle örnekler konuldu. En son 5 µl (2x Laemli buffer+beta merkaptotanol, Sigma-Aldrich, U.S.A.) tamponu örneklerin üzerine konuldu. Ardından thermo shaker (BioSan, Letonya) ile 95 °C 5 dakika süreyle kaynatıldı. 1mm’lik kuyucuk oluşturan tarak dikkatlice çıkarılarak ilk olarak marker (Bio-Rad, U.S.A.) ardından örnekler sırasıyla kuyucuklara konuldu.

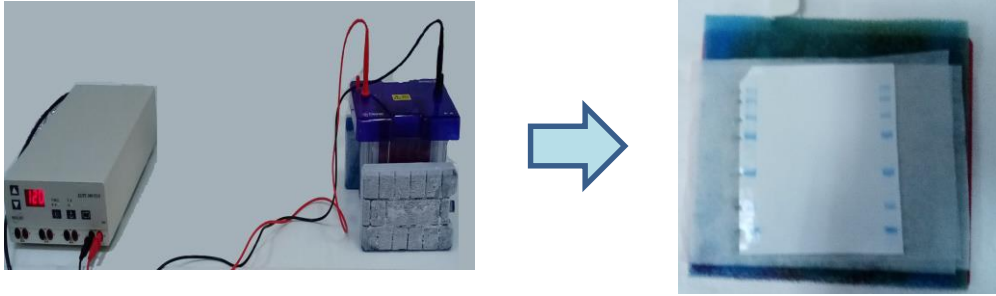
Cihazın kapağı kapatılarak kablolar renklerine uyumlu olacak şekilde güç kaynağına bağlandı.10 dakika. 90 voltta ilk koşturma yapıldı. Bu süre dolunca cihaz tekrar ayarlanarak 90 dakika 120 volt olarak ayarlandı markerın yeterince açılması için yaklaşık 150 dakika örnekler koşturuldu (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Running işlemi.

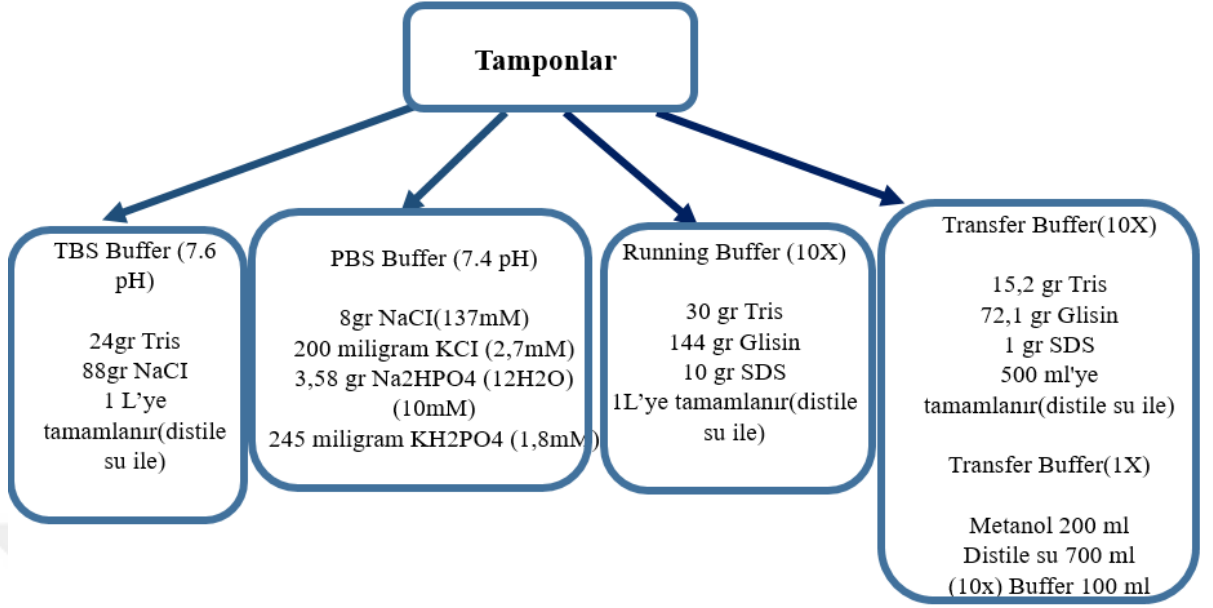
Running işlemi sona erdiğinde membrana transfer aşamasına geçildi. Yürütme tankı açılarak runing tamponu kendi kutusuna geri aktarıldı ve 4 °C’ye kaldırıldı. Jelin membrana transferi için başka bir kap içerisinde 4 °C’den çıkarılan transfer buffer eklenerek sandviç aparatları ıslanması sağlandı ardından sandviç hazırlanmaya başlandı. Sandviç kaseti açılarak her iki (kırmızı ve siyah) tarafına süngerler konuldu ve hava kabarcıkları nazik bir şekilde bir ileri bir geri yapılarak silindir şeklindeki roller ile çıkarıldı. Aynı işlem sandviçlerin her iki tarafına daha önceden sandviç aparatı boyutunda kesilmiş olan transfer tamponuna bulanık filtre kâğıtlarına da uygulandı. Nitroselüloz membran da kırmızı kısma konuldu aynı işlem onada gerçekleştirildi ve hassas bir şekilde jel membranın üstüne konuldu filtre kâğıtları da üzerine eklenerek sandviç

kapatıldı ve transfer için cihaza hazırlanmış olan sandviçlerin konulmasıyla üstüne transfer tamponu eklenerek cihazın kapağı kapatıldı. Kablolar kendi renklerine uyumlu olacak şekilde takıldı. Güç kaynağı 120 dakika 150 mA şeklinde ayarlanarak jelin mebrana transferi gerçekleştirildi (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Transfer işlemi.

Transfer işleminin bitmesiyle blotlama aşamasına geçildi. Blotlama için %5'lik taze süt 2,5 gr süt tozu ile 50 ml'lik falkon tüpüne TBS tamponu ilave edilerek toplam hacim 50 ml olacak şekilde hazırlandı. Transfer işlemi biter bitmez membran filtre kâğıtları ile hazırlanan sandviçlerden çıkarıldı. Marker yerlerinin belirtilmesinin ardından hazırlanmış olan %5'lik süt ile oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 30 dakika çalkalanarak blotlama işlemi sonlandırıldı. Membran üstündeki süt atılarak TBS-T (TBS tamponu+tween20) ile 15 dakika 3 döngü olacak şekilde yıkandı (Şekil 2.8). Ardından birincil antikor işlemine geçildi membran sırasıyla SIRT2, SIRT3, pürüvat dehidrojenaz (PDH), laktat dehidrojenaz A (LDHA) antikorlarıyla 4 °C`de gece boyu 16 saat çalkalamaya maruz bırakılarak birincil antikor işlemi yapıldı. Sürenin dolmasının ardından membran oda sıcaklığında 5-10 dakika birincil antikorla çalkalanmaya devam edildi. Birincil antikorunu uzaklaştırmak için membran 3 döngü halinde 15 dakika TBS-T ile yıkandı. Bu aşamanın sonunda 2.cil antikor işlemine geçildi. İlk ikincil antikorlar (15 ml'lik falkon tüpünde şöyle hazırlandı; (2 ml %2'lik süt+10ml TBS +1µl anti mouse veya anti rabbit antikor) ile oda sıcaklığında 30 dakika çalkalanarak inkübasyonu yapıldı. Bu işlemin de bitmesiyle aynı şekilde membran tekrar 3 döngü 15 dakika süreliğinde yıkaması TBS-T ile yapıldı. Ardından görüntüleme işlemine geçildi. Enhanced chemiluminescence (ECL) kitleri (BioRad, U.S.A.) 250 µl lüminol+250 µl Hidrojen peroksit+ 500 µl PBS karışımı ile görüntüleme cihazı IBright CL1000 (Thermofisher Scientific, U.S.A.) kullanılarak membran görüntülemesi yapıldı.



Şekil 2.8: Çalışmada kullanılan tamponlar ve içerikleri.

2.6. Akridin Orange ile Apoptozun Belirlenmesi

MDA-MB231 ve DLD-1 hücreleri 24 kuyucuklu steril platelere ekildi. Hücrelerin yeterli çoğunluğa eriştiği gözlemlenildiğinde çalışmada kullanılan maddeler verildi. Akabinde 48 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında çalışma için boya çözeltisi hazırlandı;

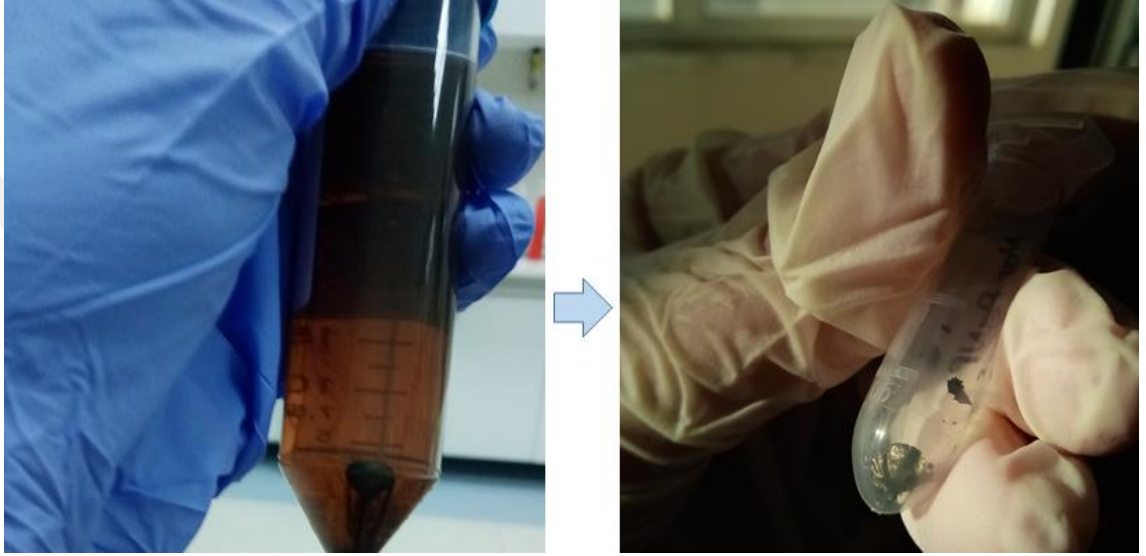
- ❖ 20 µl Etidyum Bromür (10mg/ml)
- ❖ 2 µl Akridin Orange (100mg/ml)
- ❖ 78 µl PBS

Hücrelerin inkübasyon süreleri dolduğunda kuyucuklardaki besi yeri aspire edildi. Kuyucuklar PBS ile yıkandı ve PBS'de atıldı. Kuyucuklara hazırlanmış olan 1 ml boya çözeltisi eklenildi. 30 saniye plate hafifçe çalkalandı. Ters mikroskopta (inverted) kırmızı ve yeşil kanalda hücre morfolojisindeki değişiklikleri saptamak için pozlamalar yapıldı.

3. BULGULAR

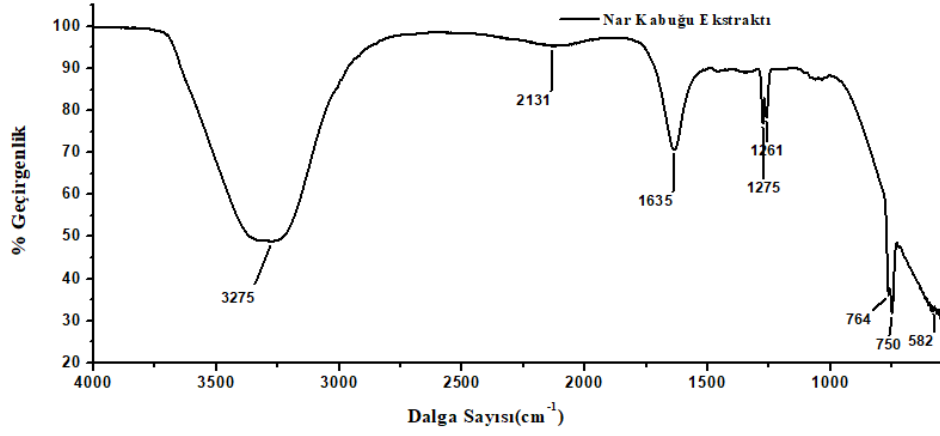
3.1. Nanopartikül Eldesi ve Karakterizasyon Bulguları

Nanopartikül eldesi için 24 saat inkübasyonun ardından nanopartikül sıvı formunun renk değiştirip açık renk halinden koyu hale dönmesi ve kurutulduğunda da gümüş nanopartikül oluşumu gözlemlenilmiş olup literatürle doğrulanmaktadır (Şekil 3.1).

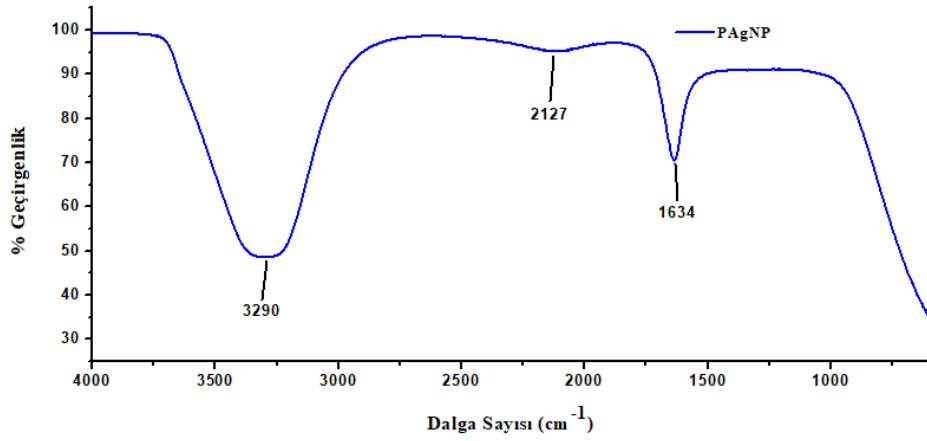


Şekil 3.1: Biyosentez yöntemiyle elde edilen gümüş nanopartikülün görüntüsü.

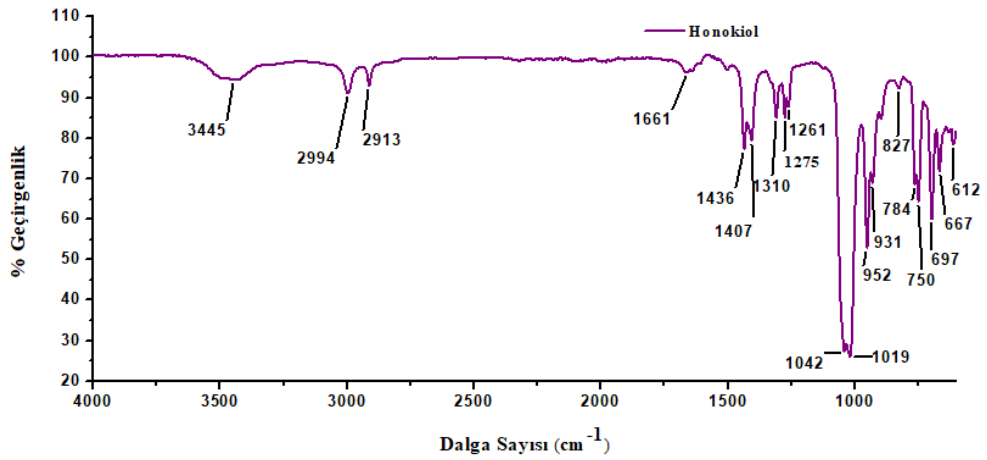
Yeşil sentez yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyon işlemleri için FT-IR kızıl ötesi spektrumlarından yararlanıldı elde edilen bu bantlar onların içeriğinde olan bağları belirtmektedir. Bu çalışmada yeşil sentez yöntemiyle nanopartikül elde edilmesini sağlayan materyal olarak nar kabuğu ekstresi şekil 3.2, elde edilen AgNP şekil 3.3, Honokiol şekil 3.4, Berberin şekil 3.5, SirReal2 şekil 3.6 ve onların AgNP ile etkileştirilmiş halleri şekil 3.7, şekil 3.8, şekil 3.9 'da belirtildiği gibi FT-IR bulgularına ulaşıldı. 3501 cm^{-1} , 3445 cm^{-1} , 3443 cm^{-1} , 3336 cm^{-1} , 3290 cm^{-1} , 3275 cm^{-1} , 3274 cm^{-1} , 2137 cm^{-1} , 2127 cm^{-1} , 2193 cm^{-1} , 2137 cm^{-1} , 2136 cm^{-1} , 2131 cm^{-1} , 2118 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} , 1634 cm^{-1} , 1612 cm^{-1} , 1437 cm^{-1} , 1436 cm^{-1} , 1407 cm^{-1} , 1319 cm^{-1} , 1310 cm^{-1} , 1275 cm^{-1} , 1261 cm^{-1} , 1260 cm^{-1} , 1042 cm^{-1} , 1019 cm^{-1} , 1010 cm^{-1} pikleri elde edildi. Bu pikler $-\text{OH}$, $-\text{CH}$, $-\text{C}-\text{C}$ gibi bağların olduğunu ifade etmektedir.



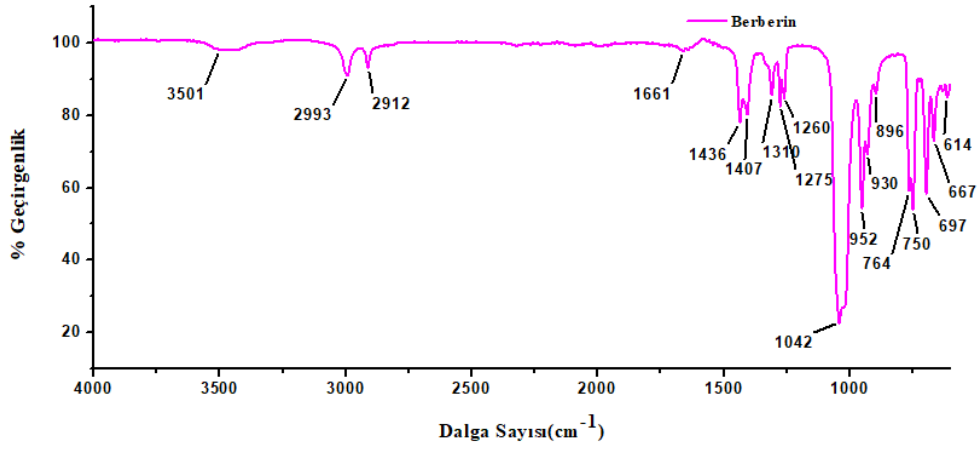
Şekil 3.2: Nar Kabuğu Ekstraktı FT-IR görüntüsü.



