GÜMÜŞ İLE YÜKLENMİŞ TİTANYUM DİOKSİT NANOTÜPLERİNİN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK, ANTİKANSER VE HÜCRE ÖLÜMÜ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Akoua Aurelie Carine ALLOUNAN

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÜMÜŞ İLE YÜKLENMİŞ TİTANYUM DİOKSİT NANOTÜPLERİNİN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK, ANTİKANSER VE HÜCRE ÖLÜMÜ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Akoua Aurelie Carine ALLOUNAN
0000-0003-2355-4703

Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

GÜMÜŞ İLE YÜKLENMİŞ TİTANYUM DİOKSİT NANOTÜPLERİNİN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK, ANTİKANSER VE HÜCRE ÖLÜMÜ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Akoua Aurelie Carine ALLOUNAN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ

Günümüzde nanomateryaller teknolojiden tıp dünyasına birçok platformda kullanım alanı bulmaktadır. Özellikle nanomateryallerin hücre içinde önemli oranda sitotoksik etki oluşturması belirli metallerin nanoboyutta sentezlenerek kanser tedavisinde ilaç taşıyıcı olarak, fototerapi amaçlı ısı ile aktifleşme ve farklı metaller ile yüklenerek kanser hücrelerini öldürme amaçlı kullanımlarını yaygınlaştırmıştır. TiO_2 bazlı nanomateryaller son dönemde medikal amaçlı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. İn-vitro çalışmalar, nanoyapılı TiO_2'nin bazı hücrelerin nükleer bölgesine erişebildiğini ve genotoksik etkiye neden olduğunu kanıtlamıştır. Gümüş, yüksek biyouyumluluk ve antimikrobiyal özellikleriyle ile tanınmaktadır. Kanser tedavisinde hastalar sıklıkla kemoterapötik ajanlara direnç geliştirmektedir. Ayrıca, bu terapötik ilaçların çoğu hedefe özgü değildir ve etrafındaki sağlıklı vücut dokularına zarar verme ihtimalleri yüksek olmaktadır.

Bu doktora tez çalışmasında ilk kez gerçekleştirilen gümüş ile yüklenmiş titanyum nanotüpleri ile insan kolorektal kanser, insan akciger kanser ve insan meme kanser hücre hatlarında olası genotoksik ve antikanser etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. 24 saatlik XTT deneyleri, 80 ila 640 µg/mL doz aralığında AgTNT'nin zaman ve doza bağlı sitotoksik etkilerini ortaya koymuştur. AgTNT'ye 24 saat boyunca maruz kalan hücrelerde komet testi ile DNA hasarı parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Reaktif oksijen türlerinde de önemli bir artış gözlenmiştir. IC_{50} dozlarında AgTNT tarafından indüklenmiş hücrelerde tipik apoptotik morfolojik özellik hücre içi TEM ile gözlenmiş ve son olarak annexin-V ve multikaspaz deneyleri ile hücre ölümü etkisi doğrulanmıştır. Test verileri, AgTNT'nin sitotoksisiteyi, önemli DNA hasarını ve HT-29, A549 ve MCF-7 hücrelerinin apoptozunu indükleyebileceğine dair güçlü kanıtlar sağlayarak antikanser potansiyellerini ortaya koymaktadır ve TiO_2 nanotüplerin etkin anti-kanser ajanlar olarak özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Nanotüpler, Gümüş, Titanyum dioksit, Kolorektal Kanser, Akciğer Kanseri, Meme Kanseri, Sitotoksisite, Anti-kanser etkisi, Apoptoz
2024, xv **+ 110 sayfa**

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC, ANTICANCER AND CELL DEATH EFFECTS OF SILVER-LOADED TITANIUM DIOXIDE NANOTUBES ON SEVERAL CANCER CELLS

Akoua Aurelie Carine ALLOUNAN

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ

Nanomaterials are used in many platforms from technology to medicine. The significant cytotoxic effect of nanomaterials on cells has expanded the use of certain metals as drug carriers in cancer treatment, such as phototherapy, and for combination with different metals to kill cancer cells. TiO_2-based nanomaterials have been widely used primarily for technological and recently for medical purposes. In-vitro studies revealed that nanostructured TiO_2 can access the nuclear region of some cells and cause genotoxic effect. Silver is known for its high biocompatibility and antimicrobial properties.In cancer treatment, patients often develop resistance to chemotherapeutic agents. Furthermore, most of these therapeutic drugs are not target-specific and are likely to damage surrounding healthy body tissues.

In this study, silver-loaded titanium nanotubes were used for the first time to determine their potential genotoxic and anticancer effects on human colorectal, lung and breast cancer cell lines. 24 h XTT experiments revealed time- and dose-dependent cytotoxic effects of AgTNT in the dose range of 80 to 640 µg/mL. A significant increase in DNA damage parameters was observed by comet assay in cells exposed to AgTNT for 24 h. A significant increase in ROS was also observed. Apoptotic morphology of cells induced by AgTNT at IC_{50} doses was observed by intracellular TEM and cell death effect was confirmed by annexin-V and multicaspase assays. Data provide strong evidence that AgTNT can induce cytotoxicity, significant DNA damage and apoptosis of HT-29, A549 and MCF-7 cells, demonstrating their anticancer potential and revealing TiO_2 nanotubes potential as effective carriers.

Key words: Silver, Titanium dioxide, Colorectal cancer, Lung cancer, Breast cancer, Cytotoxicity, Anticancer effect, Apoptosis

2024, xv **+ 110 pages**

ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR

Hayatımdaki her şeyin gerçekleşmesine izin veren, bu kıymetli dileğin gerçekleşmesi de dahil olmak üzere, çabalarım süresince beni cesaret ve azimle donatan Rabbime şükrediyorum ve teşekkürlerimi sunarım.

Prof. Dr. Nilüfer Çinkılıç'a tezime danışmanlık yapmayı kabul ettiği, alanındaki uzmanlığıyla benim için değerli bir ilham ve öğrenme kaynağı olduğu, erişilebilirliği ve bilgisini paylaşma isteği ve gösterdiği anne sevgisi sayesinde akademik, profesyonel ve kişisel gelişimime büyük katkı sağladığı için teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın başarısına yaptıkları önemli katkılardan dolayı Prof. Dr. Tolga Çavaş ve Doç. Dr. Halit Levent Hoşgün'e teşekkürlerimi sunarım.

Prof. Dr. Özgür Vatan'a bu araştırma çalışmasının yürütülmesindeki desteği, ulaşılabilirliği, uzmanlığı, tavsiyeleri ve araştırma çalışmamı geliştirmeme yardımcı olan ilgili önerileri için teşekkürlerimi sunarım.

Başta Huzeyfe Hürriyet, Zehranur Düzen, Neylan Oral ve Melika Bektaş olmak üzere hücre kültürü, genetik ve toksikoloji laboratuvarındaki tüm çalışma arkadaşlarıma misafirperverlikleri, sempati ve destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Bu macera boyunca manevi destekleri, cesaretlendirmeleri ve bu tezin gerekliliklerini anlayışla karşılamaları için aileme teşekkürlerimi sunarım.

Yakın arkadaşlarım André Soro, Sarah Konaré, Corinne Corcher, Benjamin Bantchima, Houda Rami ve Patrick Rutayisire'ye bu projenin başarıyla tamamlanmasında verdikleri destek, teşvik ve tavsiyeler için teşekkürlerimi sunarım.

Bugün bulunduğum noktada olmamı mümkün kılan ve bu çalışmayı kendisine ithaf ettiğim rahmetli dedem Blaise Anoh'a minnettarlığımı ve teşekkürlerimi ifade etmek isterim.

Bu tezin tamamlanmasına herhangi bir şekilde katkıda bulunan herkese içten teşekkürlerimi sunarım.

Akoua Aurelie Carine ALLOUNAN
16/02/2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET....vi
ABSTRACT....vii
ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR....viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ....xi
ŞEKİLLER DİZİNİ....xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ....xv
1. GİRİŞ……....1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI....5
2.1. Kanser tarihçesi....5
2.2. Kanser tanımı....5
2.3. Kanser sınıflandırılması....7
2.4. Kanser oluşum nedenleri....7
2.4.1.Virüsler ve Bakteriler....7
2.4.2. Kimyasal kanserojen maddeler....9
2.4.3. Yaşam tarzı etmenleri....11
2.4.4.Vücut yağlanması....12
2.4.5. Fiziksel aktivite....12
2.4.6. Beslenme tarzı....12
2.4.7. Alkol tüketimi....13
2.4.8. Gıdaların muhafazası, işlenmesi ve hazırlanması....14
2.4.9. Sigara içme....14
2.5. Kanserin temel özellikleri....15
2.5.1. Fenotipik plastisite ve bozulmuş farklılaşma....16
2.5.2. Mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama....17
2.5.3. Polimorfik mikrobiyomlar....17
2.5.4. Hücresel yaşlanma....18
2.6. Nanoteknoloji....19
2.6.1. Nanoteknoloji tanımı....19
2.6.2. Nanomalzemelerin ilaç dağıtımına yönelik kullanımları....20
2.6.3. Kanser tedavisinde kullanılan nanomalzemeler....22
2.6.4. Titanyum nanotüp ilaç taşıma sistemi olarak kullanımı....23
3. MATERYAL ve YÖNTEM....27
3.1. Titanyum nanotüplerin sentezlenmesi....27
3.2. Titanyum nanotüplerin karakterizasyon çalışması....28
3.2.1. Elektron mikroskopları ile yapısal analizi FESEM ve TEM....28
3.2.2. X- ışını Kırınımı (XRD)....30
3.2.3. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)....30
3.2.4. Nanotüplerin hücre içi girişi ve lokalizasyonunun TEM ile görüntülenmesi....31
3.3. Hücre kültürü protokolü....32
3.4. Araştırma sırasında gerçekleştirilen sitotoksisite deneyler....34
3.4.1. Trypan blue ile canlı hücre sayımı....34
3.4.2. Hücre canlılık testi XTT....35
3.5. Araştırma sırasında gerçekleştirilen genotoksisite deneyi....36
3.5.1. Alkalin Komet testi....36
3.6. Araştırma sırasında gerçekleştirilen hücre ölüm modu testi....37
3.6.1. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Ölçümü....37

3.6.2. Anneksin V testi 38
3.6.3. Multikaspaz testi 38
3.7. İstatistiksel Analizi 39
4. BULGULAR 40
4.1. Titanyum nanotüplerin karakterizasyon analizi 40
4.1.1. Alan emisyon taramalı elektron mikroskobi FESEM 40
4.1.2. Transmisyon elektron mikroskobi TEM 41
4.1.3. X- ışını Kırınımı XRD 42
4.1.4. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi FTIR 44
4.2. Nanotüplerin hücre içi girişi ve lokalizasyonunun TEM ile görüntülenmesi 44
4.3. Titanyum nanotüplerin sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi 47
4.4.Titanyum nanotüplerin genotoksik etkisinin Alkalin Komet deneyi kullanılarak değerlendirilmesi 49
4.4.1. Titanyum nanotüplerin kuyruk uzunluğu sonuçları 52
4.4.2. Titanyum nanotüplerin Kuyruk % DNA sonuçları 54
4.4.3. Titanyum nanotüplerin Olive Tail Momenti sonuçları 57
4.5. Titanyum nanotüplerin oluşturduğu hücre içi ROS düzeylerinin değerlendirilmesi 60
4.6. Titanyum nanotüplerin apoptotik etkisi Anneksin-V testi kullanılarak değerlendirilmesi 63
4.7. Titanyum nanotüplerin apoptotik etkisinin Multikaspaz testi kullanılarak değerlendirilmesi 68
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 73
KAYNAKLAR 87
EKLER 106
ÖZGEÇMİŞ 111

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
Ag^+	Gümüş iyonu
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
°C	Derece santigrad
V	Volt
mA	Miliamper
α	Alfa
β	Beta
≤/≥	Büyüktür/küçüktür işareti
e-	Serbest elektron
%	Yüzdelik
H	Hidrojen
O	Oksijen

Kısaltmalar	Açıklama
7-AAD	7-Aminoaktinomisin-D
A549	Insan akciğer
ABC	ATP-binding cassette
AgNO3	Gümüş nitrat
AgTNT	Gümüş yüklenmiş titanyum nanotüp
AgNP	Gümüş nanopartikül
ATCC	American type culture collection
CRC	Kolorektal kanser
DCFH-DA	2', 7'-diklorofloresin-diasetat
DCFH	Dichlorodihydrofluorescin
DNA	Deoksiribonükleik asit
dH2O	Distile su
DOX	Doksorubisin
EBV	Epstein-Bar virüsü
EDTA	Etilen diamin tetra asetikasit
EtBr	Etidyum bromür
FBS	Fetal bovine serum
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
HBV	Hepatit B virüsü
HCV	Hepatit C virüsü
HT-29	İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı
HPV	İnsan papilloma virüsü
HIV-1	İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1
H. pylori	Helicobacter pylori
H•	Hidrojen radikali
HO2•	Hidroperoksi radikalleri
H2O2	Hidrojen peroksit
IC	İnhibitör konsantrasyonu
Kaspaz	Sistein-aspartik asit proteaz

LMA	Low melting agarose
MCF-7	İnsan meme adenokarsinoma hücre hattı
MDR	Multi drug resistance (Çoklu ilaç direnci)
M.Ö	Milattan önce
NaCl	Sodyum klorür
Nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
OH•	Hidroksil radikali
OTM	Olive tail moment
O2•-	Süperoksit radikali
PBS	Phosphate buffered saline (Tuzlu fosfat tamponu)
RFU	Relative fluorescent units
RNA	Ribonukleik asit
ROS	Reactive oxygen species (Reaktif oksijen türleri)
S. bovis	Streptococcus bovis
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TiO_2	Titanyum dioksit
TNT	Titanyum nanotüp
XRD	X-Işınları difraktometresi
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-Carboxanilide

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Normal hücrelerden metastaza değişen tümör gelişim aşamaları…	6
Şekil 2.2.	Kanser temel özellikleri.....	16
Şekil 2.3.	Sol-gel yöntemiyle titanyum nanotüplerin hazırlanma süreçlerinin görüntüsü	24
Şekil 2.4.	Hidrotermal yöntemiyle titanyum nanotüplerin hazırlanma süreçlerinin görüntüsü	25
Şekil 2.5.	Anodizasyon yöntemiyle titanyum nanotüplerin hazırlanma süreçlerinin görüntüsü	26
Şekil 3.1.	Taramalı elektron mikroskobu (FESEM) görüntüsü	29
Şekil 3.2.	Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü	29
Şekil 3.3.	X- ışını Kırınımı (XRD) görüntüsü	30
Şekil 3.4.	Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) görüntüsü	31
Şekil 3.5.	İnsan kolorektal adenokarsinom HT-29 (ATCC ® HTB-38™) hücre hattının görüntüsü	33
Şekil 3.6.	İnsan akciğer karsinom A549 (ATCC ® CCL-185™) hücre hattının görüntüsü	33
Şekil 3.7.	İnsan meme adenokarsinom MCF-7 (ATCC ® HTB-22™) hücre hattının görüntüsü	34
Şekil 3.8.	XTT test prensip şeması	36
Şekil 3.9.	Alkalin komet deneyi prosedürünün görüntüsü	37
Şekil 4.1.	Boş TiO_2 nanotüplerin ve gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin FESEM görüntüleri	40
Şekil 4.2.	Boş TiO_2 nanotüplerin ve gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin TEM görüntüleri	42
Şekil 4.3.	Boş TiO_2 nanotüplerin ve gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin X- ışını kırınımı görüntüleri…….	43
Şekil 4.4.	Boş TiO_2 nanotüplerin ve gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin FTIR görüntüleri.....	44
Şekil 4.5.	Gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin A549 hücreleri içindeki TEM görüntüleri	45
Şekil 4.6.	Gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin MCF-7 hücreleri içindeki TEM görüntüleri	46
Şekil 4.7.	Gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin HT-29 hücreleri içindeki TEM görüntüleri.	46
Şekil 4.8.	TNT ve AgTNT nanotüplerin 24 saatlik uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının hücre canlılığı	48
Şekil 4.9.	TNT ve AgTNT nanotüplerin 24 saatlik uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının hücre canlılığı	48
Şekil 4.10.	TNT ve AgTNT nanotüplerin 24 saatlik uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının hücre canlılığı.....	49
Şekil 4.11.	TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının komet kuyruk uzunluğu değeri	52
Şekil 4.12.	TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının komet kuyruk uzunluğu değeri	53
Şekil 4.13.	TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının komet kuyruk uzunluğu değeri	54

Şekil 4.14. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının kuyruk % DNA değeri 55
Şekil 4.15. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının kuyruk % DNA değeri 56
Şekil 4.16. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının kuyruk % DNA değeri..... 57
Şekil 4.17. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının OTM değeri 58
Şekil 4.18. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının OTM değeri 59
Şekil 4.19. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının OTM değeri 60
Şekil 4.20. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının ROS seviyeleri belirlenmesi 61
Şekil 4.21. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının ROS seviyeleri belirlenmesi 62
Şekil 4.22. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının ROS seviyeleri belirlenmesi 63
Şekil 4.23. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının ortalama toplam apoptotik hücre sayısı ve Anneksin-V parametreleri gösterilmesi 64
Şekil 4.24. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının ortalama toplam apoptotik hücre sayısı ve Anneksin-V parametreleri gösterilmesi 66
Şekil 4.25. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının ortalama toplam apoptotik hücre sayısı ve Anneksin-V parametreleri gösterilmesi 67
Şekil 4.26. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının ortalama toplam kaspaz miktarı ve Multikaspaz testin parametreleri gösterilmesi 69
Şekil 4.27. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının ortalama toplam kaspaz miktarı ve Multikaspaz testin parametreleri gösterilmesi 71
Şekil 4.28. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının ortalama toplam kaspaz miktarı ve Multikaspaz testin parametreleri gösterilmesi 72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Enfeksiyöz ajanların kanser türü ve karsinogenez mekanizmaları……... 9
Çizelge 3.1. Çalışmada gerçekleştirilen her aşama ve yapıldığı yerler …...……. 27
Çizelge 4.1. Titanyum nanotüplerinin HT-29, A549 ve MCF-7 hücrelerindeki IC değerleri ……..... 49
Çizelge 4.2. HT-29, A549 ve MCF-7 hücre hatlarının nanotüpler muamelesi sonrası Komet parametresinin ortalama değerleri …… 51

1. GİRİŞ

Tıp ve teknolojideki önemli ilerlemelere rağmen, kanseri tamamen ortadan kaldırmaya yönelik etkili stratejilerin mevcut seçenekleri sınırlı kalmaktadır. Metastaz ve kanser tekrarı, sakatlık ve ölüm oranlarına önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Bu hastalıktan en çok etkilenen ülkelerden biri olan ABD'de 2023 yılında toplam 1.958.310 yeni kanser vakası ve 609.820 kanser kaynaklı ölüm olacağı öngörülmüştür. Bu sayı, özellikle akciğer kanseri, kadınlarda ise meme kanseri, erkeklerde prostat kanseri ve kolorektal kanser olmak üzere kadınlarda ve erkeklerde sıklıkla teşhis edilen kanserlerin sayısındaki artışla açıklanmaktadır (Siegel vd., 2023). Küresel Kanser Gözlemevi (GCO) tarafından yapılan projeksiyonlara göre, 2030 yılına kadar yılda yaklaşık 30 milyon bireyin kansere yakalanması beklenmektedir. Kanserden kaynaklanan yüksek ölüm oranı nedeniyle, aileler ve toplum üzerindeki ekonomik yük oldukça fazladır (Shah vd., 2019). Bu nedenle kanserin önlenmesi, taranması, teşhisi ve tedavisine öncelik verilmesi hayati önem taşımaktadır.

Nanomalzemeler 10 nm'den 100 nm'ye kadar bir boyut dağılımı sergileyerek önemli bir yüzey alanına sahip olmakta ve bu da onları biyolojik bağlamlarda kullanım için oldukça uygun hale getirmektedir. Nanomalzemeler insan vücudu içinde yüksek hareket kabiliyeti sergileyerek belirli dokulara etkili bir şekilde nüfuz etmelerini kolaylaştırmaktadır. Nanopartiküller ilaç molekülleriyle birlikte konjugasyonlar oluşturabilmekte ve böylece teşhis için kanser hücreleri gibi etkilenmiş dokuların özel olarak hedeflenmesini kolaylaştırmaktadır (Zhang vd., 2022). Nanomalzemeler, onları nanometre ölçeğindeki tipik makromoleküllerden ayıran farklı optik, manyetik ve elektriksel özelliklere sahip olmaktadır. Nanomalzemeler yüksek yüzey alanı/hacim oranına, artan elektrik iletkenliğine, optik soğurma spektrumlarında değişikliğe ve farklı floresan özelliklerine sahiptir. Biyolojik bariyerlerin üstesinden gelmek için artan geçirgenlik ve gelişmiş biyouyumluluk gibi bazı özellikleri, tıpta kullanım potansiyeline katkıda bulunmaktadır. Nanomalzemelerin benzersiz özellikleri, kanser tedavisinde kullanılabileceklerini düşündürmektedir (Cheng vd., 2021; Saleh, 2016). Yüksek alanı/hacim oranları nedeniyle nanopartiküller terapötik bileşiğe bağlanarak hedefe yönelik tedavide kimyasal ilaç komplekslerinin seçiciliğini artırabilmektedir (Tian vd., 2022). İlaç taşıyıcılar olarak

nanomalzemelerin kullanılmasında, boyutları bir avantaj oluşturmaktadır. Bu nanoboyutlar, endositozdan sonra hücre zarlarına nüfuz etmeye ve lizozomal kaçışa izin verebilmektedir. Boyutların dışında, nanomalzemelerin yüzey kimyasal özellikleri, parçacık alımı, proteinlerin bağlanması ve stabilizasyonu ve dağılımı için çok önemlidir (Jarosz vd., 2017).

Farmasötik mühendisliğin gelişimi için yararlı olmalarına rağmen, nanomateryaller sitotoksik etkileri sebebiyle kullanım alanı olarak sınırlı olabilmektedir. Şimdiye kadar yapılan araştırmalar, hücre ölümüyle sonuçlanan, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna bağlı oksidatif stres indüklenmesi, iltihap, genetik hasar ve hücre bölünmesinin durdurulması gibi olaylar yoluyla nanomateryallerin neden olduğu farklı toksisite sonuçlarını ortaya koymaktadır (Johnston vd., 2010; Ju-Nam ve Lead, 2008). Farklı maruz kalma yolları ile başlıca organlarda nanomateryallerin birikimi ve bunun sonucunda toksisiteye neden olduğu gösterilmiştir (Morimoto vd., 2015; Sotiriou vd., 2012).

Hidrotermal sentez koşullarını ayarlayarak nanotüpler, nanoteller, nano lifler, nanoribondlar ve nanorodlar gibi çeşitli titanyum dioksit TiO_2 nanotüp yapılarının formları üretilebilmektedir (Aydın vd., 2018). Hidrotermal yöntem, TiO_2 nanotüplerin hazırlanmasında en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Bavykin vd., 2006).

Temel olarak titanyum nanoyapılarının ilgi çekici olması TiO_2'in biyouyumluluk özelliliğinin yanı sıra mekanik özelliklerinden de kaynaklanmaktadır (Peng vd., 2009; Y. Zhang vd., 2014a). Nanoyapılı TiO_2'nin biyomedikal kullanımının birçok yararına rağmen, bu nanoyapıların toksisite sorunları birkaç bilimsel çalışmada belirtilmiştir. Nanoyapılı TiO_2'nin antikanser özelliklerini değerlendirmeye yönelik, fotodinamik terapi'de TiO_2 nanoparçacıklarının olası uygulanmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. TiO_2'nin ışık duyarlı nanoparçacıklarının tümör dokusuna uygulanmasından sonra, bu nanomalzemeler, belirli bir dalga boyuna sahip elektromanyetik bir radyasyon kullanılarak uyarılmışlardır. Sonuç olarak, ışıkla uyarılmış metal oksitlerin yüzeyinde, ROS oluşmakta ve bu daha sonra kanser hücrelerine zarar vermektedir (Liang vd., 2021; Mansfield vd., 2015; Sargazi vd., 2022).

Nanoteknolojinin ilerlemesiyle, nanoparçacıkların medikal alanda kullanımı için yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmiştir. Gümüş metali, doğal bir biyosittir (Samberg vd., 2010). Gümüş iyonlarının, hücre ölümüne neden olan ve metabolik işlemlerin bozulmasına yol açan disülfit veya sülfhidril enzim grupları ile etkileşime girdiği de bilinmektedir (Aydın vd., 2018).

Gümüş gibi inorganik metal bazlı nanopartiküller tarafından indüklenen hücresel ve moleküler tepkiler tümör hücrelerinde ayrıntılı olarak araştırılmıştır ve birçok nanopartikül türleri antikanser etkileri, çeşitli araştırma grupları tarafından açıklanmıştır (AshaRani vd., 2009; Cheng vd., 2021; Singh vd., 2009; Uygur vd., 2009).

Kanser tedavisinde hastalar sıklıkla kemoterapötik ajanlara direnç geliştirmektedir. Ek olarak, sistemik uygulamada kullanılan kemoterapötik ajanlar ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Ayrıca, bu terapötik ilaçların çoğu hedefe özgü değildir ve etrafındaki sağlıklı vücut dokularına zarar verme ihtimalleri yüksek olmaktadır.

Nanomateryal kullanımının özellikle biyomedikal alanda giderek yaygınlaşması göz önüne alındığında titanyum dioksit nanotüplerinin hücrede oluşturduğu oksidatif hasara bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğine dair sınırlı çalışma bulunmaktadır.
Bu tezin özel amaçları aşağıdaki hususlardan oluşmaktadır:

- 8-12 nm çapında, 100 nm uzunluğunda boş titanyum dioksit nanotüpleri ve gümüş partikülleriyle yüklenmiş titanyum dioksit nanotüpleri ve sentezlemek ve karakterize etmek. Hücre içi TEM görüntülemeyi kullanarak, sentezlenen ve hücrelere maruz bırakılan nanotüplerin gerçekten hücrelere nüfuz ettiğini ve çekirdeklerine ulaştığını göstermek,
- Titanyum dioksit nanotüplerin sade formda (gümüş partiküllerine bağlanmamış) kolorektal, akciğer ve meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini analiz etmek,
- Gümüş partikülleriyle yüklenmiş titanyum dioksit nanotüplerin kolorektal, akciğer ve meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini analiz etmek ve bu nanotüplerin aynı hücreler üzerindeki etkilerini boş nanotüplerin etkileri ile karşılaştırmak.

- Gümüş partiküllerle yüklenmiş titanyum dioksit nanotüplerin kolorektal, akciğer ve meme kanseri hücre hatları üzerindeki antikanser ajan olup olmadığını değerlendirmek,
- Gümüş ile yüklenmiş titanyum nanotüplerin kolorektal, akciğer ve meme kanser hücrelerinde antikanser ve apoptotik ajan olarak ilk kez denenmesini sağlamak, (aynı nanomateryal daha önce üretilerek sadece antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır)
- Titanyum dioksitin terapötik kanser molekülleri için biyouyumlu bir rezervuar ve taşıyıcı olarak potansiyelini değerlendirmek,
- Elde edilen veriler ile literatürdeki önemli bir boşluğu doldurmak ve yeni araştırmalar için bir temel oluşturmak,
- Bu çalışma ile, genel olarak yeni kanser tedavilerinin geliştirilmesine ve daha spesifik olarak kolorektal, akciğer ve meme kanser tedavisinin geliştirilmesine katkıda bulunulması ve böylece kemoterapinin sınırlarının genişletilmesi doktora tezinin özgün değerini arttırmaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

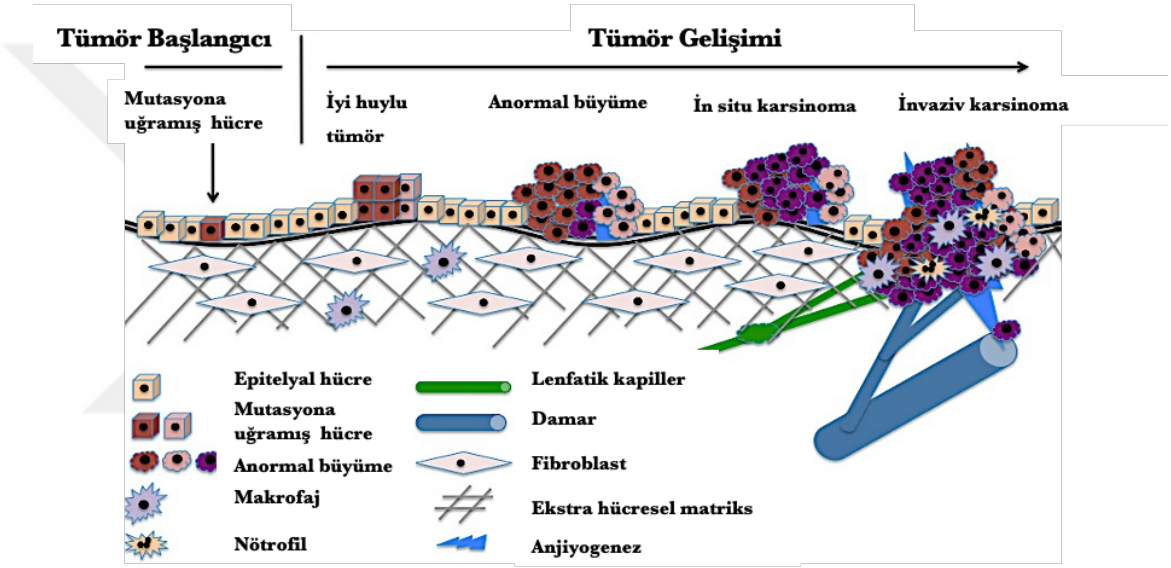
2.1. Kanser tarihçesi

Kanser, kökenleri veya ciltlerinin rengi ne olursa olsun tüm dünyada birkaç bin insanı etkileyen oldukça karmaşık bir hastalıktır. Metastatik kanser ve neoplazma kanıtları sırasıyla Edmontosaurus fosillerinde (Kretase) ve Neandertal kafatasında (M.Ö 35 000), Mısır ve İnka mumyalarında rapor edilmiştir (David ve Zimmerman, 2010). İnsanlarda kanserin en eski tanımı, Georg Ebers papirüsü, Edwin Smith papirüsü (M.Ö 1600 civarı) ve Kahun papirüsü (M.Ö 1825 civarı) dahil olmak üzere M.Ö 3000-1500 yılları arasında yazılmış Mısır papirüslerinde bulunmuştur. Yunanistan'da, tıbbın babası olan Hipokrat de Cos (M.Ö 460-370), Corpus Hippocraticum'da kanseri ayrıntılı olarak tanımlamıştır. Yunanca "carcinos" veya "carcinoma" terimlerini kronik ülserler veya kötü huylu büyüyen şişlikler için, scirrhus terimini ise sert kıvamlı bir kanser türü için kullanmıştır. Yunanca'da karsinos kerevit, kanser, tümör anlamına gelirken, skirros isim olarak katı tümör ve sıfat olarak sert, sertleşmiş anlamına gelmektedir. Romalı bir doktor olan Celsus (M.Ö 28-M.S 50) Yunanca carcinos kelimesini Latince yengeç, kerevit, ahmak ve kanser, çıban anlamına gelen cancer kelimesine çevirmiştir. Bu kelime, yengeç şeklindeki bazı kanserli lezyonlardan esinlenmiştir. Galien (131-201) Yunanca'da kitle anlamına gelen onkos terimini malignant görünen bir kitle ya da tümörü ifade etmek için kullanmıştır (Atıcı, 2007).

2.2. Kanser tanımı

Hücre büyümesi insan vücudunda fizyolojik bir süreçtir. Bir embriyo ve büyüyen bir çocuk olarak, vücudumuzdaki hücreler hızla bölünmektedir. Yaşlandıkça bu süreç yavaşlar ve hücreler genellikle yalnızca hasarlı veya ölü hücrelerin yerine geçmek için bölünmektedir. Normal hücreler sıklıkla sinyallere maruz kalmakta ve kontrol altında tutulmaktadır. Bu sinyaller hücrenin bölünmesi, başka bir hücreye farklılaşması veya ölmesi gerekip gerekmediğine karar vermekte, böylece hücreler uygun olmayan zamanlarda bölünmemektedir. Hasarlı hücreler bu kontrollerden kaçabilmekte, bu da kontrolsüz büyüme ve çoğalmaya sebep olarak tümör oluşumuna yol açabilmektedir. Kanser, insan vücudundaki çoğu dokuyu etkileyebilen bir hastalıktır. Genellikle kontrolsüz hücre büyümesi ve katı bir tümör durumunda çevre dokunun invazyonu ile

tanımlanmaktadır. Ek bir özellik olarak, hepsi olmamak ile birlikte, birçok kanserde tümör hücreleri birincil bölgeden (yani birincil tümörden) uzak bir bölgeye göç edebilmekte ve yerleşebilmektedir. Bu olay metastaz olarak bilinmekte ve ölümcül sorunun çoğundan (yaklaşık %90) sorumludur. Kanserin bu ilk tanımı, kötü huylu tümörler olarak adlandırılan tümörleri kapsamaktadır. Bu tanıma, hematopoetik dokulardan kaynaklanan ve kanda dolaşan tümör hücrelerine yol açan lösemi de dahil edilmektedir. İkinci ve daha geniş bir tanım ise, kontrolsüz hücre büyümesi gösteren ancak invazyon göstermeyen ve çoğu durumda hastanın hayatını tehdit etmeyen iyi huylu tümörleri de içermektedir (Fidler, 1989; Rusciano ve Burger, 1992).



Şekil 2.1. Normal hücrelerden metastaza değişen tümör gelişim aşamaları

Kanser gelişimi, mutasyona uğramış tek bir hücrenin anormal şekilde çoğalmaya başlamasıyla ortaya çıkmaktadır. Popülasyon içinde daha hızlı çoğalan değişime uğramış hücrelerin seçilmesini takip eden ek mutasyonlar ilerlemeye ve ardından çevredeki bağ dokularına yayılmaya yol açmaktadır. Değişmiş hücreler kan ve lenfatik damarlar yoluyla uzak organlara yayılabilmektedir.

2.3. Kanser sınıflandırılması

Kanserler, genellikle oluştukları doku ve hücre tipine göre sınıflandırılmaktadır. Karsinomalar epitelyal hücrelerden kaynaklanan ve insanlarda en sık görülen kanser türleridir. Kanser vakalarının yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Bunun nedeni, yetişkinlerde hücre çoğalmasının çoğunun epitel dokuda meydana gelmesi olabilmektedir (Fidler, 2003). Ayrıca, epitel dokular kanser gelişimini teşvik eden çeşitli fiziksel ve kimyasal hasarlara karşı en hassas dokulardır. Sarkomlar bağ dokusu veya kas hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Bu iki kategoriye girmeyen kanserler arasında beyaz kan hücrelerinden ve bunların öncüsü olan hematopoetik kök hücrelerden türeyen çeşitli lösemiler ve lenfomalar ile sinir sistemi hücrelerinden türeyen kanserler yer almaktadır. Malign tümörlerin isim setine koşut olarak, benign tümörler için de benzer bir isim seti bulunmaktadır. Örneğin bir adenom, glandüler organizasyona sahip benign bir epitelyal tümördür; buna karşılık gelen malign tümör tipi ise adenokarsinoma olarak isimlendirilmektedir. Benzer şekilde, kondrom ve kondrosarkom sırasıyla iyi huylu ve kötü huylu kıkırdak tümörleridir. Kanserlerin çoğu kökenlerini yansıtan özelliklere sahiptir. Örneğin, keratinosit kök hücresinden türeyen bir bazal hücreli karsinoma hücreleri genellikle sitokeratin ara filamentlerini sentezlemeye devam ederken, derideki bir pigment hücresinden türeyen bir melanoma hücreleri genellikle (ancak her zaman değil) pigment tanecikleri üretmeye devam etmektedir. Farklı hücre tiplerinden kaynaklanan kanserler genel olarak çok farklı hastalıklardır. Örneğin derinin bazal hücreli karsinomaları sadece lokal olarak invaziv olup nadiren metastaz yaparken, melanomalar çok daha kötü huylu olabilir ve sıklıkla metastaz oluşturmaktadır. Bazal hücreli karsinomalar cerrahi veya radyoterapi ile kolayca tedavi edilirken, malign melanomalar metastaz yaptıktan sonra genellikle ölümle sonuçlanmaktadır (Fidler, 2003).

2.4. Kanser oluşum nedenleri

2.4.1.Virüsler ve Bakteriler

Hepatit B (HBV) ve hepatit C virüsleri (HCV), Epstein-Barr virüsü (EBV), insan papilloma virüsü (HPV), insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1), Helicobacter pylori (H. pylori) ve Streptococcus bovis (S. bovis) gibi enfeksiyöz ajanlar farklı kanserlerin oluşumuna katkıda bulunmaktadır (de Flora ve la Maestra, 2015; de Martel

vd., 2012). Genel olarak, enfeksiyonlar kanser türlerinin %10'u ile ilişkilendirilmektedir (Alibek vd., 2013; Anand vd., 2008; Burd, 2003).

Enfeksiyöz ajanlar doğrudan veya dolaylı (kronik enflamasyon yoluyla veya immün süpresyon yoluyla etki ederek) kanser oluşumunda rol oynamaktadır. Bu ajanlar, bağışıklık sistemini atlatmak ve böylece kanserojen potansiyellerini tam olarak kullanabilmek için başarılı bir şekilde bazı stratejiler geliştirmiştir. Doğrudan kanserojenler esas olarak hücresel proteinlerle etkileşime giren çeşitli onkojenlerin ekspresyonuyla tanımlanan virüslerdir. Bu virüsler hücre döngüsü kontrol noktalarını bozabilmekte, apoptozu inhibe edebilmekte ve ardından hücre immortalizasyonunu artırabilmektedir (Morales-Sánchez ve Fuentes-Pananá, 2014). HPV, HBV ve EBV gibi ajanlar doğrudan karsinojen olarak tanımlanmıştır. Dolaylı kanserojenler, kronik enflamasyona neden olma özellikleri ile karakterize edilmektedir. Kronik enflamasyon genellikle enfekte hücreler ve/veya enflamatuar hücreler tarafından salgılanan kemokinler, sitokinler, prostaglandinler gibi enflamasyon mediatörlerinin üretimine sebep olmaktadır (Lemon ve McGivern, 2012; Moore ve Chang, 2017). Enflamatuar mediatörlerin salınımları, doğrudan mutajenik etkileri olan reaktif oksijen türlerinin üretimine, bağışıklık sisteminin düzensizleşmesine ve tümör neovaskülarizasyonu ve tümörün sağkalımı için çok önemli olan anjiyogenezin teşvik edilmesine yol açmaktadır. Hepatit virüsleri olan HBV ve HCV, bakteri olan H. pylori ve S. bovis, kronik enflamasyona yol açarak kanser oluşumuna neden oldukları gösterilmiş enfeksiyöz ajanlardır (International Agency for Research on Cancer, 2012). İkinci dolaylı mekanizma ise bağışıklık sisteminin baskılanması yoluyla gerçekleşmektedir. Bu mekanizma HIV-1 enfeksiyonu ile bağlantılı olarak gösterilmiştir. HIV-1 enfeksiyonuna dayalı bağışıklık sisteminin baskılanması, normalde vücudun belirli kanserlerden korunmasına yardımcı olan bağışıklık sistemini zayıflatabilmektedir (Engels vd., 2008a).

Çizelge 2.1. Enfeksiyöz ajanların kanser türü ve karsinogenez mekanizmaları

Ajanlar	Kanser türü	Karsinogenez mekanizmaları
HBV	Hepatoselüler karsinom HCC	Kronik inflamasyon ve doğrudan karsinojen (El-Serag, 2012; Levrero ve Zucman-Rossi, 2016)
HCV	Hepatoselüler karsinom HCC	Kronik inflamasyon (Poortahmasebi vd., 2016)
EBV	Burkitt lenfoması, Nazofarenks kanseri, Hodgkin lenfoma	Doğrudan karsinojen (Brady vd., 2008; Pattle ve Farrell, 2006)
HPV	Serviks karsinomu, Anal karsinoma Ağız kanseri	Doğrudan karsinojen (Münger vd., 2004)
HIV	Kaposi sarkoması, non-Hodgkin lenfoma, Serviks karsinomu	Bağışıklık sisteminin baskılanması (Engels vd., 2008b)
H. pylori	Adenokarsinoma and lenfoma	Kronik inflamasyon (Ishaq ve Nunn, 2015; Tokudome vd., 2006)
S. bovis	Kolorectal kanser	Kronik inflamasyon (Kovalchuk vd., 2014)

2.4.2. Kimyasal kanserojen maddeler

Kanserojen, uygun koşullar sağlandığında, bir veya birkaç organ veya dokuya etki ederek insan ve hayvanlarda kanser gelişim sürecini başlatabilen bir bileşiktir (Huff, 1999). Deneysel bir bakış açısıyla, bir kimyasal bileşiğin, laboratuvar hayvanlarına uygulanması, bileşiğe maruz kalmayan kontrol grubundaki hayvanlarla karşılaştırıldığında, bir veya daha fazla histolojik neoplazi türünün görülme sıklığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğunda kanserojen olarak kabul edilmektedir (Butterworth ve Bogdanffy, 1999). İnsanlar gıda, hava, su, işyerleri vb. gibi ortamlarda bulunduklarında kimyasal kanserojenlere maruz kalabilmektedir. Kimyasal kanserojenler, sentezlenen veya endüstriyel, tarımsal veya ticari amaçlarla kullanılan doğal kimyasallar, sentetik bileşikler veya her ikisinin karışımları olarak sınıflandırılabilmektedir (Irigaray ve Belpomme, 2010). Kansere neden olduğu kanıtlanmış yüzlerce kimyasal bileşik bulunmaktadır. Birçok araştırmacı, kimyasal kanserojen maddeleri başlatıcılar, destekleyiciler ve ilerleticiler olarak sınıflandırmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2000; Klaunig vd., 2011).

Tümör başlatıcılar, bölünen bir hücrede birçok mekanizma kullanarak DNA'da ilk mutasyonu indükleyebilen kanserojen bileşiklerdir, böylece mutasyona uğramış hücrelerin ilk klonu ortaya çıkabilmektedir (Irigaray ve Belpomme, 2010) . Başlatıcılar DNA'ya duyarlı kimyasallardır. DNA zincirinde kesintiler, DNA onarımında hatalar veya bir baz onarımının ortadan kaldırılması gibi DNA üzerinde değişikliklere neden olabilmektedir. Kanserojen başlatıcılara örnek olarak alkilleyici ajanlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, metaller (kadmiyum, krom ve nikel), aflatoksinler ve nitrozaminler verilebilmektedir. Destekleyici olarak sınıflandırılan kimyasal kanserojenler, başlatıcılardan sonra defalarca uygulandığında dönüşüm sürecini hızlandırmakta veya desteklemektedir. Destekleyicinin etkili olabilmesi için haftalar, aylar ve yıllar boyunca bulunması gerekmekte ve etkisi hedef dokudaki konsantrasyonuna dayanmaktadır (Butterworth vd., 1992). Bazı destekleyici ajanlar belirli bir dokuya özgü olmakla birlikte, diğerleri aynı anda birkaç doku üzerinde etkili olabilmekte ve DNA ile doğrudan etkileşime girmemektedir (Yuspa vd., 1983; Yuspa ve Poirier, 1988). Hücre yüzeyinin çeşitli büyüme faktörlerine duyarlılığının değişmesi, hücre yüzeyindeki glikoproteinlerin ve glikolipidlerin değişmesi, hücre morfolojisinin değişmesi, fosfolipid ve glikoz metabolizmasının artması, DNA sentezinin ve hücre çoğalmasının uyarılması, serbest oksijen radikallerinin üretiminin artması, gen amplifikasyonu yoluyla bir hücre döngüsü içinde orantısız DNA replikasyonunun indüklenmesi ve apoptozun önlenmesi gibi hücrelerde bazı değişikliklere neden olabilmektedir (Irigaray ve Belpomme, 2010; Klaunig vd., 2011) . Destekleyici olarak sınıflandırılan kimyasal kanserojenlere örnek olarak dietilstilbesterol, siklamatlar, phorbol 12-myristate 13-acetate ve sakarin verilmektedir.