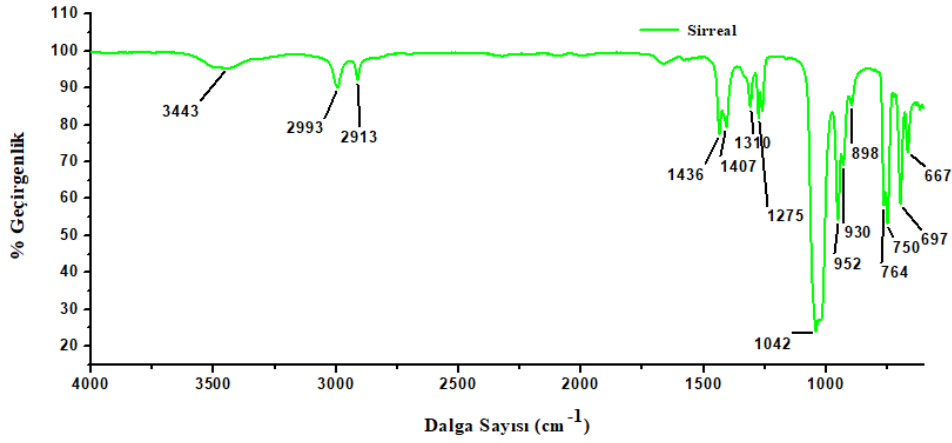
Şekil 3.3: Nar Kabuğundan Sentezlenen AgNP FT-IR görüntüsü.



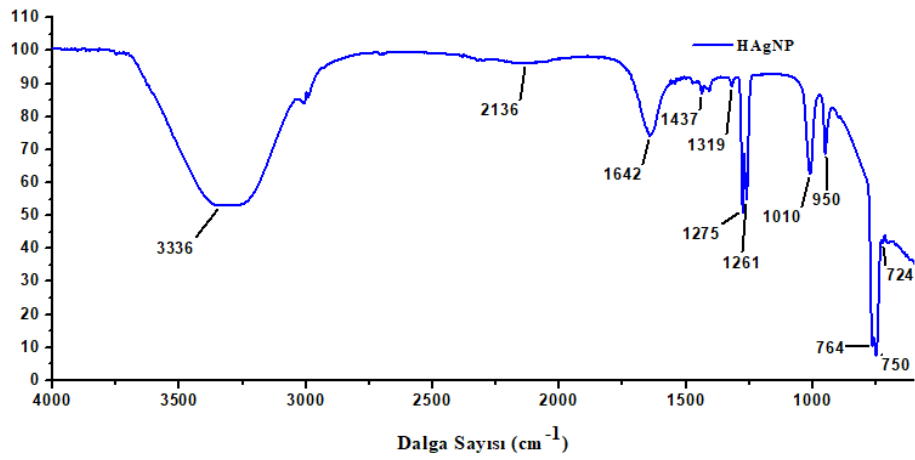
Şekil 3.4: DMSO'da çözünen Honokiolün FT-IR görüntüsü.



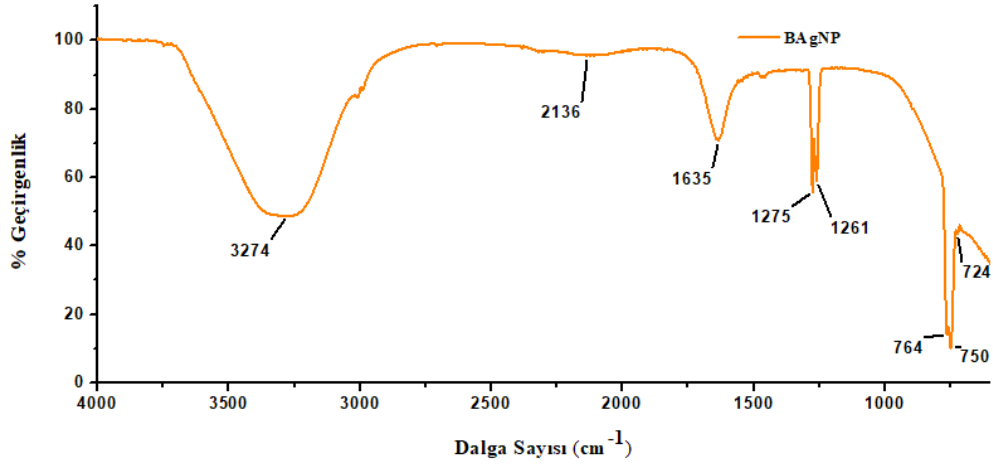
Şekil 3.5: DMSO'da çözünen Berberinin FT-IR görüntüsü.



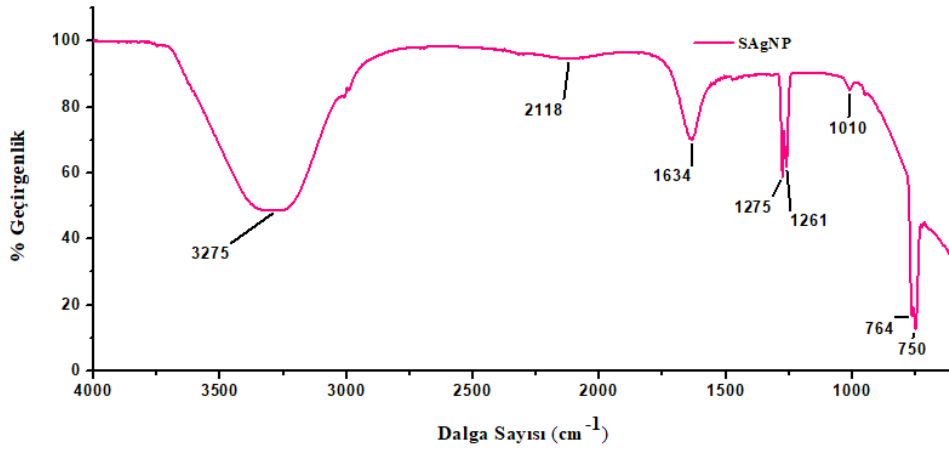
Şekil 3.6: DMSO'da çözünen SirReal2'nin FT-IR görüntüsü.



Şekil 3.7: HAgnP FT-IR görüntüsü.

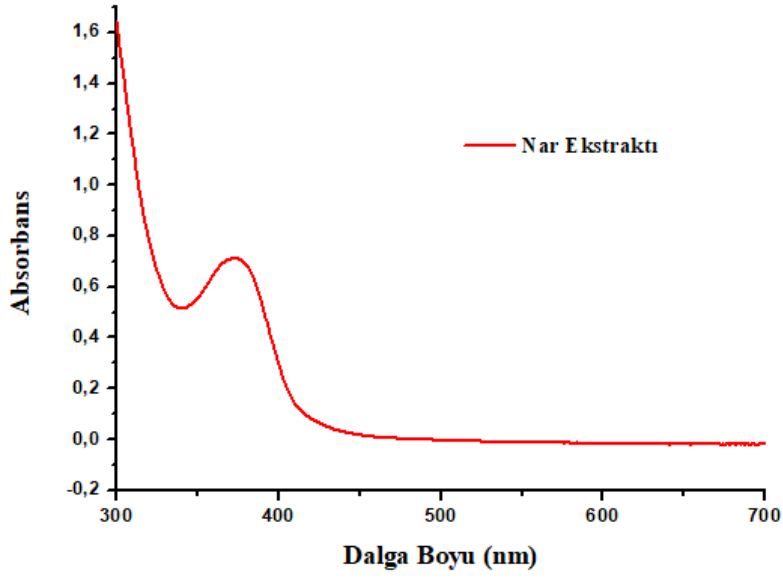


Şekil 3.8: BAgNP FT-IR görüntüsü.

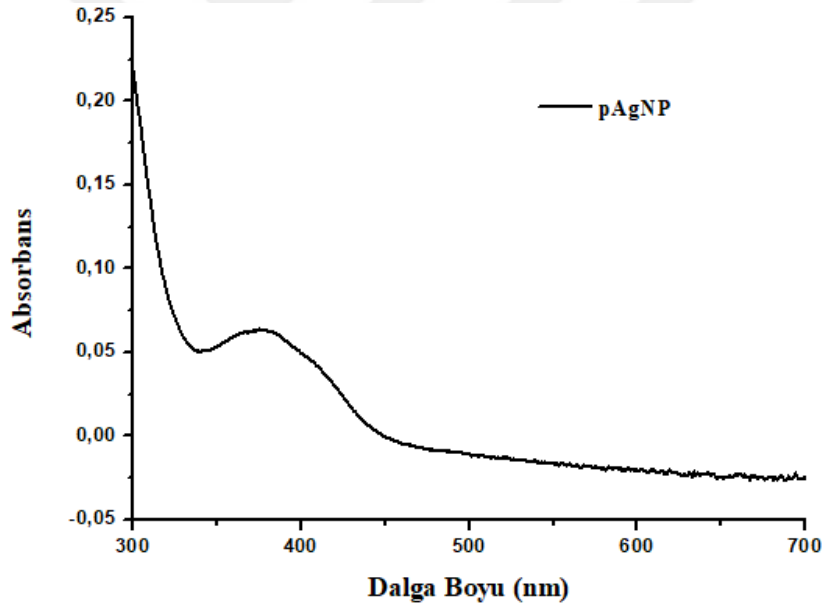


Şekil 3.9: SAgNP FT-IR görüntüsü.

Diğer karakterizasyon işlemlerinden olan UV-vis bulguları, nar ekstratı şekil 3.10'da, AgNP şekil 3.11'de, SIRT modülatörleri ve AgNP etkileşimleri şekil 3.12'de ve modülatörlerin AgNP ile etkileşmiş formları şekil 3.13' de belirtildiği gibi bulunmuştur.

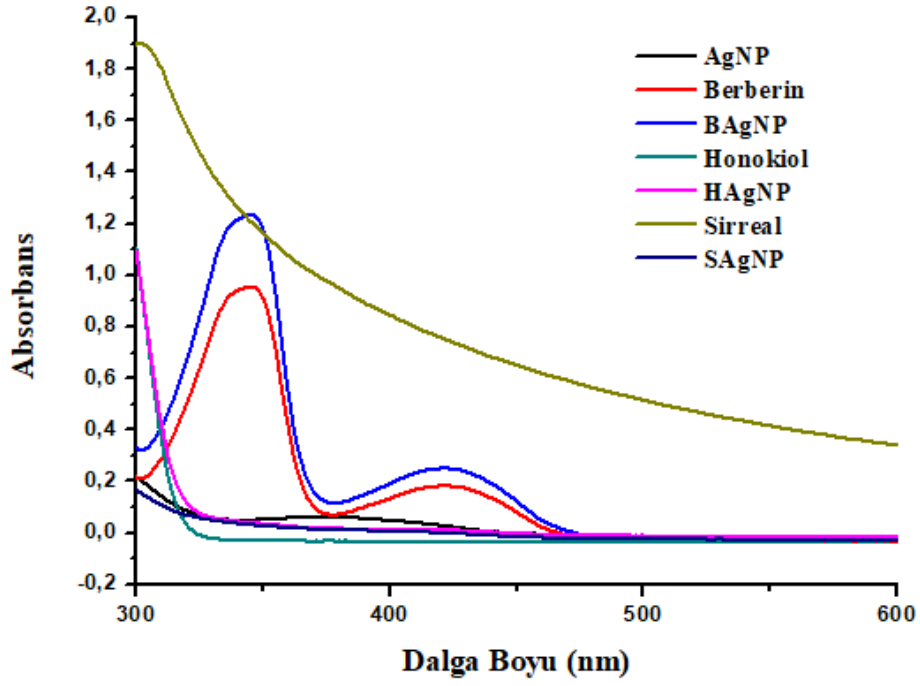


Şekil 3.10: Nar ekstraktı UV-vis görüntüsü.

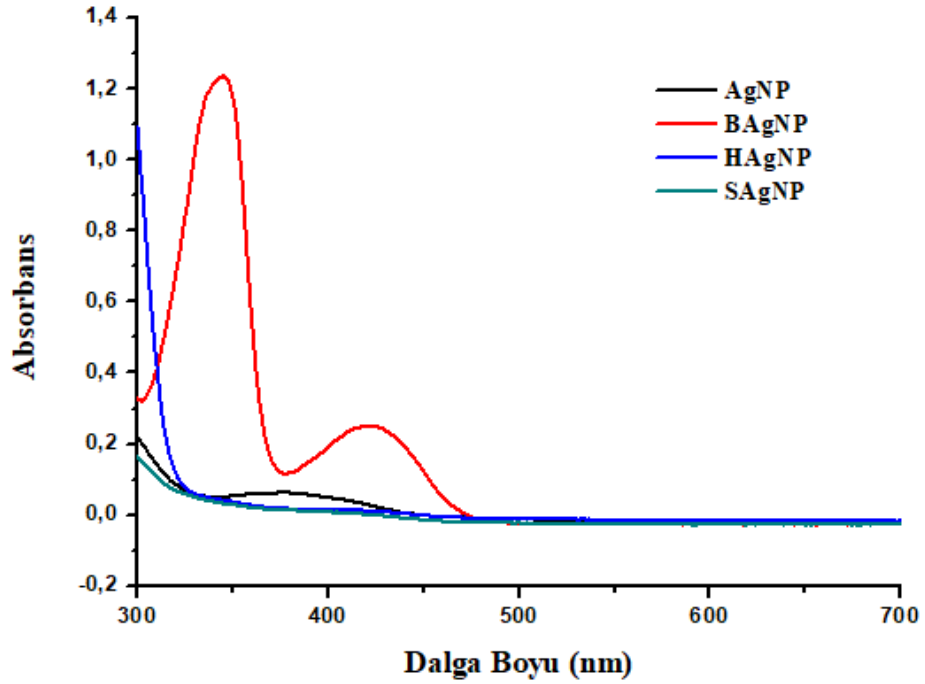


Şekil 3.11: PAgNP UV-vis görüntüsü.

Elde edilen nanopartiküllerin 350 ve 400 nm absorbasında güçlü bant eldesi literatür ile doğrulanmaktadır (Şekil 3.11).



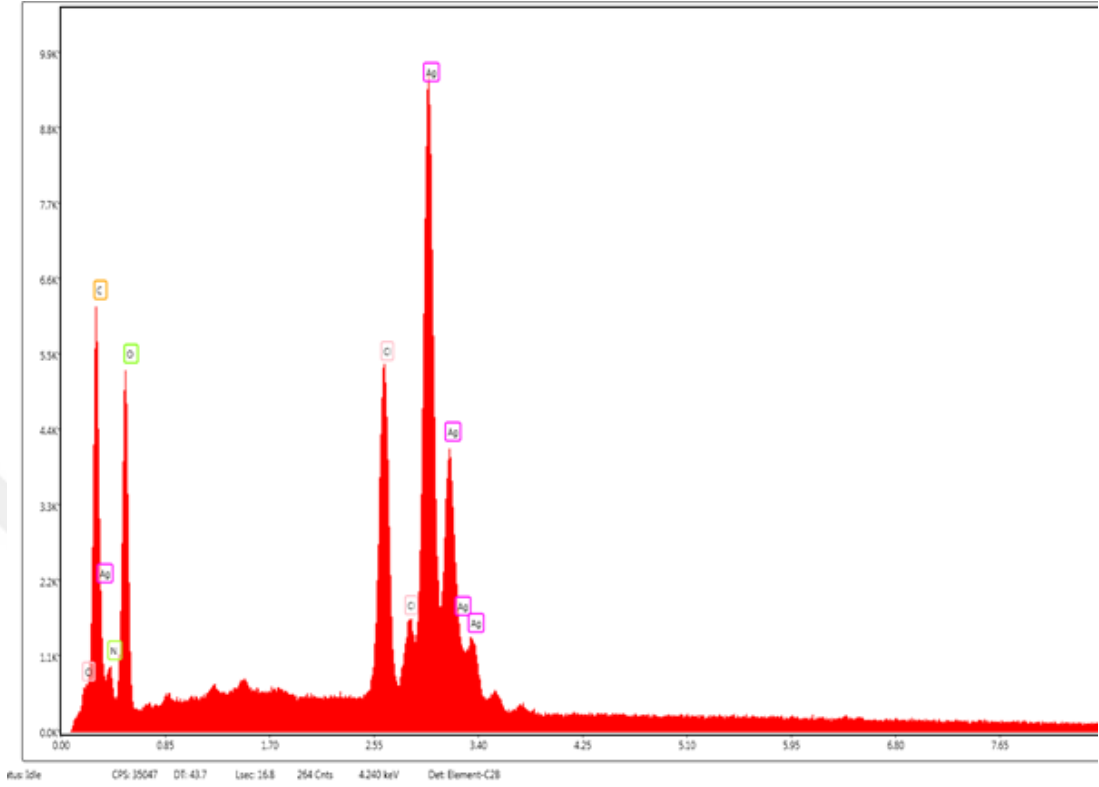
Şekil 3.12. Moleküller ve AgNP ile etkileştirilmiş halleri UV-vis görüntüsü.



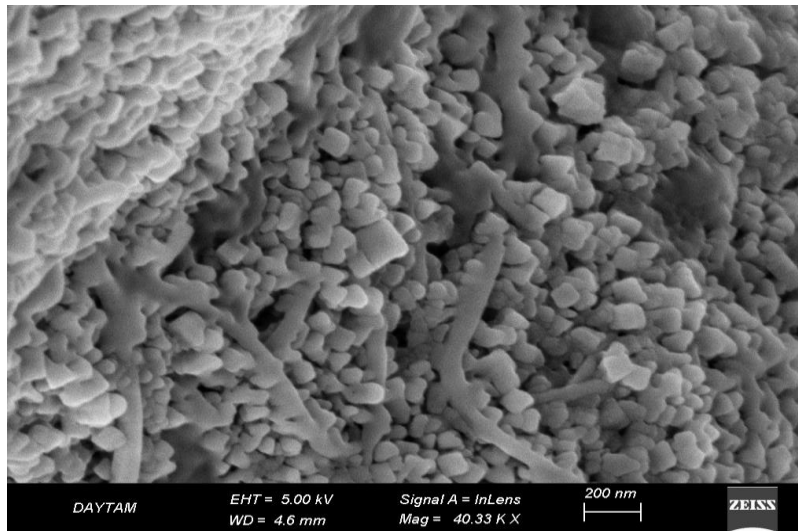
Şekil 3.13: AgNP ile etkileştirilmiş halleri UV-vis görüntüsü.

Nanopartikül Şekil 3.14 EDX görüntüsünde görüldüğü gibi içerdiği Ag elementleri ile gümüş nanopartikül ifadesini kuvvetli bir şekilde belirtmektedir. Şekil 3.15'deki SEM

görüntüsüyle de bu sentezlenen nanopartiküllerin sıklıkla kübik yapıda olduğu görülmektedir.