Kimyasal kanserojenler de ilerleticiler olarak sınıflandırılabilmektedir. Bu ajanlar mutasyona uğramış hücreleri ilerleme aşamasına geçiren kimyasal bileşiklerdir, yani premalign mutasyona uğramış hücrelerin geri dönüşümsüz olarak tamamen malign hücrelerin fenotipini elde etmelerini sağlarlamaktadır. İlerletici ajanlar arasında alkilleyici ajanlar, arsenik tuzları, asbest ve benzen bulunmaktadır (Butterworth ve Bogdanffy, 1999; Hanahan ve Weinberg, 2000).

Kimyasal kanserojenler ayrıca etki mekanizmalarının işlevine göre ve DNA ile olan ilişkilerine göre genotoksik ve genotoksik olmayan olarak sınıflandırılabilmektedir (Butterworth vd., 1992; Samuel M. Cohen ve Leon B. Ellwein, 1991; Williams, 2001). Genotoksik kanserojenler, DNA eklentileri ve ardından mutasyonlar, kromozomal aberasyonlar ve veya kromozom sayısında değişiklikler oluşturmak için DNA ile doğrudan reaksiyona girme veya etkileşime girme kapasitesine sahip olan kimyasallardır veya metabolitleridir (Butterworth, 2006; Pogribny ve Beland, 2013). DNA eklentileri makromoleküllerle kurulan kovalent bağlardan oluşmaktadır ve DNA replikasyonundan önce ortadan kaldırılmazsa bu eklentiler mutasyonlara yol açabilmektedir (Spencer vd., 2009). Bu tür mutasyonlar onkogenlerde veya hücre çoğalmasını kontrol eden tümör baskılayıcı genlerde meydana gelirse, kanser oluşumuna sebep olabilmektedir.

Genotoksik olmayan karsinojenlerin promotör olarak etki gösterdikleri ve metabolik aktivasyon gerektirmedikleri gösterilmiştir. Adlarından da anlaşıldığı gibi, DNA ile doğrudan reaksiyona girmez ve eklentiler oluşturmazlar. Genotoksik olmayan karsinojenler, reseptör aracılı endokrin modülasyonu, reseptör aracılı olmayan endokrin modülasyonu, tümör geliştirme, dokuya özgü toksisite ve iltihaplı yanıtların indüksiyonu dahil olmak üzere çok çeşitli kanser indükleme mekanizmalarına sahiptir (Hernández vd., 2009).

2.4.3. Yaşam tarzı etmenleri

Birçok bilimsel çalışma, genlerin yanı sıra diyet ve fiziksel aktiviteyi kapsayan yaşam tarzının da kanser oluşumunda önemli olduğunu göstermiştir. 1981 yılında Doll ve Peto, tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %35'inin beslenme alışkanlıklarından kaynaklandığını belirtmiştir (Doll ve Peto, 1981).

Dünya Kanser Araştırma Fonu (WCRF) ve Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü (AICR) işbirliğiyle gerçekleştirilen bir çalışmanın raporuna göre, yüksek gelirli ülkelerde tüm kanserlerin yaklaşık dörtte biri ila üçte biri, düşük gelirli ülkelerde ise yaklaşık beşte biri ila dörtte biri sağlıklı beslenerek, fiziksel olarak aktif olarak ve sağlıklı kiloyu koruyarak önlenebilmektedir (Clinton vd., 2020).

2.4.4.Vücut yağlanması

Vücut yağlanması birçok kanser türünün riskini güçlü ve tutarlı bir şekilde artırmakta ve kanser için en önemli risk faktörlerinden biridir. Meme (menopozdan sonra), kolorektum, pankreas, özofagus, endometrium ve böbrek kanserine neden olduğuna dair kanıtlar oldukça kuvvetlidir (World Cancer Research Fund vd., 2018; World Cancer Research Fund. ve American Institute for Cancer Research., 2007). Kanser gelişiminde yalnızca yağ dokusunun miktarı değil, aynı zamanda yağ dokusunun vücut içindeki yeri de önemlidir. Karınsal bölgedeki yağlanma, kolorektal kanser riskinin artmasıyla oldukça bağlantılıdır ve büyük olasılıkla meme kanseri (menopozdan sonra), pankreas kanseri ve endometriyal kansere de neden olabilmektedir (World Cancer Research Fund, 2011; World Cancer Research Fund. ve American Institute for Cancer Research., 2007). Bu bağlantıların ardındaki mekanizmanın, kanser oluşumunda rol oynayan cinsiyet hormonları, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü gibi hormonların ve büyüme faktörlerinin dolaşımdaki konsantrasyonlarının artması ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Calle ve Kaaks, 2004; Pischon vd., 2008). Ayrıca, vücuttaki yağlanma, kanser gelişimini hızlandırabilen proinflamatuar faktörlerin yüksek seviyeleri ile nitelendirilmektedir (Calle ve Kaaks, 2004; Pischon vd., 2008).

2.4.5. Fiziksel aktivite

Fiziksel aktivite kolon kanseri riskini önemli ölçüde azaltmakta ayrıca menopoz sonrası meme kanseri ve endometriyal kansere karşı da koruma sağlamaktadır. Fiziksel aktivitenin içsel steroid hormon metabolizması ve bağışıklık fonksiyonu üzerinde olumlu etkisi bulunmaktadır. Kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %3-12'sinin fiziksel olarak aktif olmakla önlenebileceği düşünülmektedir (Kushi vd., 2012; World Cancer Research Fund ve American Institute for Cancer Research., 2007).

2.4.6. Beslenme tarzı

Hayvansal gıdalar genellikle et, kümes hayvanları, balık, yumurta, süt ve diğer süt ürünlerini içermektedir. Sığır eti, domuz eti, kuzu eti ve keçi etini içeren kırmızı etin yanı sıra işlenmiş et, yani tütsülenerek, kürlenerek, tuzlanarak veya kimyasal koruyucular eklenerek muhafaza edilen etler (örneğin jambon, pastırma, pastırma, salam ve sosis),

kolon ve rektum kanseri riski artırmaktadır (World Cancer Research Fund, 2011). Kolorektal kanser oluşumunda rol oynayan faktörler, heterosiklik aminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi spesifik mutajenlerdir; bunlar etin çok yüksek sıcaklıkta veya doğrudan alev üzerinde çok fazla pişirilmesiyle oluşmaktadır. Kırmızı ette bulunan ve kanser oluşturma sürecine dahil olabilecek spesifik bir bileşen de heme demiridir. Bu bileşen iki farklı yol üzerinden etki gösterebilmekte: (1) gastrointestinal sistemdeki yağın peroksidasyonunu katalize ederek sitotoksik ve mutajenik alkenallerin oluşmasına neden olmaktadır; (2) Gastrointestinal sistemde kanserojen olan N-nitroso-bileşiklerinin üretimine neden olmaktadır. Bu söz konusu olan N-nitroso-bileşikleri, nitratlar ve nitritler işlenmiş etlere kürleme işlemi sırasında koruyucu olarak eklendiğinde de oluşabilmektedir (World Cancer Research Fund, 2011).

Süt tüketimi muhtemelen kolon ve rektum kanserine karşı koruma sağlayabilmesine rağmen, yapılan çalışmalar süt tüketiminin kanser gelişimindeki olumsuz etkilerini göstermiştir (World Cancer Research Fund. ve American Institute for Cancer Research., 2007). Yüksek kalsiyum içeren beslenmeler muhtemelen prostat kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir. Prostat kanser oluşumunda kalsiyum mekanizmasının D vitaminini içerdiği öne sürülmektedir. Yüksek kalsiyum alımı 1,25 dihidroksivitamin D oluşumunu down-regüle ederek, prostatta hücre proliferasyonunun artmasına sebep olabilmektedir (World Cancer Research Fund ve American Institute for Cancer Research., 2007).

2.4.7. Alkol tüketimi

Alkollü içecekler çeşitli kanser türlerine neden olmaktadır. Alkollü içeceklerin yüksek tüketimi, ağız, yutak, gırtlak, yemek borusu ve meme kanseri (menopoz öncesi ve sonrası) ile belirgin bir şekilde bağlantılıdır. Aynı zamanda erkeklerde kolorektal kansere neden olduğu, kadınlarda ise muhtemelen kolorektal kansere ve karaciğer kanserine neden olduğu düşünülmektedir (World Cancer Research Fund ve American Institute for Cancer Research., 2007). Etanolün birincil metaboliti olan asetaldehit ve diğer reaktif metabolitler kanserojen olabilmektdir. Ayrıca alkol, prostaglandin üretimini, lipid peroksidasyonunu ve serbest radikal oksijen türlerinin oluşumunu tetikleyebilmektedir (Kushi vd., 2012; World Cancer Research Fund ve American Institute for Cancer Research., 2007).

2.4.8. Gıdaların muhafazası, işlenmesi ve hazırlanması

Bazı gıdaların korunması, işlenmesi ve hazırlanması yöntemleri kanser riskini etkileyebilmektedir. İşlenmiş et, tuz ve tuzla korunmuş gıdalar, tahıllar ve bakliyatlar gibi aflatoksinlerle kontamine olmuş gıdalar kanser oluşumunda rol oynadıklarını kanıtlayan bulgular mevcuttur (World Cancer Research Fund ve American Institute for Cancer Research., 2007). Mide kanseri muhtemelen tek başına ve konserve yiyeceklerle birlikte tuz miktarından kaynaklanmaktadır. Aflatoksinler, yukarıda bahsedilen gıdalar sıcakta çok uzun süre saklandığında bazı küfler tarafından üretilmekte ve aflatoksin bulaşmış bu gıdalar karaciğer kanserine neden olmaktadır (World Cancer Research Fund ve American Institute for Cancer Research., 2007).

2.4.9. Sigara içme

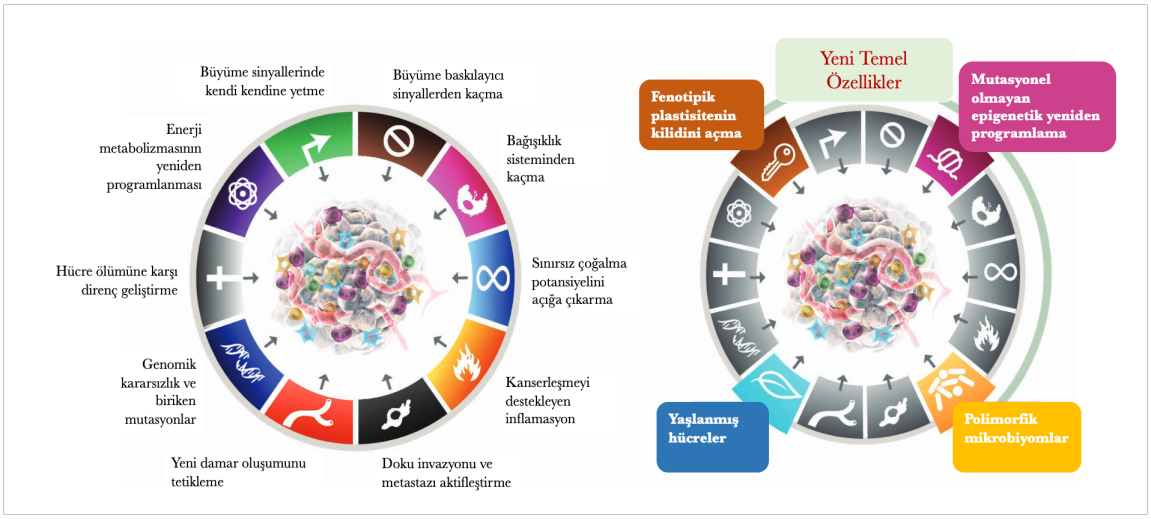
Tütün kullanımının sağlık üzerindeki etkisi şaşırtıcıdır. Dünya çapında, düzenli olarak sigara içen yaklaşık 750.000 kişi de dahil olmak üzere, bir milyardan fazla tütün ürünleri tüketicisi bulunmaktadır (Giovino vd., 2012). Bunun sonucunda ortaya çıkan erken ölüm oranı (2011 yılında yaklaşık 6 milyon ölüm), sigarayı dünya çapında önlenebilir erken ölümlerin en önemli nedeni haline getirmektedir. Bu altı milyon ölümün %33'ü kanserden kaynaklanmaktadır (Mathers ve Loncar, 2006).

Tütün dumanı, bronşiyollere ve alveollere ulaşabilecek kadar küçük partiküllerin ve gazların zengin bir karışımıdır. Taze tütün dumanının, benzo(a)piren, tütüne özgü nitrozaminler, benzen, polonyum ve toksinler gibi çok sayıda bilinen kanserojen dahil olmak üzere yaklaşık 7000 farklı kimyasal içerdiği rapor edilmiştir (United States. Public Health Service. Office of the Surgeon General., 2010). Bu bileşenler doğrudan ve dolaylı olarak karsinojeneze katkıda bulunmaktadır. Tütün dumanı yüksek oksidatif potansiyele sahiptir ve akciğerde sistemik olarak iltihaplanmaya neden olmaktadır. Tütün dumanın bileşenleri akciğerlerden dolaşıma geçmekte ve tüm vücuda ulaşmakta, böylece sadece absorpsiyon bölgesinde değil, vücudun çoğu organında karsinojenlerin dokularda birikmesine yol açmaktadır. Karaciğer, kanserojen metabolizmasının ve aktivasyonunun gerçekleştiği bir bölgedir ve böbrekler ve mesane karsinojenlerin atılımında rol oynamaktadır. Sigaranın kansere neden olduğu düşünülen hem spesifik hem de spesifik

olmayan yollar vardır. Bağımlılığın bir sonucu olarak tütün dumanındaki kanserojen maddelerle sürekli temas ve yaşamları boyunca her gün sigara içen kişilerde çok yüksek kanser riskine yol açmaktadır. Bununla birlikte, pasif sigara içenlerin sürekli ancak daha düşük seviyelerde maruz kalmaları da kansere neden olabilmektedir. Tütüne özgü karsinojenler DNA eklentileri oluşturmakta ve onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlara yol açmaktadır. Sigara içmenin, özellikle akciğer ve diğer organlarda benzo(a)piren ve tütüne özgü nitrozaminler gibi sigara dumanında bulunan karsinojenlerin DNA eklentilerinin sıklığını artırdığı ve TP53 ve KRAS dahil olmak üzere onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde DNA hasarına ve mutasyonlara neden olduğu bulunmuştur (United States. Public Health Service. Office of the Surgeon General., 2010).

2.5. Kanserin temel özellikleri

Kanser özellikleri, insan hücreleri tarafından normal durumdan neoplastik büyüme durumuna kadar kazanılan bir dizi işlevsel yetenek olarak tanımlanmaktadır. Daha spesifik olarak, insan hücrelerinin kötü huylu tümörler oluşturma kabiliyeti için çok önemli olan yetenekler olarak tanımlanmaktadır. Hanahan ve Weinberg ilk olarak, çoğalma sinyalini sürdürme, büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçınma, programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçınma, çoğalma ölümsüzlüğünü sağlama, yeni damar oluşumu tetikleme, invazyon ve metastazı aktive etme gibi edinilmiş yetenekleri içeren altı özellik önermiştir(Hanahan ve Weinberg, 2000). Daha sonra, kapsamlı çalışmalar sayesinde özellikleri yeniden gözden geçirilmiştir ve tümör mikroçevresinin çok karmaşık ve heterotipik olduğu anlaşılmıştır. Güncel yayınlar temelinde bugün, ilk önerilere ilave sekiz özellik olmak üzere toplam on dört özellik bulunmaktadır (Hanahan, 2022). Kanser hücrelerine ait ortaya çıkan yeni özellikler; bağışıklık sisteminden kaçınma, tümörü teşvik eden iltihaplanma, genom dengesizliği ve mutasyonu, hücresel metabolizmayı yeniden işleme, fenotipik plastisitenin kilidini açma, polimorfik mikrobiyomlar, mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama ve yaşlanmış hücrelerdir (Şekil 2.2.2). Her bir kapasite, tümörlerin ve onları oluşturan hücrelerin gelişimini, ilerlemesini ve dayanıklılığını desteklemede farklı bir rol oynamaktadır. Son dört özellik ayrıntılı olarak açıklanacaktır.



Şekil 2.2. Kanser temel özellikleri (Hanahan, 2022'den değiştirilerek alınmıştır)

2.5.1. Fenotipik plastisite ve bozulmuş farklılaşma

Organogenez sürecinde, homeostatik işlevleri yerine getirmek üzere hücrelerin gelişimi, belirlenmesi ve dokular halinde organize edilmesine terminal farklılaşma ile eşlik etmekte ve bu süreçlerin sonunda progenitör hücrelerin büyümesi bazen geri dönülemez bir şekilde durmaktadır. Bu nedenle, hücresel farklılaşmanın nihai sonucu çoğu durumda antiproliferatiftir ve devam eden proliferasyona karşı açık bir sınır oluşturmaktadır. Terminal farklılaşma durumundan kaçmak veya kurtulmak için normalde kısıtlı olan fenotipik plastisite yeteneğinin ortaya çıkarılmasının kanser patogenezinin kritik bir bileşeni olduğuna dair kanıtlar giderek artmaktadır (Yuan vd.,2019). Söz konusu plastisite çeşitli şekillerde ortaya çıkabilmektedir. Tamamen farklılaşmış bir duruma yaklaşan normal bir hücreden kaynaklanan yeni kanser hücreleri, kök hücre durumuna geri farklılaşabilmektedir. Diğer taraftan, farklılaşmanın son aşamasındaki bir kök hücreden kaynaklanan neoplastik hücreler farklılaşma sürecini durdurarak büyüyen kanser hücrelerini kısmen farklılaşmış, kök hücre benzeri bir durumda tutabilmektedir. Buna ek olarak, başlangıçta bir farklılaşma yoluna girmiş olan hücrelerin tamamen farklı bir gelişimsel programına geçtiği ve böylece normal köken hücreleri tarafından önceden belirlenmemiş olan dokuya özgü özellikler kazandığı transdiferansiyasyon da söz konusu olabilmektedir.

2.5.2. Mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama

Theodor Boveri, 90 yıldan daha uzun bir süre önce tanımladığı tümör hücrelerindeki anormal kromatin yapılarını gözlemleyerek epigenetiğin kanserdeki rolünün ortaya çıkarmıştır (Boveri, 2008). Epigenetik, gen diziliminde değişiklik olmadan gen ifadesinde kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır, yani genotipi değiştirmeden fenotipi değiştirmektedir (Holliday, 1987).

Genom kararsızlığı ve mutasyon özelliği, kanser oluşumu ve patogenezinde temel bir bileşendir. Kromatin yapısını düzenleyen, modüle eden ve koruyan ve böylece gen ifadesini düzenleyen genlerdeki mutasyonların giderek daha fazla tespit edildiği ve işlevsel olarak kanser özellikleriyle ilişkilendirildiği iyi bilinmektedir (Baylin ve Jones, 2016; Flavahan vd., 2017; Jones vd., 2016). Buna ek olarak, gen ifadesinde yalnızca epigenetik olarak düzenlenen değişiklikleri içeren ve "mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama" olarak adlandırılabilecek bir başka bağımsız genom yeniden programlama modu daha bulunmaktadır. Aslında, mutasyon içermeyen kanser evrimi ve ayırt edici kanser fenotiplerinin tamamen epigenetik programlanması önerisi neredeyse on yıl önce ortaya konulmuş ve giderek daha fazla tartışılmaktdir (Baylin ve Jones, 2016; Darwiche, 2020; Feng vd., 2021; S. Huang, 2012; Nam vd., 2021). Gen ifadesinin mutasyonel olmayan epigenetik düzenlenmesi kavramı, embriyonik gelişim, farklılaşma ve organogeneze aracılık eden merkezi mekanizma olarak oldukça iyi bilinmektedir (Bitman-Lotan ve Orian, 2021; Goldberg vd., 2007; Zeng ve Chen, 2019). Örneğin yetişkinlerde uzun süreli bellek, gen ve histon modifikasyonları, kromatin yapısı ve zaman içinde dengede tutulan gen ekspresyon anahtarlarının tetiklenmesindeki değişiklikleri kapsamaktadır (Hegde ve Smith, 2019; S. Kim ve Kaang, 2017). Artan kanıtlar, benzer epigenetik değişikliklerin tümör gelişimi ve malign ilerlemesi sırasında belirleyici özelliklerin kazanılmasına katkıda bulunabileceği önermesini desteklemektedir.

2.5.3. Polimorfik mikrobiyomlar

İnsan vücudunun diğer mikroorganizmalar için bir taşıyıcı olduğu kavramı iyi bir şekilde yerleşmiştir. İnsan mikrobiyomu, insan genomunun kendisinden daha büyük bir

karmaşıklığa sahip bakteri (ve virüsler ve mantarlar) topluluğundan oluşmaktadır. Vücudumuzdaki mikrobiyal metagenom, genomumuzdan en az 100 kat daha fazladır (The Human Microbiome Project Consortium, 2012). Yeni nesil dizileme ve biyoinformatik teknolojilerin kullanıldığı çeşitli analizler, yerleşik bakteriler ve mantarlar tarafından oluşturulan ekosistemlerin (mikrobiyomlar) sağlık ve hastalık üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Kanser için, bir popülasyondaki bireyler arasında mikrobiyomlardaki polimorfik değişkenliğin kanser fenotipleri üzerinde derin bir etkiye sahip olabileceğine dair kanıtlar giderek daha belirgin hale gelmektedir (Dzutsev vd., 2017; Helmink vd., 2019). İnsanlarda yapılan çalışmalar ve fare kanser modellerinde yapılan deneysel çalışmalar, kanser gelişimi, kötü huylu ilerleme ve tedaviye yanıt üzerinde koruyucu veya zararlı etkilere sahip olabilen, başta bakteriler olmak üzere belirli mikroorganizmaları ortaya çıkarmıştır. Bağırsak mikrobiyomunun, metabolik homeostazın gereği olan besinlerin parçalanması ve vücuda alınmasında kolon işlevi açısından temel öneme sahip olduğu ve kolondaki mikrobiyal popülasyonlarda meydana gelen bozulmaların bir dizi fizyolojik rahatsızlığa neden olabileceği kabul edilmiştir (Thomas vd., 2017). Bunlar arasında, kolon kanserine yakalanma olasılığının, gelişiminin ve patogenezinin bağırsak mikrobiyomundan etkilendiği düşüncesi yer almaktadır. Son yıllarda, kolon tümörü taşıyan hastalardan ve farelerden kolon kanseri geliştirmeye yatkın olan taşıyıcı farelere dışkı naklini içeren ikna edici işlevsel çalışmalar bir ilke oluşturmuştur: kolon tümörlerinin insidansını ve patogenezini modüle edebilen belirli bakteri türlerini içeren hem kanserden koruyucu hem de tümörü destekleyen mikrobiyomlar bulunmaktadır (Sears ve Garrett, 2014).

2.5.4. Hücresel yaşlanma

Hücresel yaşlanma, tipik olarak geri dönüşü olmayan bir proliferatif duraklama şeklidir ve muhtemelen doku homeostazını korumak için koruyucu bir mekanizma olarak evrimleşmiştir. Programlı hücre ölümünü tamamlayıcı bir mekanizma olarak bilinmekte olup, hastalıklı, işlevsiz veya başka bir şekilde gereksiz hücreleri etkisiz hale getirmeye ve zamanı geldiğinde ortadan kaldırmaya işlev görmektedir. Hücre bölünme döngüsünü durdurmanın yanı sıra, yaşlanma süreci hücre morfolojisi ve metabolizmasında değişikliklere ve en önemlisi kemokinler, sitokinler ve proteazlar da dahil olmak üzere çok sayıda biyoaktif proteinin salınmasına neden olmaktadır (Birch ve Gil, 2020; Faget

vd., 2019; Gorgoulis vd., 2019). Yaşlanma, hücrelerde besin yoksunluğu ve DNA hasarı gibi mikroçevresel streslerin yanı sıra organellere ve hücresel ağına verilen hasar ve hücresel sinyal ağlarındaki dengesizlikler de dahil olmak üzere çeşitli koşullar tarafından indüklenebilmektedir (Birch ve Gil, 2020; Gorgoulis vd., 2019). Hücresel yaşlanma uzun zamandır neoplaziye karşı koruyucu bir mekanizma olarak görülmekte ve kanserli hücrelerin yaşlanmaya maruz kalmasına neden olmaktadır (S. Lee ve Schmitt, 2019). Senesans genellikle malignite, özellikle de anormal hiperproliferasyondan kaynaklanan DNA hasarı ile ilişkilendirilmekte ve hiperaktif sinyalizasyona bağlı onkogenler ile kemoterapi ve radyoterapinin neden olduğu hücresel ve genomik hasar tarafından indüklenebilmektedir. Malign ilerlemeyi sınırlamada senesensin koruyucu yararlarına dair iyi bilinen örnekler bulunmaktadır (He ve Sharpless, 2017; Kowald vd., 2020). Bununla birlikte, ortaya çıkan kanıtlar bunun tam tersini göstermektedir: belirli koşullarda, yaşlanan hücreler tümör gelişimini ve malign ilerlemesini çeşitli şekillerde uyarmaktadır (Kowald vd., 2020; B. Wang vd., 2020).

Yaşlanan hücrelerin tümör fenotiplerini desteklediği başlıca mekanizmanın SASP (Senescence-Associated Subtilisin Protease- Senesans İlişkili Subtilisin Proteaz) olduğu düşünülmektedir; SASP, parakrin yoluyla yakınlardaki canlı kanser hücrelerine ve tümör mikroçevresindeki diğer hücrelere, belirgin özellikleri aktarmak üzere sinyal molekülleri iletebilmektedir. Bu nedenle, farklı deneysel sistemlerde, yaşlanan kanser hücrelerinin çeşitli şekillerde çoğalma sinyaline katkıda bulunduğu, apoptozu önlediği, anjiyogenezi indüklediği, invazyon ve metastazı uyardığı ve tümör bağışıklığını baskıladığı gösterilmiştir (Faget vd., 2019; He ve Sharpless, 2017; S. Lee ve Schmitt, 2019; B. Wang vd., 2020).

2.6. Nanoteknoloji

2.6.1. Nanoteknoloji tanımı

Nanoteknoloji, fizik, kimya, malzeme bilimi ve mühendislik gibi çeşitli disiplinleri bir araya getiren ve çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip nanoölçekli yapıların (genellikle 100 nm veya daha az) inşasıyla ilgilenen, gelişmekte olan disiplinler arasında bulunan bir alandır (Jain, 2005). Nanobilim ve nanoteknoloji yeni araştırma alanları

olmasına rağmen, nanomalzemelerin insanoğlu tarafından kullanımı antik çağlardan beri bilinmektedir. "Makarad-hwaja" ve "Jin Tu" olarak adlandırılan kırmızı kolloidal altın tentürleri uzun ömürlü ilaçlar olarak sırasıyla Hindistan ve Çin'de eski zamanlardan beri kullanılmıştır (Hayat, 1989; Mahdihassan, 1985).

2004 yılında Avrupa Bilim Vakfı, ilaç taşıyıcı sistemler araştırmalarında yeni bir alanı temsil eden nanotıp kavramını ortaya koymuştur (Reis vd., 2007). Farklı moleküler ağırlıktaki ilaçların ve diğer biyoaktif moleküllerin bölgeye özgü, zaman kontrollü dağıtımını sağladıkları için nanobilim ve nanoteknolojinin ilaç dağıtımındaki potansiyellerine büyük bir ilgi gösterilmektedir. Noninvaziv bir sistem olan ilaç taşıyıcı kavramı, son zamanlarda tıbbi enfeksiyonların ve hastalıkların tedavisi için oldukça rekabetçi ve hızlı gelişen bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda, nanopartiküller, dendrimerler, karbon nanotüpler, kuantum noktaları ve benzerleri gibi nanomedikal ilaç dağıtım sistemlerinin, kronik hastalıkların artan yükünü ele almak üzere çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmek için büyük bir potansiyele sahip olduğuna inanılmaktadır (Zülfü, 2017). Bu nanomalzemeler, beyin dokuları, kanser hücreleri ve diğer enfekte dokular gibi erişilemeyen alanlara ulaşabilen nanotaşıyıcılar aracılığıyla büyük miktarda ilacı iletmek için daha iyi verimlilik sağlayacak şekilde modifiye edilebilmektedir (Cheng vd., 2021).

2.6.2. Nanomalzemelerin ilaç dağıtımına yönelik kullanımları

İlaç dağıtımı, istenen terapötik etkiyi elde etmek için terapötik bileşiklerin vücuda girmesini ve taşınmasını sağlayan yaklaşımlara, formülasyonlara, teknolojilere ve sistemlere değinmektedir (Jain, 2020) . Geleneksel uygulamada, ilaçlar çoğunlukla oral, parenteral (enjeksiyon), transmukozal ve inhalasyon yollarıyla verilmekte olup, ilaçlar tedavinin gerekli olduğu spesifik bölgeye değil tüm vücuda dağıtılmaktadır (Jain, 2020). Bu geleneksel ilaç uygulama yolları, zayıf biyodağılım, seçicilik eksikliği, yan etkiler, toksisite, ilaç çözünürlüğü ve elverişsiz farmakokinetik gibi birçok sorun ve kısıtlama sunmaktadır (Mainardes ve Silva, 2004) .

Ayrıca, proteinler, nükleik asitler, enzimler ve genler gibi biyoaktif terapötikler enzimler tarafından parçalanma eğilimi göstermekte veya etkilenen dokulara veya hücrelere

ulaşmadan önce retiküloendotelyal sistem tarafından atılmaktadır (Drews, 2000). Dahası, bu tedaviler, ilaç moleküllerinin yalnızca küçük bir yüzdesi tedavinin gerekli olduğu ilgili bölgeye iletildiğinden, terapötiklerin düşük etkinliği ile sınırlıdır. Bu nedenle, en uygun lokal konsantrasyona ulaşabilmek için daha yüksek ilaç dozajları gerekmektedir ki bu da antikanser ilaçlar gibi bazı toksik ilaçlar söz konusu olduğunda ciddi yan etkilere yol açabilmektedir (Drews, 2000). Ayrıca, günümüzde keşfedilen ilaçların büyük bir kısmı su geçirmez ve çözünmezdir. Böylece farmakolojik etkinlikleri azaltılmış olmaktadır (Fahr ve Liu, 2007). Sonuç olarak, geleneksel yöntemlerin kısıtlamalarını ve dezavantajlarını gidermek için yenilikçi ilaç dağıtım yaklaşımlarına gereksinim duyulmaktadır (Hoffman, 2008; Kayser vd., 2005). Alternatif ilaç uygulama yolları, hastalar için en aza indirilmiş risk ve yan etkilerle birlikte yüksek etkinlik, verimlilik ve seçicilik sağlamalıdır. Nanobilim ve nanomühendislik alanındaki ilerlemeler ve özellikle nanoteknolojinin tıbba uygulanması, ilaç dağıtım uygulamaları için nanopartiküller, lipozomlar, polimer miseller, dendrimerler, nano-jeller, karbon nanotüpler, fullerenler, grafen, viral vektörler ve virüs benzeri parçacıklar dahil olmak üzere çeşitli yeni nano boyutlu malzemelerin ve ilaç taşıyıcılarının geliştirilmesini hızlandırmıştır (Duncan, 2005; LaVan vd., 2003).

İlaç dağıtımı, insanlarda veya hayvanlarda terapötik bir etki elde etmek için organik veya inorganik bileşik uygulama yöntemidir. İlaç taşıyıcı sistemlerin temel amacı, in vitro özelliklerden ziyade patofizyolojik veya in vivo koşulların kontrolü altında bireysel gereksinimleri karşılamak üzere ilaç formülasyonunu kişiye özel hale getirmektir (Brannon-Peppas, 1995). Geleneksel dozaj formlarına göre daha iyi etkinlik, daha az toksisite ve daha iyi hasta uyumu ve rahatlığı gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır. Farklı uygulama yollarıyla ilaç dağıtımı için çeşitli ilaç dağıtım sistemleri formüle edilmiş ve araştırılmıştır (Misra vd., 1997). Nanomalzemelerin ilaç dağıtımında uygulanması, ilacın kapsüllenmesi, hapsedilmesi veya konjugasyonu yoluyla kontrollü ve hedefli ilaç dağıtımının elde edilmesine yardımcı olan geniş yüzey alanı/hacim oranı gibi benzersiz özellikleri nedeniyle son yıllarda yeniden ilgi görmüştür. Nanomateryallerin ilaç taşıyıcıları olarak kullanılmasının, hücre zarlarına nüfuz etmelerine ve endositozdan sonra lizozomal kaçışa izin verebilecek boyutları gibi çeşitli faydaları bulunmaktadır. Boyutun yanı sıra, nanomalzemelerin yüzey kimyasal özellikleri, partiküllerin alımı,

bağlanması ve stabilizasyonu ve dağılımı için çok önemlidir. Nanomalzemelerin yüzey modifikasyonu, hücresel alım, hücre içi taşıma ve hücresel bağlanma açısından ilaç dağıtım verimliliğini artırmak için çeşitli olanaklar sunmaktadır. Günümüzde, polimerik bazlı ilaç taşıyıcıları, dendrimerler, nanopartiküller, kuantum noktaları ve karbon ve titanyum nanotüpler dahil olmak üzere çeşitli nanopartikül sistemler ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılmaktadır (Wang vd., 2020).

2.6.3. Kanser tedavisinde kullanılan nanomalzemeler

Nanoteknolojinin gelişimi, çeşitli kanser tedavilerinin birleştirilmesi için umut verici yeni bir yol sunan bir dizi çekici özelliğe sahip yeni nanomalzemelerin geliştirilmesine yol açmıştır (Deng vd., 2018). Nanomalzemeler, ilaç plazma dolaşım süresini uzatmak ve normal hücrelerle teması azaltmak amacıyla ilaçları kapsüllemek için taşıyıcı olarak kullanılabilmektedir. Başka bir ifadeyle, nanomalzemeler ilaçların kanser hücrelerini hedefleme etkinliğini artırabilmekte ve hedef dışı toksisiteleri azaltabilmektedir (Muntimadugu vd., 2017). Nanopartiküller, sızdıran tümör damar sistemi ve işlevsiz lenfatik drenajın neden olduğu gelişmiş geçirgenlik ve tutulma (EPR) etkileri yoluyla tümörlerde kolayca birikebilmektedir (Chen ve Zhao, 2018).

Günümüzde kanser tedavisi araştırmalarında kullanılan çok çeşitli nanomalzemeler mevcuttur. Nanomalzemeler inorganik ve organik malzemeler olarak ikiye ayrılmaktadır. İnorganik nanomalzemeler arasında altın ve gümüş nanoparçacıklar, mezopor silika nanoparçacıklar, kuantum noktaları, karbon nanotüpler, titanyum nanotüpler vb. örnekler yer almaktadır. Ayrıca, yaygın organik nanomalzemeler arasında lipozomlar, polimerik miseller, dendrimerler vb. bulunmaktadır. Nanopartiküller, özgün tasarımları sayesinde kanser tedavisi için sınırsız olanaklara sahip bir platform sağlamaktadır (Cheng vd., 2021).

Nanomateryalin türüne ek olarak, nanopartiküllerin farmakokinetiği ve biyodağılımı boyut, şekil ve yüzey modifikasyonu gibi özelliklerle tamamlanabilmektedir (Karthika vd., 2018). Araştırmalar, 5~100 nm aralığındaki boyutlara sahip nanopartiküllerin böbrek klerensinden kurtulma olasılığının daha yüksek olduğunu, ve böylece tümörlerde

birikmek için büyük bir dolaşım süresine sahip olduklarını bildirmiştir (Albanese vd., 2012a).

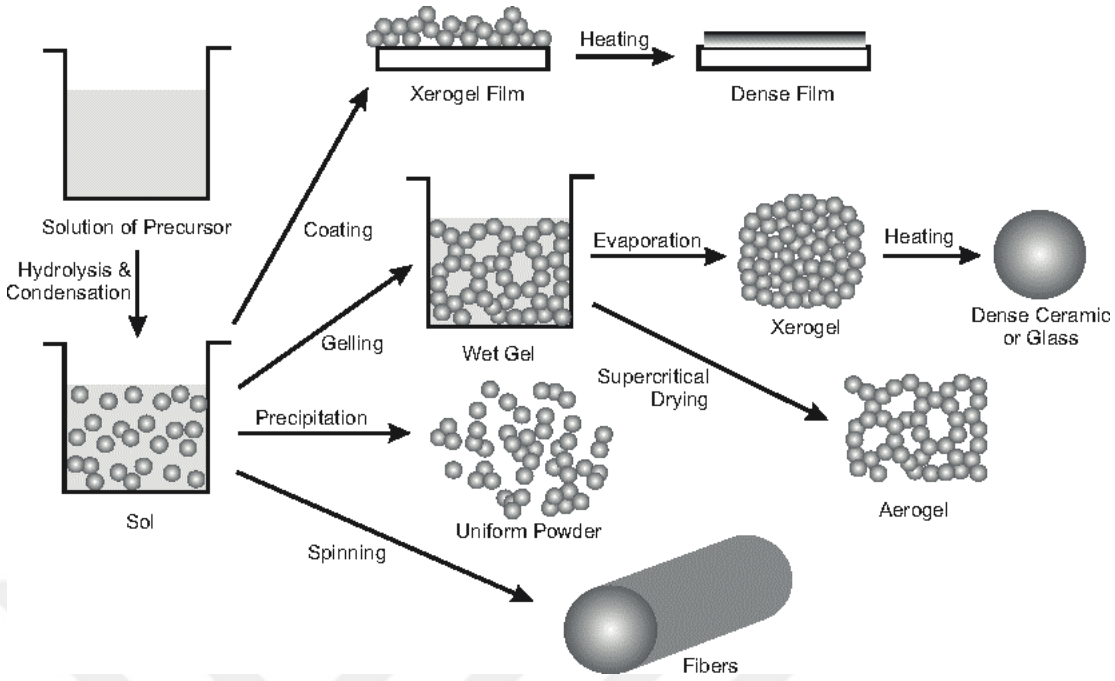
2.6.4. Titanyum nanotüp ilaç taşıma sistemi olarak kullanımı

İlaç dağıtım sistemlerindeki en yeni gelişmeler inorganik nanomalzeme platformlarına dayanmaktadır. Farklı bileşikler arasında titanyum dioksit nanoyapıları (TiO_2), özellikle implante edilebilir cihazlar söz konusu olduğunda, yeni ilaç dağıtım sistemleri alanında son zamanlarda büyük bir ilgi görmüştür (Peng vd., 2009; Zhang vd., 2014b).

Nanoyapılı titanyum dioksitin birçok özelliğinin umut verici ilaç dağıtım sistemlerinin performansını önemli ölçüde artırabileceği yaygın olarak kabul edilmektedir. Nanoyapılı TiO_2'nin özelliklerinin uyarlanmasındaki ana faktör üretim yöntemidir. TiO_2 nanomalzemelerinin üretiminde önemli ilerlemeler gerçekleştirilmiştir. Günümüzde TiO_2 nanoyapılarının boyutunu, yapısını ve homojenliğini kontrol etmek için sol-jel, hidrotermal ve elektrokimyasal anodizasyon gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Chao vd., 2012; Ghicov ve Schmuki, 2009; P. Huang vd., 2014; Mund vd., 2014; Sulka vd., 2010).

- **Sol-jel yöntemi ile titanyum nanoyapıları üretimi**

Farklı morfolojilere sahip nanoyapılı TiO_2 üretimi için en sık kullanılan yöntemlerden biri sol-jel yöntemidir. Genellikle, sol-jel yönteminde, inorganik metal tuzları veya metal alkoksitler gibi metal organik bileşikler olan öncüllerin hidroliz ve polimerizasyon reaksiyonları ile bir kolloidal süspansiyon sentezlenmektedir. Bir sonraki adımda, sıvı çözücü tam polimerizasyon ve çözücünün buharlaştırılması ile jel fazına dönüştürülmektedir. Bu süreç ince tabakaların çevirmeli kaplama, daldırmalı kaplama ve elektroforez gibi biriktirme teknikleri kullanılarak çeşitli alt tabakalar üzerinde biriktirilmesine olanak sağlamaktadır. Sol-jel yöntemiyle nanoyapılı TiO_2 üretimi, Ti(IV) izopropoksit ve titanyum tetraizopropoksit TTIP gibi bir titanyum öncüsünün hidroliziyle gerçekleştirilmektedir (Heredia-Cervera vd., 2009; Lopez vd., 2006). Sonuç olarak, TiO_2 mikrotüpleri, mezogözenekli ultra ince TiO_2 tabakaları veya makro ve mezogözenekli kümelenmiş titanya nanopartikülleri içeren rezervuarlar oluşturulabilmektedir.

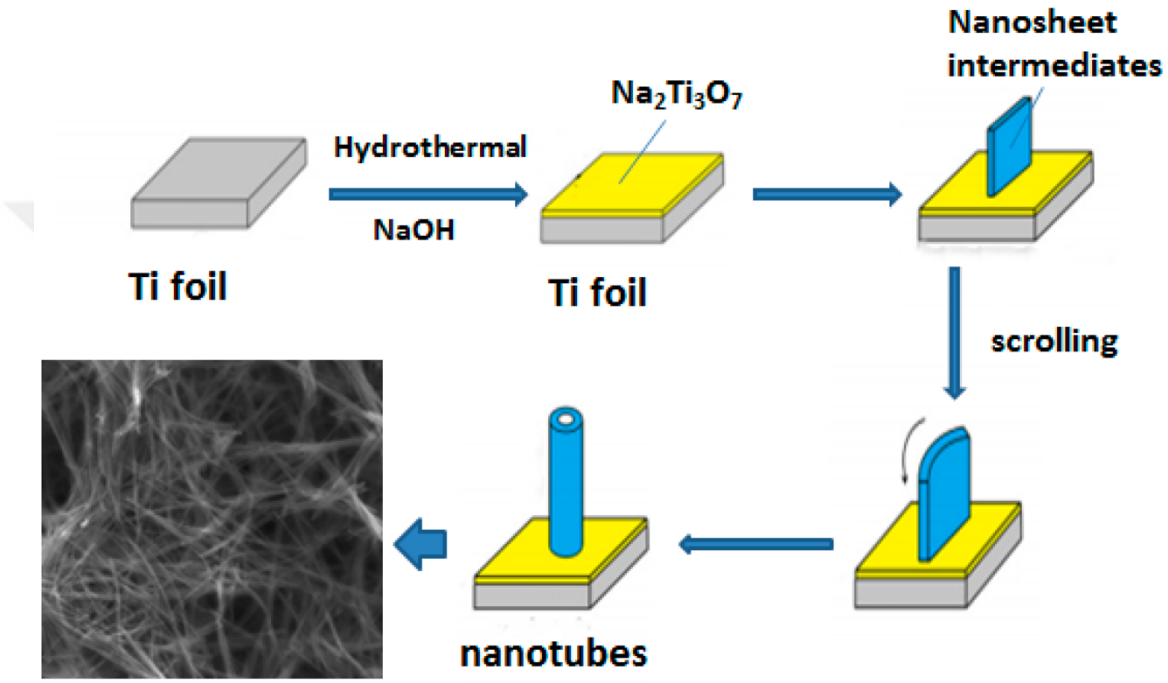


Şekil 2.3. Sol-gel yöntemiyle titanyum nanotüplerin hazırlanma süreçlerinin görüntüsü (Nyamukamba vd., 2018)

♣ Hidrotermal ve solvotermal yöntemi ile titanyum nanoyapıları üretimi

Çeşitli TiO_2 nanomalzemelerinin hazırlanması için kullanılan bir diğer yaygın teknik de hidrotermal yöntemdir (Mund vd., 2014). Bu yöntemde, sentez genellikle otoklav adı verilen sıcaklık kontrollü çelik basınçlı kaplar içinde gerekli malzeme öncüllerini içeren sulu ve organik çözeltilerde gerçekleştirilmektedir. Reaksiyon sıcaklığı, su/organik çözücünün kaynama noktasının üzerine çıkarılarak buhar doygunluğu (satürasyon) basıncına ulaşılabilmektedir. Otoklavda üretilen basınç, sıcaklık ve çözelti miktarından etkilenmektedir. Solvotermal prosedür hidrotermal yöntemle hemen hemen aynıdır, ancak ilk teknikte sentez için kullanılan çözücüler susuz iken hidrotermal işlemlerde ise su kullanılmaktadır (Huang vd., 2014). Solvotermal sentezin sıcaklığı hidrotermal yöntemdekinden çok daha yüksek olabilmektedir. Bununla birlikte, solvotermal yöntem, hidrotermal yöntemlere göre TiO_2 nanomalzemelerinin boyutu, morfolojisi ve kristal yapısı üzerinde daha iyi kontrol sağlamaktadır. Böylece TiO_2 nanopartikülleri ve nanotüpleri sentezlenebilmekte ve ilaç dağıtım sistemleri olarak kullanılabilmektedir. Elde edilen TiO_2 nanomalzemelerinin morfoloji, yüzey alanı, gözeneklilik ve kristal faz gibi özellikleri sıcaklık, reaksiyon süresi, çözücü ve öncü türü, çözelti pH'ı, kurutma

koşulları ve işlem sonrası süreç dahil olmak üzere reaksiyon koşullarına büyük ölçüde dayanmaktadır. Hidrotermal ve solvotermal yöntemler, farklı TiO_2 nanoyapıları elde etmek için çok çeşitli olanaklar sunmaktadır. Ayrıca, sol-jel yöntemini hidrotermal veya solvotermal yöntemi ile birleştirerek, belirli bir yüzey alanına sahip numuneler elde edilebilmektedir. Bu durum, nanoyapılı taşıyıcıların ilaç dağıtım sistemlerinde potansiyel kullanımı açısından özellikle önemlidir.

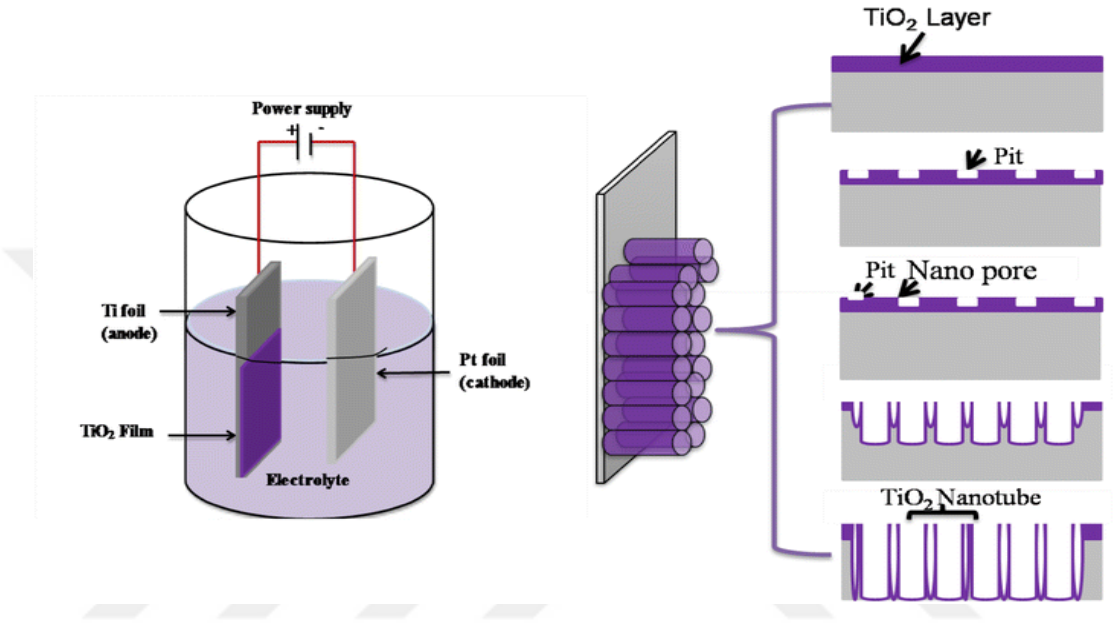


Şekil 2.4. Hidrotermal yöntemiyle titanyum nanotüplerin hazırlanma süreçlerinin görüntüsü (Yang vd., 2019)

- **Anodizasyon yöntemiyle titanyum nanoyapıların üretimi**

Bu süreç ilk olarak kromik ve hidroflorik asit karışımına dayalı bir elektrolit kullanarak nanotüp şeklinde titanyum oksit elde eden Zwilling ve arkadaşları (1999) tarafından uygulanmıştır. Anodizasyon, nanotüp şeklinde veya nanogözenekli TiO_2 tabakalarına yol açan titanyum folyonun elektrokimyasal oksidasyonudur (Ghicov ve Schmuki, 2009; Sulka vd., 2010). Elde edilen oksit tabakaları iki süreç sonucunda oluşmaktadir: sıkıştırılmış TiO_2 tabakasının oluşumu ve oluşan oksit yapısının florür iyonları tarafından kısmi çözünmesindir. Bu yöntem, elde edilen yapının gözenek veya tüp boyutunu, geometrisini ve kalınlığını kontrol etmeyi sağlamaktadır (Moseke vd., 2012). Tüp çapları

uygulanan voltaja bağlıyken, uzunluk geçirilen yük (dolayısıyla işlemin süresi) ve elektrolitin türüne göre belirlenmektedir (Moseke vd., 2012; Peng vd., 2009). Titanyumun anodizasyonu hem sulu hem de susuz elektrolitlerde gerçekleştirilebilmektedir. Anodik TiO_2 nanoyapılarının geometrik parametreleri 300 nm'den 50 µm'ye kadar değişirken, nanotüp çapı 30-150 nm aralığında olabilmektedir (Chennell vd., 2013).



Şekil 2.5. Anodizasyon yöntemiyle titanyum nanotüplerin hazırlanma süreçlerinin görüntüsü (Patil vd., 2017)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tezin deneysel çalışmaları, yani titanyum nanotüplerin sentezi, karakterizasyon çalışmaları ve sitotoksisite, antikanser ve hücre ölümü testleri farklı laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir. Her aşama ve yapıldığı yer, Çizelge 3.1' de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada gerçekleştirilen her aşama ve yapıldığı yerler

Sıra No	Çalışma aşamaları	Gerçekleştirilen yerler
1.	Titanyum nanotüpleri sentezlenmesi	Bursa Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölümünden Dr. Öğretim Üyesi Halit Levent Hoşgün
2.	Titanyum nanotüpleri karakterizasyon işlemi SEM, XRD, FTIR	Bursa Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölümünden Dr. Öğretim Üyesi Halit Levent Hoşgün
3.	Titanyum nanotüpleri hücre içi görüntüleme	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM)
4.	Titanyum nanotüpleri sitotoksik, antikanser ve hücre ölümü etkilerinin araştırılması	Bursa Uludağ Üniversitesi Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji Laboratuvar

3.1. Titanyum nanotüplerin sentezlenmesi

Titanyum dioksit bazlı nanotüplerin (TNT) ilk sentezi 1996 yılında Hoyer tarafından gözenekli bir alüminyum oksit kalıbında elektrokimyasal biriktirme yoluyla gerçekleştirilmiştir (Hoyer, 1996). Daha sonra, hidrotermal bir süreç ve elektrokimyasal anodik oksidasyon yoluyla TiO_2 nanotüplerin üretimi 1998 yılında Kasuga ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. TiO_2, çoğu durumda sentezlenmiş titanatın kurutulması veya kalsinasyonu sırasında oluşan nihai bir üründür ve birçok katalitik uygulama için gerekli bir değişim adımıdır. Gümüş ile yüklenmiş titanyum nanotüplerin (AgTNT) hidrotermal sentezi, titanyum nanotüplerin gümüş varlığında hidrotermal bir işlemle hazırlanmasını içermektedir. Bu işlem genellikle kontrollü hidrotermal koşullar altında titanyum öncü bileşikleri ve gümüş tuzlarını kullanmaktadır. Hidrotermal sentez, yüksek sıcaklık ve basınçlarda sulu bir çözelti içerisinde bir reaksiyonu kapsamaktadır. Gümüş ile yüklenmiş titanyum nanotüplerin üretimi için 1 g TiO_2 (P25) ve 0.1 g gümüş nitrat $AgNO_3$ (TiO_2'nin %10'u) konsantre sulu NaOH bir çözelti (100 mL 10 M NaOH çözeltisi) içinde çözülmüştür.

Karışım, bir homojenizatörde 5000 rpm'de 15 dakika karıştırılarak çözelti içinde homojen bir şekilde dağıtılmış ve ardından teflon kaplı bir otoklava taşınarak 140°C'de 24 saat boyunca hidrotermal işleme tabi tutulmuştur. Hidrotermal reaksiyon tamamlandıktan

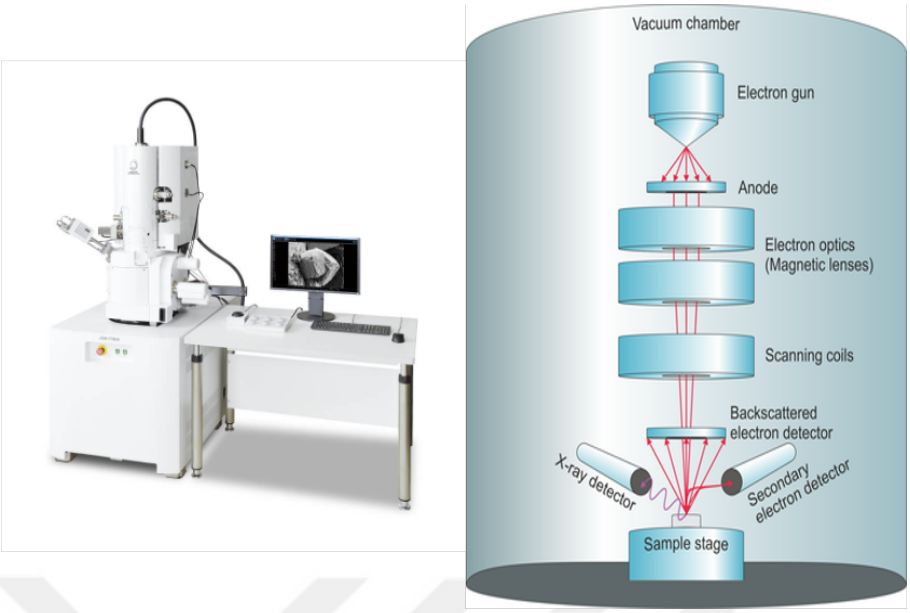
sonra, elde edilen nanotüpler, nötralizasyon sürecine geçilmesi ve klor iyonlarının uzaklaştırılması için HCl ve su ile yıkanmıştır. Nihai titanyum nanotüplerin elde etmek için 400 °C'de 2 saat kurumaya bırakılmıştır. Gümüş nitrat kullanılmadan boş titanyum nanotüplerin üretimi için de aynı süreç izlenmiştir.

3.2. Titanyum nanotüplerin karakterizasyon çalışması

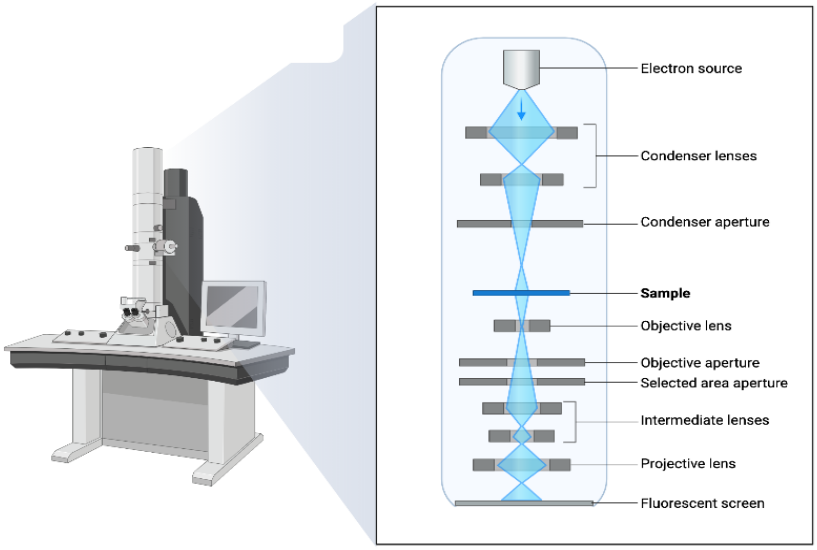
Titanyum nanotüplerin sentezinden sonra karakterizasyonunun yapılması, belirli uygulamalar için özelliklerinin anlaşılması ve optimize edilmesi açısından önem taşımaktadır. Nanotüplerin yapısal, morfolojik ve kimyasal özelliklerini değerlendirmek için çeşitli karakterizasyon teknikleri kullanılmaktadır.

3.2.1. Elektron mikroskopları ile yapısal analizi FESEM ve TEM

Elektron mikroskopları çok çeşitli nanomalzemelerin karakterizasyonu için oldukça işlevsel bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Nanotüplerin morfolojisi ve yapı özellikleri alan emisyon tabancalı taramalı elektron mikroskobu (FESEM, ZEISS Ultraplus) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM, JEOL JEM 1220) kullanılarak incelenmiştir. Alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM), nanotüp yüzeyini yüksek enerjili bir elektron demetiyle tarama deseninde tarayarak görüntüleyen bir elektron mikroskobu türüdür. Alan emisyon tabancasından elektron yayıcılar kullanılmıştır. Bu tür elektron yayıcılar, bir tungsten filamentin 1000 katına kadar emisyon oluşturabilmektedir. Ancak, çok daha yüksek vakum koşulları gerektirmektedir. Elektron demeti elektron tabancasından çıktıktan sonra, metal açıklıklar ve manyetik lensler kullanılarak ince odaklı, monokrom bir demet halinde sınırlandırılıp odaklanmaktadır. Son olarak, nanotüplerin bir görüntüsünü üretmek için sinyalleri toplayan mikroskoplara her tür elektronun dedektörleri yerleştirilmektedir (Alyamani ve M., 2012). Transmisyon elektron mikroskobu, bir numunenin yüksek oranda büyütülmüş görüntüsünü atomik düzeyde görselleştirmek için yüksek enerjili elektronları kullanan mikroskobik tekniklerdir. Bu teknik aynı zamanda nanotüplerin boyutunun, şeklinin, yapısının, dağılımının ve homojenliğinin belirlenmesi için de kullanılmaktadır (Jain vd., 2023).



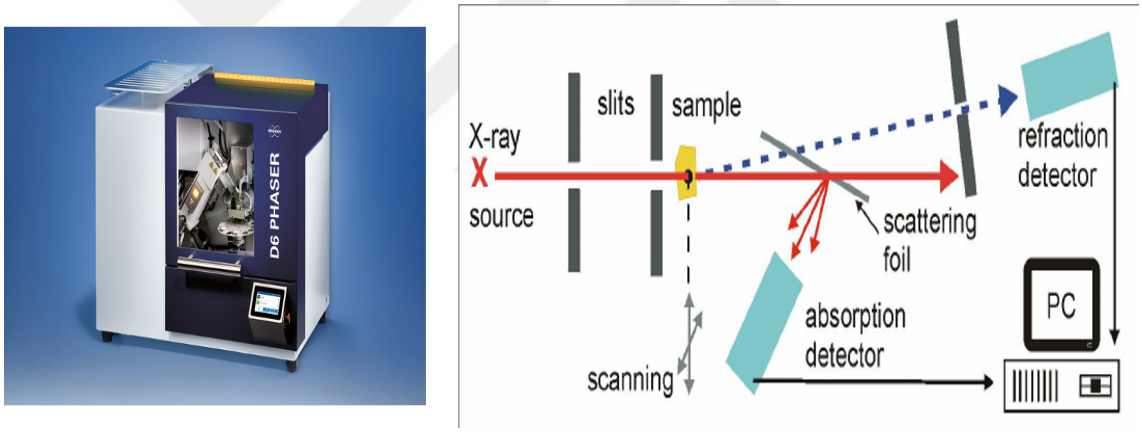
Şekil 3.1. Taramalı elektron mikroskobu (FESEM) görüntüsü (BioRender, 2022)



Şekil 3.2. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü (BioRender, 2022)

3.2.2. X- ışını Kırınımı (XRD)

X-ışını kırınımı (XRD), sıvılardan tozlara ve kristallere kadar her türlü maddeyi analiz etmek için kullanılan en önemli hasarsız tekniklerden biridir. Elektron mikroskopisi gibi doğrudan görüntüleme tekniklerinin aksine, X-ışını kırınımı parçacığın kristalografik fazı hakkında bilgi sağlayan bir yöntemdir (Ingham, 2015). Kristaller atom dizilerinden oluşmakta ve X-ışınları elektromanyetik radyasyon dalgaları olarak kabul edilebilmektedir. Atomlar, X-ışını dalgalarını öncelikle atomların elektronları aracılığıyla dağıtmaktadır. X-ışını radyasyonu, kristal katılarda var olan olağan atomlar arası boşluk sırasına göre bir dalga boyu gösterir ve bu nedenle kristal alan boyutunu ve nanomalzemelerin yapısını belirlemek için kullanılmaktadır. TNT ve AgTNT nanotüplerin XRD desenleri, 0.5 °/ dak tarama hızında monokromatik Cu- K_α radyasyonu λ=1,5406 ile bir X-ışını kırınım ölçeri (XRD, D8 Advance, Bruker Instrument Co., Ltd. Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

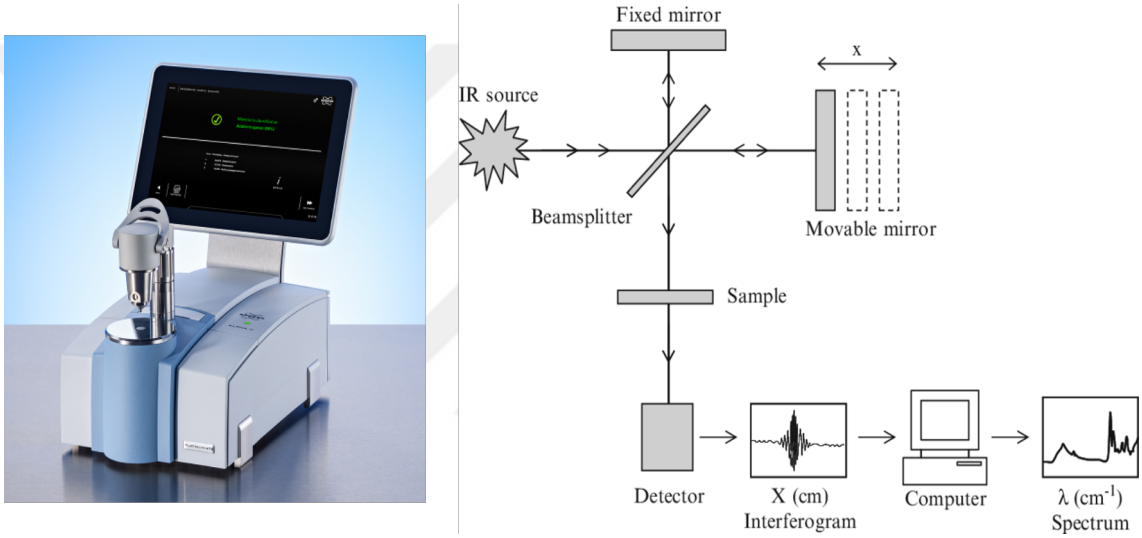


Şekil 3.3. X- ışını Kırınımı (XRD) görüntüsü (Ojeda **ve** Dittrich, 2012)

3.2.3. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

FTIR analizi veya FTIR Spektroskopisi olarak da bilinen Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi, organik, polimerik ve inorganik malzemeleri tanımlamak için kullanılan analitik bir tekniktir. FTIR analiz yöntemi, test numunelerini taramak ve kimyasal özellikleri gözlemlemek için kızılötesi ışık kullanmaktadır. Emilen radyasyon numune molekülleri tarafından dönüşümsel ve/veya titreşimsel enerjiye çevrilmektedir. Sonuçta dedektörde ortaya çıkan sinyal, genellikle 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} arasında, numunenin

moleküler parmak izini temsil eden bir spektrum olarak görüntülenmektedir. Her partikül benzersiz bir spektral parmak izi üreterek FTIR analizini nanotüp karakterizasyonu için başarılı bir araç haline getirmektedir. Absorpsiyon bantlarının karakteristik desenindeki bir değişiklik, malzemenin bileşimindeki bir değişikliği açıkça göstermektedir (Dwivedi vd., 2017; Titus vd., 2019). Böylelikle titanyum ve gümüş numunelerinin başarılı bir kombinasyon oluşturduğu gözlemlenmektedir. Bu analiz, bir Bruker Optics IFS 66v/s FTIR spektrometresi ile nanotüplerdeki karakteristik fonksiyonel grupları tanımlamak için kullanılmıştır. IR spektrumları 2 cm^{-1} spektral çözünürlük ile 4000 ile 400 cm^{-1} arasında kaydedilmiştir.



Şekil 3.4. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) görüntüsü (Ojeda **ve** Dittrich, 2012)

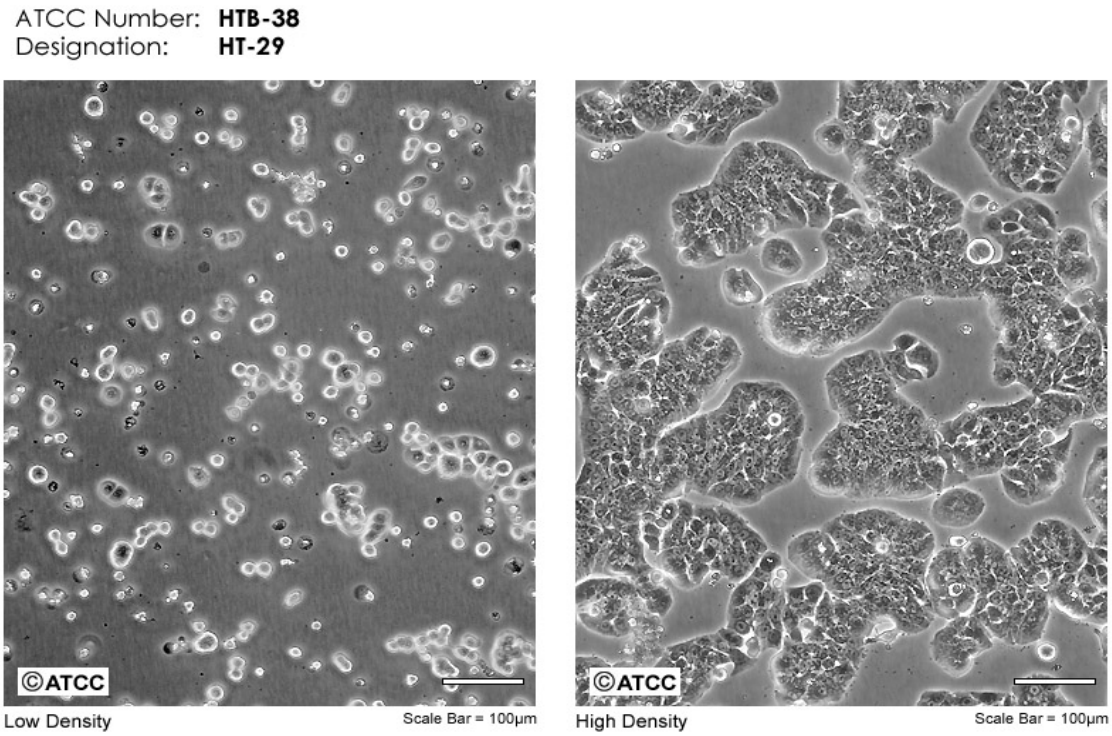
3.2.4. Nanotüplerin hücre içi girişi ve lokalizasyonunun TEM ile görüntülenmesi

Araştırmamız kapsamında farklı hücre hatlarındaki nanotüplerin yerleşim yerleri hakkında bilgi etmek için hücre içi TEM analizi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan hücreler, insan kolorektal adenokarsinom HT-29 (ATCC ® HTB-38™), akciğer karsinom A549 (ATCC ® CCL-185™) ve meme adenokarsinom MCF-7 (ATCC ® HTB-22™) hücre hatlarıdır. Bu analizi gerçekleştirmek için hücreler 75 cm^2'lik flasklara ekilmiş ve %70 konfluens sağlanana kadar inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin canlı kalmasını sağlamak için besiyerleri düzenli olarak değiştirilmiştir. Konfluens sağlandıktan sonra, her hücre hattından bir grup nanotüplerle dozlanırken bir grup kontrol olarak

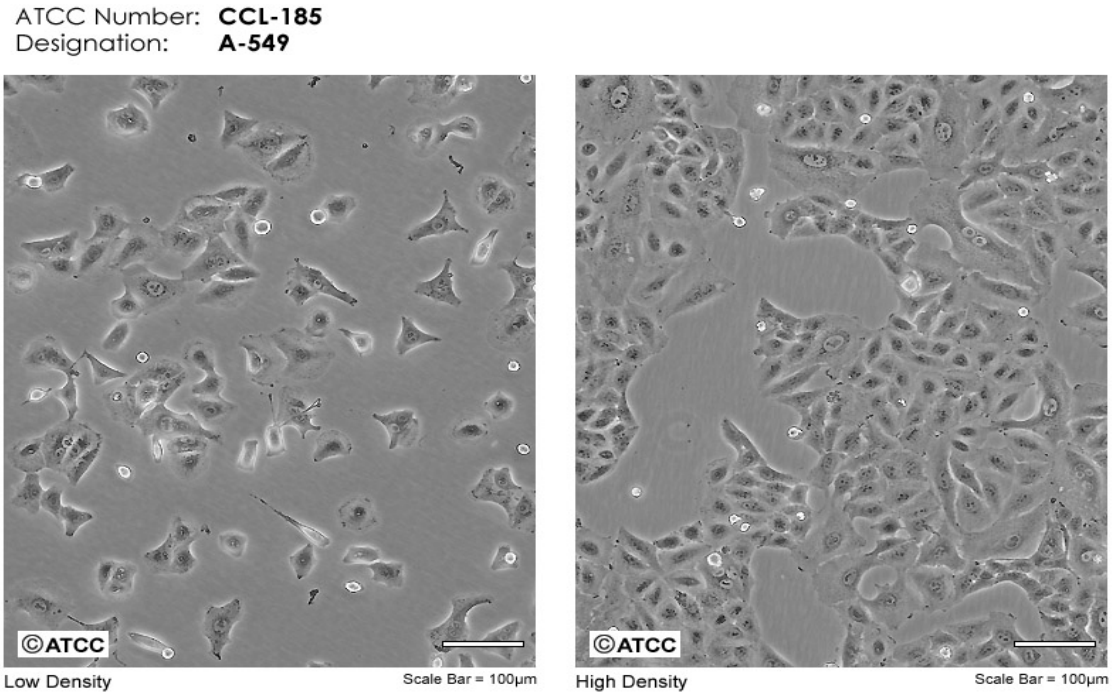
bırakılmıştır. 24 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırılmış ve peletin toplanması için santrifüj edilmiştir. Pelet 3 ml PBS (pH: 7) ile yıkanmıştır ve ardından 1000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra 3 ml PBS ile bir kez daha yıkanmıştır ve 1000 g'de 5 dakika boyunca iki kez santrifüj edilmiştir. Ardindan PBS aspire edilmiştir ve hücrelerin fiksasyonunu sağlamak için pelet PBS' de seyreltilmiş %15 glutaraldehit (3 ml glutaraldehit + 20 ml PBS) ile temasta tutulmuştur; optimum fiksasyon için glutaraldehit içinde +4°C'de 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda pellet glutaraldehitten ayrılmıştır ve PBS ile 1000 g'de 5 dakika süreyle iki kez santrifüj edilmiştir. Numuneler daha sonra ileri analiz için ilgili laboratuvara gönderilmiştir.

3.3. Hücre kültürü protokolü

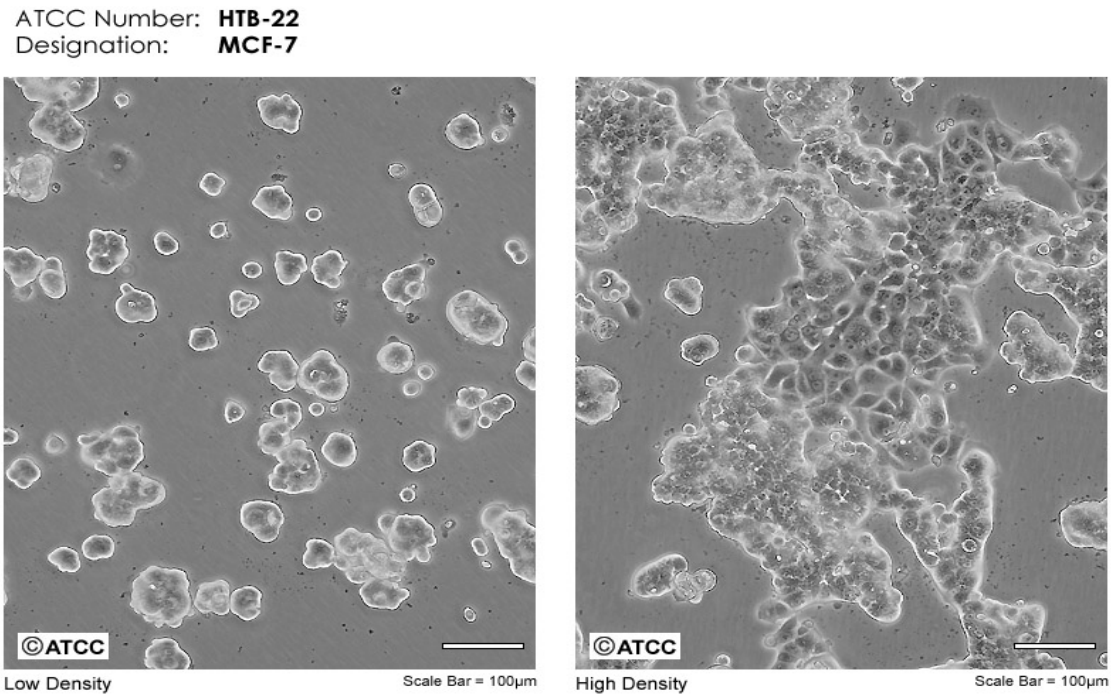
Bos titanyum nanotüplerin ve gümüş ile yüklenmiş titanyum nanotüplerin tüm in vitro deneylerini gerçekleştirmek için insan kolorektal adenokarsinom HT-29 (ATCC ® HTB-38™), akciğer karsinom A549 (ATCC ® CCL-185™) ve meme adenokarsinom MCF-7 (ATCC ® HTB-22™) hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler 75 cm^2'lik havalandırmalı flasklarda, 37°C'ye kadar önceden ısıtılmış tam besiyeri ile kültüre alınarak %5 CO^2'li nemlendirilmiş ortama sahip 37°C'lik bir inkübatörde tutulmuştur. HT-29 ve A549 hücreleri RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, LONZA 12702F) ortamında, MCF-7 hücreleri ise DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Yüksek Glikoz ortamında kulture edilmistir. Hücrelerin son besiyerlerini elde etmek için her besiyerine 60 ml fötal bovin serumu (Serox S00IZ), 6 ml penisilin-streptomisin (Biological Industries 1914361), 6 ml sodyum piruvat (Thermo SH30239.01), 3 ml L-glutamin (Sigma Aldrich G7513), eklenerek hazırlanmıştır. Hücre pasajlama protokolünü gerçekleştirmek üzere hücreler DPBS ile yıkanmıştır, tripsin ayrıştırıcı ajan ile temas ettirilmiştir ve hücrelerin ayrışmaları için inkübatörde bırakılmıştır. Daha sonra bir miktar besiyeri eklenerek hücrelerin tamamı santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve 2000 g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Deney setlerini oluşturmak için, trypan blue çözeltisiyle canlı hücre sayımı cihazı (Roche Cedex) kullanılarak canlı hücre sayısı ölçülmüştür.



Şekil 3.5. İnsan kolorektal adenokarsinom HT-29 (ATCC ® HTB-38™) hücre hattının görüntüsü



Şekil 3.6. İnsan akciğer karsinom A549 (ATCC ® CCL-185™) hücre hattının görüntüsü



Şekil 3.7. İnsan meme adenokarsinom MCF-7 (ATCC ® HTB-22™) hücre hattının görüntüsü

3.4. Araştırma sırasında gerçekleştirilen sitotoksisite deneyler

3.4.1. Trypan blue ile canlı hücre sayımı

Trypan blue boyası kullanarak canlı hücreleri saymak, canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için hücre biyolojisinde yaygın bir yöntemdir. Bir deney gerçekleştirmek için alınması gereken süspansiyon halindeki hücrelerin hacmini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Tripsin kullanarak hücreleri kaldırdıktan sonra, 1:1 oranında trypan blue boyası (5mg/ml in Saline, 100 ml, Biological Industries) ve hücre süspansiyonu dikkatlice karıştırılmıştır. Trypan blue-hücre karışımından 10 µl alınarak Cedex ® XS Analyzer (Roche) cihazi aracılığıyla hücrelerin sayılabilmesi için bir cedex lamınasına yayılmıştır. Hücreler Cedex okutma programı kullanılarak sayılmıştır. 1000 µl'deki canlı hücre sayısını veren bu programın sonucu kullanılarak canlı hücreler hesaplanmıştır.

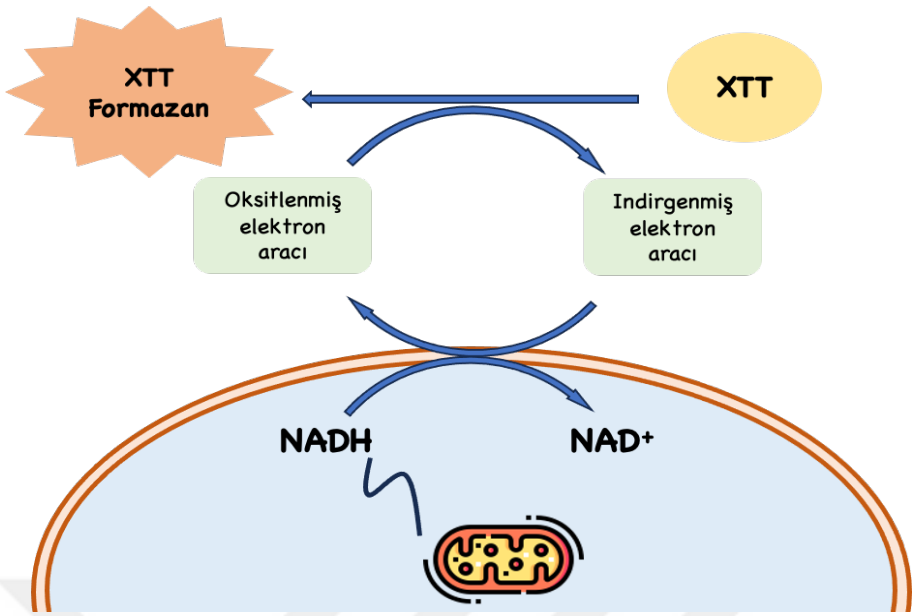
3.4.2. Hücre canlılık testi XTT

Hücre canlılığı testleri, hücrenin sağlığı ve işlevselliği hakkında bilgi sağlayarak biyolojik ve ilaç araştırmalarda çok önemli bir rol oynamaktadır. Hücre canlılığını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntem, hücrelerin metabolik aktivitesini ölçen kolorimetrik bir deney olan XTT testidir. XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) testi, XTT'nin metabolik olarak aktif hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından indirgenmesine dayanmaktadır. Bu enzimler XTT'yi spectrofotometre ile ölçülebilen suda çözünür bir formazan boyasına dönüştürmektedir. Üretilen formazan miktarı canlı hücre sayısıyla doğru orantılıdır ve hücre canlılığının güvenilir bir ölçüsünü sağlamaktadır (Scudiero vd., 1988).

TNT ve AgTNT nanotüplerin hücre canlılığı etkileri XTT deneyi kullanılarak değerlendirilmiştir. HT-29, A549 ve MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu plateler içine 0.5 x 10^4 /kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir ve çoğalmaları için inkubasyona bırakılmıştır. Hücreler tutunduktan sonra farklı konsantrasyonlarda TNT (80, 160, 320, 640, 1280, 2560 µg/ml) ve AgTNT (80, 160, 320, 640, 1280 µg/ml) ile muamele edilmiştir. Nanotüpler önceden steril RPMI-1680 ve DMEM besiyerlerinde çözülmüş ve sonikatör yardımıyla dağıtılmıştır. 24 saatlik maruziyetten sonra eski hücre kültürü besiyeri dikkatlice çıkarılmıştır ve yeni bir besiyeri eklenmiştir. Ayrıcaher kuyucuğa tedarikçinin talimatlarına göre ve 50 µl XTT çözeltisi eklenmiştir. XTT çözeltisi kuyucuklara eşit şekilde dağılması için plateler hafifçe çalkalanmış ve 37°C, %5 CO^2 inkübatörde 4 saat inkübe edilmistir. Sonrasında absorbans ELISA okuyucu (Biotek ELx800, Biotek Instruments Inc.) ile 450 nm dalgaboyunda ölçülmüştür. Blank çıkarıldıktan sonra, inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

% Büyüme Inhibisyonu = (1- Muamele Grubu Abs / Kontrol Grubu Abs) x 100

Hesaplanan absorbans değerleri kullanılarak hücre canlılık eğrileri çizilmiştir ve üç doğrusal nokta seçilerek oluşturulan doğrunun fonksiyon denklemi kullanılarak **$IC_{12.5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** değerleri hesaplanmıştır.



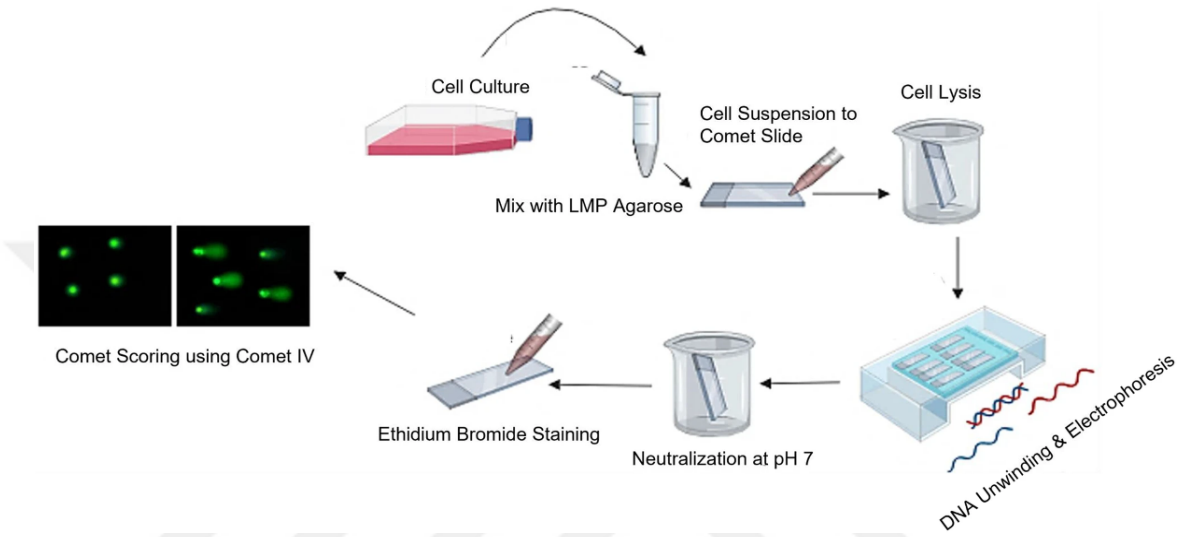
Şekil 3.8. XTT test prensip şeması

3.5. Araştırma sırasında gerçekleştirilen genotoksisite deneyi

3.5.1. Alkalin Komet testi

Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen alkalin komet deneyi, tek tek hücre düzeyinde DNA hasarının ölçülmesinde güçlü bir yöntemdir. Alkalin komet deneyi, DNA kırılmalarını değerlendirmek için Singh ve arkadaşlarına (1988) göre bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir (Costa vd., 2008). Hücreler 25 cm^2 flasklara $5x10^4$ hücre/flask yoğunluğunda ekilmiş ve 48 saat boyunca büyümeye bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hücreler 24 saat boyunca XTT sonuçlarından belirlenen beş farklı TNT ve AgTNT konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır: $\mathbf{IC_{12.5}}$, $\mathbf{IC_{25}}$, $\mathbf{IC_{50}}$ ve $\mathbf{IC_{75}}$. Süre sonunda, hücreler PBS ile hazırlanan %0,8 low melting agarose içinde süspanse edilmiş, önceden normal melting agarose ile kaplanmış mikroskop lamlarına yayılmış ve 4°C'de 15 dakika katılaşmaya bırakılmıştır. Lamlar taze hazırlanmış soğuk lizis solüsyonuna (2,5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 10 mM Tris (pH 10), %1 Triton X-100 (kullanımdan hemen önce eklenmiştir)) yerleştirilerek hücrelerin 4°C'de karanlıkta bir gece boyunca parçalanması sağlanmıştır. Lamlar 20 dakika boyunca DNA açılmasına tabi tutulmuş ve ardından elektroforez, taze hazırlanmış soğuk elektroforez tamponunda (1 mM EDTA ve 300 mM NaOH, pH 13) 25 dakika boyunca 25 V ve 300 mA' de gerçekleştirilmiştir. Elektroforezden sonra lamlar 10 dakika boyunca nötralizasyon tamponuna (0,5 M Tris-

HCl, pH 7,5) yerleştirilmiştir. Son olarak, lamlar 100 ml etidyum bromür (20 mg/ml) ile boyanmıştır. Her numune için iki lam hazırlanmış ve floresans mikroskop (Nikon eclipse i80 marka) kullanarak her lamdan 100 komet görsel elde edilmiştir. DNA hasarının kapsamı Tail Length (kuyruk uzunluğu, μm), Tail DNA (kuyruk DNA yüzdesi) ve Olive Tail Moment (OTM) ölçümleri olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.9. Alkalin komet deneyi prosedürünün görüntüsü (Tutty vd., 2022)

3.6. Araştırma sırasında gerçekleştirilen hücre ölüm modu testi

3.6.1. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Ölçümü

Reaktif Oksijen Türleri analizi, biyolojik örneklerde reaktif oksijen türlerinin varlığını ölçmek ve tespit etmek için çok önemli bir araç olarak işlev görmektedir. Bu test, hücrelerin ve dokuların redoks durumu hakkında bilgi vererek hücresel sağlık hakkında değerli bir inceleme sağlamaktadır. Hücre içi reaktif oksijen türleri seviyeleri, floresan olmayan bir bileşik olan 2′ 7′- diklorodihidrofloresein diasetat (DCFH-DA) kullanılarak ölçülmüştür. DCFH-DA hücresel esteraz tarafından hidrolize edilir ve ardından hücre içi reaktif oksijen türleri tarafından yüksek floresanlı 2′ 7′- diklorodihidrofloreseine (DCF) okside edilmektedir. Ölçülen floresan yoğunluğu, hücredeki ROS seviyesi ile doğru orantılıdır (Pogue vd., 2012). HT-29, A549 ve MCF-7 hücreleri normal tripsinizasyon işleminden sonra 24 saat steril 96 kuyucuklu siyah platelere 0.8 x 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat kültürden sonra hücreler üç kez PBS ile yıkanmıştır.

Ardından, hücreler 2 saat boyunca serum içermeyen bir besiyeri ile 50 µM DCFH-DA'da inkübe edilmiştir. Fazla DCFH-DA, PBS ile üç kez yıkanarak uzaklaştırılmış ve sadece DCFH-DA yüklü hücreler elde edilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca farklı TNT (**$IC_{12.5}$**) ve AgTNT (**$IC_{12.5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}**) konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır ve son olarak DCF floresan yoğunluğu bir floresan plaka okuyucu (Thermoscientific Fluoroskan Ascent FL) kullanılarak 480 nm (Uyarma) / 530 nm (Emisyon)'de ölçülmüştür.