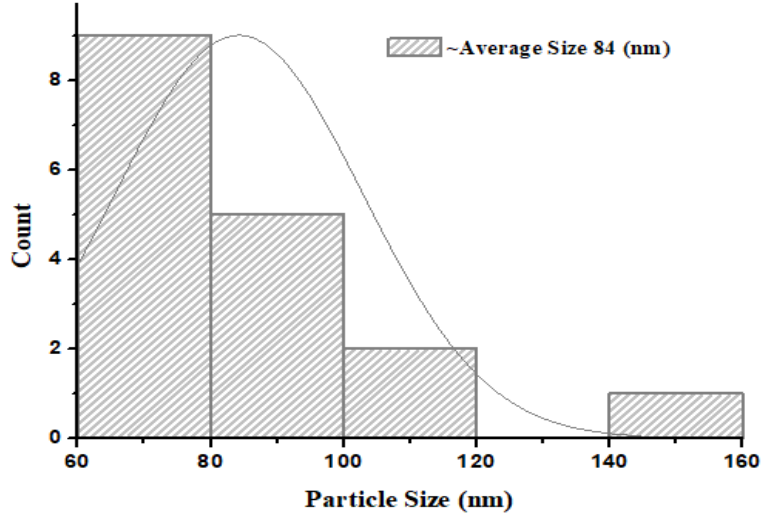


Şekil 3.14: Biyosentez yöntemiyle elde edilen gümüş nanopartikülün EDX görüntüsü.



Şekil 3.15: Nanopartiküllerin SEM görüntüsü.

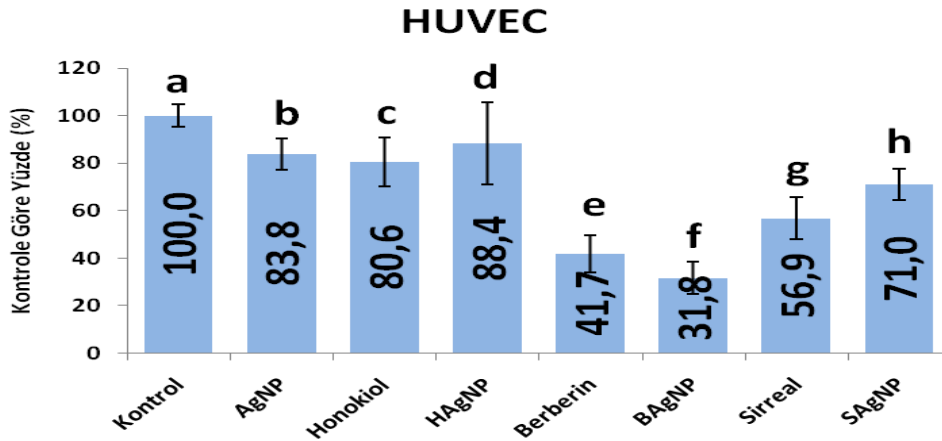
Ayrıca elde edilen bu nanopartiküllerin boyutlarının büyüklükleri ImageJ 1.53m programı yardımıyla ölçülerek veri seti oluşturuldu. Elde edilen bu verilerden nanopartiküllerin yaklaşık boyut büyüklüklerini ifade eden grafik elde edildi (Şekil 3.16). Nanopartiküllerin yaklaşık 84 nm büyüklüğünde olduğu ifade edildi.



Şekil 3.16: Nanopartiküllerin boyut analiz grafiği.

3.2. Nanopartiküllerle Etkileşen Moleküllerin Hücre Sağkalım Bulguları

HUVEC hücre hattına karşı 48 saatlik doz uygulaması hücre canlılığı test sonucu Şekil 3.17’de görülmektedir.

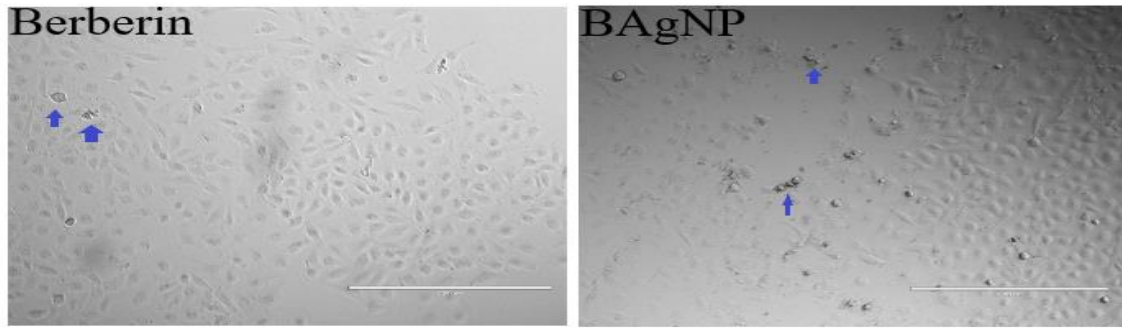


Şekil 3.17: Nanopartiküllerle etkileşen moleküllerin HUVEC hücre hattında 48 saat uygulama sonrası hücre sağkalım grafiği. AgNP: 5 ug/ml, Honokiol: 25 µM, HAgNP: Honokiol+AgNP 25 µM, Berberin: 100 µM, BAgNP: Berberin+AgNP 100 µM, SirReal2: 25 µM, SAgNP: SirReal2+AgNP 25 µM doz konsantrasyonlarında 48 saat uygulama süresinde hücre sağkalım yüzdelere bakılmıştır. One-Way ANOVA: $p < 0,001$; PostHoc (Bonferroni): $ae,af,ag,be,bf,ce,cf,de,df,fh$ $p < 0,001$, ah,bg,dg,eh $p < 0,01$, cg,fg $p < 0,05$.

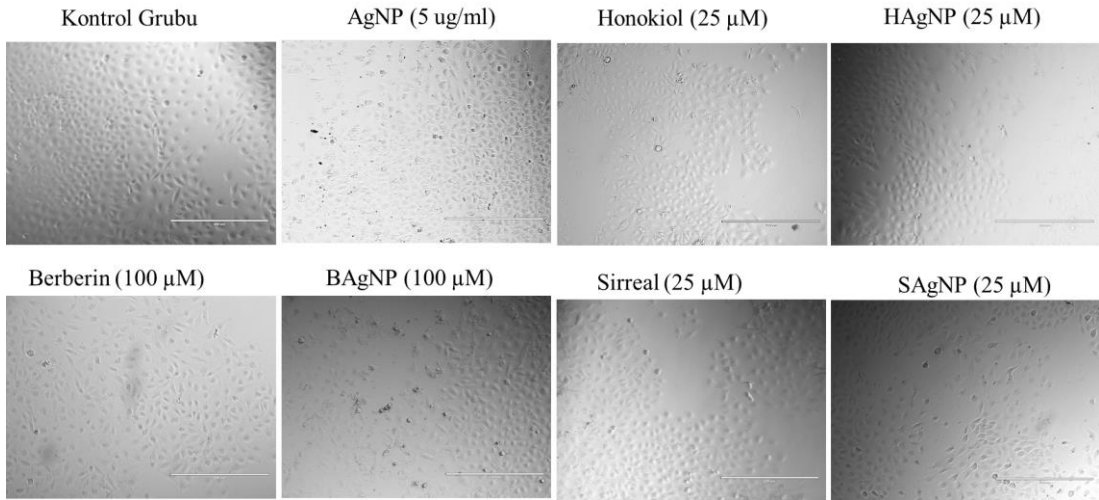
Kontrolle; AgNP ve Honokiolün kıyaslaması yapıldığında hücre sağkalımında az miktarda düşüş görülmüş olsa da istatikselsel anlam ifade etmemektedir. Kontrolle Berberin ve BAgNP karşılaştırıldığında Berberin ~%59, BAgNP'nin ~%68 oranında azalttığı $p<0,001$ anlamlılıkla ifade edilmektedir. Ancak Berberin ve BAgNP hücre morfolojik Şekil 3.18 görüntülerinde hücre deformasyonuna pek rastlanılmadı. Kontrolle Sireal ve SAgNP kıyaslandığında SirReal2'nin ~%43 ($p<0,001$), SAgNP ise %29 oranında ($p<0,01$) anlamlılık düzeyinde sağkalımı azalttığı görülmektedir. AgNP ile Honokiol, HAgNP kıyaslandığında AgNP hücre canlılığını Honokiole göre biraz daha fazla artırmakta, AgNP ile HAgNP karşılaştırıldığında ise HAgNP hücre canlılığını AgNP'ye göre artırmakta ancak istatikselsel anlam ifade etmemektedir. AgNP ile Berberin, BAgNP kıyaslanmasında AgNP Berberine göre hücre canlılığı ~%43 ve BAgNP'ye göre de ~%52 artırdığı ve $p<0,001$ istatikselsel anlamlılık ifade ettiği görülmüştür. AgNP ile SirReal2, SAgNP karşılaştırılması yapıldığında SirReal2 ~%27 hücre canlılığını azaltmakta ($p<0,01$) anlamlılık derecesinde gösterilmiştir. SAgNP, AgNP'ye göre az miktarda canlığa etki etmekte fakat istatikselsel anlam bulunmamaktadır. Honokiol ile HAgNP kendi aralarında kıyaslandığında HAgNP hücre canlılığını biraz daha artırmakta, istatikselsel olarak anlam taşımamaktadır. Honokiol, Berberin ve BAgNP ile karşılaştırıldığında Honokiol, hücre canlılığını Berberine karşı ~%39 oranda BAgNP'ye karşı ~%49 oranında ($p<0,001$) anlamlılık derecesinde artırmaktadır. Honokiolle SirReal2 kıyaslandığında, Honokiol canlılığı ~%24 oranında artırmakta istatikselsel ($p<0,05$) anlamlılık ifade etmektedir. Honokiolle SAgNP kıyaslandığında Honokiolün ~%10 oranında hücre canlılığını artırmakta ancak istatikselsel anlam ifade etmediği görülmektedir. HAgNP, Berberin ve BAgNP ile kıyaslandığında HAgNP Berberine göre ~%48, BAgNP'ye göre ~%57 anlamlılık derecesi ($p<0,001$) olarak canlılığı önemli bir şekilde artırmaktadır. HAgNP, SirReal2 ve SAgNP ile kıyaslandığında; HAgNP SirReal2'e göre ~%32 oranda ($p<0,01$) anlamlılıkla hücre canlılığında artış sağlamakta, SAgNP'ye göre ise HAgNP'nin ~%18 oranda canlılığı artırmakta ancak istatikselsel anlamlılık ifade etmemektedir. Berberin ve BAgNP kendi aralarında kıyaslanması yapıldığında Berberin BAgNP'ye göre ~%10 daha fazla hücre canlılığını artırdığı ancak istatikselsel anlamlılık ifade etmemektedir. Berberin SirReal2'e göre kıyaslandığında SirReal2'nin Berberine göre hücre canlılığını yaklaşık %16 artırmakta istatikselsel anlam ifade etmemekte, Berberinin SAgNP'yle kıyaslandığında ~%30 artırdığı ($p<0,01$) anlamlılık göstermektedir. BAgNP ile SirReal2,

SirReal2'nin canlılığı BAgNP'ye göre $p < 0,05$ anlamlılık seviyesinde $\sim\%26$ artırmaktadır, SAgNP'yle karşılaştırıldığında ise SAgNP'nin BAgNP'ye göre hücre canlılığını ($p < 0,001$) anlamlılık düzeyinde $\sim\%40$ artırdığı görülmüştür. SirReal2 ile SAgNP kendi aralarında kıyaslandığında SAgNP canlılığı $\sim\%15$ artırırken anlamlılık ifade etmemektedir.

Maddelerin HUVEC hücre hattına olan etkisinin görüntüleri Şekil 3.18 ve 3.19'da gösterilmektedir.

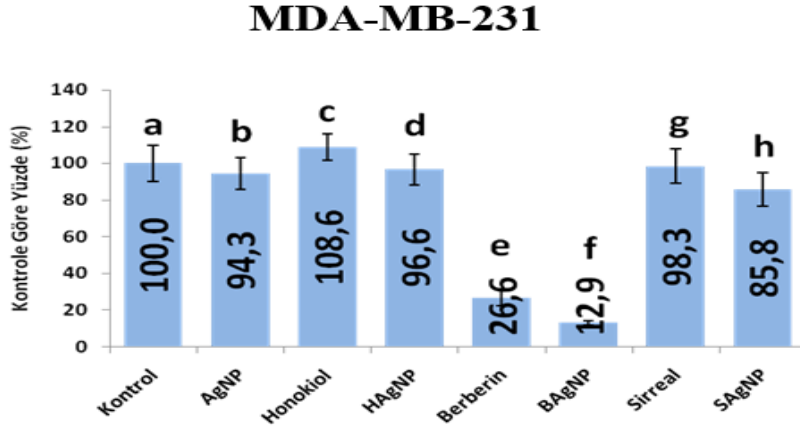


Şekil 3.18: HUVEC hücre hattı Berberin ve BAgNP hücre morfolojik görüntüleri. (Mavi ok: hücre deformasyonlarını belirtmektedir. 400 µm barında mikroskopta çekilen fotoğraflar).



Şekil 3.19: HUVEC hücre hattındaki 48 saat doz uygulama görüntüleri. (400 µm barında mikroskopta çekilen fotoğraflar).

Meme kanseri hücre hatlarından biri olan MDA-MB-231 hücre hattına moleküller ve nanopartikülle etkileştirilmiş hallerinin hücre sağkalım bulguları Şekil 3.20’de gösterilmektedir.

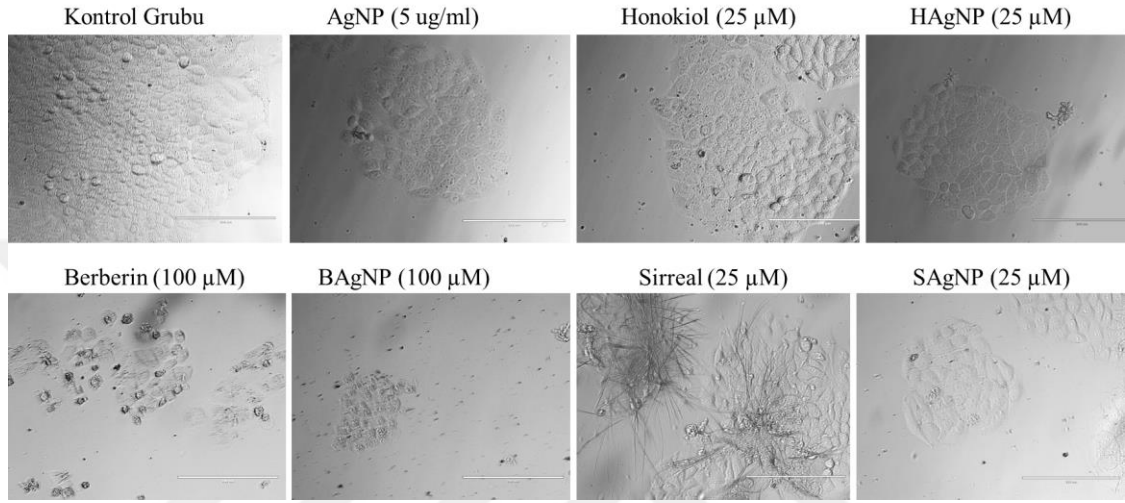


Şekil 3.20: Nanopartiküllerle etkileşen moleküllerin MDA-MB-231 hücre hattında 48 saat uygulama sonrası hücre sağkalım grafiği. AgNP: 5 ug/ml, Honokiol: 25 µM, HAgNP: Honokiol+AgNP 25 µM, Berberin: 100 µM, BAgNP: Berberin+AgNP 100 µM, SirReal2: 25 µM, SAgNP: SirReal2+AgNP 25 µM doz konsantrasyonlarında hücre sağkalım yüzdelerine bakılmıştır. One-Way ANOVA: $p < 0,001$; PostHoc (Games-Howell): ae,af,ce,de,df,eh,fh $p < 0,001$, cf,ef,eg,fg $p < 0,01$, be,bf,ch $p < 0,05$.

AgNP kontrolle karşılaştırılması yapıldığında AgNP'nin hücre canlılığını az miktarda düşürdüğü görülmekte ancak istatistiksel anlamlılık ifade etmemektedir. Kontrolle Honokiol grubunun karşılaştırılması yapıldığında Honokiolün pek etkisi görülmemektedir. Kontrol grubu ile HAgNP kıyaslandığında HAgNP hücre canlılığını azalttığı görülmekte istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmemektedir. Kontrol ile Berberin grubunun kıyaslanmasında, Berberin meme kanserindeki canlılığı ~%74 oranında şiddetli bir şekilde azalttığı, istatistiksel olarak ($p < 0,001$) derecesinde anlamlılık ifade etmektedir. Kontrol ile BAgNP kıyaslandığında BAgNP'nin ~%88 oranında hücre canlılığını çok kuvvetli bir şekilde düşürdüğü ($p < 0,001$) anlamlılık düzeyinde meme kanserine etkisi görülmüştür. Kontrol grubu ile SirReal2 ve SAgNP'nin karşılaştırıldığında SirReal2 kontrole göre hücre canlılığını az miktarda düşürürken, SAgNP kontrolle kıyaslandığında hücre canlılığını ~%15 azalttığı görülmekte ancak istatistiksel anlam ifade etmedikleri görülmüştür. AgNP ile Honokiol ve HAgNP