3.6.2. Anneksin V testi

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, doku homeostazını korumak ve hasarlı hücreleri ortadan kaldırmak için çok önemli olan bir süreçtir. Apoptoz, hücrelerde farklı morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterize edilen düzenlenmiş bir süreçtir. Bu değişiklikler arasında hücre büzülmesi, membran parçalanması, nükleer yoğunlaşma ve DNA parçalanması yer almaktadır. Anneksin V testi, hücre biyolojisi alanında güçlü bir araç olarak öne çıkmakta ve apoptotik hücrelerin hassas bir şekilde tespit edilmesine ve ölçülmesine olanak sağlamaktadır. Anneksin V floresan belirteçlerle ölçülebilmekte ve erken apoptotik hücrelerde hücre zarının dışına transloke olan fosfatidil serine yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Geç apoptotik hücrelerde membran geçirgenliğinin artması, floresan 7-aminoaktinomisin-D'nin (7-AAD) DNA'daki GC bölgelerine bağlanmasına neden olmaktadır (Zembruski vd., 2012). Anneksin-V testi Guava® Muse Cell Analyzer (Cell Analyzer, Luminex) and Muse® Annexin-V & Dead Cell Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, hücreler 0.5 x 10^6 6 kuyucuklu platelerde ekilmiş ve çoğalmaları için 37 °C, %5 CO_2 inkubatorde gece boyunca bekletilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca TNT (**$IC_{12.5}$**) ve AgTNT (**$IC_{12.5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}**) ile muamele edilmiştir. Maruziyet sonrası hücreler PBS ile yıkanarak toplanmış ve 100 µl Muse® Annexin-V & Dead Cell Reagent ile karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Flow sitometri uygulanmış ve veriler Guava® Muse Cell Analyzer yazılımı kullanılarak elde edilmiştir.

3.6.3. Multikaspaz testi

Kaspazlar, hücre ölümünün başlatılması ve yürütülmesinde çok önemli roller oynayan sistein proteazlardır. Başlatıcı (örn. kaspaz-8, -9) ve efektör (örn. kaspaz-3, -7) kaspazlar olarak sınıflandırılan kaspazlar, hücrenin düzenli bir şekilde parçalanmasına yol açan bir

aktivasyon dizisi oluşturmaktadır. Multikaspaz deneyi, hücresel bağlamda birden fazla kaspazın aktivitesini eşzamanlı olarak ölçmek için tasarlanmıştır. Bu deneyde genellikle floroforlar ile işaretlenmiş substratlar kullanılmakta ve böylece kaspaz aktivitesinin gerçek zamanlı tespiti sağlanmaktadır. Multikaspaz deneyini gerçekleştirmek için, hücreler anneksin V deneyinde olduğu gibi hazırlanmış ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda TNT (**$IC_{12.5}$**) ve AgTNT (**$IC_{12.5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}**) ile muamele ettirilmiştir. Süspansiyon halindeki hücreler (50 µl), 5 µl Muse ® MultiCaspase Reagent working solüsyonu ile iyice karıştırılmıştır. 30 dakikalık inkübasyondan sonra hücrelere 150 µL Muse Caspase 7-AAD working solüsyonu eklenmiş ve karıştırılmıştır. Son olarak hücreler ışıktan korunarak 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Multikaspaz testi verileri Guava® Muse Cell Analyzer (Cell Analyzer, Luminex) cihazı ve yazılımı kullanılarak elde edilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analizi

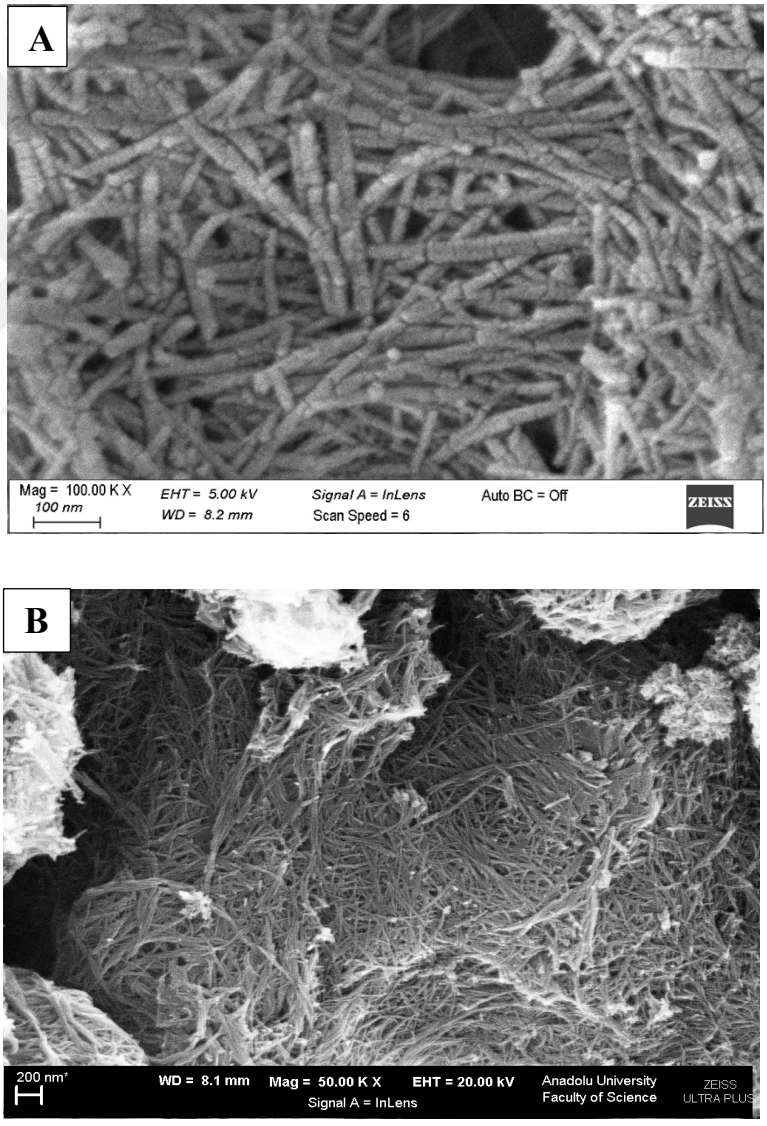
Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama ± standart sapma (S.D) olarak gösterilmiş ve SPSS Statistics 28.0 ile analiz edilmiştir. Grafikler Excel yazılımı (Microsoft Office 2016) kullanılarak hazırlanmıştır. Muamele edilen ve edilmeyen gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma Kruskal Wallis ve Mann-Whitney testleri ile yapılmıştır. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlılık taşımaktadır.

4. BULGULAR

4.1. Titanyum nanotüplerin karakterizasyon analizi

4.1.1. Alan emisyon taramalı elektron mikroskobi FESEM

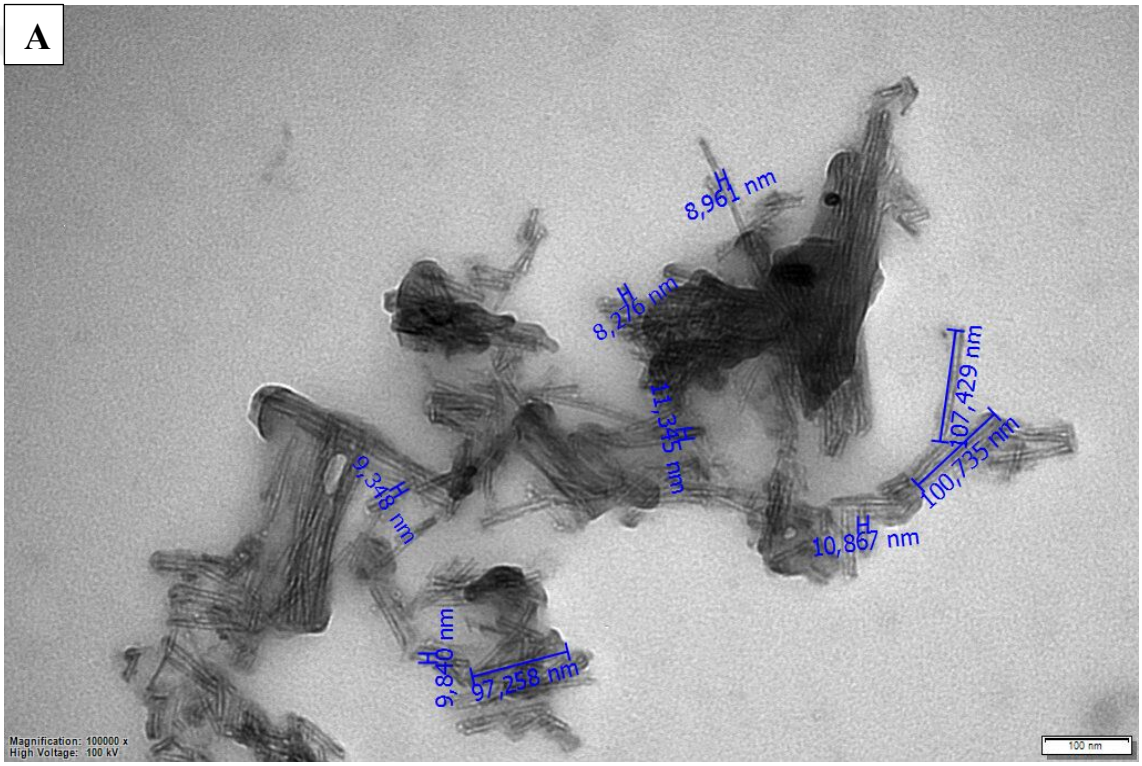
Hidrotermal yöntemi ile sentezlemiş TNT ve AgTNT nanotüplerinin morfolojisini incelemek için FESEM mikroskopisi yapılmıştır. FESEM analizi, boş ve gümüş ile yüklenmiş titanyum nanotüplerin homojen bir dağılımını göstermektedir. Şekil 4.1.a ve 4.1.b, pürüzsüz bir yüzeyle agregasyon göstermeyen nanotüplerin uzun tübüler şeklindeki morfolojisini göstermektedir.

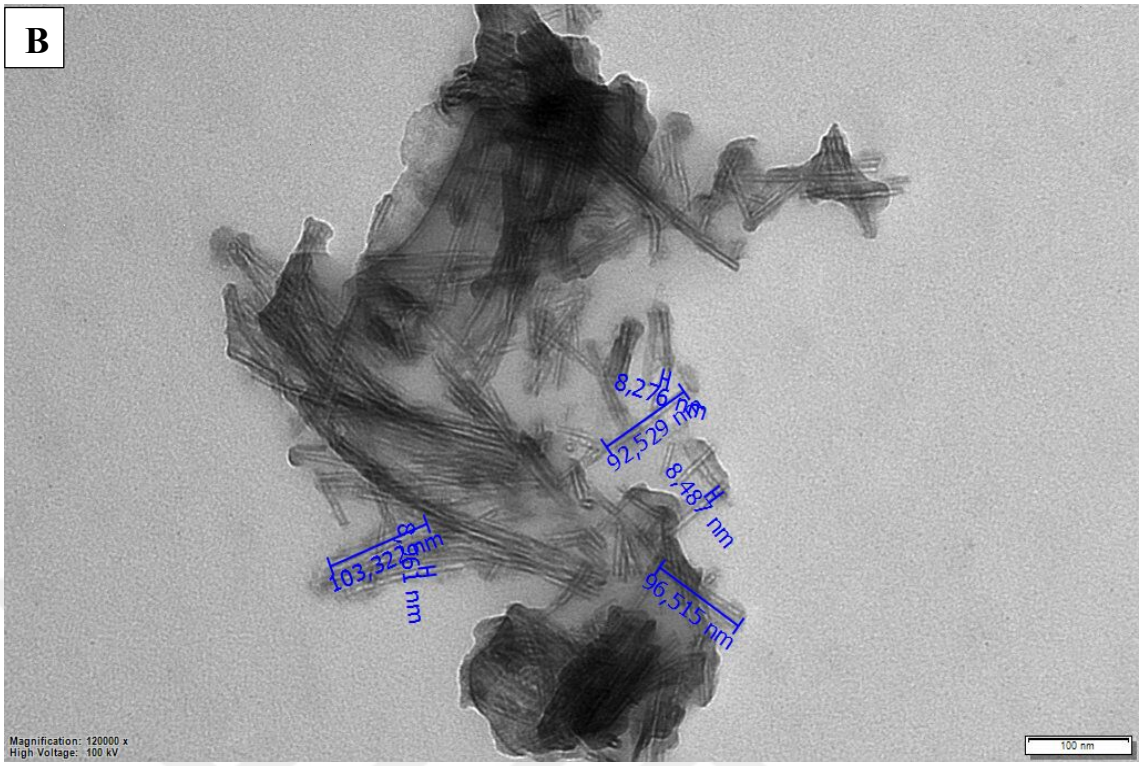


Şekil 4.1. Boş TiO_2 nanotüplerin (A) ve gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin (B) FESEM görüntüleri

4.1.2. Transmisyon elektron mikroskobi TEM

Transmisyon elektron mikroskobu mikrofotoğrafları hazır numune için sırasıyla Şekil 4.2 a ve b de gösterilmiştir. TEM görüntülerinde her iki nanotüp türünün morfolojisi, boyutu ve dağılımı görülmektedir. TNT ve AgTNT' nin ortalama uzunluğu yaklaşık 100 nm olan tübüler bir şekil içinde dağıldığı oldukça net anlaşılmaktadır. Her iki resimde de ortalama çapı 8 ila 12 nm arasında değişen, toplanmış olmayan nanotüpler görülmektedir. Gümüş ile titanyum nanotüplerin konjugasyonunun nanotüplerin şeklini değiştirmediği açıkça görülmektedir. Yapılan TEM analizinin sonuçları SEM sonuçlarıyla uyumludur ve nanotüplerin morfolojisini ve yapısını doğrulamıştır.

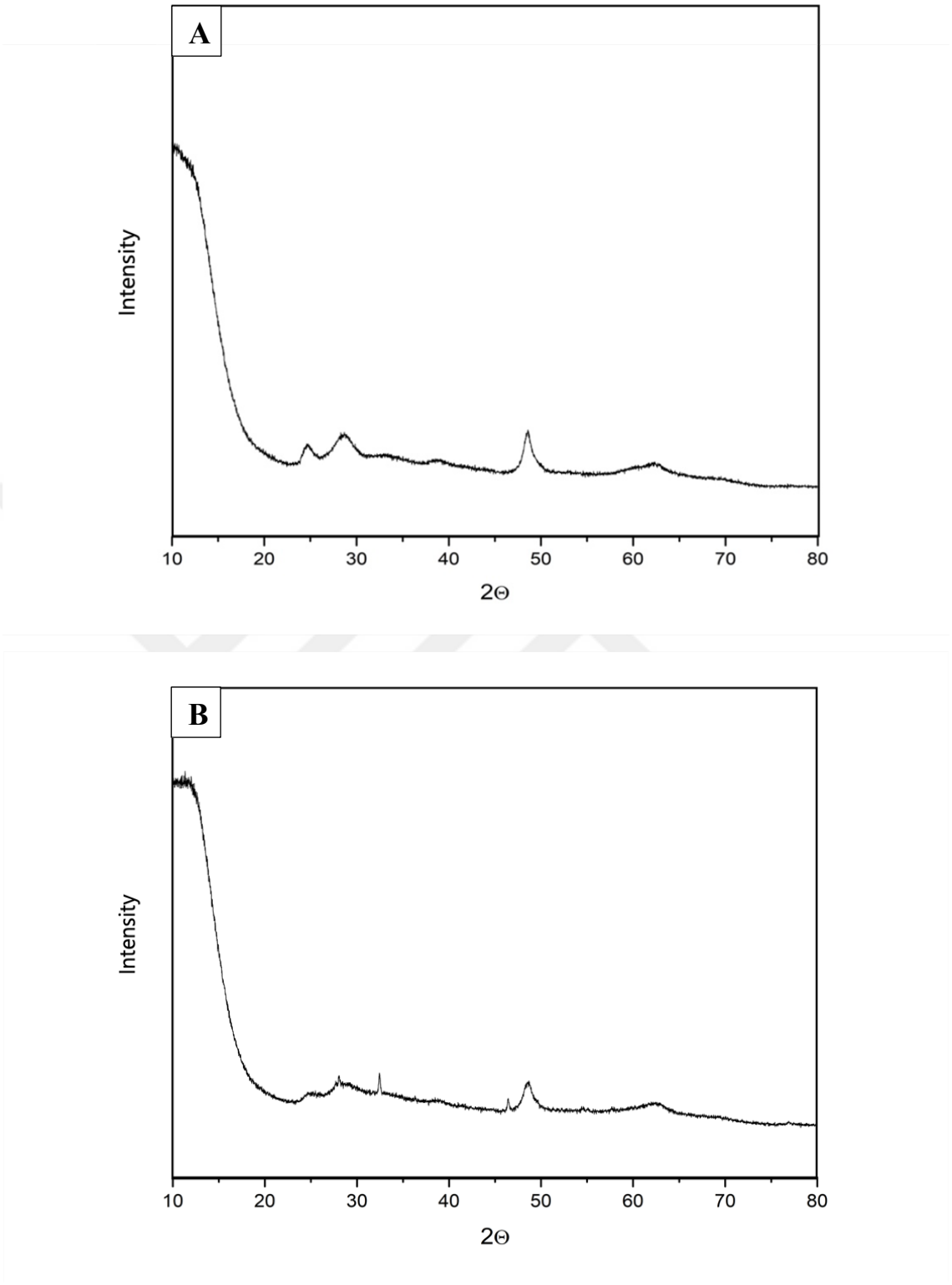




Şekil 4.2. Boş TiO_2 nanotüplerin (A) ve gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin (B) TEM görüntüleri

4.1.3. X- ışını Kırınımı XRD

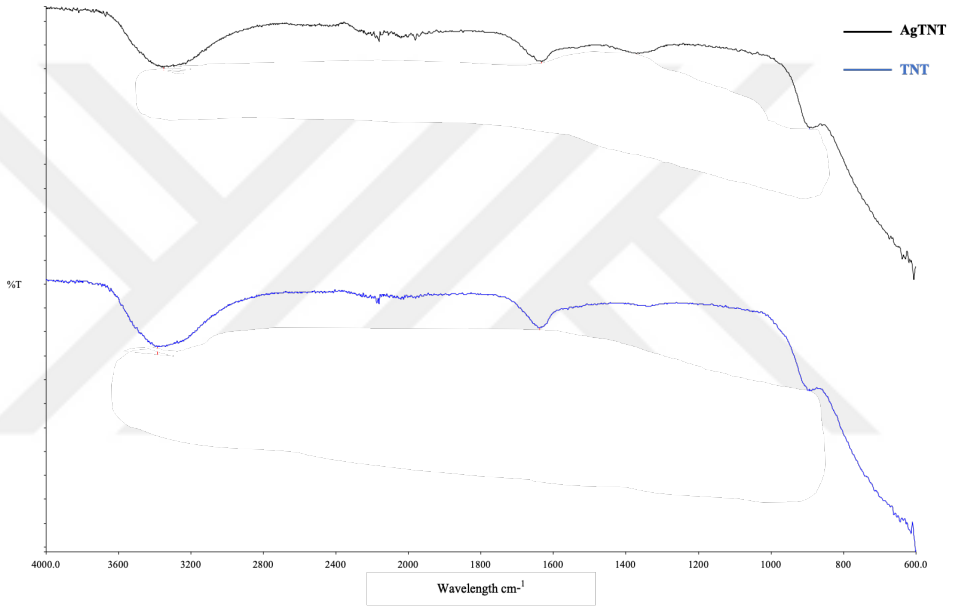
Şekil 4.4 hidrotermal işlemin ardından boş ve Ag ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerinin XRD görüntülerini göstermektedir. Şekil 4.4.a'da 2θ aralığında 24,24°, 28,36°, 48,28° ve 62,7°'de gözlenen kırınım pikleri TiO_2 yapısının anataz fazına ilişkilendirilmektedir. TNT' nin Ag ile yüklenmesini takiben, TNT piklerine 2θ=32,38° ve 2θ=46,36°'de iki ek pikin gelişimi gözlenmiştir (Şekil 4.4.b). Bu pikler Ag'nin TNT' lere başarıyla yüklendiğini ve Ag yüklemesinin TNT' lerin kristal yapısını önemli ölçüde etkilemediğini göstermektedir.



Şekil 4.3. Boş TiO_2 nanotüplerin (A) ve gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin (B) X-ışını kırınımı görüntüleri.

4.1.4. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi FTIR

TNT ve AgTNT nanokompozitlerinin FTIR spektrumları Şekil 4.4.'te sunulmaktadır. FTIR spektrumu, sentezlenen nanotüplerde bulunan 4000 ila 600 cm^{-1} arasında değişen fonksiyonel grupların ayrıntılarını göstermektedir. Her iki spektrumda da 3500 ve 3100 cm^{-1} arasında geniş bir absorpsiyon vibrasyonu gözlenmektedir. Yaklaşık 1650 cm^{-1}, 900 cm^{-1} ve 600 cm^{-1} de üç pik daha görülmektedir. IR spektrumu da TNT eğrisi ile AgTNT eğrisi arasında biraz değişkenlik göstermekte olup farklı dalga boylarında (yaklaşık 1900 cm^{-1} ve 1370 cm^{-1}) iki pik ortaya çıkmaktadır.

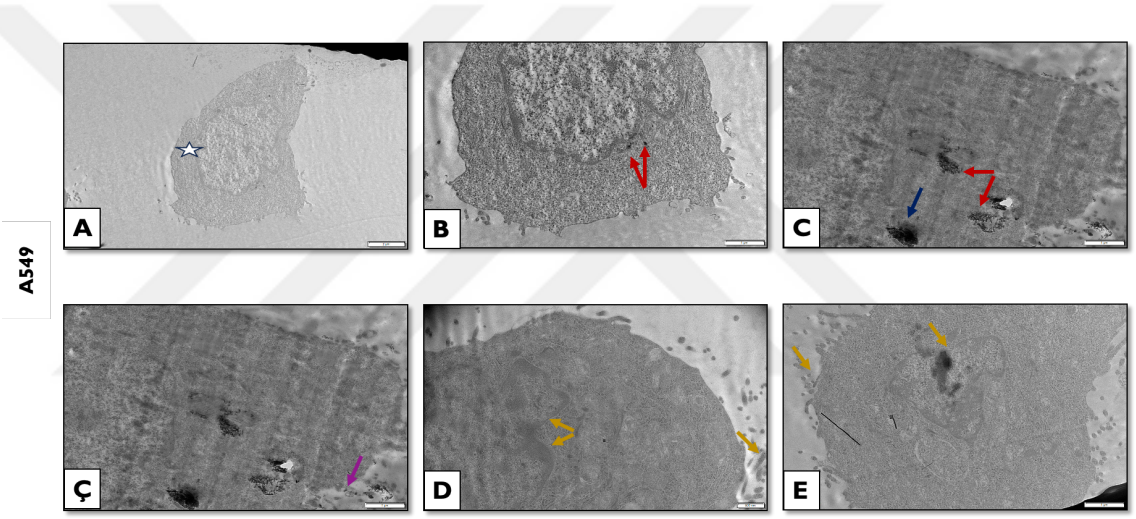


Şekil 4.4. Boş TiO_2 nanotüplerin ve gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin FTIR görüntüleri.

4.2. Nanotüplerin hücre içi girişi ve lokalizasyonunun TEM ile görüntülenmesi

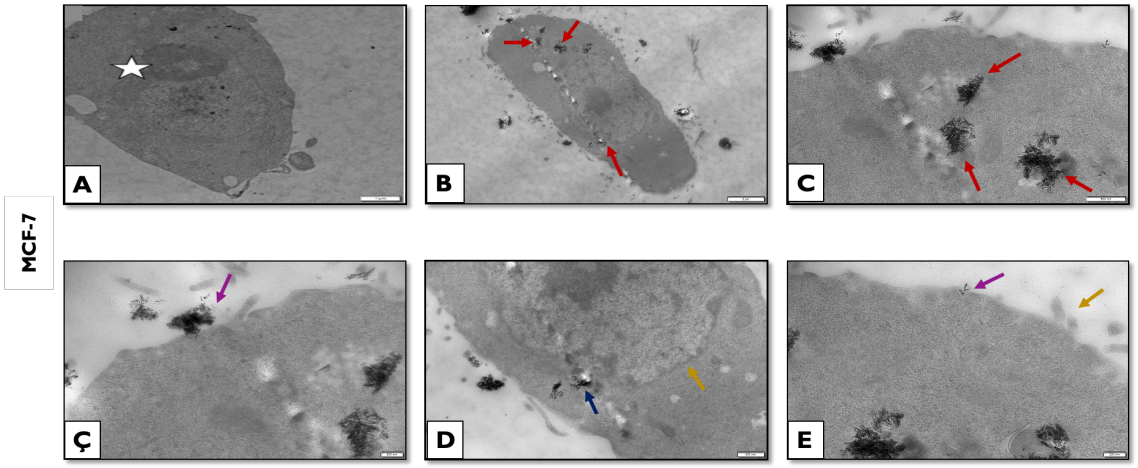
Hücrelerdeki titanyum nanotüpleri lokalize etmek için her bir hücre hattı (A549, HT-29, MCF-7) AgTNT (**IC_{25}** dozları) ile muamele edilmiş ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. **IC_{25}** dozları XTT hücre canlılığı deneyi kullanılarak tanımlanmıştır. Hücreler daha sonra glutaraldehit ile fikse edilmiştir ve TEM mikroskobu kullanarak incelenmek üzere bir protokole göre hazırlanmıştır. Elde edilen görüntüler Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7'de görülmektedir.

AgTNT uygulanmayan kontrol grubunu Şekil 4.5.a'da gösterilmiştir. Sitoplazmik veya çekirdek deformasyonu göstermeyen normal bir kanser hücresi görülmektedir. Şekil 4.5.b ve c nanotüpler içeren sitoplazmik veziküllerin oluşumunu göstermiştir. Ayrıca aynı veziküller çekirdek zarı yakınında da tespit edilmiştir, bu da nanotüplerin hücre çekirdeğine ulaşabildiğini göstermiştir. Şekil 4.5.ç' te nanotüplerin hücre zarına yaklaştığı ve tutunduğu görülmüştür. Fagositoz sürecinin başladığını gösteren, nanotüplerin hücre zarı etrafında çevrelenmeye başlaması gözlemlenmektedir. Şekil 4.5.d ve e özellikle küresel hücreler, çekirdek zarın düzensizliği, hücre zarın yoğunlaşması, membranda kabarcık ve birkaç apoptoz cisimciğin oluşumu gibi erken apoptoz özelliklerini gösteren hücreleri göstermiştir.



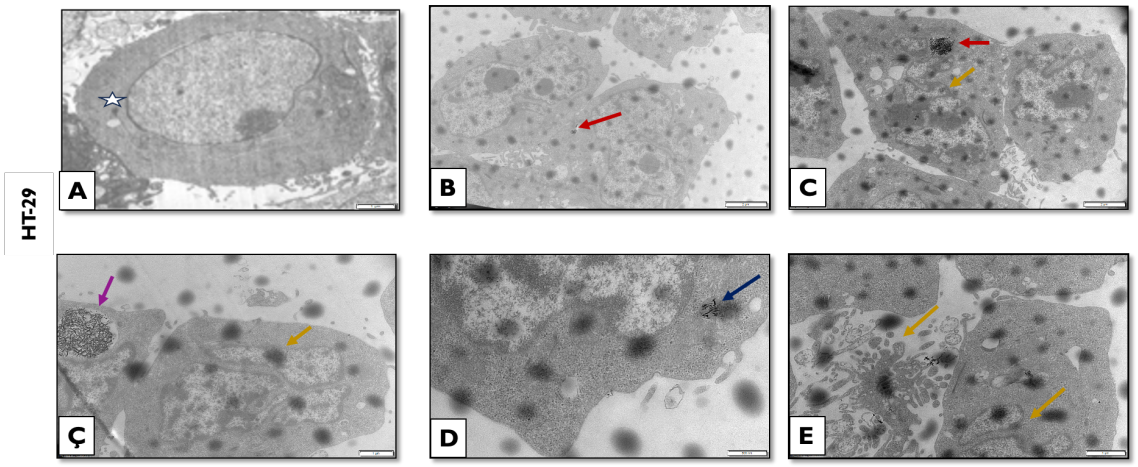
Şekil 4.5. Gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin A549 hücreleri içindeki TEM görüntüleri

Aynı gözlemler MCF-7 hücreleri üzerinde de yapılmıştır (Şekil 4.6). Çekirdek etrafında nanotüp vezikülleri gözlemlenmiş ve bu veziküllerin çekirdek zarı üzerinde bir tür baskı oluşturduğu görülmüştür. Nanotüplerin fagositoz sürecini tetiklemek için hücre zarına yapışması daha görünür olmuştur (Şekil 4.6.ç, e). Hücre zarında, çekirdeğinde ve sitoplazmasında değişiklikler gözlenmiş, ancak A549 hücrelerine göre daha az belirgin olmuştur.



Şekil 4.6. Gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin MCF-7 hücreleri içindeki TEM görüntüleri

Benzer gözlemler HT-29 hücrelerinde de yapılmış ancak A549 ve MCF-7 hücrelerine göre daha belirgin olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Şekil 4.7.b ve c' de hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinde vezikül şeklinde nanotüp kümeleri görülmüştür. Şekil 4.7.ç' te fagositoz aracılığıyla hücre tarafından absorbe edilmiş bir nanotüp kümesi görülmüştür. Ayrıca şekil 4.7 c-ç-d-e' de yoğunlaşmış kromatin, düzensiz bir çekirdek zarı ve apoptoz cisimcikler içeren küresel hücreler görülmüştür.



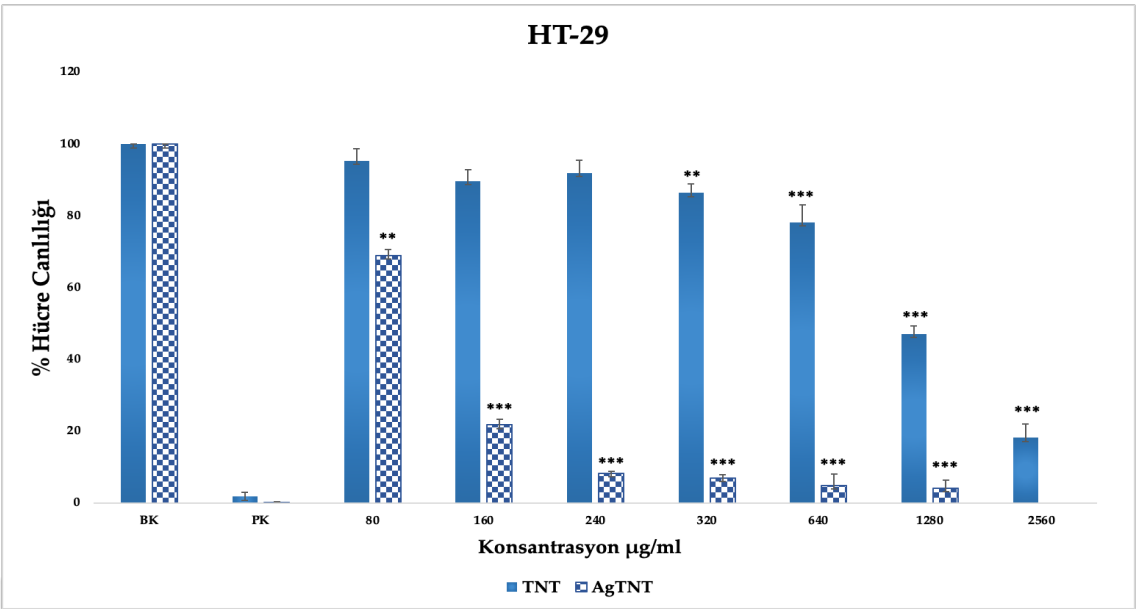
Şekil 4.7. Gümüş ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin HT-29 hücreleri içindeki TEM görüntüleri.

4.3. Titanyum nanotüplerin sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi

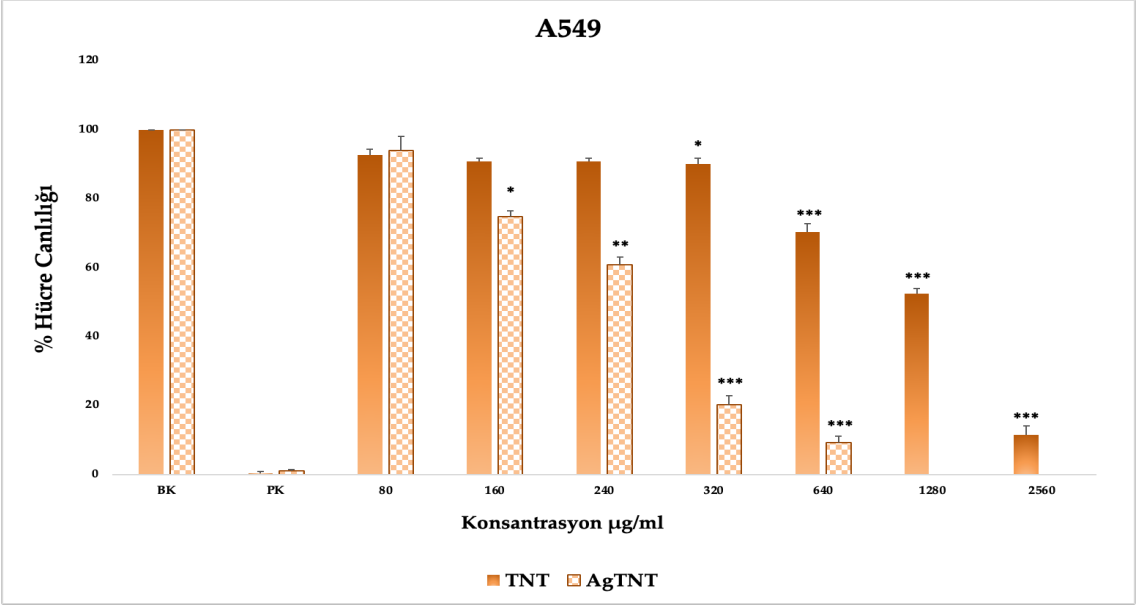
Boş titanyum ve gümüş ile yüklenmiş titanyum nanotüplerin üç hücre hattı olan HT-29, A549 ve MCF-7 üzerindeki sitotoksik etkisi 24 saatlik bir süre boyunca XTT testi kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca analiz için iki kontrol numunesi kullanılmıştır: bunlardan birinde negatif kontrol olarak kullanılan kuyucuklara hiçbir şey eklenmemiş, diğerinde ise pozitif kontrol olarak kullanılan hidrojen peroksit (3 μM) kullanılmıştır. Karşılaştırmalı istatistiksel analiz için, tüm numuneler negatif kontrol hücreleriyle karşılaştırılmıştır. Şekil 4.8, 4.9, 4.10 80 μg/ml ile 2560 μg/ml arasında değişen nanotüpler konsantrasyonları ile muameleden sonra her bir kuyucuktaki canlı hücrelerin miktarlarını göstermektedir. 24 saatlik muameleden sonra, AgTNT nanotüpleri üç hücre hattı üzerinde önemli ölçüde yüksek sitotoksik etkiler sergilemiştir.

A549 ve MCF-7 hücre hatlarında, sırasıyla 160 μg/ml ve 240 μg/ml AgTNT konsantrasyonundan itibaren canlı hücre sayısında anlamlı bir düşüş gözlenirken, HT-29 hücrelerinde AgTNT 80 μg/ml konsantrasyonundan itibaren anlamlı bir antiproliferatif etki göstermiştir. Böylece canlı HT-29 hücreleri miktarı 80 μg/ml'de 69,2 ± 1,66 ($p \leq 0,01$), A549 hücreleri 160 μg/ml'de 74,70 ±1,85 ($p \leq 0,05$) ve MCF-7 hücreleri 240 μg/ml'de 73,27 ± 2,75 olarak bulunmuştur ($p \leq 0,01$).

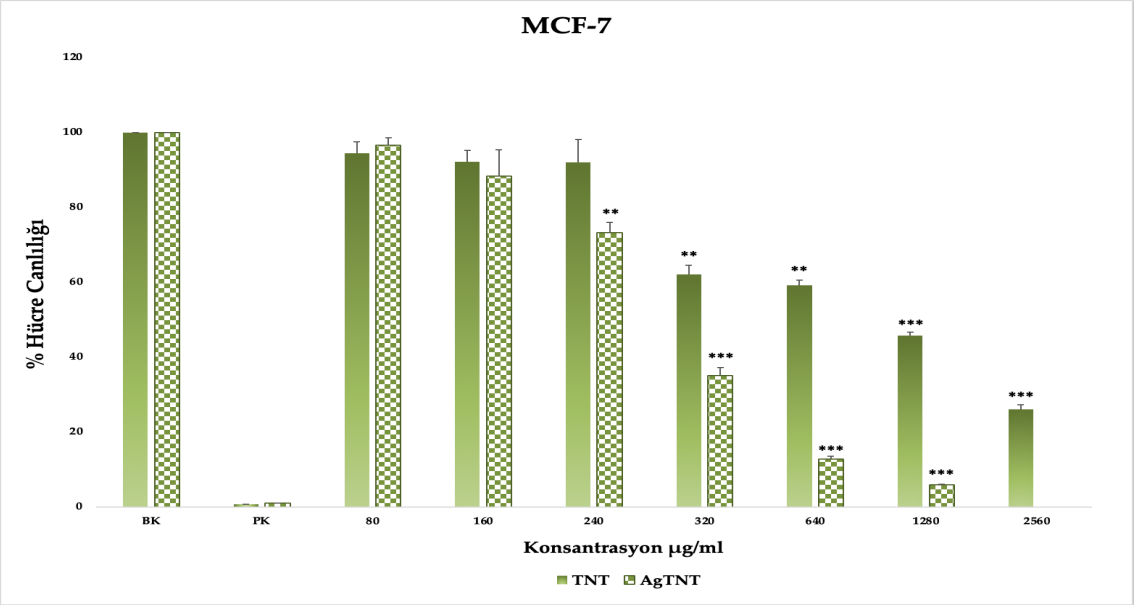
Hücrelerin TNT nanotüplerle muamelesi de hücre canlılığında bir azalmaya neden olmuştur. Negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olmakla birlikte, TNT nanotüplerin sitotoksik etkisi AgTNT nanotüplerinkinden daha az olmuştur. TNT nanotüplerin antiproliferatif etkisi tüm hücre hatlarında 320 μg/ml'den itibaren gözlenmiştir. Canlı hücre sayısı 320 μg/ml'de her hücre hattı için şöyledir, HT-29: 86,46 ± 2,56; A549: 90,13 ± 0,89; MCF-7: 62,07 ± 2,41. Elde edilen tüm veriler kullanarak, her bir hücre hattı için TNT ve AgTNT nanotüplerin farklı $\mathbf{IC_{50}}$ dozlarını belirlenmiştir. Hücre hatları için $\mathbf{IC_{50}}$ değerleri şu şekilde bulunmuştur: HT-29 111,46 μg/ml, A549 300 μg/ml ve MCF-7 310 μg/ml. Diğer deneyler için kullanılan **IC** değerleri çizelge 4.1'de özetlenmiştir.



Şekil 4.8. TNT ve AgTNT nanotüplerin 24 saatlik uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının hücre canlılığı (*p≤0,05 olanlar * ile, p≤0,01 ** ile , p≤0,001 *** ile belirtilmiştir)*



Şekil 4.9. TNT ve AgTNT nanotüplerin 24 saatlik uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının hücre canlılığı (*p≤0,05 olanlar * ile, p≤0,01 ** ile, p≤0,001 *** ile belirtilmiştir)*



Şekil 4.10. TNT ve AgTNT nanotüplerin 24 saatlik uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının hücre canlılığı (*p≤ 0,05 olanlar * ile, p≤ 0,01 ** ile , p≤ 0,001 *** ile belirtilmiştir)*

Çizelge 4.1. Titanyum nanotüplerinin HT-29, A549 ve MCF-7 hücrelerindeki IC değerleri

Nanotüp Türü	**HT-29** *(µg/ml)*				**A549** *(µg/ml)*				**MCF-7** *(µg/ml)*			
	$IC_{12,5}$	**IC_{25}**	**IC_{50}**	**IC_{75}**	**$IC_{12,5}$**	**IC_{25}**	**IC_{50}**	**IC_{75}**	**$IC_{12,5}$**	**IC_{25}**	**IC_{50}**	**IC_{75}**
TNT	317,5	635	1270	2177	344,7	689,5	1379	2068	320,2	640,4	1280	1921
AgTNT	27,86	55,73	111,4	167,1	75	150	300	450	77,5	155	310	465

4.4.Titanyum nanotüplerin genotoksik etkisinin Alkalin Komet deneyi kullanılarak değerlendirilmesi

Bu çalışmada, TNT ve AgTNT nanotüplerin genotoksik özelliğini değerlendirmek için alkalin komet deneyi kullanılmış ve komet kuyruğunun uzunluğu, kuyruk DNA yüzdesi ve Olive kuyruk momenti DNA hasarının nicel değerlendirmesi için parametreler olarak kullanılmıştır. Bu deneyi gerçekleştirmek için hücre hatları (HT-29, A549 ve MCF-7) 24 saat boyunca **$IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50}** ve **IC_{75}** dozlarında titanyum nanotüplerle muamele edilmiştir. Elde edilmiş XTT sonuçlarına göre TNT nanotüpleri çok yüksek konsantrasyonlarda sitotoksisite etkisi göstermektedir. Dolaysıyla hücreler sadece

TNT'nin **$IC_{12,5}$** dozuna maruz bırakılmıştır. 200 μM' de pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit ve negatif kontrol olarak muamele edilmemiş hücrelerden oluşan bir grup kullanılmıştır. Hücrelerin muamelesinden sonra, elde edilmiş komet kuyruk uzunluğu (μm), DNA yüzdesi (%) ve Olive tail momenti (OTM) ortalama değerleri Çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. HT-29, A549 ve MCF-7 hücre hatlarının nanotüpler muamelesi sonrası Komet parametresinin ortalama değerleri

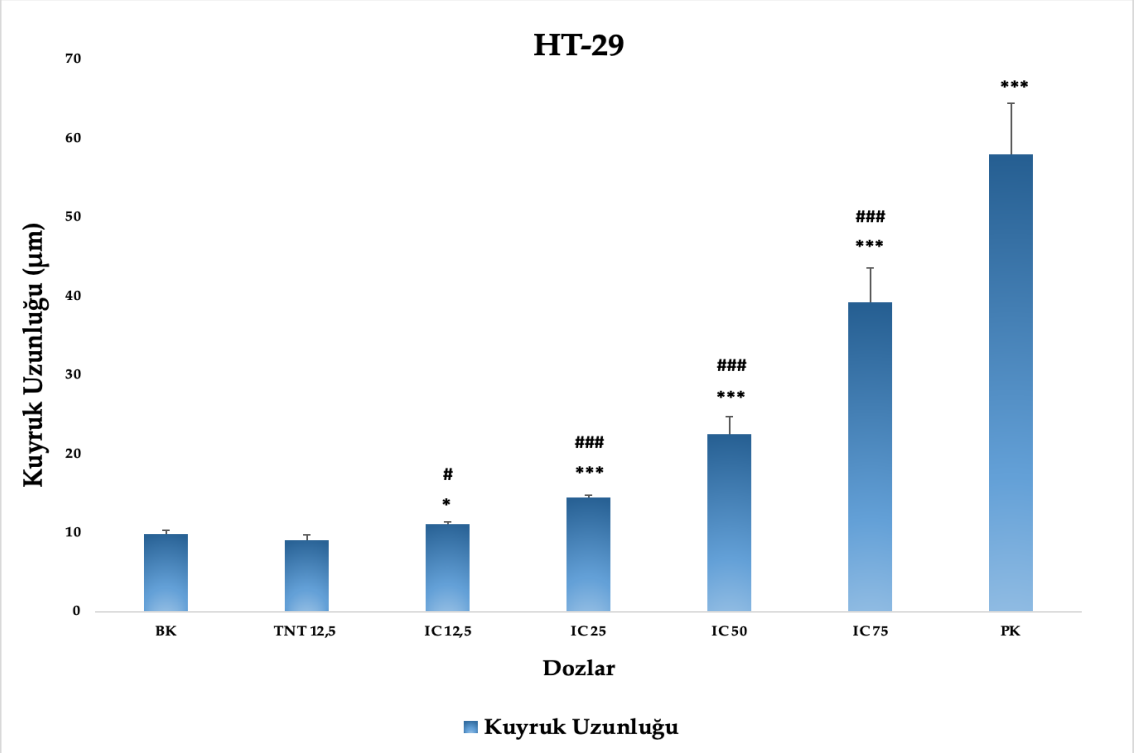
Hücre Hatları / Dozlar	HT-29			A549			MCF-7		
	Kuyruk Uzunluğu	**DNA Yüzdesi**	**OTM**	**Kuyruk Uzunluğu**	**DNA Yüzdesi**	**OTM**	**Kuyruk Uzunluğu**	**DNA Yüzdesi**	**OTM**
Büyüme Kontrol	9,85±0,47	27,41±2,24	3,53±0,13	6,64±0,59	11,78±3,4	1,42±0,4	13,86±0,74	37,98±2,54	6,97±0,45
TNT 12,5	9,08±0,68	27,96±0,62	2,97±0,42	6,35±0,38	14,64±0,81	1,65±0,04	10,29±0,27	36,10±4,06	4,22±0,25
$IC_{12,5}$	11,12±0,33$^{*\#}$	29,45±1,66	3,80±0,13	7,72±0,91$^{**\#}$	18,09±2,04	2,14±0,32$^{**\#\#}$	14,74±3,37	36,74±4,6	6,16±1,8
IC_{25}	14,49±0,34$^{***\#\#\#}$	37,99±1,12$^{***\#\#\#}$	5,09±0,35$^{***\#\#\#}$	10,54±1,09$^{**\#\#}$	21,90±1,71$^{***\#\#\#}$	3,83±0,68$^{***\#\#\#}$	21,56±3,9$^{**\#\#}$	48,75±4,43$^{*\#\#}$	8,96±1,78$^{*\#\#}$
IC_{50}	22,57±2,18$^{***\#\#\#}$	47,94±3,13$^{***\#\#\#}$	7,92±0,76$^{***\#\#\#}$	38,51±1,32$^{***\#\#\#}$	43,91±1,6$^{***\#\#\#}$	13,56±0,58$^{***\#\#\#}$	54,7±4,59$^{***\#\#\#}$	60,39±2,58$^{**\#\#\#}$	25,87±3,6$^{***\#\#\#}$
IC_{75}	39,23±4,39$^{***\#\#\#}$	53,63±3,03$^{***\#\#\#}$	15,62±2,01$^{***\#\#\#}$	57,79±5,32$^{***\#\#\#}$	58,83±4,88$^{***\#\#\#}$	24,54±3,4$^{***\#\#\#}$	63,98±2,49$^{***\#\#\#}$	66,81±3,66$^{***\#\#\#}$	28,6±2,11$^{***\#\#\#}$
Pozitif Kontrol	57,99±6,52***	61,25±8,88***	23,99±3,83***	69,92±5,09***	68,35±4,43***	32,2±4,97***	67,77±2,89***	70,98±3,87***	30,43±1,74***

*Ortalama değerler standart sapmaları ile gösterilmiştir ($p \leq 0,05$ olanlar */# ile, $p \leq 0,01$ **/## ile, $p \leq 0,001$ ***/### ile belirtilmiştir. *Kontrol grubu ile karşılaştırma # TNT 12,5 dozu ile karşılaştırma)*

4.4.1. Titanyum nanotüplerin kuyruk uzunluğu sonuçları

Büyüme kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kuyruk uzunluğu değeri tüm hücre hatlarında doza bağlı bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır (Şekil 4.11, 4.12, 4.13).

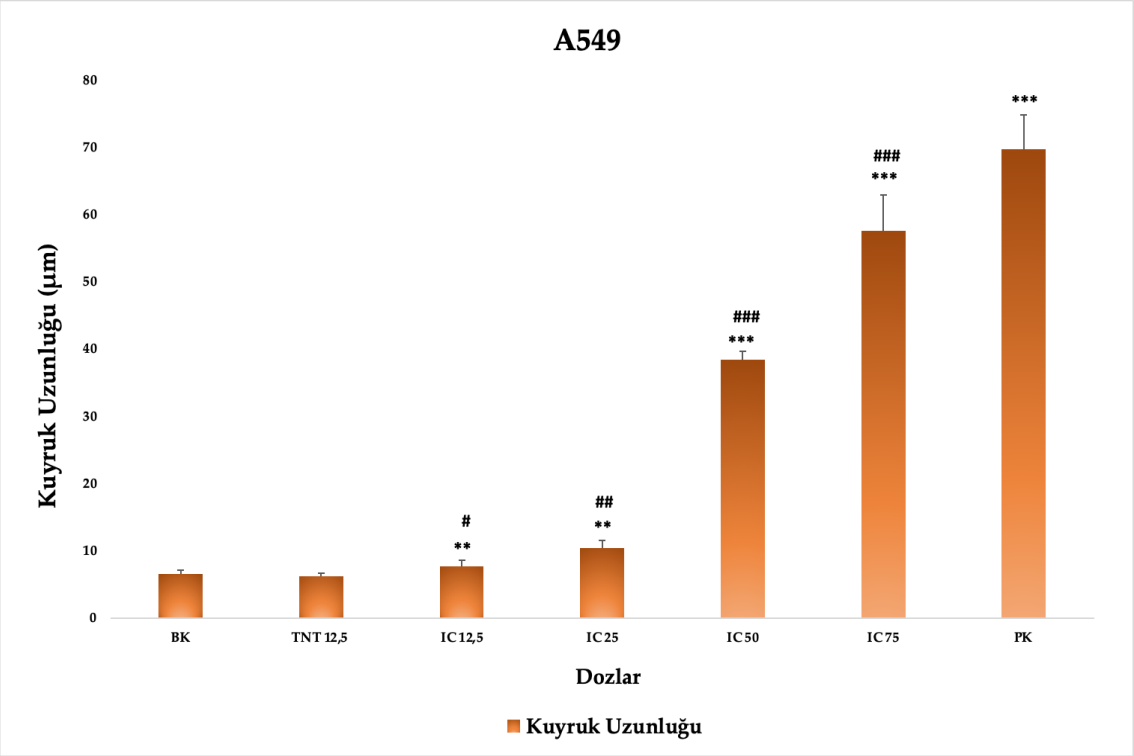
HT-29 hücrelerinde kontrol grubunun kuyruk uzunluğu değeri 9,85±0,47 olup **TNT 12,5** (9,08±0,68) ile muamele edilen hücrelerin değerine yaklaşık olarak eşittir (*p>0,05*). AgTNT uygulaması, ilgili **$IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50}** ve **IC_{75}** dozlarında sırasıyla 11,12±0,33 (*p<0,05*); 14,49±0,34 (*p<0,001*); 22,57±2,18 (*p<0,001*); 39,23±4,39 (*p<0,001*) kuyruk uzunluğu değerine neden olmuştur. Kuyruk uzunluğu değerindeki bu anlamlı artış **TNT 12,5** grubuyla karşılaştırıldığında da fark edilmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının komet kuyruk uzunluğu değeri *(p≤ 0,05 olanlar */# ile, p≤ 0,01 **/## ile, p≤ 0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

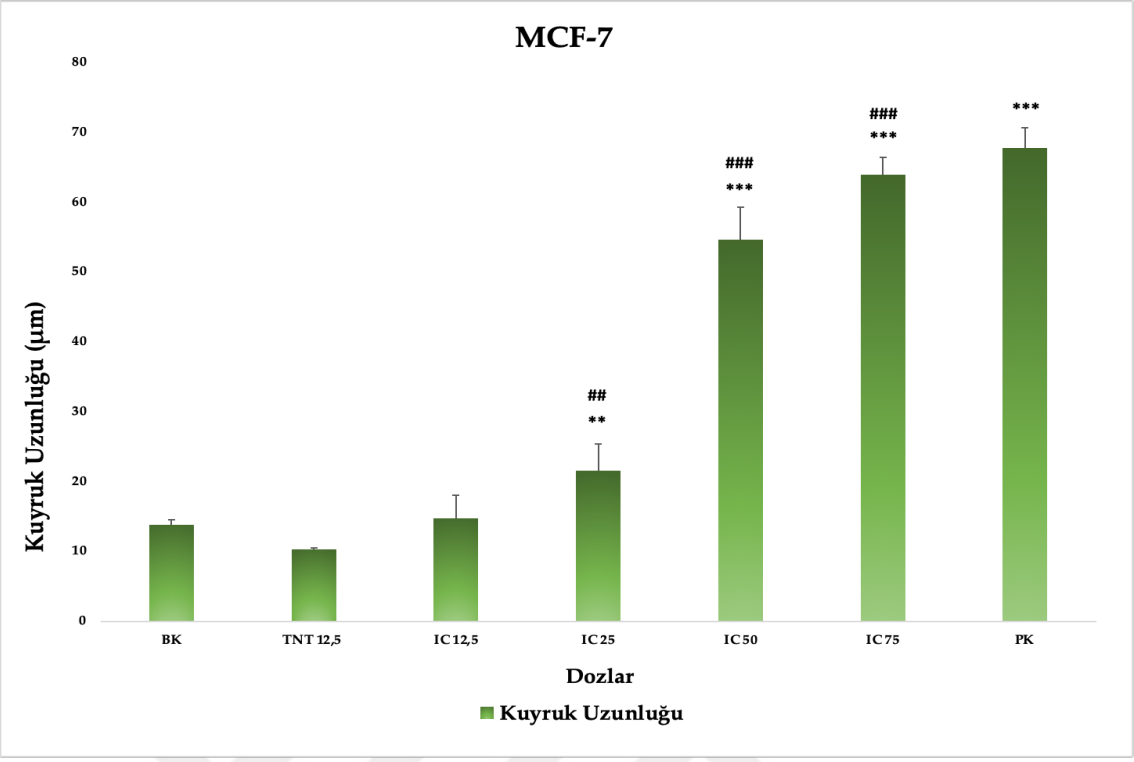
Benzer şekilde, A549 hücrelerindeki kuyruk uzunluğu değerleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. Her bir doz için elde edilen değerler

şunlardır: **BK:** 6,64±0,59; **TNT 12,5:** 6,35±0,38 (*p>0,05*); **$IC_{12,5}$:** 7,72±0,91 (*p<0,01*); **IC_{25}:** 10,54±1,09 (*p<0,01*); **IC_{50}:** 38,51±1,32 (*p<0,001*); ve **IC_{75}:** 57,79±5,32 (*p<0,001*); (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının komet kuyruk uzunluğu değeri *(p≤ 0,05 olanlar */# ile, p≤ 0,01 **/## ile, p≤ 0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

MCF-7 hücreleri için, nanotüplerle muameleden sonra elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri **BK:** 13,86±0,74; **TNT 12,5:** 10,29±0,27 (*p>0,05*); **$IC_{12,5}$:** 14,74±3,37; **IC_{25}:** 21,56±3,9 (*p<0,01*); **IC_{50}:** 54,7±4,59 (*p<0,001*) ve **IC_{75}:** 63,98±2,49 (*p<0,001*) olarak belirlenmiştir. **IC_{25}** dozundan başlayarak, dozlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. **TNT 12,5** grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmamasına rağmen, **TNT 12,5** grubu ile **IC_{25}** (*p<0,01*)**, IC_{50}** (*p<0,001*) ve **IC_{75}** (*p<0,001*) dozları arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (Şekil 4.13).

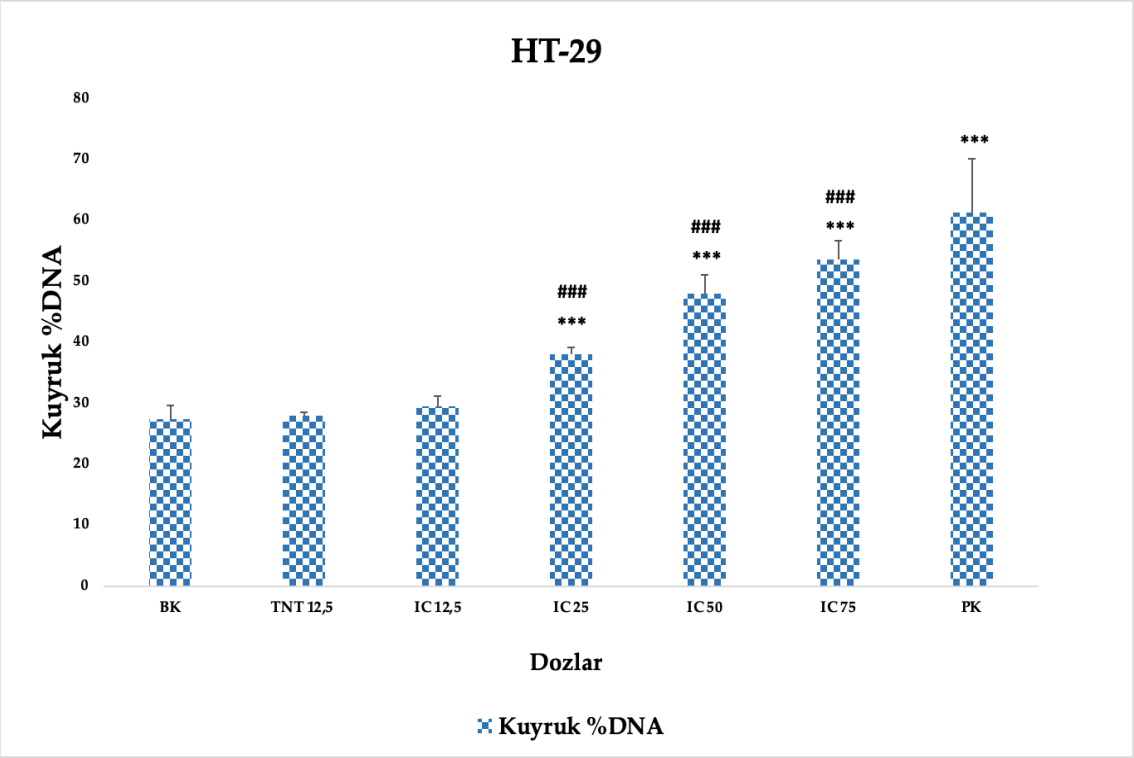


Şekil 4.13. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının komet kuyruk uzunluğu değeri *(p≤ 0,05 olanlar */# ile, p≤ 0,01 **/## ile, p≤ 0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

4.4.2. Titanyum nanotüplerin Kuyruk % DNA sonuçları

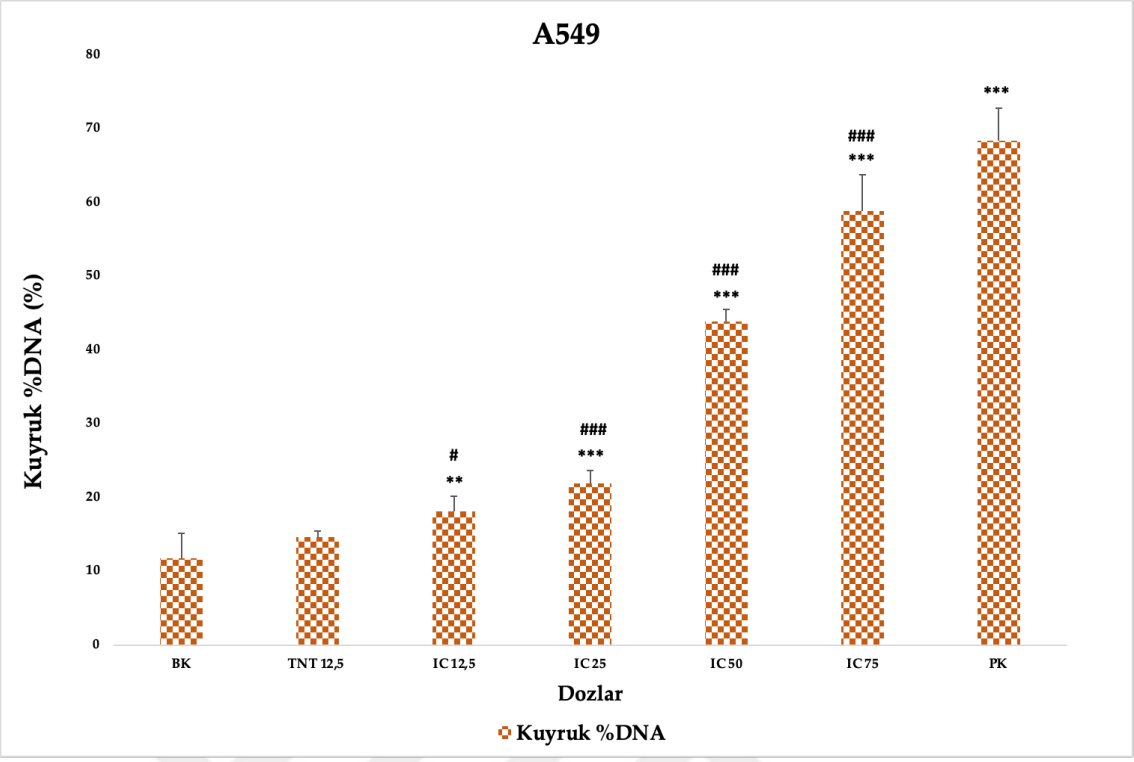
Kuyruk % DNA ölçümlerinin sonuçları, DNA'nın komet kuyruklarına geçişinin tüm hücre hatlarında **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozlarında önemli ölçüde arttığını göstermiştir.

HT-29 hücre hatlarında ortalama kuyruk % DNA değeri büyüme kontrol grubunda 27,41±2,24 ve pozitif kontrol grubunda 61,25±8,88 olarak saptanmıştır. HT-29 hücrelerinin AgTNT' nin **$IC_{12,5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozları ile muamele edilmesiyle elde edilen ortalama kuyruk % DNA değerleri sırasıyla 29,45±1,66 (*p>0,05*); 37,99±1,12 (*p<0,001*); 47,94±3,13 (*p<0,001*); 53,63±3,03 (*p<0,001*) bulunmuştur. Kontrol grubunun ortalama kuyruk % DNA değeri elde edilmiş IC doz değerleri ile karşılaştırıldığı zaman, doz kaynaklı artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile **TNT 12,5** (27,96±0,62) (*p>0,05*) grubu arasında fark gözlenmemesine rağmen, **TNT 12,5** grubu ile **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4.14).



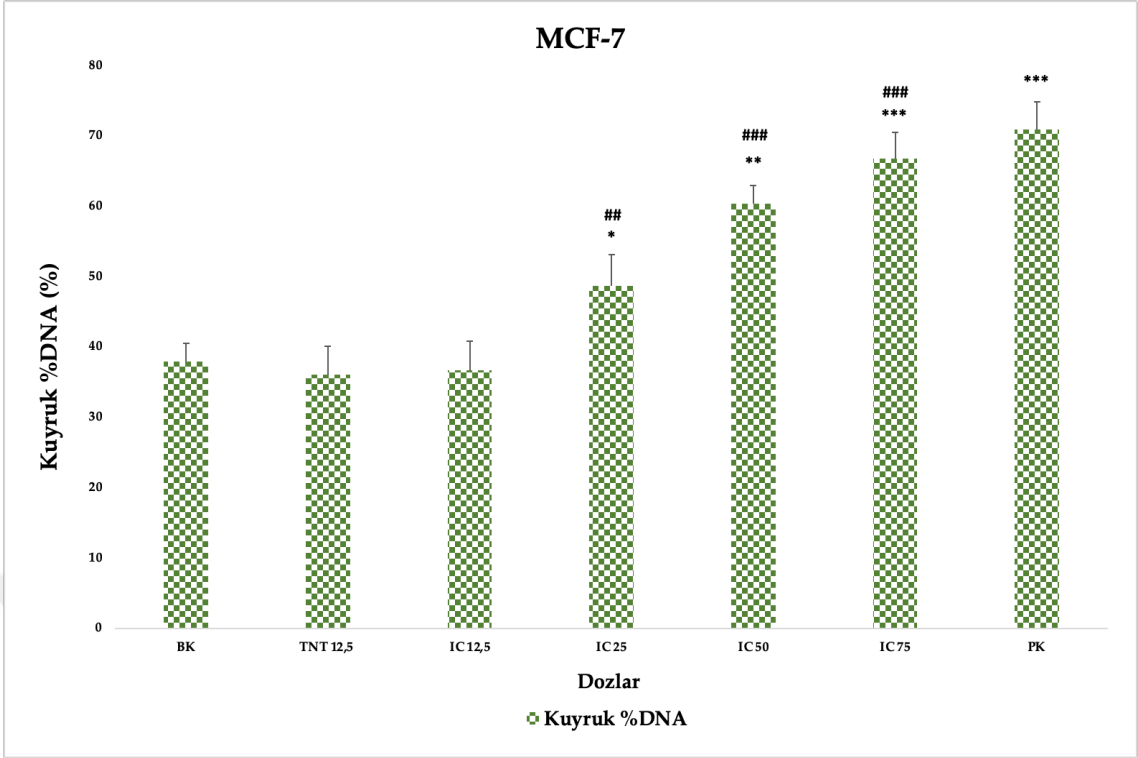
Şekil 4.14. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının kuyruk % DNA değeri *(p≤ 0,05 olanlar */# ile, p≤ 0,01 **/## ile, p≤ 0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

A549 hücre hatlarında ortalama kuyruk % DNA değeri büyüme kontrol grubunda 11,78±3,4 ve pozitif kontrol grubunda 68,35±4,43 olarak saptanmıştır. A549 hücrelerinin AgTNT' nin **$IC_{12,5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozları ile muamele edilmesiyle elde edilen ortalama kuyruk % DNA değerleri sırasıyla 18,09±2,04 (*p<0,01*); 21,90±1,71 (*p<0,001*); 43,91±1,6 (*p<0,001*); 58,83±4,88 (*p<0,001*) bulunmuştur. Kontrol grubunun ortalama kuyruk % DNA değeri elde edilmiş IC doz değerleri ile karşılaştırıldığı zaman, doz kaynaklı artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile **TNT 12,5** (14,64±0,81) (*p>0,05*) grubu arasında fark gözlenmemesine rağmen, **TNT 12,5** grubu ile **$IC_{12,5}$** (*p<0,05*); **IC_{25}** (*p<0,001*); **IC_{50}** (*p<0,001*) ve **IC_{75}** (*p<0,001*) dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının kuyruk % DNA değeri *(p≤ 0,05 olanlar */# ile, p≤ 0,01 **/## ile, p≤ 0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

MCF-7 hücre hatlarında ortalama kuyruk % DNA değeri büyüme kontrol grubunda 37,98±2,54 ve pozitif kontrol grubunda 70,98±3,87 olarak saptanmıştır. MCF-7 hücrelerinin AgTNT' nin **$IC_{12,5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozları ile muamele edilmesiyle elde edilen ortalama kuyruk % DNA değerleri sırasıyla 36,74±4,6 (*p>0,05*); 48,75±4,43 (*p<0,05*); 60,39±2,58 (*p<0,01*); 66,81±3,66 (*p<0,001*) bulunmuştur. Kontrol grubunun ortalama kuyruk % DNA değeri elde edilmiş **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** doz değerleri ile karşılaştırıldığı zaman, doz kaynaklı artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile **TNT 12,5** (14,64±0,81) (*p>0,05*) grubu arasında fark gözlenmemesine rağmen, **TNT 12,5** grubu ile **IC_{25}** (*p<0,01*); **IC_{50}** (*p<0,001*) ve **IC_{75}** (*p<0,001*) dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4.16).

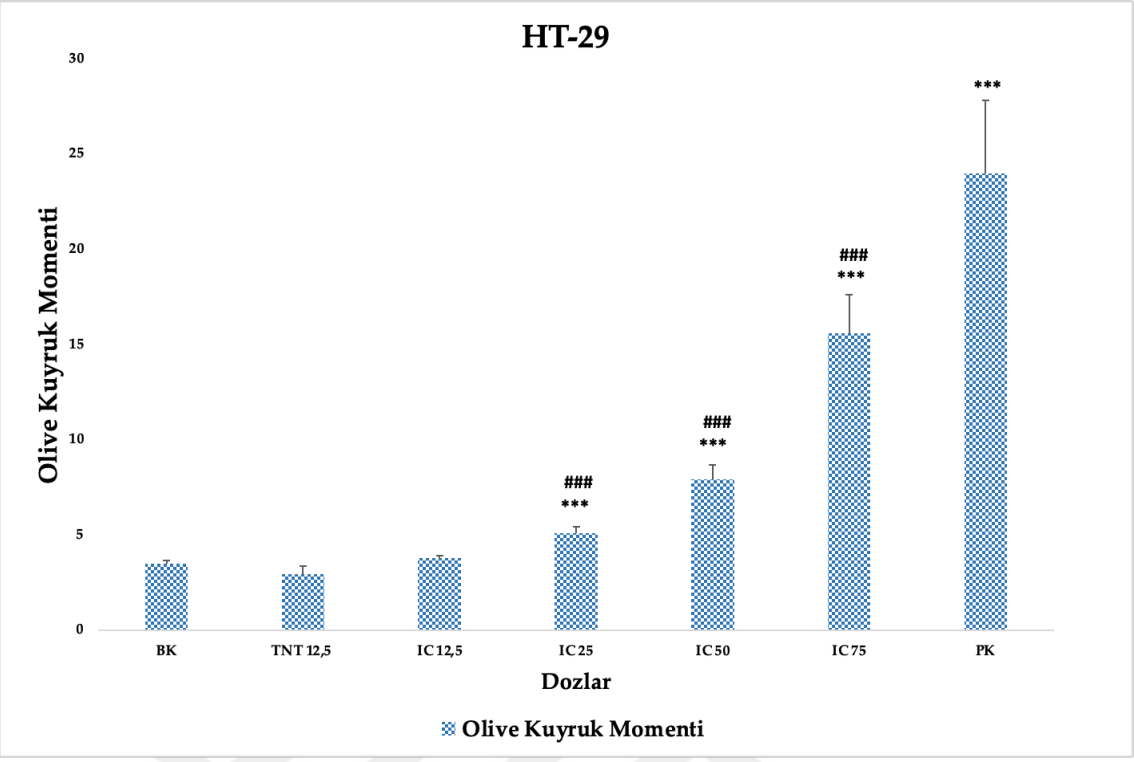


Şekil 4.16. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının kuyruk % DNA değeri *(p≤ 0,05 olanlar */# ile, p≤ 0,01 **/## ile, p≤ 0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

4.4.3. Titanyum nanotüplerin Olive Tail Momenti sonuçları

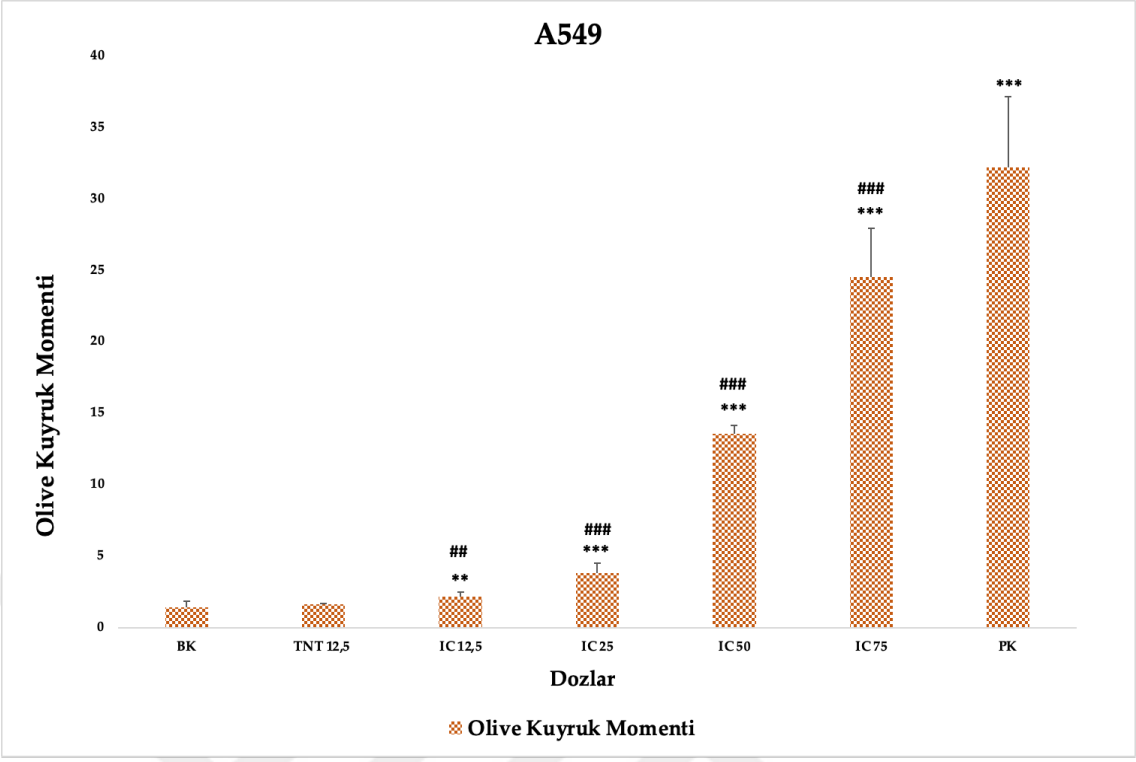
Olive tail momenti değerleri AgTNT ile muamele edilen tüm hücrelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olmuştur.

HT-29 hücre hatlarında ortalama OTM değeri büyüme kontrol grubunda 3,53±0,13 ve pozitif kontrol grubunda 23,99±3,83 olarak saptanmıştır. HT-29 hücrelerinin AgTNT' nin **$IC_{12,5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozları ile muamele edilmesiyle elde edilen ortalama OTM değerleri sırasıyla 3,80±0,13 (*p>0,05*); 5,09±0,35 (*p<0,001*); 7,92±0,76 (*p<0,001*); 15,62±2,01 (*p<0,001*) bulunmuştur. Kontrol grubunun ortalama OTM değeri elde edilmiş **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** doz değerleri ile karşılaştırıldığı zaman, doz kaynaklı artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile **TNT 12,5** (2,97±0,42) (*p>0,05*) grubu arasında fark gözlenmemesine rağmen, **TNT 12,5** grubu ile **IC_{25}** (*p<0,001*); **IC_{50}** (*p<0,001*) ve **IC_{75}** (*p<0,001*) dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4.17).



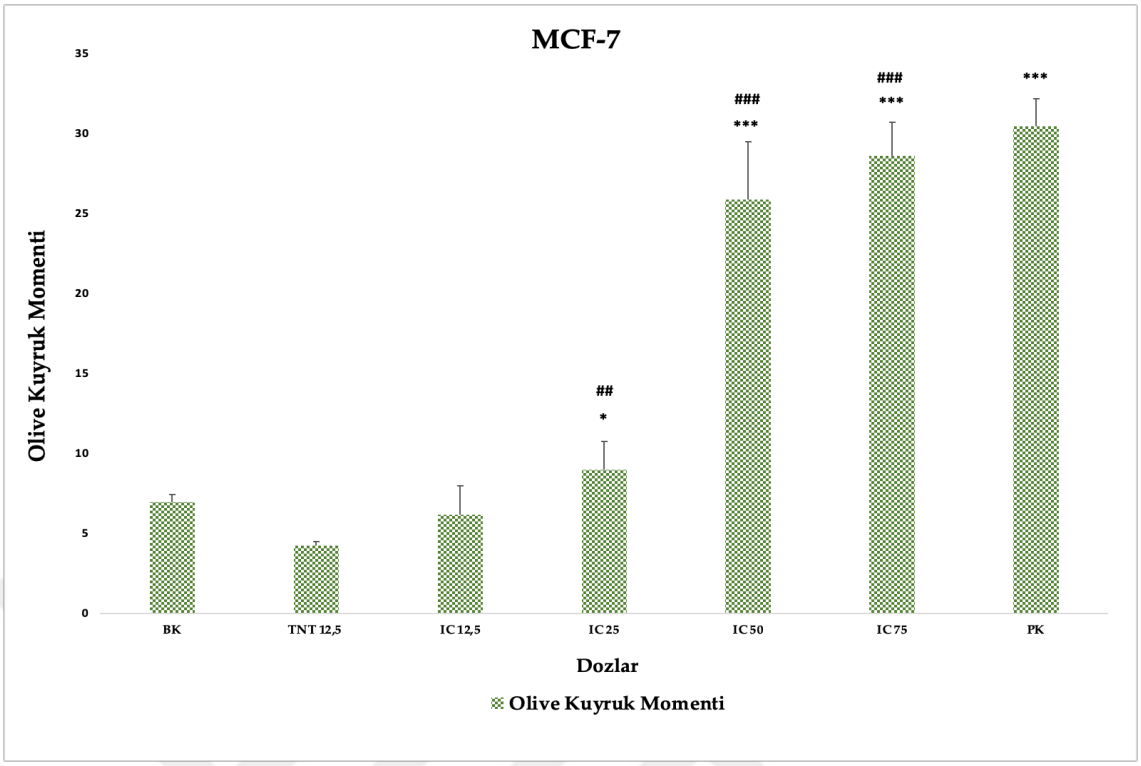
Şekil 4.17. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının OTM değeri *(p≤0,05 olanlar */# ile, p≤0,01 **/## ile, p≤0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

A549 hücre hatlarında ortalama OTM değeri büyüme kontrol grubunda 1,42±0,4 ve pozitif kontrol grubunda 32,2±4,97 olarak saptanmıştır. A549 hücrelerinin AgTNT' nin **$IC_{12,5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozları ile muamele edilmesiyle elde edilen ortalama OTM değerleri sırasıyla 2,14±0,32 (*p<0,01*); 3,83±0,68 (*p<0,001*); 13,56±0,58 (*p<0,001*); 24,54±3,4 (*p<0,001*) bulunmuştur. Kontrol grubunun ortalama OTM değeri elde edilmiş **IC** doz değerleri ile karşılaştırıldığı zaman, doz kaynaklı artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile **TNT 12,5** (1,65±0,04) (*p>0,05*) grubu arasında fark gözlenmemesine rağmen, **TNT 12,5** grubu ile **$IC_{12,5}$** (*p<0,01*), **IC_{25}** (*p<0,001*), **IC_{50}** (*p<0,001*) ve **IC_{75}** (*p<0,001*) dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının OTM değeri *(p≤0,05 olanlar */# ile, p≤0,01 **/## ile, p≤0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

MCF-7 hücre hatlarında ortalama OTM değeri büyüme kontrol grubunda 6,97±0,45 ve pozitif kontrol grubunda 30,43±1,74 olarak saptanmıştır. MCF-7 hücrelerinin AgTNT' nin **$IC_{12,5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozları ile muamele edilmesiyle elde edilen ortalama OTM değerleri sırasıyla 6,16±1,8 (*p>0,05*); 8,96±1,78 (*p<0,05*); 25,87±3,6 (*p<0,001*); 28,6±2,11(*p<0,001*) bulunmuştur. Kontrol grubunun ortalama OTM değeri elde edilmiş **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** doz değerleri ile karşılaştırıldığı zaman, doz kaynaklı artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile **TNT 12,5** (4,22±0,25) (*p>0,05*) grubu arasında fark gözlenmemesine rağmen, **TNT 12,5** grubu ile **IC_{25}** (*p<0,01*), **IC_{50}** (*p<0,001*) ve **IC_{75}** (*p<0,001*) dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 4.19).



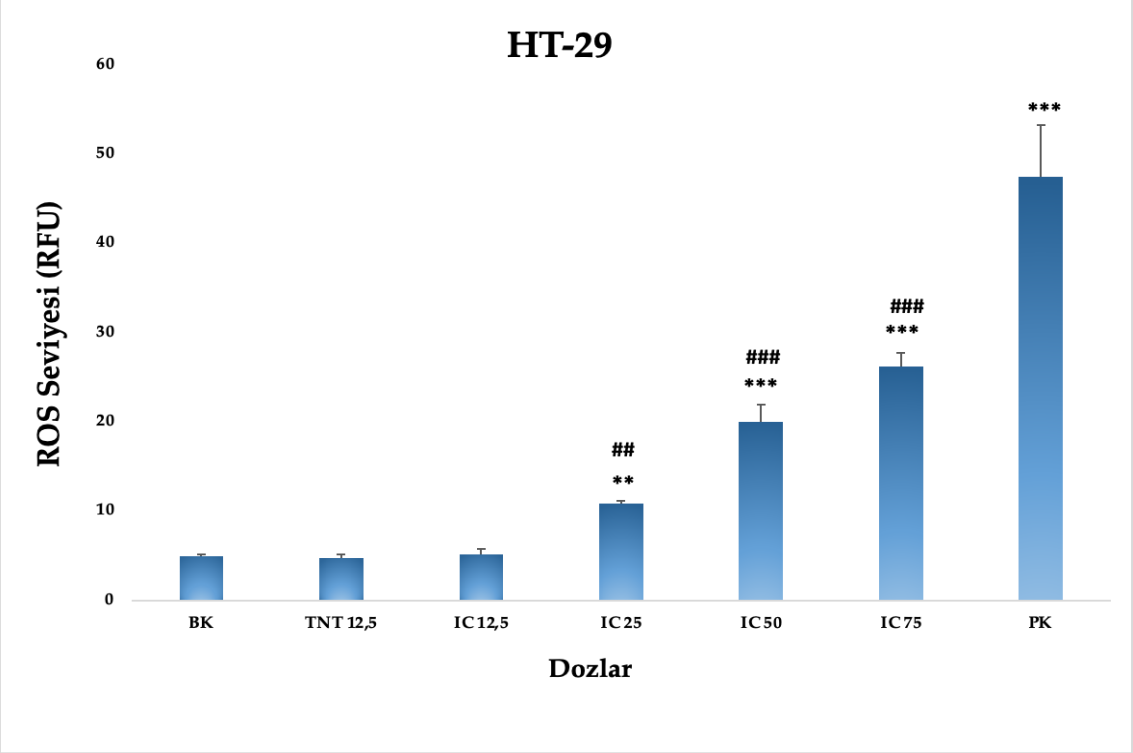
Şekil 4.19. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının OTM değeri *(p≤0,05 olanlar */# ile, p≤0,01 **/## ile, p≤0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

4.5. Titanyum nanotüplerin oluşturduğu hücre içi ROS düzeylerinin değerlendirilmesi

TNT ve AgTNT nanotüplerin antioksidan etkisini araştırmak için tüm hücre hatlarında içsel ROS seviyesi DCFH-DA boyaması ile ölçülmüştür. 4 saat muamele edilmesi sonucundan, her bir hücrenin floresan görüntüleri ve kantitatif istatistikleri sırasıyla Şekil 4.20, 4.21 ve 4.22'de gösterilmiştir.

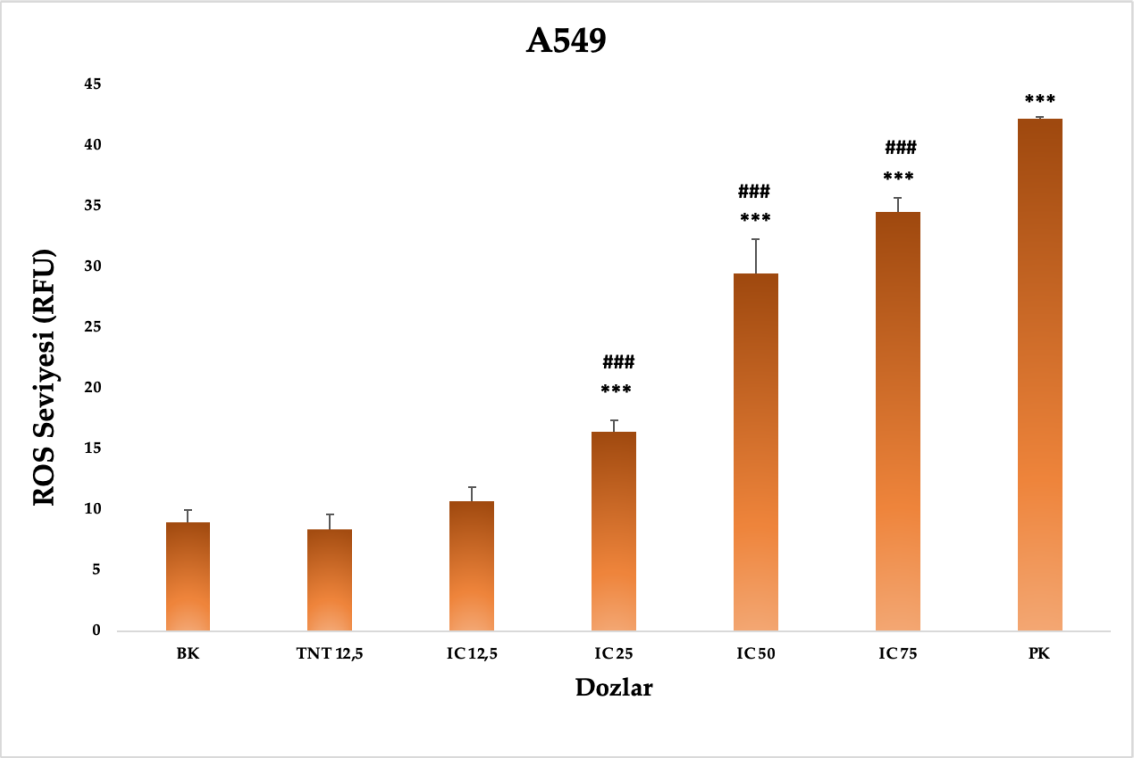
HT-29 hücrelerinde, büyüme kontrol grubu ve pozitif kontrol için elde edilen ROS miktarları sırasıyla 4,92±0,27 ve 47,495±5,71 olmuştur. **TNT 12,5** dozun ROS miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (4,69±0,42) *(p>0,05)*. Ayrıca **$IC_{12,5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozların ROS seviyeleri sırasıyla 5,2±0,56 *(p>0,05)*; 10,02±0,33 *(p<0,01)*; 20,02±1,91*(p<0,001)*; 26,22±1,50 *(p<0,001)* bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz kontrol grubu ile **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. **TNT 12,5** dozu ile karşılaştırıldığında, **IC_{25}** *(p<0,01)*, **IC_{50}**

(p<0,001) ve **IC$_{75}$** *(p<0,001)* dozları da anlamlılık düzeyinde farklılık göstererek daha yüksek ROS seviyeleri göstermiştir (Şekil 4.20).



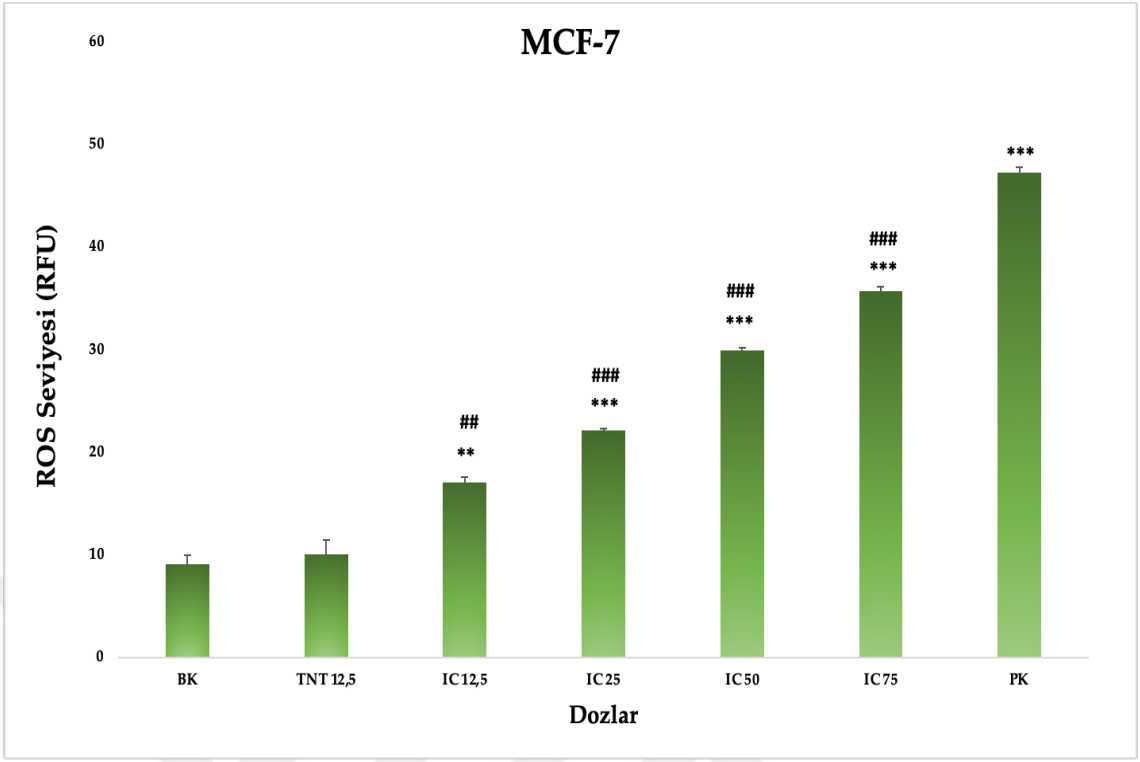
Şekil 4.20. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının ROS seviyeleri belirlenmesi *(p≤ 0,05 olanlar */# ile, p≤ 0,01 **/## ile, p≤ 0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

Şekil 4.21' de görüldüğü gibi A549 hücrelerinde, büyüme kontrol grubu ve pozitif kontrol için elde edilen ROS miktarları sırasıyla 8,99±1,03 ve 42,22±0,15 olmuştur. **TNT 12,5** dozun ROS miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (8,37±1,29) (*p>0,05*). Ayrıca **IC$_{12,5}$**, **IC$_{25}$**, **IC$_{50}$** ve **IC$_{75}$** dozların ROS seviyeleri sırasıyla 10,72±1,18; 16,40±0,96; 29,46±2,84; 34,52±1,16 bulunmuştur. İstatistiksel analiz, kontrol grubu ile **IC$_{25}$** (*p<0,001*), **IC$_{50}$** (*p<0,001*), ve **IC$_{75}$** (*p<0,001*), dozları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. **TNT 12,5** dozu ile karşılaştırıldığında, **IC$_{25}$** (*p<0,001*), **IC$_{50}$** (*p<0,001*) ve **IC$_{75}$** (*p<0,001*) dozları da anlamlılık düzeyinde farklılık göstererek daha yüksek ROS seviyeleri göstermiştir.