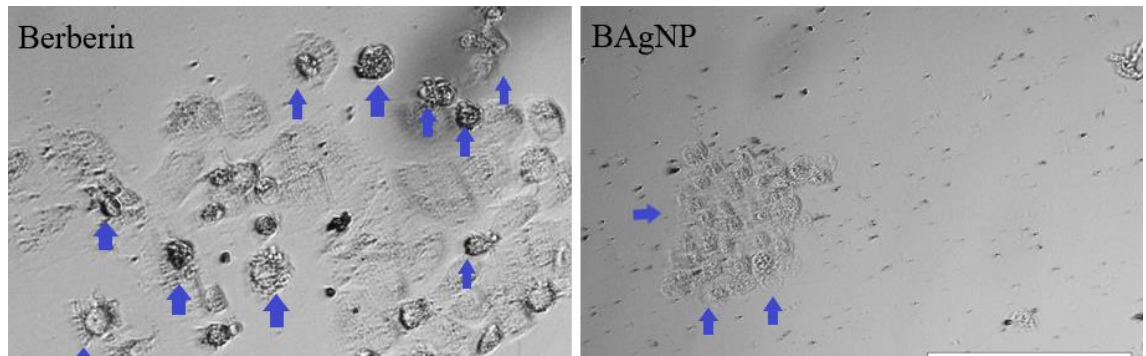
karşılaştırıldığında AgNP Honokiol ve HAgNP'ye göre burda hücre canlılığını azaltmakta fakat istatistiksel anlam ifade etmemektedir. AgNP ve Berberin kıyaslandığında, Berberin AgNP'ye göre hücre sağkalımı ~%68 oranında ($p<0,05$) anlamlılık düzeyinde düşürdüğü görülmüştür. AgNP ile BAgNP kıyaslandığında hücre canlılığını BAgNP'nin yalnız AgNP'ye karşı ~%82 oranında azalttığı ($p<0,05$) anlamlılıkla ifade edilmiştir. AgNP, SirReal2 ve SAgNP ile kıyaslandığında AgNP, SirReal2'ye göre hücre canlılığını düşürürken, SAgNP'de tersinin olduğu SAgNP'nin AgNP'ye göre hücre canlılığı azalttığı görülmekte istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedirler. Honokiol ile HAgNP kıyaslandığında, HAgNP hücre canlılığını azalttığı görülmekte istatistiksel anlamlılık ifade etmemektedir. Honokiol ile Berberin kıyaslamasında Berberin %82 oranında hücre canlılığını düşürmekte ($p<0,001$) anlamlılık göstermektedir. Honokiol ile BAgNP kıyaslandığında ise BAgNP ~%96 oranında sağkalımı azalttığı istatistiksel olarak da ($p<0,001$) anlamlılıkla önemli bir etki sergilemektedir. Honokiol ile SirReal2 karşılaştırıldığında, SirReal2'nin hücre canlılığını düşürmekte olduğunu istatistiksel anlamda anlamlılık göstermediği bulunmuştur. Honokiol ve SAgNP kıyaslamasında SirReal2'nin ~%23 oranında ($p<0,05$) anlamlılık derecesinde hücreyi azalttığı ifade edilmiştir. HAgNP ile Berberin karşılaştırılmasında Berberin hücreyi %70 oranında ($p<0,001$) anlamlılık seviyesinde düşüş sağlayarak etkisini göstermiştir. HAgNP ile BAgNP kıyaslandığında BAgNP ~%84 oranında yaşayan hücre sayısını azaltarak ($p<0,001$) anlamlılıkla etkisini belirtmiştir. HAgNP, Sirreal ve SAgNP ile karşılaştırıldığında, HAgNP SirReal2'ye karşı hücre canlılığını azaltmakta SAgNP ile kıyaslandığında ise SAgNP hücre canlılığını düşürmekte istatistiksel anlam ifade edememektedirler. Berberin ile nanopartikülle etkileştirilmiş hali BAgNP kıyaslandığında BAgNP ~%14 oranında hücre canlılığını daha fazla azaltmakta ve ($p<0,01$) anlamlılık seviyesinde gösterilmektedir. Berberin ile SirReal2 karşılaştırıldığında Berberin hücre canlılığını SirReal2'ye göre ~%72 oranda etkili bir şekilde ($p<0,01$) anlamlılıkla azaltmaktadır. Berberinin SAgNP'ye göre kıyaslandığında Berberinin ~%60 oranında hücre sağkalımını azalttığı ($p<0,001$) anlamlılıkla belirtilmiştir. BAgNP'nin, SirReal2 ve SAgNP'ye karşı hücre canlılığı üzerine etkisine bakıldığında ise BAgNP, SirReal2'ye göre hücre canlılığını ~%86 oranında düşürürken ($p<0,01$) SAgNP'ye ise ~%73 oranında ($p<0,001$) anlamlılık derecesinde sağkalımı

düşürdüğü gösterilmiştir. SirReal2 ile SAgNP kendi aralarında kıyaslandığında nanopartikülle etkileşilen SAgNP canlılığı ~%12 oranla düşürdüğü görülmüştür. MDA-MB-231 hücre hattına moleküller ve nanopartiküllü hallerinin hücre sağkalıma etkileri Şekil 3.21’de görülmektedir ve bu bulgular hücre mikroskop görüntüleri ile tutarlıdır.



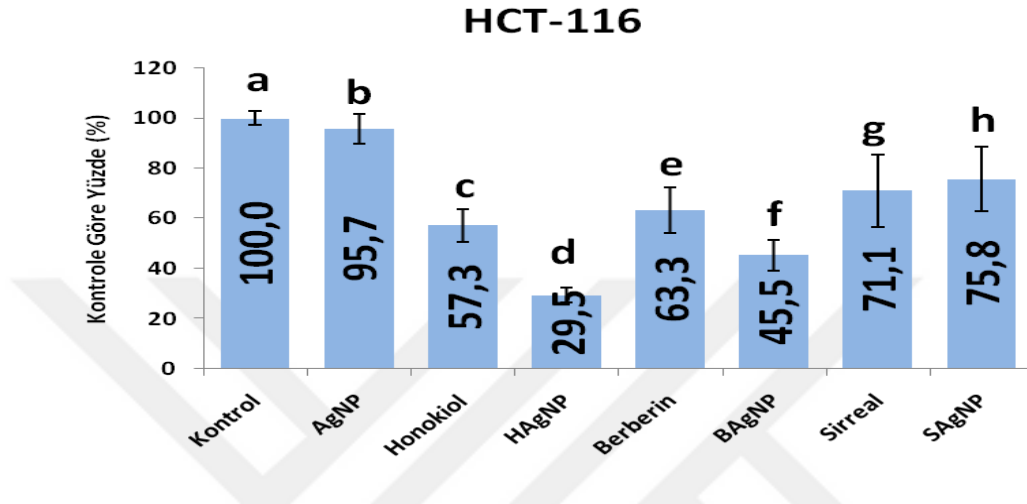
Şekil 3.21: MDA-MB-231 hücre hattındaki 48 saat doz uygulama görüntüleri. 200 µm barında çekilen mikroskop görüntüleri.

Şekil 3.22 görselinde berberin ve nanopartikül etkileşimli halinin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına ciddi bir şekilde etkisi olduğu mikroskop görüntüleriyle de teyit edilmiş ve hücrenin morfolojik yapısına zarar verdiği görülmektedir.



Şekil 3.22: Berberin gruplarının MDA-MB-231 hücrelerde oluşturduğu hasar görüntüsü. 200 µm barında çekilen mikroskop görüntüleri, mavi oklar hücre deformasyonunu belirtmektedir.

Çalışmada kullanılan moleküller ve nanopartikülle etkileştirilmiş formlarının kolon kanseri hücre hatlarından biri olan HCT-116'daki hücre sağkalım bulguları Şekil 3.23'te gösterilmektedir.



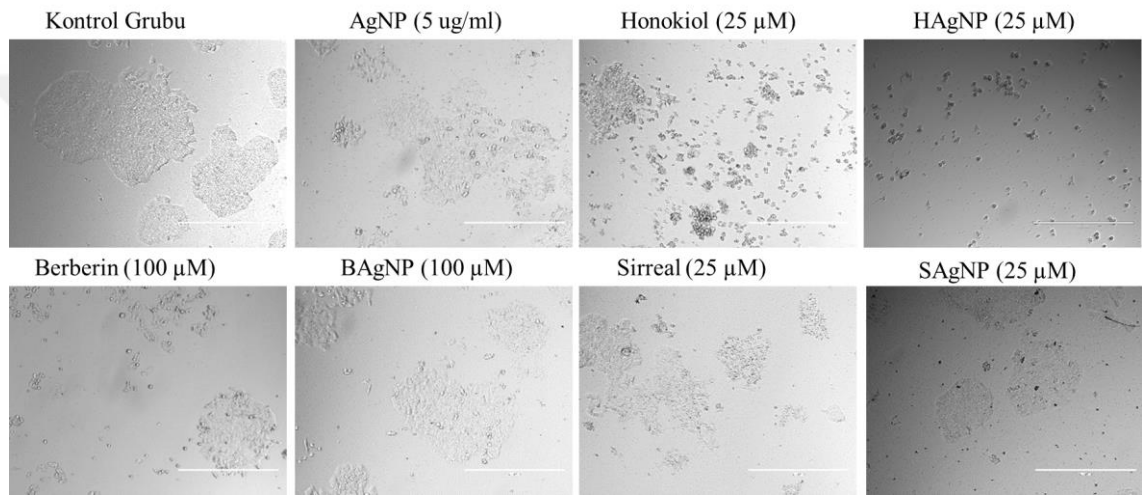
Şekil 3.23: Nanopartiküllerle etkileşen moleküllerin HCT-116 hücre hattında 48 saat uygulama sonrası hücre sağkalım grafiği. AgNP: 5 ug/ml, Honokiol: 25 µM, HAgNP: Honokiol+AgNP 25 µM, Berberin: 100 µM, BAgNP: Berberin+AgNP 100 µM, SirReal2: 25 µM, SAgNP: SirReal2+AgNP 25 µM doz konsantrasyonlarında hücre sağkalım yüzdelere bakılmıştır. One-Way ANOVA: $p < 0,001$; PostHoc (Games-Howell): $ac, ad, p < 0,001$, $ae, af, bc, bd, bf, cd, de, p < 0,01$, $be, dh, p < 0,05$.

AgNP, kontrole kıyaslandığında az miktarda hücre canlılığını düşürmekte ancak istatistiksel bir fark görülmemektedir. Honokiol kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre canlılığını istatistiksel olarak ($p < 0,001$) anlamlılık düzeyinde ~%43 oranında düşürdüğü görüldü. Honokiolün nanopartikül etkileşimli grubun da ise HAgNP, kontrole kıyasla istatistiksel olarak ($p < 0,001$) anlamlılık derecesinde ~%29 oranında hücre canlılığını azaltarak önemli derecede bir düşüş görülmekte ve hücre morfolojik görüntülerinde de bu şiddetli etki (Şekil 3.24) gözlemlenildi. Berberin grubunun, kontrole karşılaştırılması yapıldığında ($p < 0,01$) anlamlılık düzeyinde ~%37 oranında hücre canlılığında azalma meydana gelmiştir. BAgNP, kontrol grubuyla karşılaştırılması yapıldığında ($p < 0,01$) derecesinde ~%45 oranında hücre canlılığını azaltarak etkili bir sonuç elde edilmiştir. SirReal2 grubu ile nanopartiküllü grubunun, kontrole göre kıyaslaması yapıldığında SirReal2 ~%71, SAgNP grubu ise ~%75 miktarlarda hücre canlılığını azaltmakta ancak istatistiksel olarak bir fark görülmemektedir. Tek başına

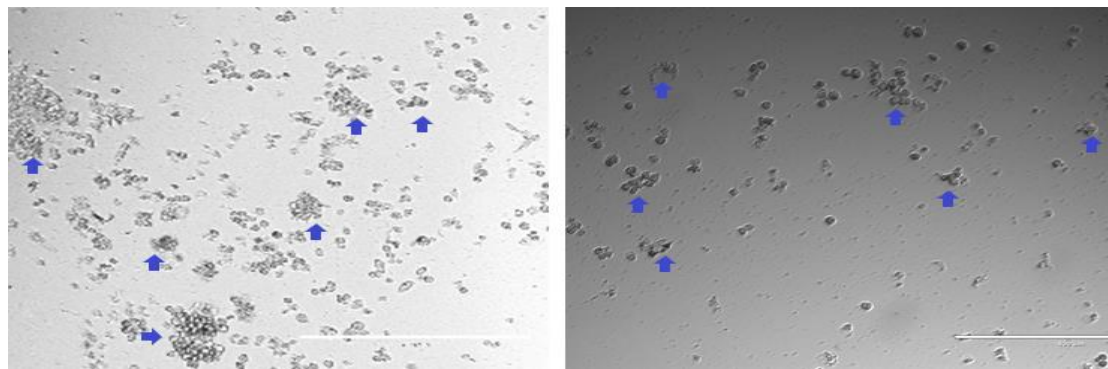
AgNP grubu ile Honokiol kıyaslandığında ($p<0,01$) anlamlılık düzeyinde Honokiolün AgNP'ye göre ~%39 oranında hücre canlılığını düşürdüğü görülmüştür. Sadece AgNP ve nanopartikülle etkileştirilmiş olan HAgNP birbiriyle kıyaslandığında yalnız AgNP'nin tek başına hücre canlılığını çok az düşüş olurken, HAgNP'nin ise hücre canlılığı etkisi ~%67 oranında hücre canlılığını azalttığı istatistiksel olarak ($p<0,01$) anlamlılıkla önemli derecede etkisi görülmüştür. AgNP ile Berberin kıyaslandığında Berberin ~%33 oranında hücre canlılığını düşürmekte istatistiksel olarak ($p<0,05$) anlamlılık ifade etmektedir. AgNP ile BAgNP kıyaslandığında BAgNP'nin hücre canlılığını ~%51 oranında azaltmakta ve ($p<0,01$) anlamlılık düzeyinde görülmektedir. AgNP ile SirReal2 kıyaslandığında, SirReal2 hücre canlılığını ~%25 azaltmakta ancak istatistiksel olarak bir anlam ifade etmemektedir. AgNP'nin SAgNP ile karşılaştırılmasında, SAgNP'nin ~%20 canlılığı azaltmakta ancak istatistiksel olarak bir anlam taşımamaktadır. Honokiol ve HAgNP, kendi aralarında karşılaştırılması yapıldığında HAgNP ~%30 oranında ($p<0,01$) anlamlılık düzeyinde hücre canlılığını azaltarak nanopartikülle etkileştirilmiş halinin hücre ölümünde daha etkili olduğu görülmüştür. Honokiol ile Berberin kıyaslandığında, Honokiol hücre canlılığında biraz daha fazla düşüş göstermekte ancak istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. Honokiol ile BAgNP kıyaslandığında, BAgNP biraz daha fazla hücre canlılığında etki yapmakta fakat istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır. Honokiol ile SirReal2 ve SAgNP kıyaslandığında, Honokiol hücre canlılığını azaltmakta ikisine karşılık daha etkin olmakta ancak bu karşılaştırma istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. HAgNP ile Berberin kıyaslandığında, HAgNP hücre canlılığını Berberine göre ~%34 düşürmekte istatistiksel olarak ($p<0,01$) anlamlı olarak görülmektedir. HAgNP ile BAgNP karşılaştırıldığında, HAgNP hücre canlılığında biraz daha fazla düşüş görüldü. Ancak istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır. HAgNP ile SirReal2 karşılaştırıldığında, HAgNP'nin, SirReal2'e göre ~%42 oranında hücre canlılığını azalttığı görülmekte istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. HAgNP'nin SAgNP ile karşılaştırılmasında, HAgNP'nin hücre sağkalıma ~%47 oranına düşüşün olduğu ($p<0,05$) anlamlılık düzeyinde etki etmektedir. Berberin ve BAgNP kendi aralarında hücre canlılığı kıyaslaması yapıldığında, BAgNP'nin ~%26 oranında canlılığı azalttığı görülmekte istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmemektedir. Berberin grubu, SirReal2 ve SAgNP ile karşılaştırılması yapıldığında; Berberin, SirReal2 ve SAgNP'ye göre hücre canlılığını azaltarak daha etkili olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlılık

göstermemektedir. BAgNP'nin SirReal2'e göre kıyaslamasında, BAgNP ~%26 hücre canlılığını azalttığı, aynı şekilde BAgNP'nin SAgNP ile kıyaslanmasında, BAgNP'nin ~%31 canlılığı azalttığı görülmekte istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. SirReal2 ve SAgNP kendi aralarında kıyaslandığında, SirReal2'nin daha etkili olduğu ama istatistiksel olarak anlam ifade etmediği görülmüştür.

Moleküller ve nanopartiküllerle kombinasyonlu hallerinin HCT-116 hücre hattına karşı göstermiş oldukları etkiler, hücre morfolojik görüntüleri ile Şekil 3.24 ve Şekil 3.25 ile tutarlıdır.

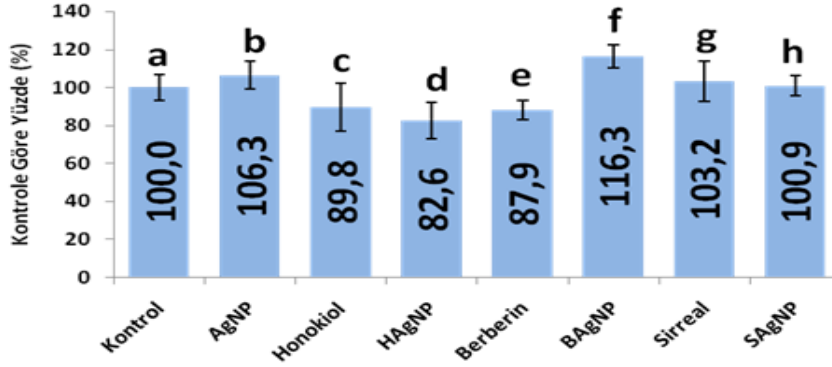


Şekil 3.24: HCT-116 hücre hattındaki 48 saat doz uygulama görüntüleri. (400 µm barında çekilen mikroskop görüntüleri)



Şekil 3.25: Honokiol ve HAgNP'nin HCT-116 hücre morfolojisindeki etkileri. (400 µm barında çekilen mikroskop görüntüleri, mavi ok hücre hasarı olduğunu belirtmektedir.)