Şekil 4.21. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının ROS seviyeleri belirlenmesi *(p≤ 0,05 olanlar */# ile, p≤ 0,01 **/## ile, p≤ 0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

MCF-7 hücrelerinde, büyüme kontrol grubu ve pozitif kontrol için elde edilen ROS miktarları sırasıyla 9,12±0,86 ve 42,22±0,51 olmuştur. **TNT 12,5** dozun ROS miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (10,04±1,39) (*p>0,05*). Ancak **$IC_{12,5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozların ROS seviyelerinde sırasıyla 17,03±0,54 (*p<0,01*); 22,13±0,16 (*p<0,001*); 29,91±0,31 (*p<0,001*); 35,77±0,41(*p<0,001*), olan istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. **TNT 12,5** dozu ile karşılaştırıldığında, **IC** (*p<0,01*) ve (*p<0,001*), dozları da anlamlılık düzeyinde farklılık göstererek daha yüksek ROS seviyeleri göstermiştir (Şekil 4.22).



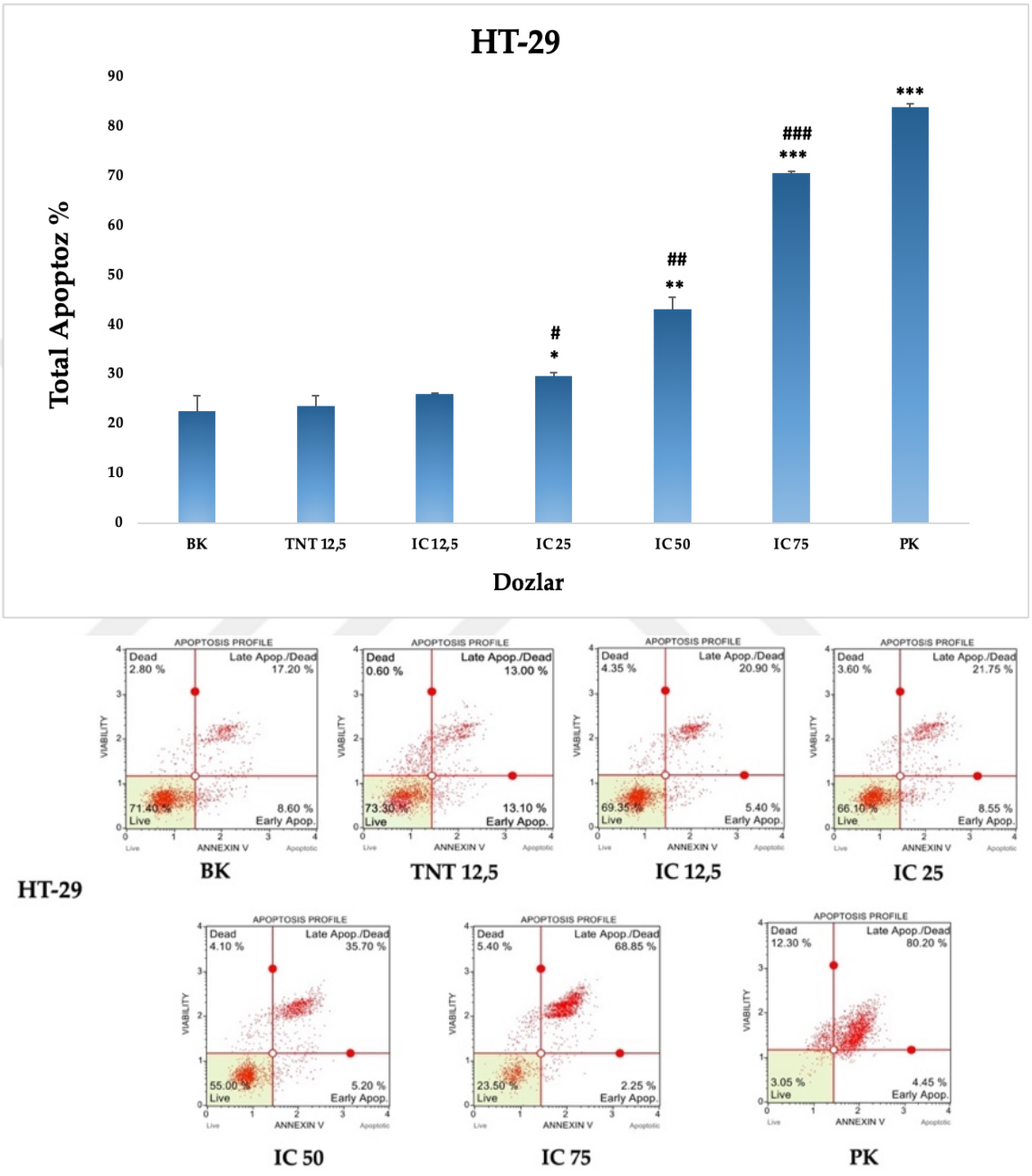
Şekil 4.22. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının ROS seviyeleri belirlenmesi *(p≤ 0,05 olanlar */# ile, p≤ 0,01 **/## ile, p≤ 0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

4.6. Titanyum nanotüplerin apoptotik etkisi Anneksin-V testi kullanılarak değerlendirilmesi

HT-29, A549 ve MCF-7 hücre hatlarının 24 saat muamelesinden sonra nanotüplerin apoptotik etkisini değerlendirmek için Anneksin-V hücre apoptoz deneyi gerçekleştirilmiştir. Her hücre hattı için elde edilmiş ortalama toplam apoptotik hücre sayısı Şekil 4.23, 4.24 ve 4.25' te belirtilmiştir. Ayrıca canlı hücreler, erken ve geç apoptoz fazındaki hücreler ve ölü hücreler olan Anneksin-V parametrelerine ilişkin sayılar her bir grafiğin altında gösterilmiştir.

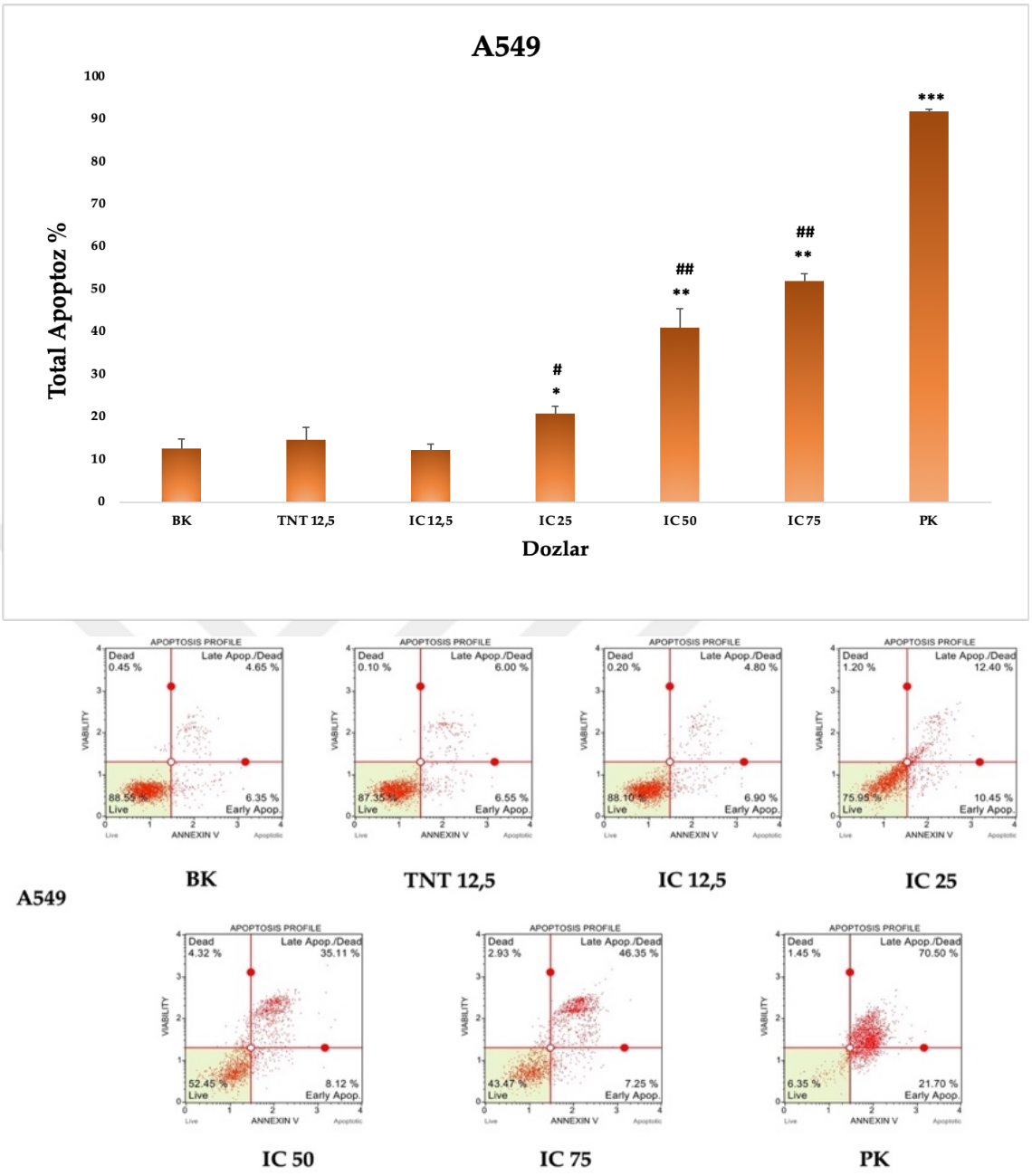
HT-29 hücre hattında, büyüme kontrol ve pozitif kontrol dozları için ortalama toplam apoptotik hücre sayısı sırasıyla 22,6±3,2 ve 84,05 ± 0,55 bulunmuştur. **TNT 12,5** dozun apoptotik hücre miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (23,6±2,17) (*p>0,05*). Ayrıca **$IC_{12,5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozların apoptotik hücre sayısı sırasıyla 26,1±0,2; 29,65±0,75; 43,25±2,35; 70,6±0,50 bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz kontrol grubu ile **IC_{25}** (*p<0,05*), **IC_{50}** (*p<0,01*) ve **IC_{75}** (*p<0,001*) dozları arasında anlamlı

bir fark olduğunu göstermiştir. **TNT 12,5** dozu ile karşılaştırıldığında, **IC_{25}** (*p<0,05*), **IC_{50}** (*p<0,01*) ve **IC_{75}** (*p<0,001*), dozları da anlamlılık düzeyinde farklılık göstererek daha yüksek apoptotik hücre sayısı göstermiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının ortalama toplam apoptotik hücre sayısı ve Anneksin-V parametreleri gösterilmesi *(p≤0,05 olanlar */# ile, p≤0,01 **/## ile, p≤0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

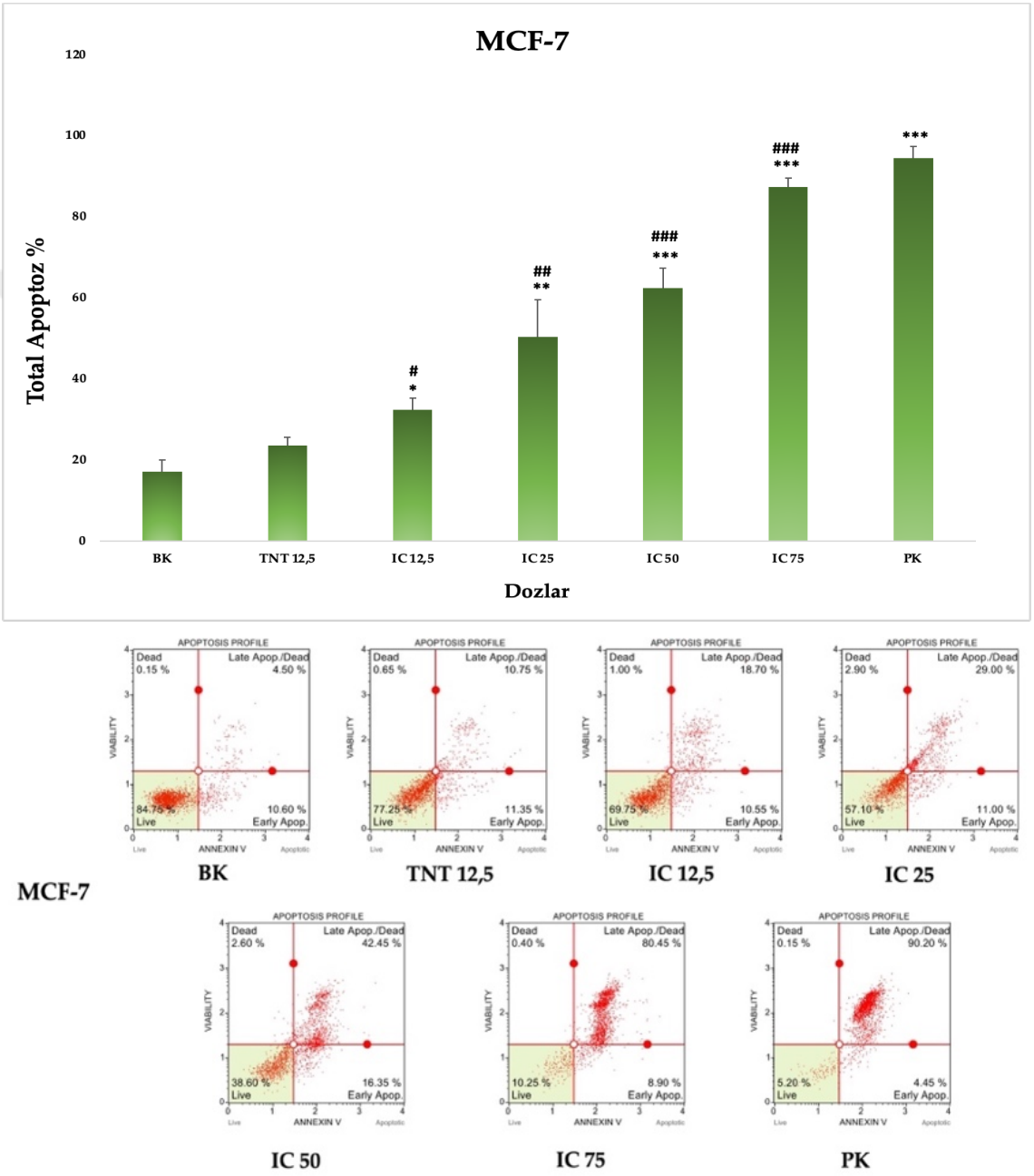
Şekil 4.24’ de görüldüğü gibi A549 hücrelerinde, büyüme kontrol grubu ve pozitif kontrol için elde edilen ortalama toplam apoptotik hücre sayısı sırasıyla 12,6±2,26 ve 91,85±0,49 olmuştur. **TNT 12,5** dozun apoptotik hücre miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (14,76±2,77). Ayrıca **$IC_{12,5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozların apoptotik hücre miktari sırasıyla 12,36±1,24; 20,95±1,64; 41±4,43; 52,1±1,70 bulunmuştur. İstatistiksel analiz, kontrol grubu ile **IC_{25}** ($p<0,05$), **IC_{50}** ($p<0,01$) ve **IC_{75}** ($p<0,01$), dozları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. **TNT 12,5** dozu ile karşılaştırıldığında, **IC_{25}** ($p<0,05$), **IC_{50}** ($p<0,01$) ve **IC_{75}** ($p<0,01$) dozları da anlamlılık düzeyinde farklılık göstererek daha yüksek apoptotik hücre sayısı göstermiştir.



Şekil 4.24. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının ortalama toplam apoptotik hücre sayısı ve Anneksin-V parametreleri gösterilmesi *(p≤0,05 olanlar */# ile, p≤0,01 **/## ile, p≤0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

MCF-7 hücrelerinde, büyüme kontrol grubu ve pozitif kontrol için elde edilen apoptotik hücre sayıları sırasıyla 17,2±2,96 ve 94,6±2,86 olmuştur. **TNT 12,5** dozun apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (23,6±2,17) (*p>0,05*). Ancak **$IC_{12,5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozların apoptotik hücre sayılarında sırasıyla 32,5±2,78

(*p<0,05*); 50,5±9,11 (*p<0,01*); 62,53±4,89 (*p<0,001*); 87,53±2,20 (*p<0,001*) olan istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. **TNT 12,5** dozu ile karşılaştırıldığında, **IC** dozları (*p<0,05; p<0,01*; *p<0,001*) da anlamlılık düzeyinde farklılık göstererek daha yüksek apoptotik hücre sayısı göstermiştir (Şekil 4.25).

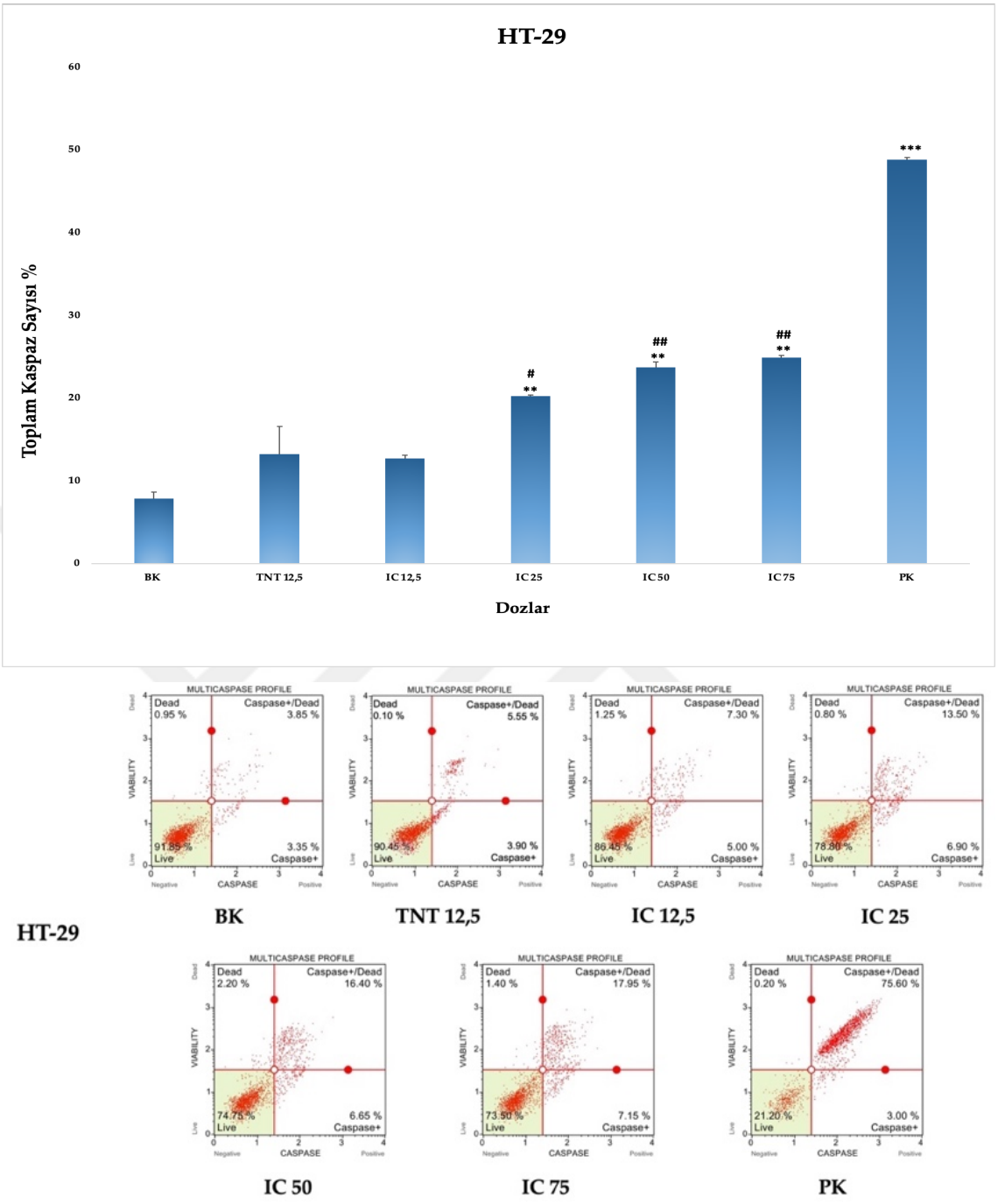


Şekil 4.25. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının ortalama toplam apoptotik hücre sayısı ve Anneksin-V parametreleri gösterilmesi *(p≤0,05 olanlar */# ile, p≤0,01 **/## ile, p≤0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

4.7. Titanyum nanotüplerin apoptotik etkisinin Multikaspaz testi kullanılarak değerlendirilmesi

Multikaspaz deneyi apoptoz süresince aktif olan kaspazların sayısını belirleyen bir deney olup Anneksin-V testinin sonuçlarını desteklemektedir. Apoptoz testinde yapıldığı gibi, hücreler 24 saat boyunca nanotüplerle muamele edilmiş ve Multikaspaz deneyi gerçekleştirilmiştir. Her hücre hattı için elde edilmiş ortalama toplam kaspaz sayısı Şekil 4.26, 4.27 ve 4.28' de belirtilmiştir. Ayrıca canlı hücreler, kaspaz + fazındaki hücreler ve ölü hücreler olan Multikaspaz parametrelerine ilişkin sayılar her bir grafiğin altında gösterilmiştir.

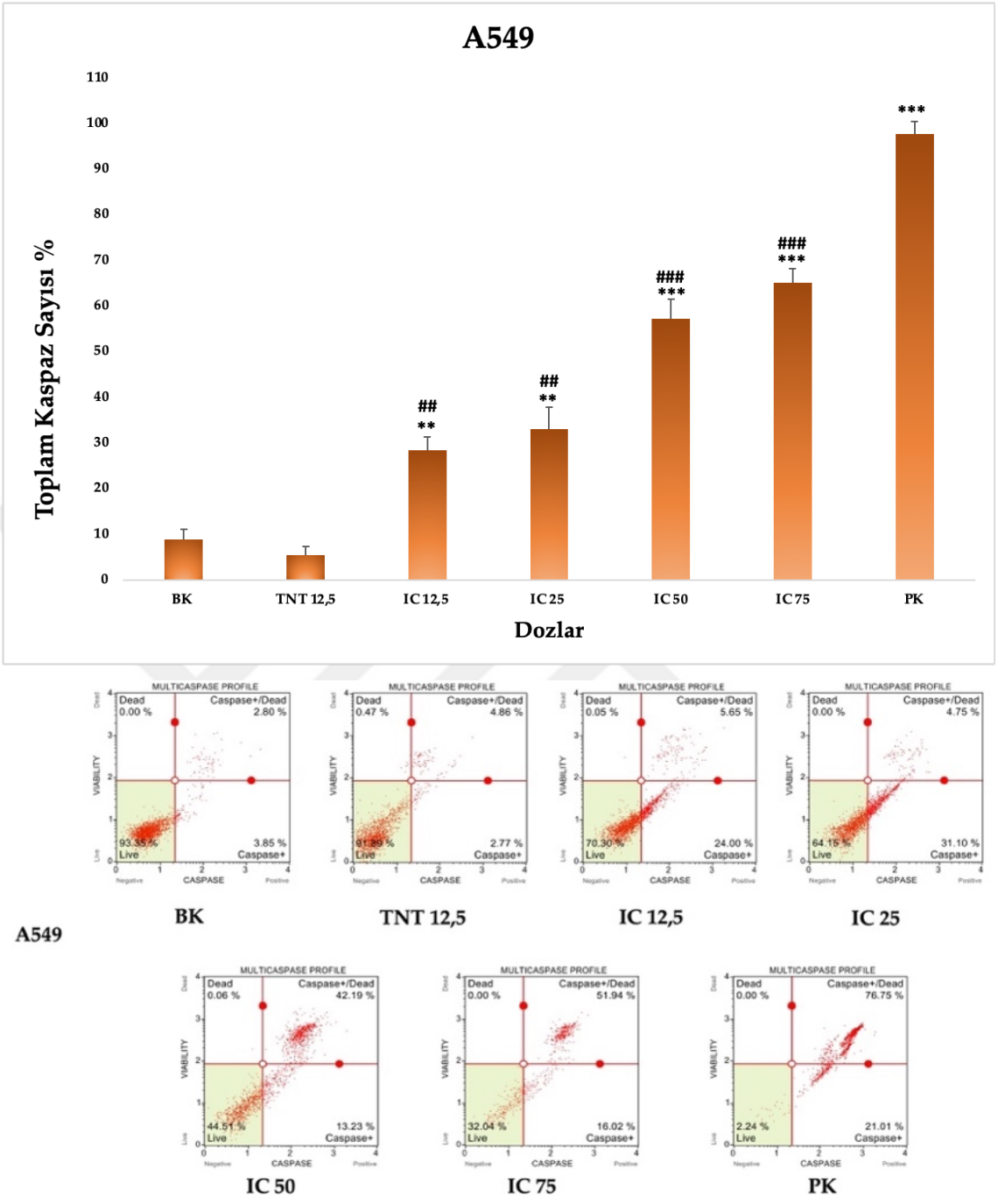
HT-29 hücre hattında, büyüme kontrol ve pozitif kontrol dozları için ortalama toplam kaspaz sayısı sırasıyla 7,9±0,8 ve 48,85 ± 0,25 bulunmuştur. **TNT 12,5** dozun kaspaz miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (13,26±3,32) ($p>0,05$). Ayrıca $\mathbf{IC_{12,5}}$, $\mathbf{IC_{25}}$, $\mathbf{IC_{50}}$ ve $\mathbf{IC_{75}}$ dozların kaspaz sayısı sırasıyla 12,7±0,4; 20,3±0,1; 23,75±0,65; 24,95±0,25 bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz kontrol grubu ile $\mathbf{IC_{25}}$ ($p<0,01$), $\mathbf{IC_{50}}$ ($p<0,01$) ve $\mathbf{IC_{75}}$ ($p<0,01$) dozları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. **TNT 12,5** dozu ile karşılaştırıldığında, $\mathbf{IC_{25}}$ ($p<0,05$), $\mathbf{IC_{50}}$ ($p<0,01$) ve $\mathbf{IC_{75}}$ ($p<0,01$) dozları da anlamlılık düzeyinde farklılık göstererek daha yüksek kaspaz sayısı göstermiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra HT-29 hücre hatlarının ortalama toplam kaspaz miktarı ve Multikaspaz testin parametreleri gösterilmesi *(p≤0,05 olanlar */# ile, p≤0,01 **/## ile, p≤0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

Şekil 4.27' de görüldüğü gibi A549 hücrelerinde, büyüme kontrol grubu ve pozitif kontrol için elde edilen ortalama toplam kaspaz miktarı sırasıyla 8,86±2,20 ve 97,8±2,67

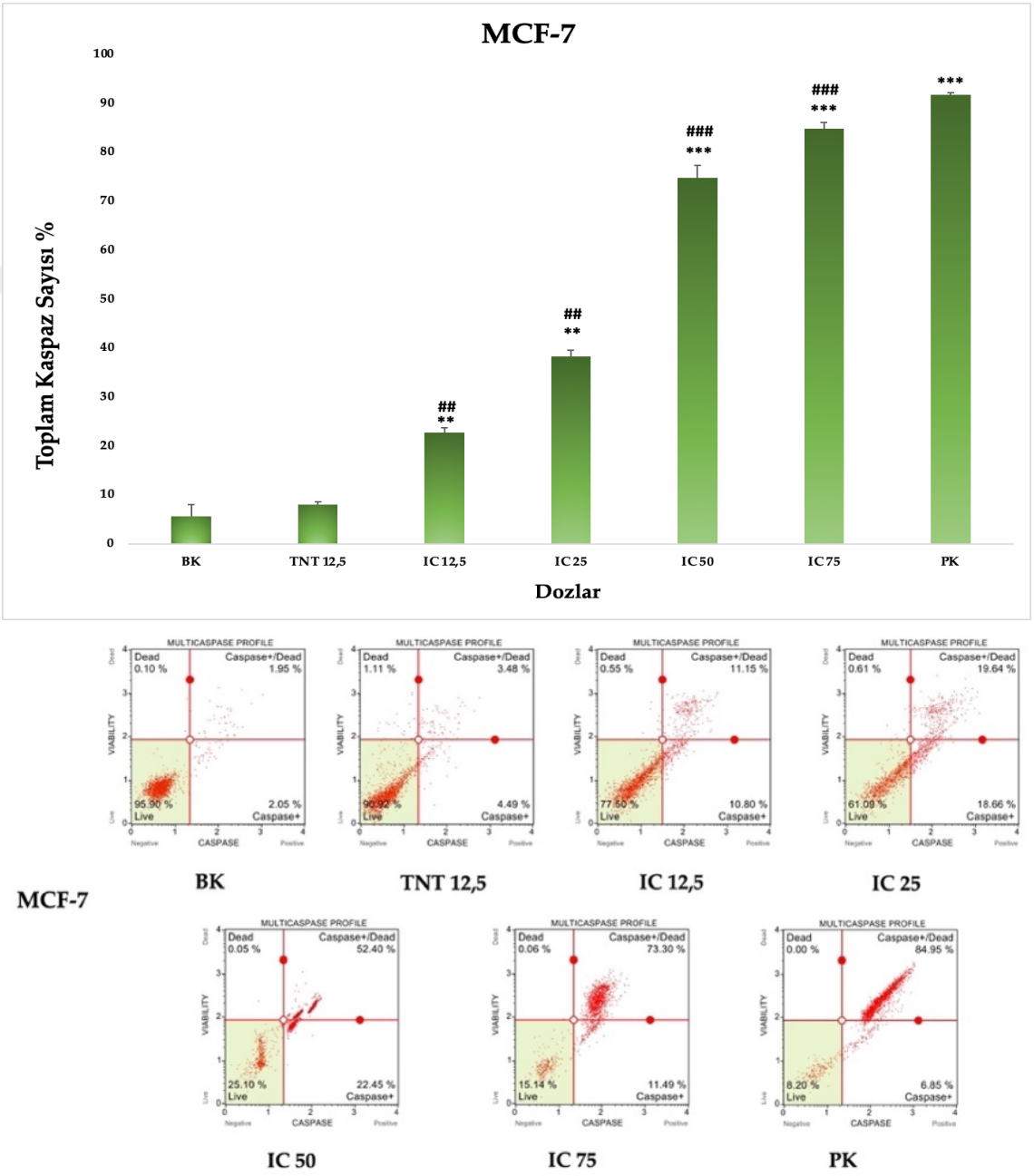
olmuştur. **TNT 12,5** dozun kaspaz miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (5,43±1,98) (*p>0,05*). Ayrıca **$IC_{12,5}$**, **IC_{25}**, **IC_{50}** ve **IC_{75}** dozların kaspaz miktarı sırasıyla 28,36±2,95; 33,13±4,79; 57,26±4,31; 65,2±3,08 bulunmuştur. İstatistiksel analiz, kontrol grubu ile **IC** dozları (*p<0,01; p<0,001*) arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. **TNT 12,5** dozu ile karşılaştırıldığında, tüm **IC** dozları (*p<0,01; p<0,001*) da anlamlılık düzeyinde farklılık göstererek daha yüksek kaspaz sayısı göstermiştir.



Şekil 4.27. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra A549 hücre hatlarının ortalama toplam kaspaz miktarı ve Multikaspaz testin parametreleri gösterilmesi *(p≤0,05 olanlar */# ile, p≤0,01 **/## ile, p≤0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

MCF-7 hücrelerinde, büyüme kontrol grubu ve pozitif kontrol için elde edilen kaspaz oranları sırasıyla 5,7±2,40 ve 91,8±0,34 olmuştur. **TNT 12,5** dozun kaspaz miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (8,1±0,45) (*p>0,05*). Ancak **$IC_{12,5}$**,

IC$_{25}$, **IC$_{50}$** ve **IC$_{75}$** dozların kaspaz sayılarında sırasıyla 22,7±0,98 (*p<0,01*); 38,3±1,26 (*p<0,01*); 74,8±2,56 (*p<0,001*); 84,8±1,26 (*p<0,001*) olan istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. **TNT 12,5** dozu ile karşılaştırıldığında, **IC** dozları (*p<0,01* ve *p<0,001*) da anlamlılık düzeyinde farklılık göstererek daha yüksek kaspaz sayısı göstermiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. TNT ve AgTNT nanotüplerin uygulamasından sonra MCF-7 hücre hatlarının ortalama toplam kaspaz miktarı ve Multikaspaz testin parametreleri gösterilmesi *(p≤0,05 olanlar */# ile, p≤0,01 **/## ile, p≤0,001 ***/### ile belirtilmiştir)*

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, modern tıp için en önemli sorunlardan biri olarak kabul edilmektedir. İnsan sağlığı ve yaşamı için ciddi bir tehdit olmaya devam ettiğinden, bilim insanları geleneksel antikanser tedavisinin verimliliğini artırmayı hedeflemektedir. Her ne kadar birçok etkili girişim gerçekleştirilmiş ve bazı başarılar elde edilmiş olsa da her yıl artan vaka sayısına yol açan tedavisi zor kanserlerde hala çözülemeyen birçok zorluk bulunmaktadır (Siegel vd., 2023). Modern kanser tedavi yöntemlerinin devamlı gelişmesine rağmen, tedavinin ilk basamağı tümörün cerrahi olarak çıkarılması ve/veya radyoterapidir. Kemoterapi genellikle tamamlayıcı bir tedavi olmakla birlikte, birçok faktör tarafından sınırlandırılmaktadır. Kemoterapötikler, insan organizmasındaki hem kanser hem de sağlıklı dokularda hızla çoğalan dokular için son derece toksik etkiye sahiptir. Bu nedenle, yeni dağıtım sistemleri ile tedavinin doku spesifikliğini artıracak ve sistemik etkilerini azaltacak yöntemler halen araştırılmaktadır. Birçok kemoterapötik ajan, kanser hücreleri tarafından sergilenen ve ilacı bir zehir olarak gören ve matriksten uzaklaştıran ABC ailesinin (ATP-binding cassette transporter) bazı üyelerinin aşırı ekspresyonu ile ilişkili çoklu ilaç direnci (MDR) mekanizması nedeniyle de etkili olamamaktadır (Marin vd., 2009; Zimmermann vd., 2014). En sık çalışılan kemoterapötik ilaçlardan biri doksorubisindir (DOX). Çeşitli kanserlerin tedavisi için birçok avantaj sağlamasına rağmen, araştırmacılar doksorubisinin en ciddi ve tehlikeli olan kardiyotoksisite de dahil olmak üzere olumsuz etkilerle ilişkili olduğunu bulmuşlardır (Rivankar, 2014).

Araştırmacılar, ideal bir çözüm arayışıyla, yaşamı tehdit eden malignitelerin erken teşhis ve tedavisine yardımcı olacak yeni ilaçların geliştirilmesini kolaylaştırabilecek etkili nanomalzemeler aramaktadır. Nanoteknoloji endüstrisi, havacılık ve uzay mühendisliği ve nanoelektronikten çevresel iyileştirme ve tıbbi sağlık hizmetlerine kadar uzanan bir dizi alana uygulanabilecek, ekonomik ve bilimsel etkileri olabilecek önemli faydalar sağlama umutlarıyla hızla büyümektedir. Yeni tasarlanmış nanomalzemelerin tasarımı ve geliştirilmesi, sundukları faydalı fizikokimyasal özellikler nedeniyle sektör için temel öneme sahip olmuştur. Bir nanomateryal, nanometre aralığında en az bir boyuta sahip bir madde olarak tanımlanmakta ve tüpler, çubuklar, teller veya küreler gibi birçok farklı form alabilmektedir (Imasaka vd., 2006; Warner vd., 2008).

Şimdiye kadar, çok sayıda inorganik ve organik nanomalzeme tümörlerin teşhis ve tedavi etkinliğini artırmak için kullanılmıştır. Bunlar arasında titanyum bazlı nanomalzemeler, henüz gelişmekte olmasına rağmen, son zamanlarda biyolojik uygulamalardaki araştırma atılımları olarak yoğun ilgi görmektedir. Bu ilgi esas olarak kimyasal inertlik, geniş yüzey alanı, arzu edilen katalitik aktivite, yakın kızılötesi (Near-infrared region) bölgede yüksek emilim ve ışık ve ultrasonla ışınlanan reaktif oksijen türlerinin yeterli üretim etkinliği gibi dikkat çekici ve benzersiz özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Han vd., 2018; Hou vd., 2015; G. Lan vd., 2019; K. Lan vd., 2018). Fotokatalitik özellikleri, çeşitli çevresel uygulamalarda kullanılmaktadir (Pavasupree vd., 2008). Daha da önemlisi, TiO_2, biyolojik uygulamalar için diğer ağır metallerden (örneğin Au, Ag, W, Bi) daha uygun olan toksik olmayan, ucuz, biyolojik olarak inaktif metallerden biri olarak kabul edilmektedir (Kim vd., 2019). Ayrıca, TiO_2 bazlı nanomateryallerin kullanılması, hazırlama işlemi sırasında bileşimi, yapıyı ve boyutu kontrol etme ve ayarlama avantajı sağlamaktadır (Zhou vd., 2014).

Yukarıdaki faydaların tümü, kanser tedavisinde TiO_2 bazlı nanomateryallerin diğer metal bazlı nanomalzemelerden daha fazla ilgi görmesine katkıda bulunmaktadır. Biyolojik uygulamalarına göre çeşitli titanyum bazlı nanomalzemeler vardır ve bunlar farklı kategorilere ayrılabilmektedir: titanyum oksit (TiO, TiO_2, Ti_3O_5, Ti_2O_3) titanyum nitrit (TiN), titanyum karbür (Ti_2C), titanyum sülfür (TiS_2) ve titanyum koordinasyon bileşikleri (Ti-5,10,15,20-tetra(p-benzoato)porfirin). Çeşitli çalışmalar, Ti-bazlı nanomalzemelerin polietilen glikol gibi iyi bilinen biyouyumlu polimerlerle birleştirilmesinin, kolloidal stabilitelerini ve farmakokinetiklerini önemli ölçüde iyileştirmek için yüzeylerini değiştirebileceğini göstermiştir (Shahbazi vd., 2020). Benzersiz özellikleri sayesinde, TiO_2 bazlı nanomalzemelerin tümör görüntüleme ve tedavisinde uygulamaları vardır. Bir çalışmada, ilaç dağıtım platformu olarak kullanılan TiO_2 bazlı nanomalzemelerin geniş yüzey alanının avantajları vurgulanmıştır (Du vd., 2015; Lai vd., 2016; Losic vd., 2012). Bu çalışmada, TiO_2 bazlı nanomalzemeler, kemoterapiyi geliştirmek ve ilaca bağlı yan etkileri etkili bir şekilde azaltmak için paklitaksel ve doksorubisin dahil olmak üzere farklı kemoterapötik ilaç türlerini yüklemek için kullanılmıştır. Başta titanyum oksitler olmak üzere titanyum bazlı nanomateryaller, mükemmel katalitik özellikleri nedeniyle fotokatalitik nanomalzemeler

ve fotosensitizerler olarak en kapsamlı şekilde çalışılmıştır. Çalışmalar, fotodinamik terapide yaygın olarak kullanılmasını sağlayan kanser hücrelerine zarar vermek için ışık ışınlaması altında oksijeni toksik reaktif oksijen türlerine etkili bir şekilde dönüştürebildiğini göstermiştir (Lan vd., 2019). Son yıllarda, titanyum bazlı nanomalzemeler, ultrasonik ışınlama altında sadece yüzeysel hücreleri yok etmekle kalmayıp aynı zamanda derin yerleşimli tümörleri de öldürebilen çok sayıda ROS üretebildikleri için sonodinamik terapi için oldukça etkili olduklarını kanıtlamışlardır (Cao vd., 2019).

Titanyum nanomalzemelerin diğer metallerle birlikte kullanımı nanotıp alanında ilgi görmektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, osteosarkom tedavisinde selenyum partikülleri ile birleştirilmiş anodize TiO_2 nanotüplerin antitümör etkisini vurgulamıştır. İn-vitro çalışmanın sonuçları, bu inorganik bileşiklere dayalı bir antitümör metal protezin üretilmesinin ve osteosarkomun rezeksiyonundan sonra implantasyonunun, yaralı kemiğin işlevsel ve yapısal bütünlüğünü geri kazandırabileceğini göstermiştir (Hu vd., 2023). Diğer araştırmacılar, sonodinamik tedaviyi geliştirmek için bir tür sonosensitizer olarak termal ayrıştırma yöntemi ile demir katkılı titanyum oksit nanodotlar sentezlemişlerdir. Çalışmaları, Fe katkılı TiO_2 nanodotların, bu nanodotların ultrasonla tetiklenen ROS üretimini arttırmak ve kemodinamik terapi için H_2O_2'den ROS üretmek üzere nanodotlara Fenton katalitik işlevi sağlamak için çok önemli olduğunu ortaya koymuştur (Bai vd., 2020).

Karakterizasyon analizleri, hidrotermal yöntemle sentezlenmiş titanyum nanotüplerin fiziksel ve yapısal özelliklerini, gümüş partikülleri ile yüklenmiş veya yüklenmemiş olarak ortaya koymuştur. FESEM ve TEM analizleri, yaklaşık 100 nm'lik tübüler bir morfolojiye ve 8 ila 12 nm arasında bir çapa sahip nanotüpleri ortaya çıkarmıştır. Bu geniş yüzey alanı ve elde edilen fiziksel boyutlar, nanotüplerin gümüş parçacıklarıyla birleştirilerek AgTNT nanotüplerinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Benzer sonuçlar başka çalışmalarda da gözlemlenmiştir (Aytekin Aydın vd., 2018). Morfoloji bozulmadan kalmasına rağmen, AgTNT nanotüplerin uzunluğu biraz azalmış ve yaklaşık 100 nm'de kalmıştır. Bu hafif azalmanın gümüş taneciklerin titanyum nanotüplerle birleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir akademik çalışmaya göre metal iyonlarıyla optimal

düzeyde katkılama, partikül büyümesini engelleyebilmektedir (Ahamed vd., 2017). Gümüş katkısının TiO_2 nanopartiküllerinin boyutunun küçülmesi üzerindeki etkisi, katkı iyonlarının neden olduğu tane sınırlarının sıkışmasına bağlanmış, bu da katkının sınırlardaki simetri kırma etkileriyle tane büyümesini sınırlayarak daha küçük partikül boyutlarına neden olmuştur (Ahamed vd., 2017; Majeed Khan vd., 2014).