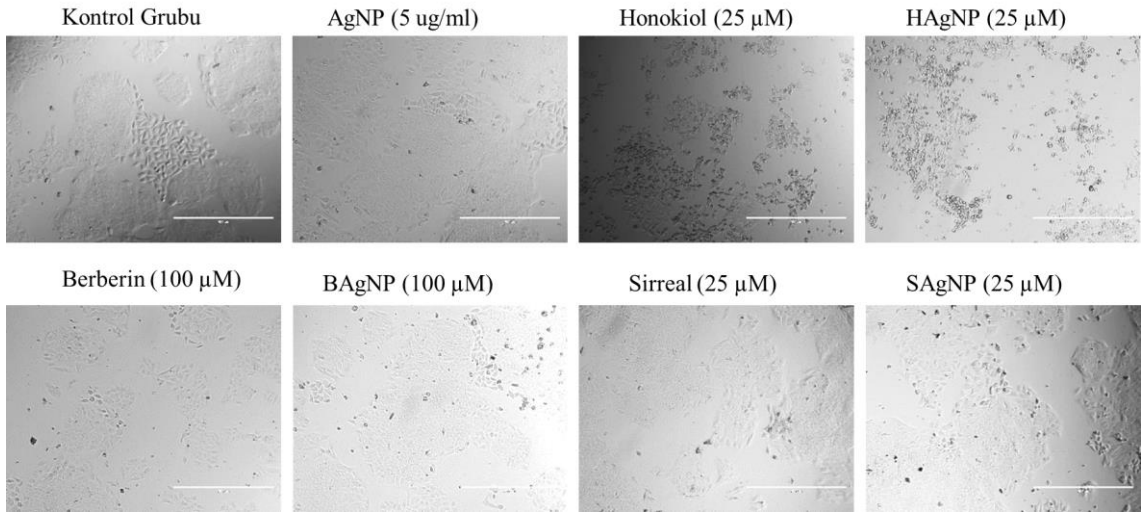
DLD-1



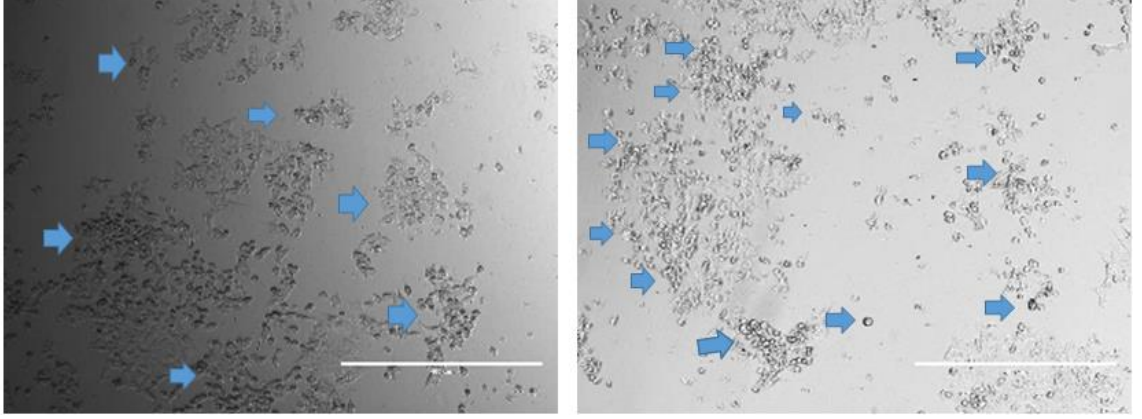
Şekil 3.26: Nanopartiküllerle etkileşen moleküllerin DLD-1 hücre hattında 48 saat uygulama sonrası hücre sağkalım grafiği (AgNP: 5 ug/ml, Honokiol: 25 µM, HAgNP: Honokiol+AgNP 25 µM, Berberin: 100 µM, BAgNP: Berberin+AgNP 100 µM, SirReal2: 25 µM, SAgNP: SirReal2+AgNP 25 µM doz konsantrasyonlarında hücre sağkalım yüzdelere bakılmıştır.) (One-Way ANOVA: $p < 0,001$; PostHoc (Bonferroni): $ad, bd, dg, df, p < 0,05$, $cf, p < 0,01$, $df, ef, p < 0,001$)

Moleküller ve nanopartiküllü hallerinin DLD-1 kolon kanseri hücre hattındaki hücre sağkalım bulguları Şekil 3.26’de görülmektedir. AgNP’nin kontrol grubuyla kıyaslaması yapıldığında AgNP çok az miktarda hücre canlılığını artırarak istatistiksel bir anlamlılık ifade etmemektedir. Honokiol grubunun kontrole karşılaştırılması yapıldığında Honokiolün hücre canlılığını ~%11 azaltmakta istatistiksel olarak anlamlılık göstermemektedir. HAgNP grubu kontrole karşılaştırıldığında, canlılığı ($p < 0,05$) anlamlılık düzeyinde ~%18 oranında azaltarak etki göstermektedir. Honokiol ve HAgNP’nin DLD-1 hücre hattına ciddi şekilde hücre hasarı oluşturarak etkisini göstermektedir (Şekil 3.28). Berberin grubu kontrollle kıyaslaması yapıldığında, istatistiksel anlamlılık ifade etmemekte ancak ~%13 düzeyinde hücre canlılığını azaltmaktadır. BAgNP, SirReal2 ve SAgNP kontrole kıyaslaması yapıldığında istatistiksel anlam ifade etmemekle beraber hücre canlılığında az miktarda artış görülmektedir. Ancak hücre morfolojik görüntülerinde hücreler üzerinde hasarları görülmektedir (Şekil 3.27). AgNP’nin Honokiolle karşılaştırılmasında Honokiolün ~%17 oranında hücre canlılığında düşüş görülmekte ancak istatistiksel anlamlılık göstermemektedir. Yalnız AgNP’nin HAgNP ile kıyaslanmasında, HAgNP hücre canlılığını ~%24 oranında düşürdüğü istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlılık derecesinde etki ettiği görülmektedir. AgNP grubu Berberin, BAgNP, SirReal2, SAgNP ile

kıyaslanması yapıldığında diğer grupların yalnız AgNP'ye göre hücre canlılığını azalttığı görülmekte ancak istatistiksel anlamlılık ifade etmemektedir. Honokiolla HAgNP kendi aralarında karşılaştırıldığında hücre canlılığına HAgNP'nin daha etkili olduğu, Honokiol ile Berberin kıyaslanmasında ise Berberin daha etkinken istatistiksel anlamlılık ifade etmemektedirler. Honokiol ile BAgNP kıyaslandığında, Honokiol hücre canlılığını ~%27 ($p<0,01$) anlamlılık derecesinde azaltmaktadır. Honokiol'ün, SirReal2 ve SAgNP'yle kıyaslanmasında ~%14 ve ~%12 hücre canlılığını azalttığı ancak istatistiksel anlam ifade etmediği görülmüştür. HAgNP, Berberine göre hücre canlılığını azaltmakta istatistiksel anlamlılık görülmemekte, HAgNP ile BAgNP'nin kıyaslanmasında ise hücre canlılığını ($p<0,001$) anlamlılık derecesinde ~%34 azalttığı etkili bir şekilde görülmüştür. HAgNP SirReal2 ile karşılaştırıldığında, HAgNP'nin SirReal2'e göre hücre canlılığını ~%21 azalttığı ($p<0,05$) anlamlılık düzeyinde görülmektedir. HAgNP'yle SAgNP karşılaştırıldığında, HAgNP hücre sağkalımı ~%19 azalttığı istatistiksel anlam ifade etmediği görülmüştür. Berberin ve BAgNP'nin karşılaştırılmasında, Berberin hücre sağkalımında ($p<0,001$) anlamlılık derecesinde ~%29 düşüş görülmüştür. Hem Berberin hem de BAgNP, SirReal2 ve SAgNP'ye göre hücre canlılığını azaltmakta, SirReal2 ve SAgNP ile karşılaştırıldığında, SAgNP hücre canlılığını azaltmakta, ancak istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir.



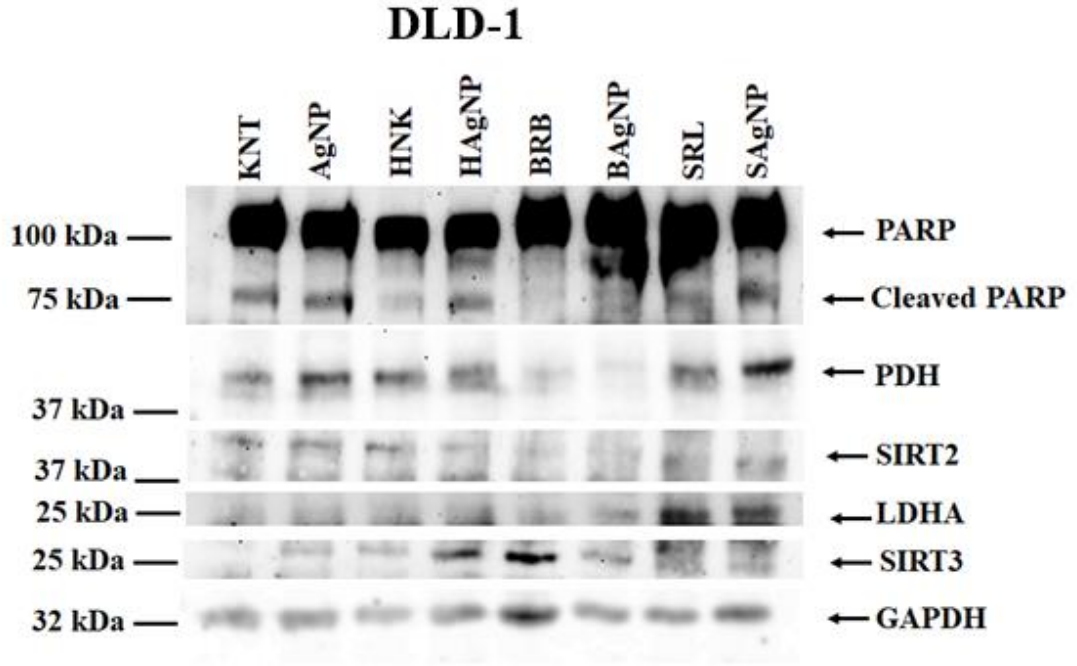
Şekil 3.27: DLD-1 hücre hattındaki 48 saat doz uygulama görüntüleri. (400 µm barında çekilen mikroskop görüntüleri)



Şekil 3.28: Honokiol gruplarının DLD-1 hücre hattındaki morfolojik etkileri. (400 µm barında çekilen mikroskop görüntüleri, mavi oklar hücre deformasyonunu belirtmektedir.)

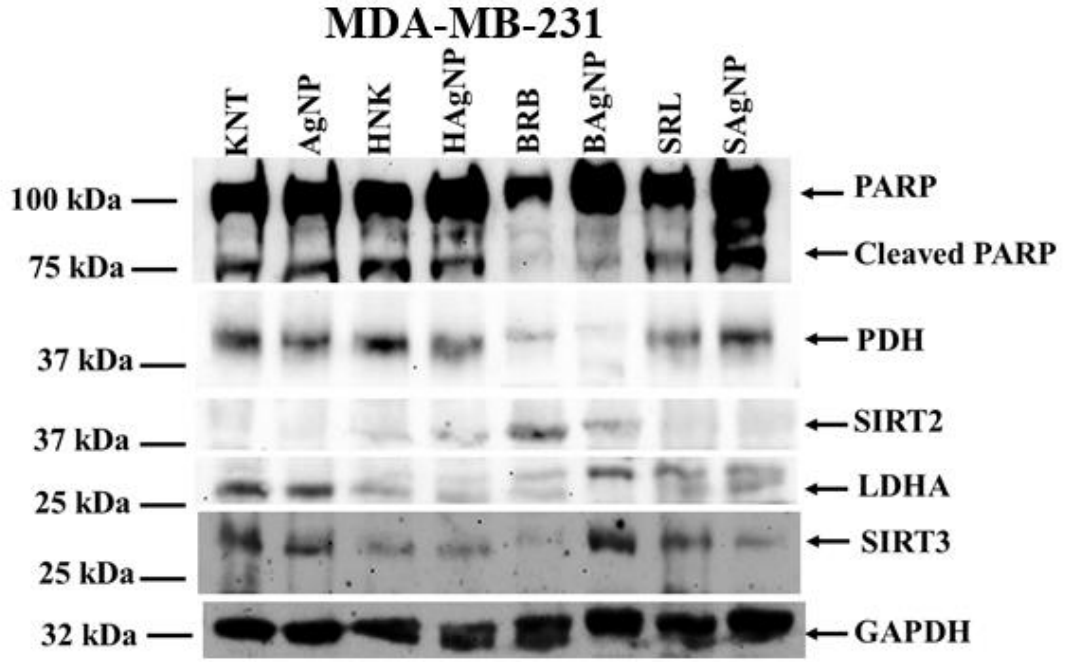
3.3. Nanopartiküllerle Etkileştirilmiş Moleküllerin Protein Ekspresyon Bulguları

DLD-1 hücre hattındaki protein ekspresyon sonucu Şekil 3.29’da gösterilmektedir. Gümüş nanopartiküllerle etkileşmiş Honokiol, berberin ve SirReal2’in NP’lerle etkileşmemiş formlarına göre PARP’ın kesilmiş formunun artmasına (cleaved PARP) neden olmuştur. Özellikle SAgNP uygulanan grupta PDH protein ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Uygulamalar SIRT2 düzeylerde belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır. SirReal2’nin hem kendisi hem de NP’lerle etkileşmiş formu LDHA miktarını arttırmış, Berberin’in ise hem kendisi hem de NP’lerle etkileşmiş formu SIRT3 miktarını arttırmıştır.



Şekil 3.29: Nanopartiküllerle etkileştirilmiş moleküllerin DLD-1 hücre hattındaki 48 saat uygulama sonrası protein ekspresyon düzeyleri. KNT: Kontrol grubu, AgNP: 5 ug/ml, HNK: Honokiol 25 μ M, HAgNP: AgNP ile etkileştirilmiş Honokiol 25 μ M, BRB: Berberin 50 μ M, BAgNP: AgNP ile etkileştirilmiş Berberin 50 μ M, SRL: SirReal2 25 μ M, SAgNP: AgNP ile etkileştirilmiş SirReal2 25 μ M ifade etmektedir.)

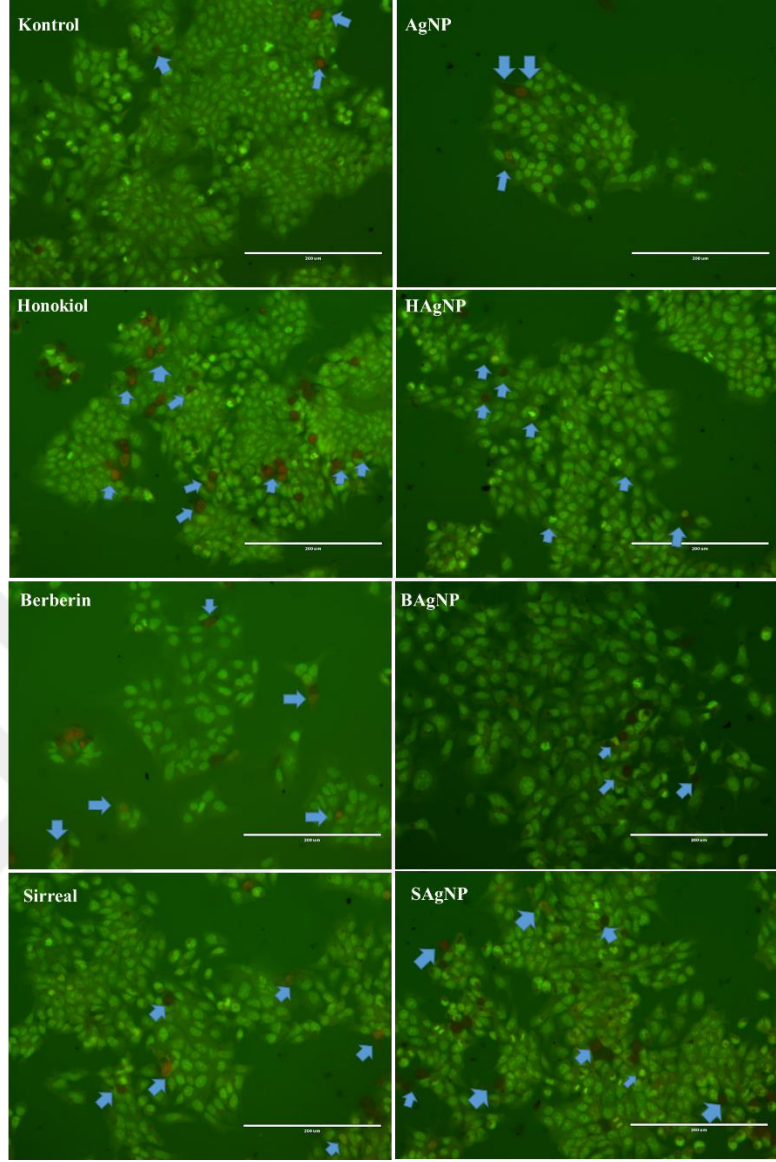
MDA-MB-231'in protein ekspresyon bulguları Şekil 3.30'da belirtilmektedir. Özellikle gümüş NP'lerle etkileşen SirReal2 (SAgNP) PARP'ın parçalanmasına yol açmıştır. Honokiol, berberin ve SirReal2 uygulamaların hem kendileri hem de NP'lerle etkileşmiş formları SIRT2 düzeylerini azaltmıştır. Gümüş NP'lerle etkileşmiş berberin (BAgNP) SIRT3 protein ifadesini arttırdığı görülmüştür.



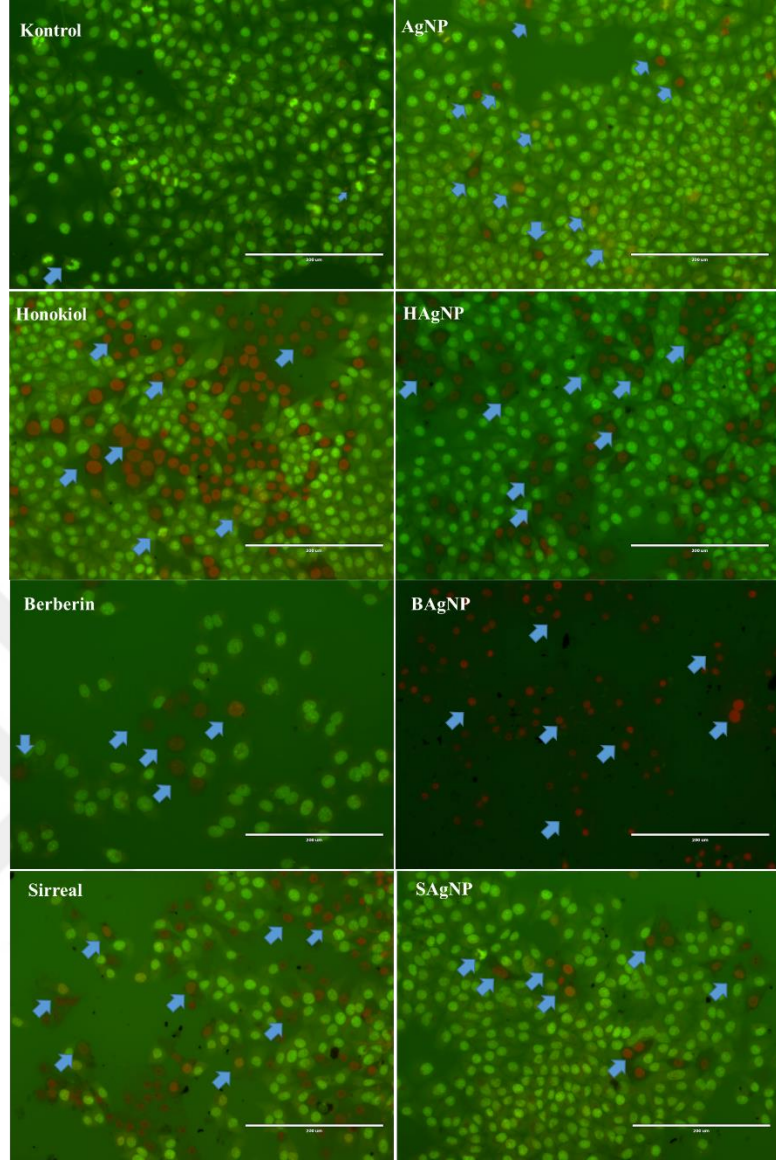
Şekil 3.30: Nanopartiküllerle etkileştirilmiş moleküllerin MDA-MB-231 hücre hattındaki 48 saat uygulama sonrası protein ekspresyon düzeyleri. KNT: Kontrol grubu, AgNP: 5 ug/ml, HNK: Honokiol 25 μ M, HAgNP: AgNP ile etkileştirilmiş Honokiol 25 μ M, BRB: Berberin 50 μ M, BAgNP: AgNP ile etkileştirilmiş Berberin 50 μ M, SRL: SirReal2 25 μ M, SAgNP: AgNP ile etkileştirilmiş SirReal2 25 μ M ifade etmektedir.