Ag partiküllerini TiO_2 nanotüplerin yüzeyine ve içine bağlamak için çeşitli yöntemler kullanılabilmektedir. Bunlar ultrasonikasyon (Sun vd., 2009) , $AgNO_3$ çözeltisinde bekletme (Zhao vd., 2011) elektrodepozisyon (Ma vd., 2011)veya püskürtme biriktirme (Roguska vd., 2012) olarak sıralanabilmektedir. Doğada bilinen üç polimorfik TiO_2 formu vardır: bunlar anataz, brookit ve rütil formlardır (Raja vd., 2020). Anataz, UV ışınımı altında fotokatalist olarak kullanılan piramidal kristal yapıya, rütil prizmatik bir alışkanlığa sahip tetragonal bir yapıya ve brookit ortorombik kristal yapıya sahiptir. Brookit daha az kararlı olduğu için TiO_2 nanotüplerin üretiminde kullanılan en yaygın formlar anataz ve rütil formalar olmaktadır (Yadav vd., 2016). Boş ve Ag ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerin XRD desenleri, boş TiO_2 nanotüpleri için 24,24°, 28,36°, 48,28° ve 62,7°'de ana kırınım pikleri göstermiştir (Bavykin vd., 2006; Iijima, 1991; Lee vd., 2005; Liu vd., 2014; Ou ve Lo, 2007; Rahimnejad ve Torbati, 2016). Gözlenen tüm kırınım pikleri TiO_2 yapısının anataz fazına atanabilmektedir. 32,38°, 46,36°'deki XRD pikleri gümüş için sırasıyla 122 ve 231 düzlemlerine karşılık gelmektedir (Nayak vd., 2021; Suman vd., 2013).

Ayrıca, Ag ile yüklenmiş TiO_2 nanotüplerde görülen tüm pikler katkılamadan sonra anataz nanokristal yapının korunduğunu göstermektedir.

IR spektrumlarının her iki eğrisinde de, 3500 ila 3100 cm^{-1} aralığındaki geniş absorpsiyon titreşimi nanotüp numunelerinin yüzeyindeki O—H esnetme titreşimine ve 1650 cm^{-1} civarındaki H—O—H bükülme titreşimi yüzeye adsorbe edilmiş su ve hidroksil gruplarına ilişkilendirilebilmektedir (Gao vd., 2009; Rodrigues vd., 2010). Yaklaşık 900 ve 600'de gözlenen pikler TiO_2'nin karakteristik bantlarıdır (Q. Chen vd., 2002; Gao vd., 2009; Liu vd., 2014b; Rodrigues vd., 2010). Ag yüklenmesinden sonra TiO_2 nanotüplerin FT-IR spektrumu çok az değişmektedir, bu da sentezlenen malzemelerin Ag yüklenmiş TiO_2 olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır (Gao vd., 2009; Panáček vd., 2006; Xu vd., 2016).

Nanomateryallerin epitel hücreler tarafından alımı, nanomateryallerin boyutu, kimyasal bileşimi ve yüzey tepkiselliği ile ilişkili olarak ortaya çıkan biyolojik tepkilerde merkezi bir rol oynamaktadır. Hücre membranları ve reseptörleri ile etkileşim, nanomalzemelerin hücresel mikro çevreden biyolojik molekülleri birleştirme ve böylece bir protein koronası oluşturma yeteneği ile güçlü bir şekilde bağlantılıdır (Nel vd., 2009). Çalışmalar, nanomalzemelerin protein koronalarının hücre zarının lipidleri veya protein reseptörleri ile etkileşimde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Hellstrand vd., 2009; Lundqvist vd., 2008; Lynch vd., 2009). Nanopartikül yüzeyi ve mühendislik süreçlerinden kaynaklanan spesifik kimyasal bileşikleri, dispersiyon ve deneysel hazırlık için kullanılan yöntemler, spesifik biyolojik bileşikleri, özellikle proteinleri adsorbe etme yeteneğini belirleyebilmektedir. Korona, hücresel alım için önemlidir ve hücresel farklılaşma ile ilgili olarak spesifik sinyal yollarının aktivasyonuna yol açabilmektedir.

Diğer metal nanopartiküllere benzer şekilde, TiO_2 bazlı nanomateryallerin pinositoz, fagositoz veya mikropinositoz yoluyla hücreye girebildiği ve daha sonra veziküller, sitoplazma veya mitokondri gibi belirli konumlarda hücrelerde birikebildiği bulunmuştur (AshaRani, Hande, vd., 2009; Bergin ve Witzmann, 2013; Marano vd., 2011; Rauch vd., 2013). Endositoz, doğal veziküler salgılar yoluyla hücre dışı nanomateryalleri yakalamak için plazma membranında meydana gelir. Fagositoz, 500 nm'den büyük partiküllerin alımında tercih edilen yoldur. Pinositoz, hücreler daha küçük nanopartiküllerle (2-6 nm) karşılaştığında meydana gelir ve genellikle hedef ligandlara bağlanan hücre yüzeyi reseptörleri tarafından başlatılır ve aracılık edilmektedir (Ghosh vd., 2013; Scherbart vd., 2011). Klatrin bağımlı ya da bağımsız mekanizmalarla oluşan pinositik veziküller daha sonra endozomlarla birleşmektedir. İnternalizasyon mekanizması, partikül boyutlarının az ile birkaç yüz nanometre arasında değişmesine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Rauch vd., 2013).

TiO_2 nanopartiküller besiyerinde büyük aglomeratlar oluşturabilmektedir (Limbach vd., 2005). Birikmeyi önlemek için nanotüplerin süspansiyonları 300 W'ta 10 dakika süreyle ultrason edilmiştir. Hücre içi TEM görüntülenmesi analizi ile HT-29, A549 ve MCF-7 hücre hatlarının hücre zarlarında, sitoplazmalarında ve çekirdek zarlarında nanotüpler tespit etmiştir. Hücre çekirdeğinde nanotüp vezikülleri gözlenmemiştir. Ancak,

nanotüpler hücre çekirdeği üzerinde baskı uygulayan kümeler şeklinde gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, Wang ve meslektaşlarının 24 saatlik inkübasyondan sonra TiO_2 nanotüplerin hücresel olarak içselleştirildiğini gösteren konfokal görüntülerle benzerlik göstermektedir. Aynı TiO_2 nanotüpleri karyotekayı geçmeden hücre çekirdeği etrafında da lokalize olmuştur (Wang vd., 2013). Benzer şekilde Singh ve arkadaşları (2009) TiO_2 nanopartikullerin hücreler tarafından hızla alındığını, genellikle hücre zarına bağlı agregatlar ve veziküller, vakuoller ve lameller cisimciklerde büyük hücre içi agregatlar şeklinde olduğunu, ancak çekirdeklerin veya diğer organellerin içinde hiçbir partikül gözlenmediğini bildirmiştir. Bununla birlikte, nanotüplere daha uzun süre maruz kalmanın nanotüplerin çekirdeğe nüfuz etmesini desteklemiş olması olasılığı vardır. Dawson ve arkadaşları (2009), 100 nm'den küçük nanoparçacıkların hücrelere nüfuz edebildiğini ve 40 nm'den küçük olanların hücre çekirdeğine nüfuz edebildiğini belirtmiştir.

Hammadde aynı olmasına rağmen, nanomalzemeler sentez ve üretim süreçlerine göre farklı özelliklere sahip olup, hücreler üzerindeki toksik etkileri de çeşitlilik göstermektedir. Belirli nanopartiküllerin toksisitesi boyut, şekil, en-boy oranı, yük ve yüzey alanı gibi çok sayıda fizikokimyasal parametre ile ilişkilendirilmiştir (Albanese vd., 2012b; Unfried vd., 2007). Ayrıca, nanopartiküllerin boyutu toksisite sergilemeye katkıda bulunan potansiyel bir faktördür; küçük boyutlu nanopartiküller daha yüksek bir toplam yüzey alanına ve toplam partikül sayısına sahiptir, bu da toksisitenin artmasına neden olabilmektedir. Nanoboyutlu TiO_2'nin daha büyük partiküllere kıyasla daha toksik olduğu bulunmuştur (Gurr vd., 2005) ve farklı boyutlardaki nanopartiküllerin toksik etkileri aynı olmamaktadır (Yeo ve Kang, 2012). Bir araştırma, 10-30 nm boyutundaki küçük bir TIO_2 nanopartikül aglomeratının, kontrollere kıyasla bronkoalveolar lavaj sıvılarında en belirgin proinflamatuar etkilere neden olduğunu göstermiştir (LDH aktivitesindeki artışla değerlendirilmiştir) (Noël vd., 2013).

Canlı hücreler, kolorimetrik bir test olan XTT deneyi ile değerlendirilmiştir. Hücrelerin canlılığı, metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz tarafından sarı XTT'nin turuncu formazan şekline indirgenmesiyle belirlenmiştir. Söz konusu yöntem, hücre proliferasyon inhibisyonunu ölçmek için hassas bir araç olarak

hizmet veren bir parametredir (Scudiero vd., 1988). Kültürlenmiş HT-29, A549 ve MCF-7 24 saat boyunca TNT ve AgTNT ile ayrı ayrı muamele edilmiştir. Ardından oluşan formazan boyası bir spektrofotometre kullanılarak 450 nm dalga boyunda absorbans ile ölçülmüştür. **IC_{50}** değerlerine göre, HT-29, A549 ve MCF-7 hücrelerinin çoğalmasının %50 oranında engellenmesi için gereken AgTNT konsantrasyonu TNT konsantrasyonuna kıyasla daha düşüktür. TNT nanotüpler, 1200 µg/ml'ye kadar konsantrasyonda hücre çoğalmasında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır, bu da TNT'nin toksisitesinin olmadığını göstermektedir. TNT nanotüpler, HT-29, A549 ve MCF-7 hücrelerinde sırasıyla 1270 µg/ml, 1379 µg/ml ve 1280 µg/ml dozlarında hücre çoğalmasının inhibisyonunu önemli ölçüde indüklemiştir. Bu da TNT'nin yüksek dozlarda sitotoksik etkisini vurgulamaktadır. Wang ve meslektaşları titanyum nanotüplerin nöral kök hücreler (NSC) üzerindeki sitotoksisitesini incelemişlerdir. Yaklaşık 100 nm uzunluğunda ve 4 ila 5 nm çapında titanyum nanotüplerin, 12 saatlik inkübasyon boyunca konsantrasyonlar 200 µg/ml'nin altında olduğunda sitotoksik etki göstermediğini bulmuşlardır. Titanyum nanotüpler 48 saate kadar uzayan inkübasyon sürelerinde nöral hücreler üzerinde sitotoksisite göstererek zamana bağlı bir toksisite ortaya koymuştur (Wang vd., 2013). Benzer şekilde, 15 nm çapında ve küresel bir şekle sahip titanyum nanopartiküllerin sitotoksisitesinin değerlendirilmesi, karaciğer kanser (HepG2) hücrelerinin canlılığı üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olmadıklarını ortaya koymuştur (Ahamed vd., 2017). Yapılan başka bir çalışma, 5 nm boyutundaki küresel TiO_2 nanopartiküllerinin 48 ve 72 saat maruziyetten sonra A549 hücrelerinde hücre çoğalmasının engellenme oranında bir artışa yol açtığını göstermiştir (Wang vd., 2015). Bu sonuçlara dayanarak, bizim çalışmamızda TNT' lerin hücre hatlarında gözlenen düşük sitotoksisitesi nanotüplerin boyutu ve inkübasyon süresiyle bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Daha küçük nanotüplerin 48 saate kadar uzun süre maruz kalması, daha düşük dozlarda önemli sitotoksisiteye neden olabilmektedir.

Gümüş nanopartiküllerin sağlık alanında en yaygın kullanılan nanomalzemeler olduğu ve özellikle gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı geniş bir etki spektrumuna sahip antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle önemli biyolojik özelliklere sahip oldukları bilinmektedir (Aytekin Aydın vd., 2018; Pal vd., 2007; Rai vd., 2012; Wang vd., 2016). Birincil biyolojik etkileri arasında oksidatif stres ve DNA hasarını tetikleyen reaktif

radikallerin oluşumu yer almaktadır (Igaz vd., 2016; Suresh vd., 2012). Son zamanlarda AgNP'ler tümör hücrelerine karşı potansiyel göstermiştir (Bonan vd., 2019; Jang vd., 2016).

Çalışmamızda, hücrelerin 24 saat boyunca AgTNT ile muamele edilmesi, HT-29 hücrelerinde 111,4 µg/ml, A549 hücrelerinde 300 µg/ml ve MCF-7 hücrelerinde 310 µg/ml dozunda %50 oranında önemli bir proliferasyon inhibisyonuna neden olmuştur. Tüm konsantrasyonlarda AgTNT tarafından hücre proliferasyonunun inhibisyonu saf TNT'nin kendisinden daha fazladır. Buna göre TiO_2'nin tübüler yapısına konjuge edilmiş gümüş partikülünün varlığı HT-29 kolorektal kanser, A549 akciğer kanseri ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının inhibisyonunu TiO_2 nanotüpün kendisinden daha fazla arttırmaktadır. HT-29 hücreleri AgTNT nanotüplerine karşı A549 ve MCF-7 hücrelerinden daha hassas ve duyarlı olmuştur. Benzer sonuçlar daha önceki çalışmalarda da gözlemlenmiştir. Önceki bir çalışmada, Ag katkılı TiO_2 NP'lerin insan karaciğer kanseri (HepG2) hücrelerinde, TiO_2 NP'lerdeki Ag katkısı miktarıyla orantılı olarak doza bağlı etkiyle sitotoksisite indüksiyonu bildirilmiştir (Ahamed vd., 2017). Yapılan araştırmalar AgNP'lerin biyolojik sıvılarda Ag+ iyon salınımı yapabildiğini, sitotoksisitenin ise büyük ölçüde Ag+ kaynaklı olduğunu göstermiştir (Xue vd., 2016). Ayrıca, gümüş nanopartiküller içeren TiO_2 nanofiberler, insan karaciğer karsinomu hücre hattı (HepG2) üzerinde antikanser aktivite göstermiştir (Bonan vd., 2019). Ayrıca, *Ficus religiosa* AgNP'leri, A549, insan servikal karsinom hücreleri (HeLa), insan epidermoid karsinom hücre hattı (Hep2), insan kolon kanseri hücreleri (COLO 205) ve insan nöroblastom hücreleri (SH-SY5Y) dahil olmak üzere farklı kanser hücre hatlarında hücre canlılığını zamana ve doza bağlı bir şekilde azaltmıştır (Nakkala vd., 2017).

Birçok çalışma TiO_2 bazlı nanomalzemelerin genotoksisitesini araştırmıştır. Araştırmalar TiO_2'nin fotokatalitik aktivitesi sayesinde genotoksisite etkisi gösterebileceğini ve bu genotoksik etkinin diğer metal oksit nanoparçacıkları ile birleştiğinde artabileceğini göstermiştir (Ibrahim vd., 2014; Shukla vd., 2014). Bununla birlikte, TiO_2'nin in-vitro genotoksisitesi üzerine yapılan araştırmalar, TiO_2'nin hücreler üzerinde düşük dozlarda genotoksik bir etki göstermediğini ortaya koymuştur (Dobrzyńska vd., 2014). Vales ve arkadaşları (2015), TiO_2 NP'lerin BEAS-2B hücrelerine 4 hafta süreyle maruz

bırakılmasının ROS seviyesinde ve DNA hasarında bir artışa yol açmadığını bulmuşlardır. Ayrıca, TiO_2 NP'lerin hücreler tarafından alım kapasitesini inceleyen Brandao ve arkadaşları (2020), aynı maruz kalma konsantrasyonunda TiO_2 nanopartiküllerini daha fazla alan sinir hücrelerinin (A172, SH- SY5Y) önemli genetik hasar göstermediğini bulmuştur. Komet testi, canlı hücrelerdeki onarılmamış DNA iplik kırıkları lezyonları da dahil olmak üzere DNA hasarını tespit eden bir tekniktir. Komet testi gibi yöntemler DNA iplik kırılmaları yoluyla DNA hasarını belirlemekte ve nanopartiküllerin genotoksik aktivitelerini araştırmak için sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmamızda, TiO_2 bazlı nanomalzemelerin genotoksik aktivitelerini araştırmak için alkalin komet testini kullanılmıştır. Genotoksisite analizimizde, komet kuyruklarının farklı uzunlukları, kuyruktaki DNA yüzdesi ve OTM tüm hücre hatlarında AgTNT konsantrasyonu ile orantılı bulunmuştur. Böylece doz arttığında AgTNT'nin genotoksisiteye neden olduğu ortaya çıkmıştır. Gözlemlenen genotoksisite etki, genotoksik özellikleri daha önce tanımlanmış olan gümüş partiküllerine bağlı olduğunu düşünülmektedir (AshaRani, Hande, vd., 2009; Hadrup vd., 2018; Y. J. Kim vd., 2019; Rodriguez-Garraus vd., 2020; Tiwari vd., 2011; X. Wang vd., 2019). Nanomalzemelerin DNA hasarına neden olduğu temel mekanizma, DNA'ya zarar verebilen ve mutajenez süreçlerine yol açabilen ROS üretimine dayanmaktadır (Abdal Dayem vd., 2017; Che vd., 2017; Dobrzyńska vd., 2014; McShan vd., 2014). Çalışmalar AgNP'lerin mitokondri ile etkileşime girebileceğini ve elektron taşıma zincirini bozabileceğini, böylece ROS üretimine ve ATP sentezinin kesintiye uğramasına neden olabileceğini göstermiştir; ROS artışı ve ATP eksikliği protein ve DNA hasarı ile sonuçlanmaktadır (AshaRani, Mun, vd., 2009; McShan vd., 2014). Buna ek olarak, AgNP'lerin DNA onarım hücre sistemlerini bozduğu, böylece antioksidan moleküllerin azalmasına ve hücre zarının zarar görmesine yol açtığı gösterilmiştir (McShan vd., 2014). Ayrıca, AgNP'ler ve DNA arasındaki etkileşim DNA'nın kesilmesine veya denatürasyonuna neden olabilmekte ve hücre bölünmesini bozabilmektedir (Dakal vd., 2016). Ayrıca AgNP'lerden salınan Ag^+ iyonlarının proteinlerle etkileşime girerek konformasyonun değişmesine, deaktivasyona ve bozulmaya yol açtığı gösterilmiştir (McShan vd., 2014; Salim vd., 2019). Ag partikülleri ve protein arasında korona yapısının oluşması, DNA hasarında rol oynayan genlerin ekspresyonuna yol açmaktadır (McShan vd., 2014). Buna ek olarak Ag^+ iyonları, tiyol grupları aracılığıyla proteinlerle kompleksler oluşturmak için spesifik bir kapasiteye

sahiptir (Nallanthighal vd., 2017; Salim vd., 2019). Bu kompleksler Na^+/Cl^- taşınmasına müdahale edebilmekte ve ROS üretimine katkıda bulunabilmekte, bu da proteinlerin fizyolojik aktivitesini bozabilmekte ve hatta hücre ölümüne yol açabilmektedir (Burdușel vd., 2018; Nallanthighal vd., 2017; Salim vd., 2019).
Diğer taraftan TNT 12,5 ile muamele, hücrelerde sitotoksik etki gözlenmediği için genotoksik etkiye neden olmamıştır.

Literatüre göre, titanyum dioksitin yanı sıra çinko oksit, karbon nanotüpler ve silikon dioksit gibi nanomalzemelerin çoğu toksik etkilerini oksidatif stres yoluyla göstermektedir (Park vd., 2008; H. Yang vd., 2009). ROS oldukça reaktif olduğundan proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasara yol açmaktadır. Mitokondriler hücredeki ROS üretiminin ana bölgeleridir. Oksidatif fosforilasyon sırasında oksijen, solunum zinciri aracılığıyla kontrollü bir şekilde elektron eklenerek suya dönüştürülmektedir. Bu elektronların bazıları bazen zincirden kaçmakta ve moleküler oksijen tarafından kabul edilerek son derece reaktif süperoksit anyon radikalini ($O_2^{-\bullet}$), daha sonra hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşmekte ve bu da tamamen suya indirgenebilmekte veya kısmen suya indirgenebilmektedir. Kısmen de en güçlü oksidanlardan biri olan hidroksil radikali $OH^\bullet$'ye indirgenebilmektedir (Boonstra ve Post, 2004). AgNP'nin mitokondride birikmesi, elektron taşıma zincirini bozarak mitokondrinin normal işleyişini değiştirebilmekte, sonuçta ROS ve düşük ATP verimine neden olabilmektedir. AgNP'nin yüzey oksidasyonunun, hücre kültürü ortamı veya sitoplazmadaki proteinlerle temas ettiğinde, toksisiteyi artırabilecek Ag^+ iyonlarını salınması olasılığı vardır (AshaRani, Mun, vd., 2009). Gümüş iyonlarının *Escherichia coli* üzerindeki toksisitesi incelenmiştir ve sonuçlar solunum zincirindeki benzerlik nedeniyle memeli hücrelerine yansıtılabilmektedir (Yang ve Pon, 2003). Bazı çalışmalar, Ag^+ iyonunun bakteri hücrelerindeki solunum zincirindeki etkisi için bir mekanizma önermiştir. *Escherichia coli* 'de bulunan iki tip NADH dehidrojenaz, gümüş için yüksek afiniteye sahip sistein kalıntıları içermektedir (Bragg ve Rainnie, 1974; Friedrich, 1998). Bu dehidrojenaz enzimleri Ag^+ iyonunun tanınması için potansiyel bölgeler olarak ortaya çıkmaktadır (Bragg ve Rainnie, 1974; Liau vd., 1997). Dolayısıyla, Ag^+'nin bakteriyel solunum zincirinin bu enzimlerine bağlanması, terminal oksidazdaki elektronların oksijene yetersiz geçişine neden olarak büyük miktarlarda ROS üretimine yol açmakta ve böylece

Ag^+ iyonlarının bakteriye toksisitesini açıklamaktadır (Holt ve Bard, 2005). Çalışmamızda TNT ve AgTNT nanotüplerinin oksidatif stres oluşturma potansiyelini hücre geçirgen florojenik bir prob olan DCFDA kullanarak farklı hücre hatlarında değerlendirilmiştir. AgTNT konsantrasyonları arttığında ROS seviyesi belirgin bir şekilde artmıştır. ROS yüksek oranda reaktif olduğundan ve DNA hasarına yol açtığından, sonuçlarımız AgTNT'nin HT-29, A549 ve MCF-7 hücreleri üzerindeki genotoksik etkisini kanıtlayan komet sonuçlarıyla uyumludur. Gümüş genotoksisitesi üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (Das vd., 2017; Olugbodi vd., 2023; Xue vd., 2016).

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, genler tarafından düzenlenen bir süreçtir. Apoptoz iki temel sinyal yoluyla tetiklenebilir ölüm reseptörü aracılı ekstrinsik yol ve mitokondri aracılı intrinsik yol dahil olmak üzere yolaklar bulunmaktadır. Apoptoz düzenleyici mekanizmalar ölüm reseptörlerini, kaspazların aktivasyonunu ve diğer mekanizmaları içermektedir. İnflamasyon ve apoptozun düzenleyicileri olarak kaspazlar (sistein-aspartik asit proteaz), birçok hücrede hücre ölüm yollarında kritik bir role sahiptir. Bu moleküller programlanmış hücre ölümünün hem başlatılması hem de geliştirilmesinde rol oynamaktadır. Efektör kaspazlar (3 ve 7), apoptoz ile ilişkili değişikliklere ve nihayetinde hücrenin ölümüne neden olan belirli öncüllerinin aktivasyonundan sorumlu olmaktadır. Başlangıç kaspazlar (8 ve 9), efektör kaspazları aktif hale getirmeye yaramaktadır (Elmore, 2007).

Nanotüplerin hücre ölümünün kapsamını ve şeklini değerlendirmek için annexin-V boyaması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca nanotüplerin apoptoz yolaklarının sinyal iletiminde başlıca başlatıcı veya yürütücü olan kaspaz aktivasyonundaki etkilerini de incelemiştir. Çalışmamızda, apoptotik hücrelerin yüzdesi her hücre hattındaki AgTNT konsantrasyonu ile orantılı olmuştur. AgTNT konsantrasyonu ne kadar yüksekse, apoptotik hücre yüzdesi de o kadar artmıştır. Apoptoz sonuçları multikaspaz deneyinin sonuçları ile desteklenmiştir. Multikaspaz testimiz, birkaç kaspazın (kaspaz-1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9) varlığını tespit edebilen bir Pan Kaspaz testidir. AgTNT'lerin apoptolik aktivitesi, doza bağlı bir şekilde yüksek oranda kaspazın aktif olduğunu gösteren kaspaz aktivasyon testi ile açıkça ortaya konmuştur. AgNP'lerin hepatoselüler hücre hatlarındaki apoptotik

potansiyelinin değerlendirildiği bir çalışmada, konsantrasyona bağlı bir şekilde artan kaspaz-3, -8 ve -9 aktivitesi gösterilmiştir. Sonuçlar, küresel AgNp'ler tarafından indüklenen kaspaz bağımlı bir hücre ölümü ve Bax gibi pro-apoptotik faktörlerin tetiklediği up-regülasyonunu göstermiştir (Ahmadian vd., 2018). Diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar gözlemlenmiştir (Çiftçi vd., 2013; Hadrup vd., 2018; Jang vd., 2016; Jia vd., 2020; Y.-H. Lee vd., 2014; Miura ve Shinohara, 2009; Nakkala vd., 2017; Rodriguez-Garraus vd., 2020; Solairaj vd., 2017; Xue vd., 2016). TiO_2 NP'lerin ROS üretimi, mitokondriyal hasar ve apoptoz yoluyla sitotoksik etkilere neden olduğu bildirilmiş olsa da (Park vd., 2008; Shi vd., 2013; Tang vd., 2013; Ursini vd., 2014), sonuçlarımız TNT 12,5 dozunda yüksek düzeyde apoptotik hücre göstermemiştir. Bunun sitotoksisite deneyinde gözlenen sitotoksik olmayan etkiden kaynaklandığını düşünülmektedir (Gulla vd., 2021).

Çalışmamız, gümüş partiküllerle birleştirilmiş titanyum nanotüplerin sitotoksik, genotoksik ve antikanser özelliklerini ortaya çıkarmayı amaçlamaktadır. Nanotüplerin karakterizasyon analizleri, çapları 8 ila 12 nm arasında olan tübüler nanotüpleri açığa çıkarmıştır. HT-29, A549 ve MCF-7 olmak üzere üç hücre hattının muamelesinden sonra, nanotüpler muhtemelen fagositoz yoluyla hücrelerde internalize olduğunu görülmüştür. Nanotüpler sitoplazmada ve hücrelerin çekirdek zarında veziküller şeklinde gözlenmiştir. Sitotoksisite analizinde, AgTNT'nin nanotüp konsantrasyonu arttığında hücre çoğalmasını engellediğini tespit edilmiştir. Ayrıntılı analiz, AgTNT'nin sitotoksik etkisini kolorektal karsinom hücresi HT-29, akciğer kanseri hücresi A549 ve meme kanseri hücresi MCF-7'de ROS seviyesini artırarak gerçekleştirdiğini göstermiştir. ROS üretimi daha sonra mitokondrinin işlevsel aktivitesini bozarak sonuç olarak etkili kaspazların aktivasyonu yoluyla apoptotik süreci tetiklemektedir. Elde edilen bulgular, AgTNT'nin HT-29, A549 ve MCF-7 hücre hatlarında ROS ile indüklenen antikanser aktivitesine sahip olduğu fikrini açıkça desteklemektedir. Bu antikanser potansiyelinin, gümüşün hücresel ortamda veya hücreye nüfuz ettikten sonra saldığı Ag^+ iyonuyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. TNT'nin $\mathbf{IC_{12,5}}$ dozundaki antiapoptotik etkisi, titanyum dioksit nanotüplerin insan hücrelerindeki düşük toksisitesine bağlanabilmektedir. Titanyum dioksitin in-vitro ve in-vivo sitotoksik etkiye sahip olabileceği gösterilmiş olmasına rağmen, hücre hatlarımızda titanyum dioksit nanotüplerin toksik etkisi

gözlemlenmemiştir. Bu nedenle TNT'nin toksisitesinin doza ve partiküllerin fiziksel özelliklerine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Nanoteknoloji bazlı kombinasyon terapisi dünya çapında araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Hidrotermal yöntemi ile sentezlenen boş titanyum (TNT) ve gümüş ile yüklenmiş titanyum (AgTNT) nanotüpleri fizikokimyasal yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Verilerimiz, nanomateryallerin hücreler tarafından alımının nanomateryallerin fizikokimyasal özelliklerine ve maruz kalma süresine bağlı olabileceğini göstermektedir. TNT'nin tüm hücre hatları tarafından etkin bir şekilde internalize edildiği, ancak 1200 μg/ml'nin altındaki dozlarda sitotoksisite veya genotoksisitenin ilişkili olmadığı göz önüne alındığında, mevcut veriler TNT'nin hücre hatları üzerinde canlılığı etkilemediğini göstermektedir. Titanyum dioksit nanotüplerimizin çalışmamızdaki farklı hücre hatları üzerinde sitotoksik bir etkisi olmamasına rağmen, titanyum dioksitin fotokatalitik özellikleri göz ardı edilmemektedir. Bu özellikler, özellikle fotodinamik terapi, sonodinamik terapi ve kemosonodinamik terapi gibi belirli terapi türlerinde oksidatif stres etkisi göstermesini sağlamaktadır. Kolorektal kanser hücreleri HT-29, akciğer kanseri hücreleri A549 ve meme kanseri hücreleri MCF-7 üzerindeki sitotoksisite sonuçları, AgTNT nanotüplerinin sadece TNT nanotüplerinden daha sitotoksik olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, AgTNT'nin antikanser aktivitesinin mekanizması analiz edilmiş ve AgTNT'nin HT-29, A549 ve MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklediği ve hücrelerdeki DNA hasarını ve ROS seviyesini arttırdığı bulunmuştur. Dahası, AgTNT hücrelerde kaspaz ekspresyonunun arttırmıştır. Tüm bu sonuçlar, gümüş yüklü titanyum nanotüplerin tek başına titanyum nanotüplere kıyasla güçlü bir antikanser ajan olduğunu ortaya koymuştur. Dolayısıyla, bu çalışmalar kanser tedavisi için potansiyel bir terapötik olarak AgTNT'nin in-vivo modellerinin ve klinik kullanımının incelenmesi için yararlı olacaktır.

Bu çalışma, ilaç dağıtımında gerçek bir rol oynayabilecek rezervuarlar olarak titanyum nanotüplerin dikkat çekici özelliklerini vurgulamaktadır. Çalışmamız, nanotüplerin düşük toksisitesinin, mevcut tedavilerin sınırlamalarının, özellikle de sağlıklı hücreler üzerindeki yüksek sitotoksisitelerinin üstesinden gelmek için kanser tedavisini ilerletmede bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla bu çalışma, kanserle

mücadele için yeni alternatifler keşfetmeyi amaçlayan bilimsel araştırma çabalarını desteklemektedir.

KAYNAKLAR

Abdal Dayem, A., Hossain, M., Lee, S., Kim, K., Saha, S., Yang, G.-M., Choi, H., & Cho, S.-G. (2017). The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. International Journal of Molecular Sciences, 18(1), 120. https://doi.org/10.3390/ijms18010120

Ahamed, M., Khan, M. A. M., Akhtar, M. J., Alhadlaq, H. A., & Alshamsan, A. (2017). Ag-doping regulates the cytotoxicity of TiO2 nanoparticles via oxidative stress in human cancer cells. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-17559-9

Ahmadian, E., Dizaj, S. M., Rahimpour, E., Hasanzadeh, A., Eftekhari, A., Hosain zadegan, H., Halajzadeh, J., & Ahmadian, H. (2018). Effect of silver nanoparticles in the induction of apoptosis on human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Materials Science and Engineering C*, *93*, 465-471. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.027

Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. W. (2012a). The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *14*(1), 1-16. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124

Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. W. (2012b). The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *14*(1), 1-16. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124

Alibek, K., Mussabekova, A., Kakpenova, A., Duisembekova, A., Baiken, Y., Aituov, B., Karatayeva, N., & Zhussupbekova, S. (2013). Childhood cancers: what is a possible role of infectious agents? *Infectious Agents and Cancer*, *8*(1), 48. https://doi.org/10.1186/1750-9378-8-48

Alyamani, A., & M., O. (2012). FE-SEM Characterization of some nanomaterial. Içinde *Scanning Electron Microscopy*. InTech. https://doi.org/10.5772/34361

Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, *25*(9), 2097-2116. https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9

AshaRani, P., Hande, M. P., & Valiyaveettil, S. (2009). Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*, *10*(1), 65. https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-65

AshaRani, P. V., Mun, G. L. K., Hande, M. P., & Valiyaveettil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, *3*(2), 279-290. https://doi.org/10.1021/nn800596w

Atıcı, E. (2007). *Tıp tarihinde kanser ve lösemi Cancer and leukemia in the history of medicine*. 197-204.

Aytekin Aydın, M. T., Hoşgün, H. L., Dede, A., & Güven, K. (2018). Synthesis, characterization and antibacterial activity of silver-doped TiO2 nanotubes. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *205*, 503-507. https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.07.063

Bai, S., Yang, N., Wang, X., Gong, F., Dong, Z., Gong, Y., Liu, Z., & Cheng, L. (2020). Ultrasmall Iron-Doped Titanium Oxide Nanodots for Enhanced Sonodynamic and Chemodynamic Cancer Therapy. *ACS Nano*, *14*(11), 15119-15130. https://doi.org/10.1021/acsnano.0c05235

Bavykin, D. V., Friedrich, J. M., & Walsh, F. C. (2006). Protonated Titanates and TiO2 Nanostructured Materials: Synthesis, Properties, and Applications. *Advanced Materials*, *18*(21), 2807-2824. https://doi.org/10.1002/adma.200502696

Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(9), a019505. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505

Bergin, I. L., & Witzmann, F. A. (2013). Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology*, *3*(1/2), 163. https://doi.org/10.1504/IJBNN.2013.054515

BioRender. (2022). *Electron Microscopy* . https://www.biorender.com/template/transmission-electron-microscopy-tem

Birch, J., & Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes & Development*, *34*(23-24), 1565-1576. https://doi.org/10.1101/gad.343129.120

Bitman-Lotan, E., & Orian, A. (2021). Nuclear organization and regulation of the differentiated state. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(7), 3141-3158. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03731-4

Bonan, R. F., Mota, M. F., da Costa Farias, R. M., da Silva, S. D., Bonan, P. R. F., Diesel, L., Menezes, R. R., & da Cruz Perez, D. E. (2019). In vitro antimicrobial and anticancer properties of TiO2 blow-spun nanofibers containing silver nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, *104*, 109876. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109876

Boonstra, J., & Post, J. A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, *337*, 1-13. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.04.032

Boveri, T. (2008). Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *Journal of Cell Science*, *121*(Supplement_1), 1-84. https://doi.org/10.1242/jcs.025742

Brady, G., MacArthur, G. J., & Farrell, P. J. (2008). Epstein–Barr virus and Burkitt lymphoma. *Postgraduate Medical Journal*, *84*(993), 372-377. https://doi.org/10.1136/jcp.2007.047977

Bragg, P. D., & Rainnie, D. J. (1974). The effect of silver ions on the respiratory chain of Escherichia coli. *Canadian Journal of Microbiology*, *20*(6), 883-889. https://doi.org/10.1139/m74-135

Brandão, F., Fernández-bertólez, N., Rosário, F., Bessa, M. J., Fraga, S., Pásaro, E., Teixeira, J. P., Laffon, B., Valdiglesias, V., & Costa, C. (2020). Genotoxicity of tio2 nanoparticles in four different human cell lines (A549, HEPG2, A172 and SH-SY5Y). *Nanomaterials*, *10*(3), 1-14. https://doi.org/10.3390/nano10030412

Brannon-Peppas, L. (1995). Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *116*(1), 1-9. https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00324-X

Burd, E. M. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(1), 1-17. https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.1-17.2003

Butterworth, B. E. (2006). A classification framework and practical guidance for establishing a mode of action for chemical carcinogens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *45*(1), 9-23. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.01.011

Butterworth, B. E., & Bogdanffy, M. S. (1999). A Comprehensive Approach for Integration of Toxicity and Cancer Risk Assessments. *Regulartory Toxicology and Pharmacology*, *29*, 23-36. http://www.idealibrary.com

Butterworth, B. E., Popp, J. A., Conolly, R. B., & Goldsworthy, T. L. (1992). Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. *IARC scientific publications*, *116*, 279-305.

Calle, E. E., & Kaaks, R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, *4*(8), 579-591. https://doi.org/10.1038/nrc1408

Cao, Y., Wu, T., Dai, W., Dong, H., & Zhang, X. (2019). TiO2 Nanosheets with the Au Nanocrystal-Decorated Edge for Mitochondria-Targeting Enhanced Sonodynamic Therapy. *Chemistry of Materials*, *31*(21), 9105-9114. https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b03430

Chao, C.-S., Liu, K.-H., Tung, W.-L., Chen, S.-Y., Liu, D.-M., & Chang, Y.-P. (2012). Bioactive TiO2 ultrathin film with worm-like mesoporosity for controlled drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, *152*, 58-63. https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2011.12.006

Che, B., Luo, Q., Zhai, B., Fan, G., Liu, Z., Cheng, K., & Xin, L. (2017). Cytotoxicity and genotoxicity of nanosilver in stable GADD45α promoter-driven luciferase reporter HepG2 and A549 cells. Environmental Toxicology, 32(9), 2203-2211. https://doi.org/10.1002/tox.22433

Chen, H., & Zhao, Y. (2018). Applications of Light-Responsive Systems for Cancer Theranostics. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *10*(25), 21021-21034. https://doi.org/10.1021/acsami.8b01114

Cheng, Z., Li, M., Dey, R., & Chen, Y. (2021). Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives. *Journal of Hematology & Oncology*, *14*(1), 85. https://doi.org/10.1186/s13045-021-01096-0

Chennell, P., Feschet-Chassot, E., Devers, T., Awitor, K. O., Descamps, S., & Sautou, V. (2013). In vitro evaluation of TiO2 nanotubes as cefuroxime carriers on orthopaedic implants for the prevention of periprosthetic joint infections. *International Journal of Pharmaceutics*, *455*(1-2), 298-305. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.014

Clinton, S. K., Giovannucci, E. L., & Hursting, S. D. (2020). The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. *The Journal of Nutrition*, *150*(4), 663-671. https://doi.org/10.1093/jn/nxz268

Costa, S., Coelho, P., Costa, C., Silva, S., Mayan, O., Santos, L. S., Gaspar, J., & Teixeira, J. P. (2008). Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology*, *252*(1-3), 40-48. https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.07.056

Çiftçi, H., Turk, M., Tamer, U., Karahan, S., & Menemen, Y. (2013). Silver nanoparticles: Cytotoxic, apoptotic, and necrotic effects on MCF-7 cells. *Turkish Journal of Biology*, *37*(5), 573-581. https://doi.org/10.3906/biy-1302-21

Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S., & Yadav, V. (2016). Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. Frontiers in Microbiology, 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831

Darwiche, N. (2020). Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. *American journal of cancer research*, *10*(7), 1954-1978.

Das, B., Tripathy, S., Adhikary, J., Chattopadhyay, S., Mandal, D., Dash, S. K., Das, S., Dey, A., Dey, S. K., Das, D., & Roy, S. (2017). Surface modification minimizes the toxicity of silver nanoparticles: an in vitro and in vivo study. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *22*(6), 893-918. https://doi.org/10.1007/s00775-017-1468-x

David, A. R., & Zimmerman, M. R. (2010). Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nature Reviews Cancer*, *10*(10), 728-733. https://doi.org/10.1038/nrc2914

Dawson, K. A., Salvati, A., & Lynch, I. (2009). Nanoparticles reconstruct lipids. *Nature Nanotechnology*, *4*(2), 84-85. https://doi.org/10.1038/nnano.2008.426

de Flora, S., & la Maestra, S. (2015). Epidemiology of cancers of infectious origin and prevention strategies. *Journal of preventive medicine and hygiene*, *56*(1), E15-20.

de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., & Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*, *13*(6), 607-615. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70137-7

Deng, J., Xun, X., Zheng, W., Su, Y., Zheng, L., Wang, C., & Su, M. (2018). Sequential delivery of bismuth nanoparticles and doxorubicin by injectable macroporous hydrogels for combined anticancer kilovoltage X-ray radio- and chemo-therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, *6*(47), 7966-7973. https://doi.org/10.1039/C8TB02284D

Dobrzyńska, M. M., Gajowik, A., Radzikowska, J., Lankoff, A., Dušinská, M., & Kruszewski, M. (2014). Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bone marrow cells of rats in vivo. *Toxicology*, *315*(1), 86-91. https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.11.012

Doll, R., & Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*, *66*(6), 1191-1308. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7017215

Drews, J. (2000). Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science*, *287*(5460), 1960-1964. https://doi.org/10.1126/science.287.5460.1960

Du, Y., Ren, W., Li, Y., Zhang, Q., Zeng, L., Chi, C., Wu, A., & Tian, J. (2015). The enhanced chemotherapeutic effects of doxorubicin loaded PEG coated TiO2 nanocarriers in an orthotopic breast tumor bearing mouse model. *Journal of Materials Chemistry B*, *3*(8), 1518-1528. https://doi.org/10.1039/C4TB01781A

Duncan, R. (2005). Nanomedicine gets clinical. *Materials Today*, *8*(8), 16-17. https://doi.org/10.1016/S1369-7021(05)71032-4

Dwivedi, C., Pandey, I., Pandey, H., Ramteke, P. W., Pandey, A. C., Mishra, S. B., & Patil, S. (2017). Electrospun Nanofibrous Scaffold as a Potential Carrier of Antimicrobial Therapeutics for Diabetic Wound Healing and Tissue Regeneration. Içinde *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems* (ss. 147-164). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52727-9.00009-1

Dzutsev, A., Badger, J. H., Perez-Chanona, E., Roy, S., Salcedo, R., Smith, C. K., & Trinchieri, G. (2017). Microbes and Cancer. *Annual Review of Immunology*, *35*(1), 199-228. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052133

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicology Pathology*, *35*(4), 495-516.

El-Serag, H. B. (2012). Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, *142*(6), 1264-1273.e1. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.061

Engels, E. A., Biggar, R. J., Hall, H. I., Cross, H., Crutchfield, A., Finch, J. L., Grigg, R., Hylton, T., Pawlish, K. S., McNeel, T. S., & Goedert, J. J. (2008a). Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *International Journal of Cancer*, *123*(1), 187-194. https://doi.org/10.1002/ijc.23487

Engels, E. A., Biggar, R. J., Hall, H. I., Cross, H., Crutchfield, A., Finch, J. L., Grigg, R., Hylton, T., Pawlish, K. S., McNeel, T. S., & Goedert, J. J. (2008b). Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *International Journal of Cancer*, *123*(1), 187-194. https://doi.org/10.1002/ijc.23487

Faget, D. V., Ren, Q., & Stewart, S. A. (2019). Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *19*(8), 439-453. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2

Fahr, A., & Liu, X. (2007). Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *4*(4), 403-416. https://doi.org/10.1517/17425247.4.4.403

Feng, Y., Liu, X., & Pauklin, S. (2021). 3D chromatin architecture and epigenetic regulation in cancer stem cells. *Protein & Cell*, *12*(6), 440-454. https://doi.org/10.1007/s13238-020-00819-2

Fidler, I. J. (1989). Origin and Biology of Cancer. *Cytometry* , *10*, 673-680.

Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, *3*(6), 453-458. https://doi.org/10.1038/nrc1098

Flavahan, W. A., Gaskell, E., & Bernstein, B. E. (2017). Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science*, *357*(6348). https://doi.org/10.1126/science.aal2380

Friedrich, T. (1998). The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1364*(2), 134-146. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00024-3

Gao, T., Fjellvåg, H., & Norby, P. (2009). Crystal Structures of Titanate Nanotubes: A Raman Scattering Study. *Inorganic Chemistry*, *48*(4), 1423-1432. https://doi.org/10.1021/ic801508k

Ghicov, A., & Schmuki, P. (2009). Self-ordering electrochemistry: a review on growth and functionality of TiO2 nanotubes and other self-aligned MOx structures. *Chemical Communications*, *20*, 2791. https://doi.org/10.1039/b822726h

Ghosh, M., Chakraborty, A., & Mukherjee, A. (2013). Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology*, *33*(10), 1097-1110. https://doi.org/10.1002/jat.2863

Giovino, G. A., Mirza, S. A., Samet, J. M., Gupta, P. C., Jarvis, M. J., Bhala, N., Peto, R., Zatonski, W., Hsia, J., Morton, J., Palipudi, K. M., & Asma, S. (2012). Tobacco use in 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross-sectional household surveys. *Lancet*, *380*, 668-679. www.thelancet.com

Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*, *128*(4), 635-638. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006

Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F.,

Robbins, P. D., … Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, *179*(4), 813-827. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005

Gulla, S., Lomada, D., Araveti, P. B., Srivastava, A., Murikinati, M. K., Reddy, K. R., Inamuddin, Reddy, M. C., & Altalhi, T. (2021). Titanium dioxide nanotubes conjugated with quercetin function as an effective anticancer agent by inducing apoptosis in melanoma cells. *Journal of Nanostructure in Chemistry*. https://doi.org/10.1007/s40097-021-00396-8

Gurr, J.-R., Wang, A. S. S., Chen, C.-H., & Jan, K.-Y. (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, *213*(1-2), 66-73. https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.05.007

Hadrup, N., Sharma, A. K., & Loeschner, K. (2018). Toxicity of silver ions, metallic silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *98*(June), 257-267. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.08.007

Han, X., Huang, J., Jing, X., Yang, D., Lin, H., Wang, Z., Li, P., & Chen, Y. (2018). Oxygen-Deficient Black Titania for Synergistic/Enhanced Sonodynamic and Photoinduced Cancer Therapy at Near Infrared-II Biowindow. *ACS Nano*, *12*(5), 4545-4555. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b00899

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31-46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*, 57-70.