3.4. Apoptoz Bulguları

Akdirin oranj boyama yöntemiyle boyaması yapılan hücrelerin mikroskop görüntüleri Şekil 3.31 ve 3.32’de gösterilmektedir. Bu boyama yöntemiyle hücrelerin apoptoza geçiş düzeyleri belirtilmektedir. Hücrelerin morfolojik görüntülerindeki yeşil renk, hücrelerin canlı olduğu, turuncu renk hücrelerin apoptoza geçtiğini kırmızı renkli hücreler ise hücre ölümünü göstermektedir.



Şekil 3.31: Kolon kanseri hücre hattında apoptoz oluşumlarının belirtildiği mikroskop görüntüleri. Ölçekleme çubuğu: 200 µm, mavi oklar: apoptoz ve ölü hücreleri gösterir.



Şekil 3.32: Meme kanseri hücre hattında apoptoz oluşumlarının belirtildiği mikroskop görüntüleri. 200 μ m barında çekilmiştir, mavi oklar: apoptoz ve ölü hücreleri gösterir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser insanların ölümüne neden olan, hem fizyolojik hem de psikolojik olarak insanı olumsuz etkileyen ve hayat kalitesini önemli derecede düşüren bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hastalığın ileri boyuta ulaşması vücudun diğer organlarına sıçrayarak tedavisinin oldukça zor hale gelmesine neden olur.

2020 yılı kanser araştırma verilerine göre dünya genelinde yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser teşhisi, 10 milyon ise kanserden dolayı ölüm meydana geldiği görülmüştür. (Sung vd., 2021; Wu vd., 2018). Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi gibi bilinen tedaviler kansere karşı sık kullanılmakta ancak maliyet, aşırı dozların alımı ile kanserli doku dışındaki sağlıklı doku ve organlara zarar verebilmesi, ölümcül yan etki gibi nedenlerinden dolayı dezavantajları olduğu bilinmektedir (Çeşmeli ve Biray Avcı, 2019; Hossen vd., 2019). Bu nedenle kanser tedavi yöntemleri araştırmacıların dikkatini çekmekte ve yan etkilerinin oldukça minimuma indirgenmesi, düşük maliyet, ölüm oranlarını azaltmak gibi amaçlar doğrultusunda çalışmalar yapılmaktadır.

Kanserli bölgelerin iyileştirilmesi kemaoterapi ilaçlarının yüksek doz seviyesinde ve tekrarlı alımlarıyla mümkün olabilmektedir. Ancak bu ilaçların sıkça ve yüksek konsantrasyonlarda alımları kanserli bölgeyle sınırlı kalmayıp diğer bölgelere de etki etmektedir. Bu da olumsuz sonuçlar oluşturmaktadır (Bharti vd., 2019). Nanopartiküller yapıları ve eşsiz özelliklerinden dolayı hedefli tedavi yani kanserli bölgeye odaklı tedaviyi sunabilmektedir. Bizde bu çalışmada biyosentez yöntemi kullanılarak elde edilen düşük maliyetli, verimli, çevreye faydalı nanopartiküllerin çeşitli moleküllerle etkileştirilmesi sağlanılarak kolon ve meme kanserine karşı göstermiş olduğu etkileri incelemeyi potansiyel ilaç olabilme durumlarını araştırmayı amaçlamaktayız.

Sıkça adını ve kullanımlarını duyduğumuz nanopartiküllerden biri olan gümüş nanopartiküller anti bakteriyel, anti inflamatuvar, antikanser davranışlar sergilediklerinden dolayı ilaç sanayisi, tekstil sanayisi, biyosensörler, akıllı tedaviler, kozmetik, görüntüleme sistemleri, kanser tedavileri gibi alanlarda görülmektedir. Bu AgNP'lerin elde edilebilmesi için çeşitli sentez yöntemi bulunmakta ancak çevreye duyarlı, düşük maliyetli, kolay elde edilebilme gibi özellikleri yeşil sentez yöntemi sunmaktadır (Srikar

vd., 2016). Bu çalışmada ilk olarak biyotemelli yaklaşım olan yeşil sentez yöntemi ile nar bitkisi (*Punica granatum L.*) kabukları kullanılarak AgNP'nin eldesi sağlandı. Elde edilen nanopartikül literatürde yer aldığı gibi açık renk halinden koyu renge dönüşümü ve yapılan karakterizasyonlarla AgNP elde edildiği doğrulanmıştır (Shanmugavadivu vd., 2014). Yeşil sentez yöntemiyle çeşitli bitki materyali kullanılarak eldesi yapılan AgNP'lerin antikanser aktiviteleri literatürde yapılan çalışmalar ile raporlandırılmıştır.

Nakkala ve arkadaşları 2017'de yaptıkları çalışmalarında *Ficus religiosa* bitkisinininden elde ettikleri gümüş nanopartiküllerin anti bakteriyel ve anti kanser özellikleri araştırılmıştır. Bitkisel yöntemle elde edilen gümüş nanopartiküller ortalama 21 nm büyüklüğünde küresel şekil yapısına sahip olduğu bildirilmiştir. Bu elde edilen nanopartiküller akciğer kanseri ve servikal adenokarsinom hücre hatlarında apoptotik farklılıklara neden olduğu *in vivo* uygulamaları ile AgNP'lerin çok işlevsellik, biyouyumlu gibi özellikleri ile nanotıp alanında yarar sağlayabileceği sonucuna varılmıştır (Nakkala vd., 2017). Venugopal ve diğerlerinin 2017'de araştırmalarında ise Beta vulgaris bitkisinden biyosentezlenen gümüş nanopartiküller UV, XRD ve HRETEM analizleri yaparak doğrulanmıştır. Boyutları küresel şekilli 10 ila 20 nm boyutlarında olmakla birlikte normal hücrelere kıyasla MCF-7 meme kanseri, A549 akciğer kanseri, HepG2 karaciğer kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkiler bulundurarak nanopartiküllerin kanser tedavilerine yararlı olabilecek anti kanser ajan olarak kullanılabilir sonucuna ulaşılmıştır (Venugopal vd., 2017). Diğer çalışmada ise atık yeşil otlar kullanılarak gümüş nanopartiküller sentezlenmiş olup bu AgNP'lerin boyutu yaklaşık 15 nm olarak ifade edilmiştir. AgNP'ler UV-Vis spektroskopisi, XRD ve TEM kullanılarak fizikokimyasal özellikleri ve antimikrobiyal, antifungal aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca güçlü seviyede sitotoksik etkileri ise Cyclin D1 proteininin ekspresyonunda türetilerek gösterilmiştir (Khatami vd., 2018). Castro-Aceituno vd. 2016'da yaptıkları çalışmada *Panax ginseng* Meyer (*P. ginseng*) bitkisinin yapraklarından eldesi yapılan AgNP'lerin A549 akciğer kanser hücre hattında anti-kanser aktivitesi sergilemiş olduğu ve EGFR/p38 MAPK/p53 yolunun düzenlenmesinde anti-aktivitesinin olası mekanizması olabileceği bildirilmiştir. (Castro-Aceituno vd., 2016). El-Naggar ve arkadaşlarının 2017'de yaptıkları çalışmada diğer bir çalışmada ise biyolojik sentezle elde edilen AgNP'nin tıbbi açıdan önemli patojenik (*Staphylococcus*

aureus), (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* ve *Klebsiella pneumonia*) bakterilerin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği ayrıca MCF-7 hücre hattına ise 27.79 ± 2.3 ug / mL IC_{50} değerinde etkili sitotoksik aktivitesi gösterilmiştir. *In vivo* çalışmaların da ise AgNP'lerin Ehrlic hassit karsinomu taşıyan farelerde tümör büyümesini inhibe etme kapasitesine sahip olduğu belirtilmiştir (El-Naggar vd., 2017). Singh ve arkadaşlarının 2021'de yaptıkları bir çalışmada *Carica papaya* bitkisinin yapraklarının ekstresi ile gümüş nanopartikül eldesi yapılmıştır. Teknik yöntemler ile karakterizasyonu yapılmış olan partiküllerin 10 ila 20 nm aralığında farklılık gösterebilen ve küresel bir şekle sahip AgNP'ler olduğu belirtilmiştir. Bitki ekstresinden elde edilmiş olan bu AgNP, AgNP-sitrik asit ve bitki ekstresine karşı kanser hücrelerine karşı daha iyi etkinlik ve normal hücreler için de nispeten daha az toksik rol oynadığı ifade edilmiştir. Prostat kanser hücre hattı olan DU145 hücrelerinin bu yeşil yöntemle eldesi yapılan AgNP'lerle (0,5-5,0 µg/ml) 24-48 saat zaman kadar işlenmesi, toplam hücre sayısını %24-36 oranında azalttığı ($P < 0,05$) aktarılmıştır. Ayrıca AgNP'lerin akciğer, meme ve epidermoid karsinom hücrelerine karşı anti-kanser aktivitesi vurgulanmıştır. (Singh vd., 2021). Ebrahimzadeh ve diğerlerinin 2020'de yapmış oldukları araştırmalarında *Anabaena flos-aque* biokütle özü sayesinde biyolojik sentez ile AgNP'lere ulaşılmıştır. Yapılarının küresel şekilli ve ortalama boyları da 100 nm altında oldukça kararlı bir yapı sergilemiş olduğu antikanser ve sitotoksik etkisini MTT testi ve akış sitometrisi uygulamaları ile T47D (meme kanseri) hücre dizilerine karşı çoğalma engelleyici tesiri belirtilmiştir. *Anabaena*'nın yeşil nanoteknoloji kapsamında AgNP eldesi için iyi bir organizma olarak kullanılabilirliği ve bu partiküllerin kanser karşıtı tedavi uygulamaları için önemli yeri olduğu aktarılmıştır (Ebrahimzadeh vd., 2020). Al – Brahim ve Mohammed'in 2020 'de yaptıkları araştırmada ise farklı iki çiçek kaynağından (*Ziziphus spina-christi* ve *Acacia gerrardii*) üretilen baldan AgNP eldesi yapılmıştır. Bunların antioksidan, sitotoksik, antibakteriyel aktivitelerine bakılmıştır. Yeşil metodla eldesi yapılmış olan AgNP'ler bazı Gram (-) ve Gram (+) bakterilere karşı anti bakteriyel HepG2 hücrelerine karşı ise sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Al-Brahim ve Mohammed, 2020). Elde ettiğimiz bitki temelli gümüş nanopartiküller UV-vis ölçümlerinde 350 ve 400 nm arasında güçlü absorpsiyon bandı verdiği görüldü. SEM görüntülerinde de bu nanopartiküllerin çoğunlukla kübik yapıda olduğu ve boyutunda 100 nm altında olabileceği analiz edildi. Bu nanopartiküller gerek doza bağlı gerek

kombine etkileriyle kansere karşılık sitotoksik aktivite sergilemesiyle literatürle uyumlu olmaktadır.

Antioksidatif, antimalaryal, antiinflamatuvar, kardiyoprotektif, anti-tümör, serebroprotektif etkiler dâhil olmak üzere bildirilen birden çok farklı biyoaktiviteye sahip olduğu belirlenen Berberin ve Magnolia türlerinin kök ve gövde kabuğunda bulunabilen Honokiol bileşikleri gösterdikleri terapötik etkilerden dolayı eski Çin tıbbında ilaç olarak kullanılmıştır (Arora vd., 2012; Hahm vd., 2008; Ye vd., 2009).

Çevre dostu, kolay, düşük maliyetli olarak bilinen yeşil sentez yöntemi ile (*Punica granatum L.*) nar kabukları kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküller FT-IR, UV-vis SEM ve EDX yöntemleri kullanılarak karakterizasyon işlemleriyle tanımlandı. Bu çalışma da çeşitli hastalıklara karşı ilaç olarak kullanımı görülen Honokiol ve Berberin, SIRT inhibitörü olarak bilinen SirReal2 molekülleri ile yeşil sentez yöntemi vasıtasıyla elde edilen AgNP'nin etkinleştirilmesi sağlandı. 48 saat uygulama süresince meme ve kolon kanserine karşı tekrarlı hücre canlılığı testleri yapıldı. HUVEC, MDA-MB-231, HCT-116, DLD-1 hücre hatlarına karşı gösterdikleri etkiler hücre sağkalım analizleri yapılarak belirlendi.

Park ve arkadaşları 2009'daki çalışmalarında MDA-MB-231 meme kanser hücre hattına 60 µm, 80 µm, 100 µm doz konsantrasyonlarında 24 saat uygulama ile Honokiolün hücre canlılığına olan etkisine bakılmıştır. Yapılan uygulamanın sonucunda IC₅₀ değeri 59,5 µm olarak bildirmişlerdir (Park vd., 2009). Çalışmamızda da Honokiol 48 saat 25 µm konsantrasyonu MDA-MB-231 hücre hattına karşı etkisi pek görülmedi. Ancak kolon kanseri hücre hattına karşı Honokiolün etkinliğine bakılan diğer çalışma da ise 48 saat boyunca 5-10 ug/mL Honokiol, kaspaz basamaklarını aktive ederek apoptozu indüklediği belirtilmiştir. Ayrıca Honokiolün intraperitoneal enjeksiyonla hızla emilebildiğini ve plazmada 10 saatten fazla tutulabildiğini göstermişlerdir. Bununla birlikte kolon kanser hücre hatlarından olan RKO ile inkübe edilmiş tümör taşıyan farelerde, tümör büyümesini inhibe ederek ve bu farelerin ömrünü uzatarak antikanser aktivitesi sergilediği, zamana ve doza bağlı bir şekilde RKO hücrelerinin apoptozunu indüklediği bildirilmiştir (Chen vd., 2004). Bizim çalışmamızda DLD-1 kolon kanseri hücresinde ise Honokiolün

nanopartikülle etkileştirilmiş hali (HAgNP) (25 μ M), dozda hücre canlılığını \sim %18 miktarında ($p<0,05$) azalttığı, HCT-116 kolon kanseri hücre hattında ise Honokiol (25 μ m) konsantrasyonda canlılığı \sim %43 ($p<0,001$), HAgNP (25 μ m) ise \sim %71 ($p<0,001$) seviyesinde kuvvetli düşüş göstererek hücre sağ kalımında önemli bir etki sağladığı görülmekte ve ayrıca hücrelere olan bu kuvvetli etkiler hücre morfolojileri ile de teyit edildi. Pan ve diğerlerinin 2014'teki çalışmalarında ise Honokiölün etkisi mitokondriyal fonksiyonun inhibisyonu yoluyla akciğer tümörjenezini inhibe ettiğini ilaveten mitokondriyal solunumu baskıladığını ve mitokondride ROS oluşumunu artırarak akciğer kanseri hücrelerinde apoptoz indüksiyonuna yol açtığı vurgulanmıştır (Pan vd., 2014). Yaptığımız çalışmada da Honokiol ile nanopartiküllü halleri kolon ve meme kanser hücrelerinde oranj boyama görüntü analizlerimizde renk değişimlerinden apoptoza geçiş görülmektedir. Diğer çalışmada ise Shigemura ve ekibinin 2007'deki prostat kanseri hücrelerinin Honokiolden dolayı apoptoza yanıt verdiği ifade edilmiştir. Üstelik Honokiol primer ve metastatik prostat kanserlerini, prostat stromal fibroblastlarını, kemik iliği stromal hücrelerini ve kemik iliği ile ilişkili endotel hücrelerini çevreleyen hücrelerde önemli düzeyde ölüme neden olduğu ilaveten hormona dirençli prostat kanseri ve onun uzak kemik metastazlarının tedavisi için düşük doz docetaxel ile adjuvan olarak kullanılabilir, umut verici, toksik olmayan bir ajan diye raporlandırılmıştır (Shigemura vd., 2007). Literatürdeki etkisine paralel olarak elde ettiğimiz bulgulardan Honokiol ve nanopartiküllü halleri kanser hücrelerine karşı güçlü etki gösterebilmektedir.

Yao ve ekibinin 2019'daki çalışmalarında üçlü negatif meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattına Berberin etkisi çeşitli doz konsantrasyonlarında hücre canlılığı 48 saat uygulama süresince araştırılmıştır. Yapılan çalışmada doz konsantrasyonun artışına bağlı olarak etkili sitotoksik aktivite gösterebildiği, hücrelerin koloni oluşumlarını azalttığını ilaveten IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi karsinogenezde rol oynayan proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasında belirgin bir azalmaya neden olduğu bilgisine ulaşılmıştır (Yao vd., 2019). Berberinin adenosin monofosfatla aktive olan protein kinazın (AMPK) ve hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa'nın (HIF-1 α) aşağı regülasyonu ile bağlantılı olduğunu üstelik hücre çoğalmasını engelleme, kötü huylu tümör gelişimini baskılama, apoptoz indüklenme gibi kansere karşı gösterdiği güçlü tepkileri yapılan araştırmalarla ifade edilmiştir. Bundan dolayıdır ki hedefli bölgeye Berberin dağıtımında taşıyıcı olarak

AgNP'lerin kullanımları mevcuttur (Mirhadi vd., 2018). Bhanumathi ve arkadaşlarının 2017'deki çalışmalarında MCF-7 hücreleri kullanılarak ksenografli fare modeli üzerinde etkisi incelendiğinde Berberin AgNP etkileşimi farelerin vücut ağırlıklarını azaltmadan MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını engelleyerek tümör hacmini ve ağırlığını azaltabildiği sonucuna varılmıştır (Bhanumathi vd., 2017). Çeşitli fizyolojik durumlarda yer alan ve insan kanserlerini değiştirme gibi etkileri bulunan PI3K/AKT ve Ras/Raf/MEK/ERK moleküler sinyal ağı hayatta kalma, çoğalma ve metabolizma gibi olaylarda görev almaktadır (Asati vd., 2016; Pappalardo vd., 2016). Bhanumathi ve diğerlerinin 2018'deki araştırmalarında ise bu AgNP ile etkileşimli Berberini meme kanseri hücrelerinin sitoplazmasına girip bu hücrelerin sitoplazmalarını parçaladığı bundan hareketle HIF-1 α ekspresyonunu engelleyerek ve PI3K/AKT sinyal yollarında, Ras/Raf/ERK protein ekspresyonunun inhibisyonu, ROS üretilmesi gibi sitotoksik etkileri indüklediği ve apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Bhanumathi vd., 2018). Araştırmamıza göre Berberin (100 μ M) dozu, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında canlılığı, ~%74 oranında ($p < 0,001$), nanopartikülle etkinleştirilmiş hali ise BAgNP (100 μ M) ~%88 ($p < 0,001$) düzeyinde şiddetli bir şekilde azalttığı görülmüştür. Bundan hareketle sonuçlarımız literatürle yakın olmakla beraber Berberinin nanopartikülle etkinleştirilmesinin meme kanserine şiddetli bir şekilde etki ettiğini göstermektedir. HUVEC hücre hattında Berberin ve BAgNP gruplarında düşüşler görülmesine rağmen morfolojik analizinde ise bu grupların HUVEC hücre hattına karşı ciddi hasarlarına pek de rastlanılmadığı görülmüştür.

Yaşlanma, uzun ömür, üreme, hücrel stres, metabolizmanın düzenlenmesi veya gen susturma gibi birçok farklı fizyolojik fonksiyonları olan memeli SIRT'ları sınıf III histon deasetilazlara (HDAC'ler) aittir. Yapılan araştırmalar SIRT'ların yaşla bağlantılı olduğu bu sebeple SIRT aktivitesinin artması veya azalması yaşın neden olduğu kanser, kardiyak ve nörolojik hastalıklarla bağlantılıdır (Wątroba ve Szukiewicz, 2016).

Sirtuinler ilişkili olduğu farklı substrat (Ozden ve Park, 2021; Özden, 2017), modülatör ve inhibitörleri sayesinde kanser gibi hastalıklar da SIRT proteinine hedeflenmiş olan aktivatör ve inhibitörlerinin katkılarıyla kanser tedavilerini kolaylaştırmakta ve ilaç gelişimini desteklemektedir (Choi vd., 2013; He vd., 2021; Park vd., 2016; Schiedel vd.,

2018; Yıldırım vd., 2022). Bu çalışma da SIRT3 aktivatörleri olarak Berberin, Honokiol SIRT2 inhibitörlerinden olan SirReal2 molekülleri kullanılmıştır.

Yang ve arkadaşlarının 2020'de yapmış oldukları araştırmalarında kadınlarda görülen rahim ağzı kanseri alanında çalışılmıştır. Geçmişe yönelik 2010 ve 2014 aralığında hastanede tedavi görmüş olan 191 serviks hastaya ait iyi muhafaza edilmiş tümör ve yapışık dokularda SIRT2 ekspresyonuna immünohistokimya yöntemi ile bakılmıştır. Sonuç olarak rahim ağzı kanseri hastalarının tedavisinde SIRT2 ekspresyonu hastalık gözetimi ve prognozu için biyobelirteç potansiyeli görevi olduğu ortaya koyulmuştur (Yang vd., 2020). Li ve diğerlerinin 2018'de mide kanseri üzerine yaptıkları çalışmada ise RAS / ERK / JNK / MMP-9 yolunu aktive ederek indüklenen hücre göçü ve istilasını arttırdığını ayrıca SIRT2, PEPCK1 protein seviyelerini ve mitokondriyal aktiviteyi artırdığı görülmüştür. PEPCK1, SIRT2'nin aşağı akış hedefi olduğu bir de SIRT2 aktivitesinin inhibisyonu mide kanseri için önemli olmakla beraber metabolik ve metastatik mekanizmalarına yol gösterici ve SIRT2'nin tedavilerde moleküler hedef olabileceği bildirilmiştir (Li vd., 2018). Diğer çalışmada ise 22 tane meme kanseri hastası olan kadınlardan kan örnekleri alınıp bunların radyoterapi öncesi ve sonrasındaki SIRT2 seviyeleri araştırılmıştır. Radyoterapinin SIRT2 seviyesini düşürdüğü ve çözünür proteinlerdeki bu azalmış seviyenin kanser tedavisinde faydalı olabileceği, üstelik p53 aracılı apoptozun yukarı düzenlenmesi yoluyla belirli mevcut veya önceden var olan kanserlerin tedavisinde tesirli olunabileceği vurgulanmıştır (Helvacı vd., 2021).

Chen ve diğerlerinin 2021'de yaptıkları çalışma da melatonin, akciğer kanser hücrelerinde SIRT3 uyarılması aracılığıyla metabolizmanın yeniden programlanmasını tersine döndürerek, PDH aktivitesinin artırılmasından ötürü tümör proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Chen vd., 2021). Wang ve arkadaşlarının 2018'de yaptıkları çalışmada ise Honokiol uygulaması, AMPK / PGC-1 α / SIRT3 sinyal yolu aracılığıyla mitokondriyal anti-oksidasyonu, mitokondriyal dinamikleri ve mitofajiyi artırarak oksidatif stres kaynaklı apoptoz ve yaşlanmayı kurtardığı ek olarak mitokondriyal disfonksiyonu iyileştirdiği raporlandırılmıştır (Wang vd., 2018).

Araştırmamızda Western blot analizi yapılarak PARP, SIRT2, SIRT3, LDHA ve PDH gibi proteinlerin seviyelerine bakıldı. İlaveten akridin oranj boyama ile de apoptoz düzeyleri incelendi. DLD-1 protein ekspresyon sonuçlarımıza göre Gümüş

nanopartiküllerle etkileşmiş Honokiol, Berberin ve SirReal2'in NP'lerle etkileşmemiş formlarına göre PARP'ın kesilmiş formunun artmasına (cleaved PARP) neden olmuştur. Özellikle (SAgNP) uygulanan grupta PDH protein ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Uygulamalar SIRT2 düzeylerde belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır. SirReal2'nin hem kendisi hem de NP'lerle etkileşmiş formu LDHA miktarını arttırmış, Berberin'in ise hem kendisi hem de NP'lerle etkileşmiş formu SIRT3 miktarını arttırmıştır. MDA-MB-231'in protein ekspresyon sonuçlarımızda ise özellikle gümüş NP'lerle etkileşen SirReal2 (SAgNP) PARP'ın parçalanmasına yol açmıştır. Honokiol, Berberin ve SirReal2 uygulamaların hem kendileri hem de NP'lerle etkileşmiş formları SIRT2 düzeylerini azaltmıştır. Gümüş NP'lerle etkileşmiş Berberin (BAgNP) SIRT3 protein ifadesini arttırdığı görülmüştür.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre Berberin, Honokiol ve SirReal2 moleküllerin gümüş nanopartiküllerle kombinasyonu meme ve kolon kanserlerine karşı önemli derecede anti kanser özelliği taşıdığı görülmüştür. Bundan hareketle moleküllerin nanopartiküllerle etkileştirilmiş halleri kolon ve meme kanseri için potansiyel antikanser ilaç olabilir düşüncesini ortaya koymuştur.

5. KAYNAKLAR

Adams, L. S., Seeram, N. P., Aggarwal, B. B., Takada, Y., Sand, D., & Heber, D. (2006). Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(3), 980-985.

Ahuja, N., Schwer, B., Carobbio, S., Waltregny, D., North, B. J., Castronovo, V., ... & Verdin, E. (2007). Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33583-33592.

Al-Brahim, J. S., & Mohammed, A. E. (2020). Antioxidant, cytotoxic and antibacterial potentials of biosynthesized silver nanoparticles using bee's honey from two different floral sources in Saudi Arabia. *Saudi journal of biological sciences*, 27(1), 363-373.

Alonso-Castro, A. J., Domínguez, F., García-Regalado, A., González-Sánchez, I., Cerbón, M. A., & García-Carrancá, A. (2014). Magnolia dealbata seeds extract exert cytotoxic and chemopreventive effects on MDA-MB231 breast cancer cells. *Pharmaceutical Biology*, 52(5), 621-627.

AlSalhi, M. S., Devanesan, S., Alfuraydi, A. A., Vishnubalaji, R., Munusamy, M. A., Murugan, K., ... & Benelli, G. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using Pimpinella anisum seeds: antimicrobial activity and cytotoxicity on human neonatal skin stromal cells and colon cancer cells. *International journal of nanomedicine*, 11, 4439.

Aqil, F., Munagala, R., Vadhanam, M. V., Kausar, H., Jeyabalan, J., Schultz, D. J., & Gupta, R. C. (2012). Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Research International*, 49(1), 345-353.

Arokiyaraj, S., Arasu, M. V., Vincent, S., Prakash, N. U., Choi, S. H., Oh, Y. K., ... & Kim, K. H. (2014). Rapid green synthesis of silver nanoparticles from Chrysanthemum indicum L and its antibacterial and cytotoxic effects: an in vitro study. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 379.

Arora, S., Singh, S., Piazza, G. A., Contreras, C. M., Panyam, J., & Singh, A. P. (2012). Honokiol: a novel natural agent for cancer prevention and therapy. *Current molecular medicine*, 12(10), 1244-1252.

Arya, A., Kumar, S., Suryavanshi, A., & Kain, D. (2019). Biosynthesis of metallic nanoparticles from medicinal plants: A review. *Journal of Nanoscience and Technology*, 827-831.

Asati, V., Mahapatra, D. K., & Bharti, S. K. (2016). PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *European journal of medicinal chemistry*, 109, 314-341.

Averett, C., Bhardwaj, A., Arora, S., Srivastava, S. K., Khan, M. A., Ahmad, A., ... & Singh, A. P. (2016). Honokiol suppresses pancreatic tumor growth, metastasis and desmoplasia by interfering with tumor–stromal cross-talk. *Carcinogenesis*, 37(11), 1052-1061.

Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., ... & Fuhrman, B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American journal of clinical nutrition*, 71(5), 1062-1076.

Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., ... & Hayek, T. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical nutrition*, 23(3), 423-433.

Azim Jr, H. A., De Azambuja, E., Colozza, M., Bines, J., & Piccart, M. J. (2011). Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Annals of oncology*, 22(9), 1939-1947.

Bello, B. A., Khan, S. A., Khan, J. A., Syed, F. Q., Mirza, M. B., Shah, L., & Khan, S. B. (2017). Anticancer, antibacterial and pollutant degradation potential of silver nanoparticles from *Hyphaene thebaica*. *Biochemical and biophysical research communications*, 490(3), 889-894.

Benson, J. R. (2003). The TNM staging system and breast cancer. *The lancet oncology*, 4(1), 56-60.

Bever, T. B., Anderson, B. O., Bonaccio, E., Buys, S., Daly, M. B., Dempsey, P. J., ... & Yankeelov, T. (2009). Breast cancer screening and diagnosis. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 7(10), 1060-1096.

Bhanumathi, R., Manivannan, M., Thangaraj, R., & 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.

Bhanumathi, R., Vimala, K., Shanthi, K., Thangaraj, R., & Kannan, S. (2017). Bioformulation of silver nanoparticles as berberine carrier cum anticancer agent against breast cancer. *New Journal of Chemistry*, 41(23), 14466-14477.

Bharti, S., Kaur, G., Jain, S., Gupta, S., & Tripathi, S. K. (2019). Characteristics and mechanism associated with drug conjugated inorganic nanoparticles. *Journal of Drug Targeting*, 27(8), 813-829.

Bordone, L., Cohen, D., Robinson, A., Motta, M. C., Van Veen, E., Czopik, A., ... & Guarente, L. (2007). SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging cell*, 6(6), 759-767.

Bovelli, D., Plataniotis, G., & Roila, F. E. G. W. (2010). Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents and radiotherapy-related heart disease: ESMO Clinical practice guidelines. *Annals of oncology*, 21, v277-v282.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.

Cáceres, A., Girón, L. M., Alvarado, S. R., & Torres, M. F. (1987). Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *Journal of ethnopharmacology*, 20(3), 223-237.

Cai, W., & Chen, X. (2007). Nanoplatforms for targeted molecular imaging in living subjects. *Small*, 3(11), 1840-1854.

Castro-Aceituno, V., Ahn, S., Simu, S. Y., Singh, P., Mathiyalagan, R., Lee, H. A., & Yang, D. C. (2016). Anticancer activity of silver nanoparticles from *Panax ginseng* fresh leaves in human cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 158-165.

Chalkiadaki, A., & Guarente, L. (2012). Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(5), 287-296.

Chen, F., Wang, T., Wu, Y. F., Gu, Y., Xu, X. L., Zheng, S., & Hu, X. (2004). Honokiol: a potent chemotherapy candidate for human colorectal carcinoma. *World journal of gastroenterology: WJG*, 10(23), 3459.

Chen, X., Hao, B., Li, D., Reiter, R. J., Bai, Y., Abay, B., ... & Fan, L. (2021). Melatonin inhibits lung cancer development by reversing the Warburg effect via stimulating the SIRT3/PDH axis. *Journal of pineal research*, 71(2), e12755.

Cho, Y. A., Lee, J., Oh, J. H., Chang, H. J., Sohn, D. K., Shin, A., & Kim, J. (2019). Genetic risk score, combined lifestyle factors and risk of colorectal cancer. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*, 51(3), 1033-1040.

Choi, G., Lee, J., Ji, J. Y., Woo, J., Kang, N. S., Cho, S. Y., ... & Han, S. Y. (2013). Discovery of a potent small molecule SIRT1/2 inhibitor with anticancer effects. *International Journal of Oncology*, 43(4), 1205-1211.

Cianfrocca, M., & Goldstein, L. J. (2004). Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *The oncologist*, 9(6), 606-616.

Çeşmeli, S., & Biray Avci, C. (2019). Application of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in cancer therapies. *Journal of drug targeting*, 27(7), 762-766.

Dean, M., & Moitra, K. (2017). *Biology of neoplasia. Cancer epidemiology and prevention*, 4th edition. Thun, M., Linet, M. S., Cerhan, J. R., Haiman, C. A., & Schottenfeld, D. (Eds.). Oxford University Press, New York, 9-17.

Dragovic-Uzelac, V., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D., & Boras, M. (2007). The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food chemistry*, 102(3), 966-975.

Ebrahimzadeh, Z., Salehzadeh, A., Naemi, A. S., & Jalali, A. (2020). Silver nanoparticles biosynthesized by *Anabaena flos-aquae* enhance the apoptosis in breast cancer cell line. *Bulletin of materials science*, 43(1), 1-7.

El-Naggar, N. E. A., Hussein, M. H., & El-Sawah, A. A. (2017). Bio-fabrication of silver nanoparticles by phycocyanin, characterization, in vitro anticancer activity against breast cancer cell line and in vivo cytotoxicity. *Scientific reports*, 7(1), 1-20.

Engin, O., Uyar, M. E., Sunamak, O., & Ipekci, F. (2015). Colonoscopy. In *colon polyps and the prevention of colorectal cancer* (pp. 41-112). Springer, Cham.

Feynman, R. P. (1960). There's plenty of room at the bottom, *Engineering and Science* (California Institute of Technology).

Fijten, G. H., Starmans, R., Muris, J. W., Schouten, H. J., Blijham, G. H., & Knottnerus, J. A. (1995). Predictive value of signs and symptoms for colorectal cancer in patients with rectal bleeding in general practice. *Family Practice*, 12(3), 279-286.

Ford, E., Voit, R., Liszt, G., Magin, C., Grummt, I., & Guarente, L. (2006). Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes & development*, 20(9), 1075-1080.

Frank, B., Conzelmann, C., Weil, T., Groß, R., Jungke, P., Eggers, M., ... & Kessler, U. (2020). Antiviral activity of plant juices and green tea against SARS-CoV-2 and influenza virus in vitro. *bioRxiv*.

Fried, L. E., & Arbiser, J. L. (2009). Honokiol, a multifunctional antiangiogenic and antitumor agent. *Antioxidants & redox signaling*, 11(5), 1139-1148.

Frye, R. A. (1999). Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 260(1), 273-279.

Gelen, V., Kükürt, A., Şengül, E., Başer, Ö. F., & Karapehlivan, M. (2021). Can polyphenols be used as anti-inflammatory agents against covid-19 (SARS-CoV-2)-induced inflammation?. In *phenolic compounds-chemistry, synthesis, diversity, non-conventional industrial, pharmaceutical and therapeutic applications*. IntechOpen.

Govindaraju, K., Krishnamoorthy, K., Alsagaby, S. A., Singaravelu, G., & Premanathan, M. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles for selective toxicity towards cancer cells. *IET nanobiotechnology*, 9(6), 325-330.

Gurunathan, S., Han, J. W., Dayem, A. A., Eppakayala, V., Park, J. H., Cho, S. G., ... & Kim, J. H. (2013). Green synthesis of anisotropic silver nanoparticles and its potential cytotoxicity in human breast cancer cells (MCF-7). *Journal of industrial and engineering chemistry*, 19(5), 1600-1605.

Gurunathan, S., Park, J. H., Han, J. W., & Kim, J. H. (2015). Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 human breast cancer cells: targeting p53 for anticancer therapy. *International journal of nanomedicine*, 10, 4203.

Hahm, E. R., Arlotti, J. A., Marynowski, S. W., & Singh, S. V. (2008). Honokiol, a constituent of oriental medicinal herb *magnolia officinalis*, inhibits growth of PC-3 xenografts in vivo in association with apoptosis induction. *Clinical cancer research*, 14(4), 1248-1257.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

Hashemi-Niasari, F., Rabbani-Chadegani, A., Razmi, M., & Fallah, S. (2018). Synergy of theophylline reduces necrotic effect of berberine, induces cell cycle arrest and PARP, HMGB1, Bcl-2 family mediated apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 106, 858-867.

Hashemi, S. F., Tasharrofi, N., & Saber, M. M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Teucrium polium* leaf extract and assessment of their antitumor effects against MNK45 human gastric cancer cell line. *Journal of molecular structure*, 1208, 127889.

He, J. L., Wang, T. S., & Wang, Y. P. (2021). Sirtuins and mitochondrial dysfunction. in *sirtuin biology in cancer and metabolic disease* (pp. 79-89). Academic Press.

Helvacı, N., Saraçoğlu, H., Yıldız, O. G., & Kılıç, E. (2021). The study of sirtuins in breast cancer patients before and after radiotherapy. *Turkish journal of medical sciences*, 51(3), 1354-1359.

Hossen, S., Hossain, M. K., Basher, M. K., Mia, M. N. H., Rahman, M. T., & Uddin, M. J. (2019). Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. *Journal of advanced research*, 15, 1-18.

Hu, Q., Qin, Y., Ji, S., Xu, W., Liu, W., Sun, Q., ... & Xu, X. (2019). UHRF1 promotes aerobic glycolysis and proliferation via suppression of SIRT4 in pancreatic cancer. *Cancer letters*, 452, 226-236.

Hu, Y., Lin, J., Lin, Y., Chen, X., Zhu, G., & Huang, G. (2019). Overexpression of SIRT4 inhibits the proliferation of gastric cancer cells through cell cycle arrest. *Oncology letters*, 17(2), 2171-2176.

Huang, G., & Zhu, G. (2018). Sirtuin-4 (SIRT4), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive activity in cancer. *Oncotargets and therapy*, 11, 3395.

Imenshahidi, M., & Hosseinzadeh, H. (2019). Berberine and barberry (*Berberis vulgaris*): a clinical review. *Phytotherapy Research*, 33(3), 504-523.

Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638-2650.

Jeong, S. M., Xiao, C., Finley, L. W., Lahusen, T., Souza, A. L., Pierce, K., ... & Haigis, M. C. (2013). SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. *Cancer cell*, 23(4), 450-463.

Jeyaraj, M., Gurunathan, S., Qasim, M., Kang, M. H., & Kim, J. H. (2019). A comprehensive review on the synthesis, characterization, and biomedical application of platinum nanoparticles. *Nanomaterials*, 9(12), 1719.

Jha, A. K., & Prasad, K. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles and its activity on SiHa cervical cancer cell line. *Adv. Mater. Lett*, 5(12), 501-505.

Jia, S., Zhang, R., Li, Z., & Li, J. (2017). Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(33), 55632.

Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., & Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. *Przegląd menopauzalny= Menopause review*, 14(3), 196.

Kavitha, K. S., Baker, S., Rakshith, D., Kavitha, H. U., Yashwantha Rao, H. C., Harini, B. P., & Satish, S. (2013). Plants as green source towards synthesis of nanoparticles. *Int Res J Biol Sci*, 2(6), 66-76.

Kayl, A. E., & Meyers, C. A. (2006). Side-effects of chemotherapy and quality of life in ovarian and breast cancer patients. *Current opinion in obstetrics and gynecology*, 18(1), 24-28.

Khan, N., Afaq, F., Kweon, M. H., Kim, K., & Mukhtar, H. (2007). Oral consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice. *Cancer research*, 67(7), 3475-3482.

Khatami, M., Sharifi, I., Nobre, M. A., Zafarnia, N., & Aflatoonian, M. R. (2018). Waste-grass-mediated green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of their anticancer, antifungal and antibacterial activity. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 11(2), 125-134.

Kim, H. S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K. S., Aykin-Burns, N., Pennington, J. D., ... & Gius, D. (2010). SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer cell*, 17(1), 41-52.

Kundranda, M. N., & Niu, J. (2015). Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: clinical development and future directions. *Drug design, development and therapy*, 9, 3767.

Kuo, C. L., Chi, C. W., & Liu, T. Y. (2004). The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer letters*, 203(2), 127-137.

La, X., Zhang, L., Li, Z., Yang, P., & Wang, Y. (2017). Berberine-induced autophagic cell death by elevating GRP78 levels in cancer cells. *Oncotarget*, 8(13), 20909.

Lakshmanan, G., Sathiyaseelan, A., Kalaichelvan, P. T., & Murugesan, K. (2018). Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles using fruit extract of *Cleome viscosa* L.: assessment of their antibacterial and anticancer activity. *Karbala International Journal of Modern Science*, 4(1), 61-68.

Langley, P. (2000). Why a pomegranate?. *Bmj*, 321(7269), 1153-1154.

Li, C. I., Uribe, D. J., & Daling, J. R. (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British journal of cancer*, 93(9), 1046-1052.

Li, Y., Zhang, M., Dorfman, R. G., Pan, Y., Tang, D., Xu, L., ... & Zou, X. (2018). SIRT2 promotes the migration and invasion of gastric cancer through RAS/ERK/JNK/MMP-9 pathway by increasing PEPCK1-related metabolism. *Neoplasia*, 20(7), 745-756.

Lin, Y. R., Chen, H. H., Ko, C. H., & Chan, M. H. (2007). Effects of honokiol and magnolol on acute and inflammatory pain models in mice. *Life Sciences*, 81(13), 1071-1078.

Liu, S. H., Lee, W. J., Lai, D. W., Wu, S. M., Liu, C. Y., Tien, H. R., ... & Sheu, M. L. (2015). Honokiol confers immunogenicity by dictating calreticulin exposure, activating ER stress and inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular oncology*, 9(4), 834-849.

Longo, V. D., & Kennedy, B. K. (2006). Sirtuins in aging and age-related disease. *Cell*, 126(2), 257-268.

Majeed, S., Aripin, F. H. B., Shoeb, N. S. B., Danish, M., Ibrahim, M. M., & Hashim, R. (2019). Bioengineered silver nanoparticles capped with bovine serum albumin and its anticancer and apoptotic activity against breast, bone and intestinal colon cancer cell lines. *Materials Science and Engineering: C*, 102, 254-263.

Meade, E., & Dowling, M. (2012). Early breast cancer: diagnosis, treatment and survivorship. *British Journal of Nursing*, 21(Sup17), S4-S7.

Milne, J. C., & Denu, J. M. (2008). The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging. *Current opinion in chemical biology*, 12(1), 11-17.

Mirhadi, E., Rezaee, M., & Malaekheh-Nikouei, B. (2018). Nano strategies for berberine delivery, a natural alkaloid of Berberis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 104, 465-473.

Mohanpuria, P., Rana, N. K., & Yadav, S. K. (2008). Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of nanoparticle research*, 10(3), 507-517.

Mosa, A. F., & Mohamed, M. A. E. (2021). Potential effect of pomegranate peels extract (punica granatum.) against covid-19 virus.

Mousavi, B., Tafvizi, F., & Zaker Bostanabad, S. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using *Artemisia turcomanica* leaf extract and the study of anti-cancer effect and apoptosis induction on gastric cancer cell line (AGS). *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup1), 499-510.

Naidu, K. S. B., Adam, J. K., & Govender, P. (2015). Biomedical applications and toxicity of nanosilver: a review. *Medical technology SA*, 29(2), 13-19.

Nakagawa, T., Lomb, D. J., Haigis, M. C., & Guarente, L. (2009). SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell*, 137(3), 560-570.

Nakkala, J. R., Mata, R., & Sadras, S. R. (2017). Green synthesized nano silver: Synthesis, physicochemical profiling, antibacterial, anticancer activities and biological in vivo toxicity. *Journal of colloid and interface science*, 499, 33-45.

Newman, R. A., Lansky, E. P., & Block, M. L. (2007). *Pomegranate: The most medicinal fruit*. Basic Health Publications, Inc.

National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007. Understanding Cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>.

Okugawa, Y., Grady, W. M., & Goel, A. (2015). Epigenetic alterations in colorectal cancer: emerging biomarkers. *Gastroenterology*, 149(5), 1204-1225.

Ozden, O., & Park, S. H. (2021). SIRT2 mediated downregulation of FOXM1 in response to TGF β through the RAF-MEK-ERK signaling pathway in colon cancer. *Archives of Biological Sciences*, 73(2), 257-264.

Ozden, O., Park, S. H., Wagner, B. A., Song, H. Y., Zhu, Y., Vassilopoulos, A., ... & Gius, D. (2014). SIRT3 deacetylates and increases pyruvate dehydrogenase activity in cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 76, 163-172.

Ozden, O., & Tural, K. (2018). Changes in the Expression and the Role of Sirtuin 3 in Cancer Cells and in Cardiovascular Health and Disease. In *Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells-Transcription Toward the Establishment of Novel Therapeutics*. Fumiaki Uchiumi (ed.), IntechOpen, Croatia, 163-180.

Özden, Ö. Deacetylation of Androgen Receptor by SIRT2 and its Dysregulation Promotes Pathogenesis and Progression of Prostate Cancer. *Kafkas Journal of Medical Sciences*, 7(2), 97-101.

Pan, J., Zhang, Q., Liu, Q., Komar, S. M., Kalyanaraman, B., Lubet, R. A., ... & You, M. (2014). Honokiol inhibits lung tumorigenesis through inhibition of mitochondrial function. *Cancer prevention research*, 7(11), 1149-1159.

Pappalardo, F., Russo, G., Candido, S., Pennisi, M., Cavalieri, S., Motta, S., ... & Libra, M. (2016). Computational modeling of PI3K/AKT and MAPK signaling pathways in melanoma cancer. *PLoS One*, 11(3), e0152104.

Park, E. J., Min, H. Y., Chung, H. J., Hong, J. Y., Kang, Y. J., Hung, T. M., ... & Lee, S. K. (2009). Down-regulation of c-Src/EGFR-mediated signaling activation is involved in the honokiol-induced cell cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer letters*, 277(2), 133-140.

Park, S. H., Ozden, O., Jiang, H., Cha, Y. I., Pennington, J. D., Aykin-Burns, N., ... & Kim, H. S. (2011). Sirt3, mitochondrial ROS, ageing, and carcinogenesis. *International journal of molecular sciences*, 12(9), 6226-6239.

Park, S. H., Ozden, O., Liu, G., Song, H. Y., Zhu, Y., Yan, Y., ... & Gius, D. (2016). SIRT2-mediated deacetylation and tetramerization of pyruvate kinase directs glycolysis and tumor growth. *Cancer research*, 76(13), 3802-3812.

Park, S. H., Zhu, Y., Ozden, O., Kim, H. S., Jiang, H., Deng, C. X., ... & Vassilopoulos, A. (2012). SIRT2 is a tumor suppressor that connects aging, acetylome, cell cycle signaling, and carcinogenesis. *Translational cancer research*, 1(1), 15.

Partridge, A. H., Burstein, H. J., & Winer, E. P. (2001). Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. *JNCI Monographs*, 2001(30), 135-142.

Patra, S., Mukherjee, S., Barui, A. K., Ganguly, A., Sreedhar, B., & Patra, C. R. (2015). Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. *Materials Science and Engineering: C*, 53, 298-309.

Patravale, V. B., Date, A. A., & Kulkarni, R. M. (2004). Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 56(7), 827-840.

Rabinow, B. E. (2004). Nanosuspensions in drug delivery. *Nature reviews Drug discovery*, 3(9), 785-796.

Rickert, U., Cossais, F., Heimke, M., Arnold, P., Preuß-Prange, A., Wilms, H., & Lucius, R. (2018). Anti-inflammatory properties of Honokiol in activated primary microglia and astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 323, 78-86.

Robles, A. I., Traverso, G., Zhang, M., Roberts, N. J., Khan, M. A., Joseph, C., ... & Papadopoulou, N. (2016). Whole-exome sequencing analyses of inflammatory bowel Disease– Associated colorectal cancers. *Gastroenterology*, 150(4), 931-943.

Roome, T., & Razzak, A. (2020). Clinical implications of metals-based drug-delivery systems. In *Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications* (pp. 237-258). Elsevier.

Ruddon, R. W. (2007). *Cancer biology*. Oxford University Press.

Rumpf, T., Schiedel, M., Karaman, B., Roessler, C., North, B. J., Lehotzky, A., ... & Jung, M. (2015). Selective Sirt2 inhibition by ligand-induced rearrangement of the active site. *Nature communications*, 6(1), 1-13.

Saber, M. M., Mirtajani, S. B., & Karimzadeh, K. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using *Trapa natans* extract and their anticancer activity against A431 human skin cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47, 375-379.

Sarikhani, M., Mishra, S., Desingu, P. A., Kotyada, C., Wolfgeher, D., Gupta, M. P., ... & Sundaresan, N. R. (2018). SIRT2 regulates oxidative stress-induced cell death through deacetylation of c-Jun NH2-terminal kinase. *Cell Death & Differentiation*, 25(9), 1638-1656.

Sarkar, S., & Kotteeswaran, V. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous leaf extract of Pomegranate (*Punica granatum*) and their anticancer activity on human cervical cancer cells. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 9(2), 025014.

Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 215S-217S.

Schiedel, M., Robaa, D., Rumpf, T., Sippl, W., & Jung, M. (2018). The current state of NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins) as novel therapeutic targets. *Medicinal research reviews*, 38(1), 147-200.

Sebastián, C., Satterstrom, F. K., Haigis, M. C., & Mostoslavsky, R. (2012). From sirtuin biology to human diseases: an update. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42444-42452.

Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K., & Poinern, G. E. J. (2015). Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Materials*, 8(11), 7278-7308.

Shamsuddin, A. M. (1990). Normal and pathological anatomy of the large intestine. *Colon Cancer Cells*, 2, 15-40.

Shanmugavadivu, M., Kuppasamy, S., & Ranjithkumar, R. (2014). Synthesis of pomegranate peel extract mediated silver nanoparticles and its antibacterial activity. *Am J Adv Drug Deliv*, 2(2), 174-182.

Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., & Sharma, K. K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 1(2), 109.

Sharma, P., McClees, S. F., & Afaq, F. (2017). Pomegranate for prevention and treatment of cancer: An update. *Molecules*, 22(1), 177.

Shigemura, K., Arbiser, J. L., Sun, S. Y., Zayzafoon, M., Johnstone, P. A., Fujisawa, M., ... & Chung, L. W. (2007). Honokiol, a natural plant product, inhibits the bone metastatic growth of human prostate cancer cells. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 109(7), 1279-1289.

Shore, D., Squire, M., & Nasmyth, K. A. (1984). Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *The EMBO journal*, 3(12), 2817-2823.

Singh, S. P., Mishra, A., Shyanti, R. K., Singh, R. P., & Acharya, A. (2021). Silver nanoparticles synthesized using *Carica papaya* leaf extract (AgNPs-PLE) causes cell cycle arrest and apoptosis in human prostate (DU145) cancer cells. *Biological Trace Element Research*, 199(4), 1316-1331.

Singhal, K. C. (1976). Anthelmintic activity of berberine hydrochloride against *Syphacia obvelata* in mice. *Indian journal of experimental biology*, 14(3), 345-347.

Singletary, S. E., & Greene, F. L. (2003). Revision of breast cancer staging: the 6th edition of the TNM Classification. In *Seminars in surgical oncology* (Vol. 21, No. 1, pp. 53-59). Hoboken: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.

Sitzia, J., & Huggins, L. (1998). Side effects of cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil (CMF) chemotherapy for breast cancer. *Cancer practice*, 6(1), 13-21.

Song, H. Y., Rellinger, E. J., Park, S. H., Paul, P., Qiao, J., Vasilopoulos, A., ... & Chung, D. H. (2018). Inhibition of Sirtuin 6 induces neuroblastoma differentiation. *Anticancer research*, 38(2), 647-654.

Song, S., Qin, Y., He, Y., Huang, Q., Fan, C., & Chen, H. Y. (2010). Functional nanoprobe for ultrasensitive detection of biomolecules. *Chemical Society Reviews*, 39(11), 4234-4243.

Spiegelman, N. A., Price, I. R., Jing, H., Wang, M., Yang, M., Cao, J., ... & Lin, H. (2018). Direct Comparison of SIRT2 Inhibitors: Potency, Specificity, Activity-Dependent Inhibition, and On-Target Anticancer Activities. *ChemMedChem*, 13(18), 1890-1894.

Sreekanth, T. V. M., Pandurangan, M., Kim, D. H., & Lee, Y. R. (2016). Green synthesis: in-vitro anticancer activity of silver nanoparticles on human cervical cancer cells. *Journal of Cluster Science*, 27(2), 671-681.

Srikar, S. K., Giri, D. D., Pal, D. B., Mishra, P. K., & Upadhyay, S. N. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles: a review. *Green and Sustainable Chemistry*, 6(1), 34-56.

Stoffel, E. M., & Kastrinos, F. (2014). Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 12(7), 1059-1068.

Stover, E. D., & Mercure, E. W. (2007). The pomegranate: a new look at the fruit of paradise. *HortScience*, 42(5), 1088-1092.

Stryker, S. J., Wolff, B. G., Culp, C. E., Libbe, S. D., Ilstrup, D. M., & MacCarty, R. L. (1987). Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology*, 93(5), 1009-1013.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.

Tang, P., Gu, J. M., Xie, Z. A., Gu, Y., Jie, Z. W., Huang, K. M., ... & Hu, Z. J. (2018). Honokiol alleviates the degeneration of intervertebral disc via suppressing the activation of TXNIP-NLRP3 inflammasome signal pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 120, 368-379.

Tao, R., Leclerc, J., Yildiz, K., Park, S. H., Jung, B., Gius, D., & Özden, Ö. (2015). Changes in gene expression in SIRT3 knockout liver cells. *Turkish Journal of Biology*, 39(3), 380-387.

Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2), 171-182.

Venugopal, K., Ahmad, H., Manikandan, E., Arul, K. T., Kavitha, K., Moodley, M. K., ... & Bhaskar, M. (2017). The impact of anticancer activity upon Beta vulgaris extract mediated biosynthesized silver nanoparticles (ag-NPs) against human breast (MCF-7), lung (A549) and pharynx (Hep-2) cancer cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 173, 99-107.

Wang, J., Nisar, M., Huang, C., Pan, X., Lin, D., Zheng, G., ... & Wang, X. (2018). Small molecule natural compound agonist of SIRT3 as a therapeutic target for the treatment of intervertebral disc degeneration. *Experimental & molecular medicine*, 50(11), 1-14.

Wang, J., Sui, M., & Fan, W. (2010). Nanoparticles for tumor targeted therapies and their pharmacokinetics. *Current drug metabolism*, 11(2), 129-141.

Wątroba, M., & Szukiewicz, D. (2016). The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Advances in medical sciences*, 61(1), 52-62.

Wolf, I., O'Kelly, J., Wakimoto, N., Nguyen, A., Amblard, F., Karlan, B. Y., ... & Koeffler, H. P. (2007). Honokiol, a natural biphenyl, inhibits in vitro and in vivo growth of breast cancer through induction of apoptosis and cell cycle arrest. *International journal of oncology*, 30(6), 1529-1537.

Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., & Hannun, Y. A. (2018). Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nature communications*, 9(1), 1-12.

Wu, X. K., Wang, Y. Y., Liu, J. P., Hou, L. H., Gao, Y. Q., Du, S. M., ... & Ng, E. H. (2015). Letrozole, berberine, or a combination for infertility in Chinese women with polycystic ovary syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 386, S70.

Yamamoto, H., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2007). Sirtuin functions in health and disease. *Molecular endocrinology*, 21(8), 1745-1755.

Yang, L. P., Feng, H. Q., Ma, J. C., Wu, H., & Liu, C. R. (2020). SIRT2 expression exhibits potential to serve as a biomarker for disease surveillance and prognosis in the management of cervical cancer patients. *Medicine*, 99(11).

Yao, M., Fan, X., Yuan, B., Takagi, N., Liu, S., Han, X., ... & Liu, J. (2019). Berberine inhibits NLRP3 Inflammasome pathway in human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 1-11.

Yasoathamani, V., & Vivek, R. (2019). Biosynthesis of Nanoparticles for cancer therapeutic applications. *Biol Syn Nanopt Appl*, 6, 105.

Ye, M., Fu, S., Pi, R., & He, F. (2009). Neuropharmacological and pharmacokinetic properties of berberine: a review of recent research. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(7), 831-837.

Yıldırım, S., Demirel, R., İçen, M., & Özden, Ö., (2022). Sirtuin1-3 Deasetilazlar: Biyolojik Fonksiyonları ve Kanserde Terapötik Potansiyelleri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 12(2), 1055-1069.

Yu, S. J., Yin, Y. G., & Liu, J. F. (2013). Silver nanoparticles in the environment. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(1), 78-92.

Zahin, M., Ahmad, I., Gupta, R. C., & Aqil, F. (2014). Punicalagin and ellagic acid demonstrate antimutagenic activity and inhibition of benzo [a] pyrene induced DNA adducts. *BioMed research international*, 2014.

Zhang, Q., Zhao, W., Ye, C., Zhuang, J., Chang, C., Li, Y., ... & Yan, J. (2015). Honokiol inhibits bladder tumor growth by suppressing EZH2/miR-143 axis. *Oncotarget*, 6(35), 37335.

Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1534.

Zhang, Y., Chen, T., Yuan, P., Tian, R., Hu, W., Tang, Y., ... & Zhang, L. (2015). Encapsulation of honokiol into self-assembled pectin nanoparticles for drug delivery to HepG2 cells. *Carbohydrate polymers*, 133, 31-38.

Zhang, Y., Li, M., Gao, X., Chen, Y., & Liu, T. (2019). Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities. *Journal of hematology & oncology*, 12(1), 1-13.