Hayat, M. A. (1989). *Colloidal Gold:Principles, Methods and Applications.* (M. A. Hayat, Ed.; Elsevier, C. 1). Academic Press Inc.

He, S., & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in health and disease. *Cell*, *169*(6), 1000-1011. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015

Hegde, A. N., & Smith, S. G. (2019). Recent developments in transcriptional and translational regulation underlying long-term synaptic plasticity and memory. *Learning & Memory*, *26*(9), 307-317. https://doi.org/10.1101/lm.048769.118

Hellstrand, E., Lynch, I., Andersson, A., Drakenberg, T., Dahlbäck, B., Dawson, K. A., Linse, S., & Cedervall, T. (2009). Complete high-density lipoproteins in nanoparticle corona. *The FEBS Journal*, *276*(12), 3372-3381. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07062.x

Helmink, B. A., Khan, M. A. W., Hermann, A., Gopalakrishnan, V., & Wargo, J. A. (2019). The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nature Medicine*, *25*(3), 377-388. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0377-7

Heredia-Cervera, B. E., González-Azcorra, S. A., Rodríguez-Gattorno, G., López, T., Ortiz-Islas, E., & Oskam, G. (2009). Controlled Release of Phenytoin from Nanostructured TiO2 Reservoirs. *Science of Advanced Materials*, *1*(1), 63-68. https://doi.org/10.1166/sam.2009.1009

Hernández, L. G., van Steeg, H., Luijten, M., & van Benthem, J. (2009). Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *682*(2-3), 94-109. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.07.002

Hoffman, A. S. (2008). The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, *132*(3), 153-163. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.08.012

Holliday, R. (1987). The Inheritance of Epigenetic Defects. *Science*, *238*(4824), 163-170. https://doi.org/10.1126/science.3310230

Holt, K. B., & Bard, A. J. (2005). Interaction of Silver(I) Ions with the Respiratory Chain of Escherichia coli : An Electrochemical and Scanning Electrochemical Microscopy Study of the Antimicrobial Mechanism of Micromolar Ag+. *Biochemistry*, *44*(39), 13214-13223. https://doi.org/10.1021/bi0508542

Hou, Z., Zhang, Y., Deng, K., Chen, Y., Li, X., Deng, X., Cheng, Z., Lian, H., Li, C., & Lin, J. (2015). UV-Emitting Upconversion-Based TiO2 Photosensitizing Nanoplatform: Near-Infrared Light Mediated *in Vivo* Photodynamic Therapy *via* Mitochondria-Involved Apoptosis Pathway. *ACS Nano*, *9*(3), 2584-2599. https://doi.org/10.1021/nn506107c

Hoyer, P. (1996). Formation of a Titanium Dioxide Nanotube Array. *Langmuir*, *12*(6), 1411-1413. https://doi.org/10.1021/la9507803

Hu, X., Ke, C., Zhong, J., Chen, Y., Dong, J., Hao, M., Chen, Q., Ni, J., & Peng, Z. (2023). Nano selenium-doped TiO2 nanotube arrays on orthopedic implants for suppressing osteosarcoma growth. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1252816

Huang, P., Wang, J., Lai, S., Liu, F., Ni, N., Cao, Q., Liu, W., Deng, D. Y. B., & Zhou, W. (2014). Surface modified titania nanotubes containing anti-bacterial drugs for controlled delivery nanosystems with high bioactivity. *J. Mater. Chem. B*, *2*(48), 8616-8625. https://doi.org/10.1039/C4TB01281J

Huang, S. (2012). Tumor progression: Chance and necessity in Darwinian and Lamarckian somatic (mutationless) evolution. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *110*(1), 69-86. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2012.05.001

Huff, J. (1999). *Chemicals associated with tumours of the kidney, urinary bladder and thyroidgland in laboratory rodents from 2000 US National Toxicology Program/National Cancer Institute bioassays for carcinogenicity* (C. 147). International Agency for Research on Cancer.

Ibrahim, M. M., Ahmed, S. A., Khairou, K. S., & Mokhtar, M. (2014). Carbon nanotube/titanium nanotube composites loaded platinum nanoparticles as high performance photocatalysts. *Applied Catalysis A: General*, *475*, 90-97. https://doi.org/10.1016/j.apcata.2014.01.030

Igaz, N., Kovács, D., Rázga, Z., Kónya, Z., Boros, I. M., & Kiricsi, M. (2016). Modulating chromatin structure and DNA accessibility by deacetylase inhibition enhances the anti-cancer activity of silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *146*, 670-677. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.004

Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, *354*(6348), 56-58. https://doi.org/10.1038/354056a0

Imasaka, K., Kanatake, Y., Ohshiro, Y., Suehiro, J., & Hara, M. (2006). Production of carbon nanoonions and nanotubes using an intermittent arc discharge in water. *Thin Solid Films*, *506-507*, 250-254. https://doi.org/10.1016/j.tsf.2005.08.024

Ingham, B. (2015). X-ray scattering characterisation of nanoparticles. *Crystallography Reviews*, *21*(4), 229-303. https://doi.org/10.1080/0889311X.2015.1024114

International Agency for Research on Cancer. (2012). Biological agents: A review of human carcinogens. Içinde *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human: C. 100 B*.

Irigaray, P., & Belpomme, D. (2010). Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. Içinde *Carcinogenesis* (C. 31, Sayı 2, ss. 135-148). https://doi.org/10.1093/carcin/bgp252

Ishaq, S., & Nunn, L. (2015). Helicobacter pylori and gastric cancer: a state of the art review. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, *8*(Suppl 1), S6-S14.

Jain, K. K. (2005). The role of nanobiotechnology in drug discovery. *Drug Discovery Today*, *10*(21), 1435-1442. https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03573-7

Jain, K. K. (2020). *Drug Delivery Systems* (K. K. Jain, Ed.; C. 3). Humana Press. http://www.springer.com/series/7651

Jain, S., Kumar, N., Tahir, M., & Garg, S. (2023). Nanoparticle synthesis, characterization and applications. Içinde *The Impact of Nanoparticles on Agriculture and Soil* (ss. 13-40). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91703-2.00007-5

Jang, S. J., Yang, I. J., Tettey, C. O., Kim, K. M., & Shin, H. M. (2016). In-vitro anticancer activity of green synthesized silver nanoparticles on MCF-7 human breast cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*, *68*, 430-435. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.101

Jarosz, M., Kapusta-Kołodziej, J., Pawlik, A., Syrek, K., & Sulka, G. D. (2017). Drug delivery systems based on titania nanostructures. *Nanostructures for Drug Delivery*, *May*, 299-326. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46143-6.00009-9

Jia, M., Zhang, W., He, T., Shu, M., Deng, J., Wang, J., Li, W., Bai, J., Lin, Q., Luo, F., Zhou, W., & Zeng, X. (2020). Evaluation of the genotoxic and oxidative damage potential of silver nanoparticles in human NCM460 and HCT116 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5). https://doi.org/10.3390/ijms21051618

Johnston, H. J., Hutchison, G., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., & Stone, V. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, *40*(4), 328-346. https://doi.org/10.3109/10408440903453074

Jones, P. A., Issa, J.-P. J., & Baylin, S. (2016). Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nature Reviews Genetics*, *17*(10), 630-641. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.93

Ju-Nam, Y., & Lead, J. R. (2008). Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of The Total Environment*, *400*(1-3), 396-414. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.042

Karthika, V., Kaleeswarran, P., Gopinath, K., Arumugam, A., Govindarajan, M., Alharbi, N. S., Khaled, J. M., Al-anbr, M. N., & Benelli, G. (2018). Biocompatible properties of nano-drug carriers using TiO2-Au embedded on multiwall carbon nanotubes for targeted drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, *90*(April), 589-601. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.094

Kayser, O., Lemke, A., & Hernandez-Trejo, N. (2005). The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *6*(1), 3-5. https://doi.org/10.2174/1389201053167158

Kim, K. T., Eo, M. Y., Nguyen, T. T. H., & Kim, S. M. (2019). General review of titanium toxicity. *International Journal of Implant Dentistry*, *5*(1), 10. https://doi.org/10.1186/s40729-019-0162-x

Kim, S., & Kaang, B.-K. (2017). Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. *Experimental & Molecular Medicine*, *49*(1), e281-e281. https://doi.org/10.1038/emm.2016.140

Kim, Y. J., Rahman, M. M., Lee, S. M., Kim, J. M., Park, K., Kang, J. H., & Seo, Y. R. (2019). Assessment of in vivo genotoxicity of citrated-coated silver nanoparticles via transcriptomic analysis of rabbit liver tissue. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 393-405. https://doi.org/10.2147/IJN.S174515

Klaunig, J. E., Wang, Z., Pu, X., & Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *254*(2), 86-99. https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.028

Kovalchuk, O., Walz, P., & Kovalchuk, I. (2014). Does bacterial infection cause genome instability and cancer in the host cell? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *761*, 1-14. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.01.004

Kowald, A., Passos, J. F., & Kirkwood, T. B. L. (2020). On the evolution of cellular senescence. *Aging Cell*, *19*(12). https://doi.org/10.1111/acel.13270

Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C. L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E. V., Gapstur, S., Patel, A. V., Andrews, K., & Gansler, T. (2012). American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *62*(1), 30-67. https://doi.org/10.3322/caac.20140

Lai, Y.-K., Wang, Q., Huang, J.-Y., Li, H.-Q., Chen, Z., Zhao, A. Z.-J., Wang, Y., Zhang, K.-Q., Sun, H.-T., & Al-Deyab, S. S. (2016). TiO2 nanotube platforms for smart drug delivery: a review. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 11*, 4819-4834. https://doi.org/10.2147/IJN.S108847

Lan, G., Ni, K., Veroneau, S. S., Feng, X., Nash, G. T., Luo, T., Xu, Z., & Lin, W. (2019). Titanium-Based Nanoscale Metal–Organic Framework for Type I Photodynamic Therapy. *Journal of the American Chemical Society*, *141*(10), 4204-4208. https://doi.org/10.1021/jacs.8b13804

Lan, K., Liu, Y., Zhang, W., Liu, Y., Elzatahry, A., Wang, R., Xia, Y., Al-Dhayan, D., Zheng, N., & Zhao, D. (2018). Uniform Ordered Two-Dimensional Mesoporous TiO2 Nanosheets from Hydrothermal-Induced Solvent-Confined Monomicelle Assembly. *Journal of the American Chemical Society*, *140*(11), 4135-4143. https://doi.org/10.1021/jacs.8b00909

LaVan, D. A., McGuire, T., & Langer, R. (2003). Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nature Biotechnology*, *21*(10), 1184-1191. https://doi.org/10.1038/nbt876

Lee, J. H., Leu, I. C., Hsu, M. C., Chung, Y. W., & Hon, M. H. (2005). Fabrication of aligned TiO2 one-dimensional nanostructured arrays using a one-step templating solution approach. *Journal of Physical Chemistry B*, *109*(27), 13056-13059. https://doi.org/10.1021/jp052203l

Lee, S., & Schmitt, C. A. (2019). The dynamic nature of senescence in cancer. *Nature Cell Biology*, *21*(1), 94-101. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2

Lee, Y.-H., Cheng, F.-Y., Chiu, H.-W., Tsai, J.-C., Fang, C.-Y., Chen, C.-W., & Wang, Y.-J. (2014). Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. *Biomaterials*, *35*(16), 4706-4715. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.021

Lemon, S. M., & McGivern, D. R. (2012). Is Hepatitis C Virus Carcinogenic? *Gastroenterology*, *142*(6), 1274-1278. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.01.045

Levrero, M., & Zucman-Rossi, J. (2016). Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, *64*(1), S84-S101. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.021

Liang, X., Xie, Y., Wu, J., Wang, J., Petković, M., Stepić, M., Zhao, J., Ma, J., & Mi, L. (2021). Functional titanium dioxide nanoparticle conjugated with phthalocyanine and folic acid as a promising photosensitizer for targeted photodynamic therapy in vitro and in vivo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *215*, 112122. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112122

Liau, S. Y., Read, D. C., Pugh, W. J., Furr, J. R., & Russell, A. D. (1997). Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterialaction of silver ions. *Letters in Applied Microbiology*, *25*(4), 279-283. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00219.x

Limbach, L. K., Li, Y., Grass, R. N., Brunner, T. J., Hintermann, M. A., Muller, M., Gunther, D., & Stark, W. J. (2005). Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblasts: Effects of Particle Size, Agglomeration, and Diffusion at Low Concentrations. *Environmental Science & Technology*, *39*(23), 9370-9376. https://doi.org/10.1021/es051043o

Liu, N., Chen, X., Zhang, J., & Schwank, J. W. (2014). A review on TiO2-based nanotubes synthesized via hydrothermal method: Formation mechanism, structure modification, and photocatalytic applications. *Catalysis Today*, *225*, 34-51. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2013.10.090

Lopez, T., Ortiz-Islas, E., Manjarrez, J., Reinoso, F. R., Sepulveda, A., & Gonzalez, R. D. (2006). Biocompatible titania microtubes formed by nanoparticles and its application in the drug delivery of valproic acid. *Optical Materials*, *29*(1), 70-74. https://doi.org/10.1016/j.optmat.2006.03.016

Losic, D., Gulati, & Sinn Aw, M. (2012). Nanoengineered drug-releasing Ti wires as an alternative for local delivery of chemotherapeutics in the brain. *International Journal of Nanomedicine*, 2069. https://doi.org/10.2147/IJN.S29917

Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., & Dawson, K. A. (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(38), 14265-14270. https://doi.org/10.1073/pnas.0805135105

Lynch, I., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2009). What does the cell see? *Nature Nanotechnology*, *4*(9), 546-547. https://doi.org/10.1038/nnano.2009.248

Ma, Q., Mei, S., Ji, K., Zhang, Y., & Chu, P. K. (2011). Immobilization of Ag nanoparticles/FGF-2 on a modified titanium implant surface and improved human gingival fibroblasts behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *98A*(2), 274-286. https://doi.org/10.1002/jbm.a.33111

Mahdihassan, S. (1985). Cinnabar-gold as the Best Alchemical Drug of Longevity, Called Makaradhwaja in India. *The American Journal of Chinese Medicine*, *13*(01n04), 93-108. https://doi.org/10.1142/S0192415X85000149

Mainardes, R., & Silva, L. (2004). Drug Delivery Systems: Past, Present, and Future. *Current Drug Targets*, *5*(5), 449-455. https://doi.org/10.2174/1389450043345407

Majeed Khan, M. A., Kumar, S., Naziruddin Khan, M., Ahamed, M., & Al Dwayyan, A. S. (2014). Microstructure and blueshift in optical band gap of nanocrystalline

AlxZn1−xO thin films. *Journal of Luminescence*, *155*, 275-281. https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.06.007

Mansfield, C. M., Alloy, M. M., Hamilton, J., Verbeck, G. F., Newton, K., Klaine, S. J., & Roberts, A. P. (2015). Photo-induced toxicity of titanium dioxide nanoparticles to Daphnia magna under natural sunlight. *Chemosphere*, *120*, 206-210. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.075

Marano, F., Hussain, S., Rodrigues-Lima, F., Baeza-Squiban, A., & Boland, S. (2011). Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Archives of Toxicology*, *85*(7), 733-741. https://doi.org/10.1007/s00204-010-0546-4

Marin, J. J. G., Romero, M. R., Blazquez, A. G., Herraez, E., Keck, E., & Briz, O. (2009). Importance and Limitations of Chemotherapy Among the Available Treatments for Gastrointestinal Tumours. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *9*(2), 162-184. https://doi.org/10.2174/187152009787313828

Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine | www*, *3*(11). www.plosmedicine.org

McShan, D., Ray, P. C., & Yu, H. (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver. Journal of Food and Drug Analysis, 22(1), 116-127. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010

Misra, A., Pal, R., Majumbar, S. S., Talwar, G. P., & Singh, O. (1997). Biphasic Testosterone Delivery Profile Observed with Two Different Transdermal Formulations. *Pharmaceutical Research*, *14*(9).

Miura, N., & Shinohara, Y. (2009). Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *390*(3), 733-737. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.039

Moore, P. S., & Chang, Y. (2017). Common Commensal Cancer Viruses. *PLOS Pathogens*, *13*(1), e1006078. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006078

Morales-Sánchez, A., & Fuentes-Pananá, E. (2014). Human Viruses and Cancer. *Viruses*, *6*(10), 4047-4079. https://doi.org/10.3390/v6104047

Morimoto, Y., Izumi, H., Yoshiura, Y., Tomonaga, T., Oyabu, T., Myojo, T., Kawai, K., Yatera, K., Shimada, M., Kubo, M., Yamamoto, K., Kitajima, S., Kuroda, E., Kawaguchi, K., & Sasaki, T. (2015). Pulmonary toxicity of well-dispersed cerium oxide nanoparticles following intratracheal instillation and inhalation. *Journal of Nanoparticle Research*, *17*(11), 442. https://doi.org/10.1007/s11051-015-3249-1

Moseke, C., Hage, F., Vorndran, E., & Gbureck, U. (2012). TiO2 nanotube arrays deposited on Ti substrate by anodic oxidation and their potential as a long-term drug delivery system for antimicrobial agents. *Applied Surface Science*, *258*(14), 5399-5404. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.02.022

Mund, R., Panda, N., Nimesh, S., & Biswas, A. (2014). Novel titanium oxide nanoparticles for effective delivery of paclitaxel to human breast cancer cells. *Journal of Nanoparticle Research*, *16*(12), 2739. https://doi.org/10.1007/s11051-014-2739-x

Muntimadugu, E., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). Exploring the Potential of Nanotherapeutics in Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Pharmacological Research*, *126*, 109-122. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.010

Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M., & Huh, K. (2004). Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced

Oncogenesis. *Journal of Virology*, *78*(21), 11451-11460. https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004

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. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.03.090

Nallanthighal, S., Chan, C., Bharali, D. J., Mousa, S. A., Vásquez, E., & Reliene, R. (2017). Particle coatings but not silver ions mediate genotoxicity of ingested silver nanoparticles in a mouse model. NanoImpact, 5, 92-100. https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.01.003

Nam, A. S., Chaligne, R., & Landau, D. A. (2021). Integrating genetic and non-genetic determinants of cancer evolution by single-cell multi-omics. *Nature Reviews Genetics*, *22*(1), 3-18. https://doi.org/10.1038/s41576-020-0265-5

Nayak, S., Sajankila, S. P., Rao, C. V., Hegde, A. R., & Mutalik, S. (2021). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Jatropha curcas* seed cake extract and characterization: evaluation of its antibacterial activity. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, *43*(24), 3415-3423. https://doi.org/10.1080/15567036.2019.1632394

Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., & Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*, *8*(7), 543-557. https://doi.org/10.1038/nmat2442

Noël, A., Charbonneau, M., Cloutier, Y., Tardif, R., & Truchon, G. (2013). Rat pulmonary responses to inhaled nano-TiO2: effect of primary particle size and agglomeration state. *Particle and Fibre Toxicology*, *10*(1), 48. https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-48

Nyamukamba, P., Okoh, O., Mungondori, H., Taziwa, R., & Zinya, S. (2018). Synthetic Methods for Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review. Içinde *Titanium Dioxide - Material for a Sustainable Environment*. InTech. https://doi.org/10.5772/intechopen.75425

Ojeda, J. J., & Dittrich, M. (2012). *Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Molecular Analysis of Microbial Cells* (ss. 187-211). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6_8

Olugbodi, J. O., Lawal, B., Bako, G., Onikanni, A. S., Abolenin, S. M., Mohammud, S. S., Ataya, F. S., & Batiha, G. E.-S. (2023). Effect of sub-dermal exposure of silver nanoparticles on hepatic, renal and cardiac functions accompanying oxidative damage in male Wistar rats. *Scientific Reports*, *13*(1), 10539. https://doi.org/10.1038/s41598-023-37178-x

Ou, H. H., & Lo, S. L. (2007). Review of titania nanotubes synthesized via the hydrothermal treatment: Fabrication, modification, and application. *Separation and Purification Technology*, *58*(1), 179-191. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.07.017

Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(6), 1712-1720. https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06

Panáček, A., Kvítek, L., Prucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrová, N., Sharma, V. K., Nevěčná, T., & Zbořil, R. (2006). Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, *110*(33), 16248-16253. https://doi.org/10.1021/jp063826h

Park, E. J., Yi, J., Chung, K. H., Ryu, D. Y., Choi, J., & Park, K. (2008). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters*, *180*(3), 222-229. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.06.869

Patil, J. V., Mali, S. S., Hong, C. K., Kim, J. H., & Patil, P. S. (2017). Structural, morphological, and wettability study of electrochemically anodized 1D TiO2 nanotube arrays. *Applied Physics A*, *123*(10), 610. https://doi.org/10.1007/s00339-017-1197-6

Pattle, S. B., & Farrell, P. J. (2006). The role of Epstein–Barr virus in cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *6*(11), 1193-1205. https://doi.org/10.1517/14712598.6.11.1193

Pavasupree, S., Jitputti, J., Ngamsinlapasathian, S., & Yoshikawa, S. (2008). Hydrothermal synthesis, characterization, photocatalytic activity and dye-sensitized solar cell performance of mesoporous anatase TiO2 nanopowders. *Materials Research Bulletin*, *43*(1), 149-157. https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2007.02.028

Peng, L., Mendelsohn, A. D., LaTempa, T. J., Yoriya, S., Grimes, C. A., & Desai, T. A. (2009). Long-Term Small Molecule and Protein Elution from TiO2 Nanotubes. *Nano Letters*, *9*(5), 1932-1936. https://doi.org/10.1021/nl9001052

Pischon, T., Nöthlings, U., & Boeing, H. (2008). Obesity and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, *67*(2), 128-145. https://doi.org/10.1017/S0029665108006976

Pogribny, I. P., & Beland, F. A. (2013). DNA methylome alterations in chemical carcinogenesis. *Cancer Letters*, *334*(1), 39-45. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.09.010

Pogue, A. I., Jones, B. M., Bhattacharjee, S., Percy, M. E., Zhao, Y., & Lukiw, W. J. (2012). Metal-Sulfate Induced Generation of ROS in Human Brain Cells: Detection Using an Isomeric Mixture of 5- and 6-Carboxy-2′,7′-Dichlorofluorescein Diacetate (Carboxy-DCFDA) as a Cell Permeant Tracer. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(8), 9615-9626. https://doi.org/10.3390/ijms13089615

Poortahmasebi, V., Poorebrahim, M., Najafi, S., Jazayeri, S. M., Alavian, S. M., Arab, S. S., Ghavami, S., Alavian, S. E., Rezaei Moghadam, A., & Amiri, M. (2016). How Hepatitis C Virus Leads to Hepatocellular Carcinoma: A Network-Based Study. *Hepatitis Monthly*, *16*(2). https://doi.org/10.5812/hepatmon.36005

Rahimnejad, S., & Torbati, M. B. (2016). Synthesis of Hydroxyapatite / Ag / TiO 2 Nanotubes and Evaluation of Their Anticancer Activity on Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Journal of Chemical Health Risks*, *6*(3), 203-212.

Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., & Gade, A. K. (2012). Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *112*(5), 841-852. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x

Raja, G., Cao, S., Kim, D.-H., & Kim, T.-J. (2020). Mechanoregulation of titanium dioxide nanoparticles in cancer therapy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, *107*(12). https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110303.Mechanoregulation

Rauch, J., Kolch, W., Laurent, S., & Mahmoudi, M. (2013). Big Signals from Small Particles: Regulation of Cell Signaling Pathways by Nanoparticles. *Chemical Reviews*, *113*(5), 3391-3406. https://doi.org/10.1021/cr3002627

Reis, C. P., Ribeiro, A. J., Houng, S., Veiga, F., & Neufeld, R. J. (2007). Nanoparticulate delivery system for insulin: Design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *30*(5), 392-397. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.12.007

Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, *10*(4), 853. https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267

Rodrigues, C. M., Ferreira, O. P., & Alves, O. L. (2010). Interaction of sodium titanate nanotubes with organic acids and base: chemical, structural and morphological stabilities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *21*(7), 1341-1348. https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000700021

Rodriguez-Garraus, A., Azqueta, A., Vettorazzi, A., & de Cerain, A. L. (2020). Genotoxicity of silver nanoparticles. *Nanomaterials*, *10*(2), 1-27. https://doi.org/10.3390/nano10020251

Roguska, A., Pisarek, M., Andrzejczuk, M., Lewandowska, M., Kurzydlowski, K. J., & Janik-Czachor, M. (2012). Surface characterization of Ca-P/Ag/TiO2 nanotube composite layers on Ti intended for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *100A*(8), 1954-1962. https://doi.org/10.1002/jbm.a.34044

Rusciano, D., & Burger, M. M. (1992). Why do cancer cells metastasize into particular organs? *BioEssays*, *14*(3), 185-194.

Saleh, T. A. (2016). Nanomaterials for Pharmaceuticals Determination. *Bioenergetics: Open Access*, *5*(1), 1-6. https://doi.org/10.4172/2167-7662.1000226

Salim, E., Abdel-Halim, K., Abu-Risha, S., & Abdel-Latif, A. (2019). Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine and ultrastructure alterations by silver nanoparticles attributing to placental transfer in pregnant rats and fetuses. Human & Experimental Toxicology, 38(6), 734-745. https://doi.org/10.1177/0960327119836199

Samberg, M. E., Oldenburg, S. J., & Monteiro-Riviere, N. A. (2010). Evaluation of Silver Nanoparticle Toxicity in Skin in Vivo and Keratinocytes in Vitro. *Environmental Health Perspectives*, *118*(3), 407-413. https://doi.org/10.1289/ehp.0901398

Samuel M. Cohen, & Leon B. Ellwein. (1991). Genetic Errors, Cell Proliferation, and Carcinogenesis. *Cancer Res*, *51*(24), 6493-6505.

Sargazi, S., ER, S., Sacide Gelen, S., Rahdar, A., Bilal, M., Arshad, R., Ajalli, N., Farhan Ali Khan, M., & Pandey, S. (2022). Application of titanium dioxide nanoparticles in photothermal and photodynamic therapy of cancer: An updated and comprehensive review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *75*, 103605. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103605

Scherbart, A. M., Langer, J., Bushmelev, A., van Berlo, D., Haberzettl, P., van Schooten, F.-J., Schmidt, A. M., Rose, C. R., Schins, R. P., & Albrecht, C. (2011). Contrasting macrophage activation by fine and ultrafine titanium dioxide particles is associated with different uptake mechanisms. *Particle and Fibre Toxicology*, *8*(1), 31. https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-31

Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., & Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble

tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research*, *48*(17), 4827-4833.

Sears, C. L., & Garrett, W. S. (2014). Microbes, Microbiota, and Colon Cancer. *Cell Host & Microbe*, *15*(3), 317-328. https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.007

Shah, S. C., Kayamba, V., Peek, R. M., & Heimburger, D. (2019). Cancer Control in Low- and Middle-Income Countries: Is It Time to Consider Screening? *Journal of Global Oncology*, *5*, 1-8. https://doi.org/10.1200/JGO.18.00200

Shahbazi, M.-A., Faghfouri, L., Ferreira, M. P. A., Figueiredo, P., Maleki, H., Sefat, F., Hirvonen, J., & Santos, H. A. (2020). The versatile biomedical applications of bismuth-based nanoparticles and composites: therapeutic, diagnostic, biosensing, and regenerative properties. *Chemical Society Reviews*, *49*(4), 1253-1321. https://doi.org/10.1039/C9CS00283A

Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., & Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*, *10*(1), 15. https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-15

Shukla, R. K., Kumar, A., Vallabani, N. V. S., Pandey, A. K., & Dhawan, A. (2014). Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice. *Nanomedicine*, *9*(9), 1423-1434. https://doi.org/10.2217/nnm.13.100

Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *73*(1), 17-48. https://doi.org/10.3322/caac.21763

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffeis, T. G. G., Wright, C. J., & Doak, S. H. (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, *30*(23-24), 3891-3914. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.009

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* , *175*, 184-191.

Solairaj, D., Rameshthangam, P., & Arunachalam, G. (2017). Anticancer activity of silver and copper embedded chitin nanocomposites against human breast cancer (MCF-7) cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, *105*, 608-619. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.078

Sotiriou, G. A., Diaz, E., Long, M. S., Godleski, J., Brain, J., Pratsinis, S. E., & Demokritou, P. (2012). A novel platform for pulmonary and cardiovascular toxicological characterization of inhaled engineered nanomaterials. *Nanotoxicology*, *6*(6), 680-690. https://doi.org/10.3109/17435390.2011.604439

Spencer, W. A., Lehmler, H.-J., Robertson, L. W., & Gupta, R. C. (2009). Oxidative DNA adducts after Cu2+-mediated activation of dihydroxy PCBs: Role of reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, *46*(10), 1346-1352. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.005

Sulka, G. D., Kapusta-Kołodziej, J., Brzózka, A., & Jaskuła, M. (2010). Fabrication of nanoporous TiO2 by electrochemical anodization. *Electrochimica Acta*, *55*(14), 4359-4367. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.12.053

Suman, T. Y., Radhika Rajasree, S. R., Kanchana, A., & Elizabeth, S. B. (2013). Biosynthesis, characterization and cytotoxic effect of plant mediated silver

nanoparticles using Morinda citrifolia root extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *106*, 74-78. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.037

Sun, L., Li, J., Wang, C., Li, S., Lai, Y., Chen, H., & Lin, C. (2009). Ultrasound aided photochemical synthesis of Ag loaded TiO2 nanotube arrays to enhance photocatalytic activity. *Journal of Hazardous Materials*, *171*(1-3), 1045-1050. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.115

Suresh, A. K., Pelletier, D. A., Wang, W., Morrell-Falvey, J. L., Gu, B., & Doktycz, M. J. (2012). Cytotoxicity Induced by Engineered Silver Nanocrystallites Is Dependent on Surface Coatings and Cell Types. *Langmuir*, *28*(5), 2727-2735. https://doi.org/10.1021/la2042058

Tang, Y., Wang, F., Jin, C., Liang, H., Zhong, X., & Yang, Y. (2013). Mitochondrial injury induced by nanosized titanium dioxide in A549 cells and rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *36*(1), 66-72. https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.03.006

The Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, *486*(7402), 207-214. https://doi.org/10.1038/nature11234

Thomas, S., Izard, J., Walsh, E., Batich, K., Chongsathidkiet, P., Clarke, G., Sela, D. A., Muller, A. J., Mullin, J. M., Albert, K., Gilligan, J. P., DiGuilio, K., Dilbarova, R., Alexander, W., & Prendergast, G. C. (2017). The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Research*, *77*(8), 1783-1812. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2929

Tian, H., Zhang, T., Qin, S., Huang, Z., Zhou, L., Shi, J., Nice, E. C., Xie, N., Huang, C., & Shen, Z. (2022). Enhancing the therapeutic efficacy of nanoparticles for cancer treatment using versatile targeted strategies. *Journal of Hematology & Oncology*, *15*(1), 132. https://doi.org/10.1186/s13045-022-01320-5

Titus, D., James Jebaseelan Samuel, E., & Roopan, S. M. (2019). Nanoparticle characterization techniques. Içinde *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles* (ss. 303-319). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5

Tiwari, D. K., Jin, T., & Behari, J. (2011). Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *21*(1), 13-24. https://doi.org/10.3109/15376516.2010.529184

Tokudome, S., Ghadimi, R., Suzuki, S., Hosono, A., Tanaka, T., Arakawa, K., Zhao, Y., Hattori, N., Agawa, H., Marumoto, M., Ando, R., & Moore, M. A. (2006). Helicobacter pylori infection appears the prime risk factor for stomach cancer. Içinde *International Journal of Cancer* (C. 119, Sayı 12, ss. 2991-2991). https://doi.org/10.1002/ijc.22223

Tutty, M. A., Vella, G., Vennemann, A., Wiemann, M., & Prina-Mello, A. (2022). Evaluating nanobiomaterial-induced DNA strand breaks using the alkaline comet assay. *Drug Delivery and Translational Research*, *12*(9), 2243-2258. https://doi.org/10.1007/s13346-022-01178-7

Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L.-O., Von Mikecz, A., Grether-Beck, S., & Schins, R. P. F. (2007). Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, *1*(1), 52-71. https://doi.org/10.1080/00222930701314932

United States. Public Health Service. Office of the Surgeon General. (2010). *How tobacco smoke causes disease : the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease : a report of the Surgeon General.* U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Office of the Surgeon General.

Ursini, C. L., Cavallo, D., Fresegna, A. M., Ciervo, A., Maiello, R., Tassone, P., Buresti, G., Casciardi, S., & Iavicoli, S. (2014). Evaluation of cytotoxic, genotoxic and inflammatory response in human alveolar and bronchial epithelial cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, *34*(11), 1209-1219. https://doi.org/10.1002/jat.3038

Uygur, B., Craig, G., Mason, M. D., & Ng, A. K. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanomaterials. *Technical Proceedings of the 2009 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2009*, *2*(2), 383-386.

Vales, G., Rubio, L., & Marcos, R. (2015). Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. *Nanotoxicology*, *9*(5), 568-578. https://doi.org/10.3109/17435390.2014.957252

Wang, B., Kohli, J., & Demaria, M. (2020). Senescent cells in cancer therapy: friends or foes? *Trends in Cancer*, *6*(10), 838-857. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.004

Wang, J., Li, J., Guo, G., Wang, Q., Tang, J., Zhao, Y., Qin, H., Wahafu, T., Shen, H., Liu, X., & Zhang, X. (2016). Silver-nanoparticles-modified biomaterial surface resistant to staphylococcus: new insight into the antimicrobial action of silver. *Scientific Reports*, *6*(1), 32699. https://doi.org/10.1038/srep32699

Wang, J., Wu, X., Shen, P., Wang, J., Shen, Y., Shen, Y., Webster, T. J., & Deng, J. (2020). Applications of Inorganic Nanomaterials in Photothermal Therapy Based on Combinational Cancer Treatment. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 15*, 1903-1914. https://doi.org/10.2147/IJN.S239751

Wang, X., Li, T., Su, X., Li, J., Li, W., Gan, J., Wu, T., Kong, L., Zhang, T., Tang, M., & Xue, Y. (2019). Genotoxic effects of silver nanoparticles with/without coating in human liver HepG2 cells and in mice. *Journal of Applied Toxicology*, *39*(6), 908-918. https://doi.org/10.1002/jat.3779

Wang, Y., Cui, H., Zhou, J., Li, F., Wang, J., Chen, M., & Liu, Q. (2015). Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(7), 5519-5530. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3717-7

Wang, Y., Sui, K., Fang, J., Yao, C., Yuan, L., Wu, Q., & Wu, M. (2013). Cytotoxicity Evaluation and Subcellular Location of Titanium Dioxide Nanotubes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *171*(7), 1568-1577. https://doi.org/10.1007/s12010-013-0447-0

Warner, J. H., Ito, Y., Zaka, M., Ge, L., Akachi, T., Okimoto, H., Porfyrakis, K., Watt, A. A. R., Shinohara, H., & Briggs, G. A. D. (2008). Rotating Fullerene Chains in Carbon Nanopeapods. *Nano Letters*, *8*(8), 2328-2335. https://doi.org/10.1021/nl801149z

Williams, G. M. (2001). Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*, *166*(1-2), 3-10. https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00442-5

World Cancer Research Fund. (2011). *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer*. www.dietandcancerreport.org/er].

World Cancer Research Fund., & American Institute for Cancer Research. (2007). *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer : a global perspective*. WCRF/AICR.

World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, & Continuous Update Project. (2018). *Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer*.

Xu, Z., Li, M., Li, X., Liu, X., Ma, F., Wu, S., Yeung, K. W. K., Han, Y., & Chu, P. K. (2016). Antibacterial Activity of Silver Doped Titanate Nanowires on Ti Implants. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *8*(26), 16584-16594. https://doi.org/10.1021/acsami.6b04161

Xue, Y., Zhang, T., Zhang, B., Gong, F., Huang, Y., & Tang, M. (2016). Cytotoxicity and apoptosis induced by silver nanoparticles in human liver HepG2 cells in different dispersion media. *Journal of Applied Toxicology*, *36*(3), 352-360. https://doi.org/10.1002/jat.3199

Yadav, H. M., Kim, J.-S., & Pawar, S. H. (2016). Developments in photocatalytic antibacterial activity of nano TiO2: A review. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *33*(7), 1989-1998. https://doi.org/10.1007/s11814-016-0118-2

Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H., & Xi, Z. (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *Journal of Applied Toxicology*, *29*(1), 69-78. https://doi.org/10.1002/jat.1385

Yang, H.-C., & Pon, L. A. (2003). Toxicity of Metal Ions Used in Dental Alloys: A Study in the Yeast Saccharomyces cerevisiae. *Drug and Chemical Toxicology*, *26*(2), 75-85. https://doi.org/10.1081/DCT-120020403

Yang, J., Du, J., Li, X., Liu, Y., Jiang, C., Qi, W., Zhang, K., Gong, C., Li, R., Luo, M., & Peng, H. (2019). Highly Hydrophilic TiO2 Nanotubes Network by Alkaline Hydrothermal Method for Photocatalysis Degradation of Methyl Orange. *Nanomaterials*, *9*(4), 526. https://doi.org/10.3390/nano9040526

Yeo, M.-K., & Kang, M. (2012). The biological toxicities of two crystalline phases and differential sizes of TiO2 nanoparticles during zebrafish embryogenesis development. *Molecular & Cellular Toxicology*, *8*(4), 317-326. https://doi.org/10.1007/s13273-012-0039-z

Yuan, S., Norgard, R. J., & Stanger, B. Z. (2019). Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discovery*, *9*(7), 837-851. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0015

Yuspa, S. H., Hennings, H., Lichti, U., & Kulesz-Martin, M. (1983). Organ Specificity and Tumor Promotion. Içinde *Organ and Species Specificity in Chemical Carcinogenesis* (ss. 157-171). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4400-1_8

Yuspa, S. H., & Poirier, M. C. (1988). *Chemical Carcinogenesis: From Animal Models To Molecular Models In One Decade* (ss. 25-70). https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60434-0

Zembruski, N. C. L., Stache, V., Haefeli, W. E., & Weiss, J. (2012). 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Analytical Biochemistry*, *429*(1), 79-81. https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.005

Zeng, Y., & Chen, T. (2019). DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. *Genes*, *10*(4), 257. https://doi.org/10.3390/genes10040257

Zhang, W., Lu, Y., Zang, Y., Han, J., Xiong, Q., & Xiong, J. (2022). Photodynamic Therapy and Multi-Modality Imaging of Up-Conversion Nanomaterial Doped with AuNPs. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1227. https://doi.org/10.3390/ijms23031227

Zhang, Y., He, F., Sun, Z., Li, L., & Huang, Y. (2014a). Controlled delivery of dexamethasone from TiO2 film with nanoporous structure on Ti-25Nb-3Mo-2Sn-3Zr biomedical alloy without polymeric carrier. *Materials Letters*, *128*, 384-387. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.04.149

Zhang, Y., He, F., Sun, Z., Li, L., & Huang, Y. (2014b). Controlled delivery of dexamethasone from TiO2 film with nanoporous structure on Ti–25Nb–3Mo–2Sn–3Zr biomedical alloy without polymeric carrier. *Materials Letters*, *128*, 384-387. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.04.149

Zhao, L., Wang, H., Huo, K., Cui, L., Zhang, W., Ni, H., Zhang, Y., Wu, Z., & Chu, P. K. (2011). Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials*, *32*(24), 5706-5716. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.040

Zhou, W., Li, W., Wang, J.-Q., Qu, Y., Yang, Y., Xie, Y., Zhang, K., Wang, L., Fu, H., & Zhao, D. (2014). Ordered Mesoporous Black TiO2 as Highly Efficient Hydrogen Evolution Photocatalyst. *Journal of the American Chemical Society*, *136*(26), 9280-9283. https://doi.org/10.1021/ja504802q

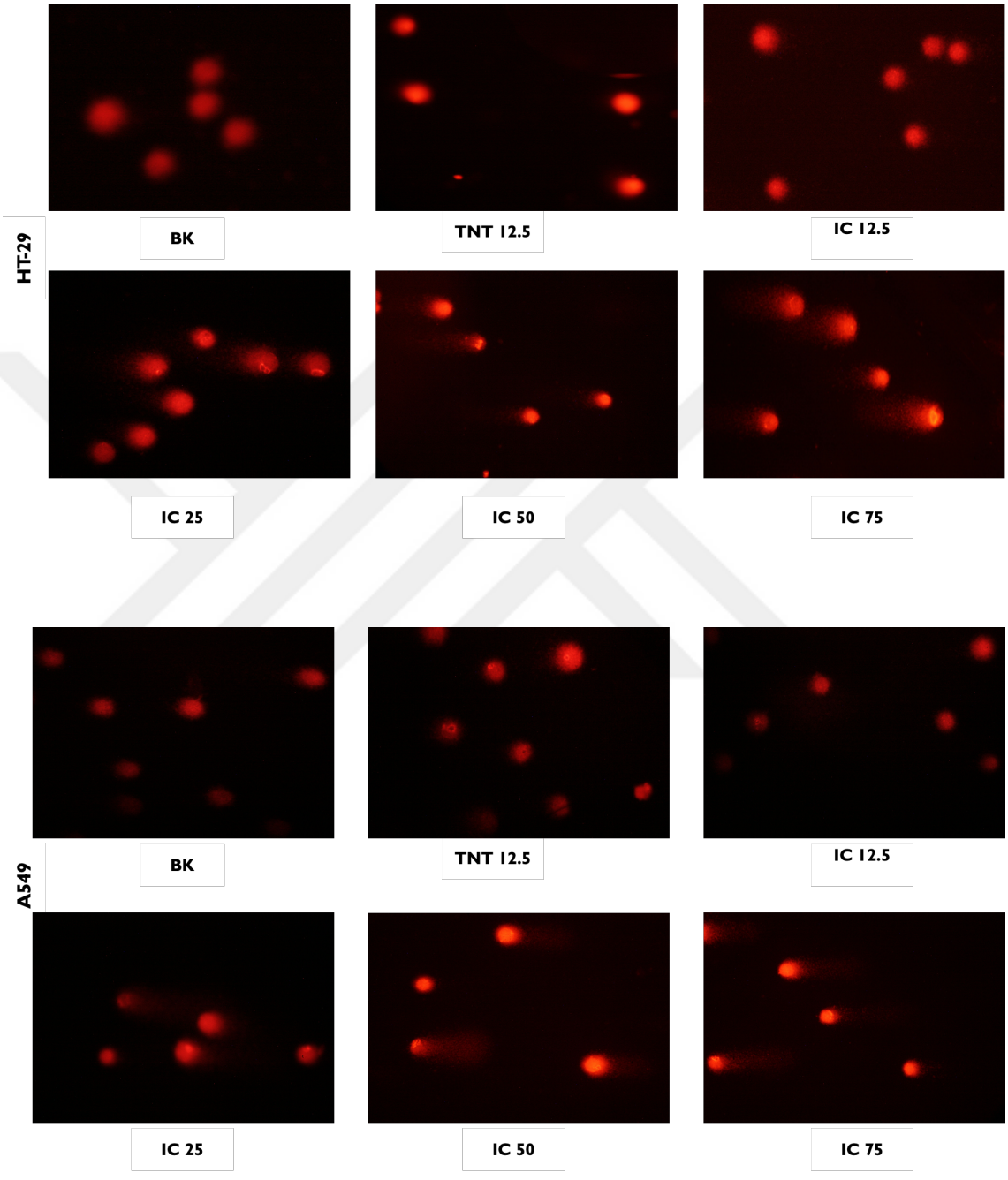
Zimmermann, S., Dziadziuszko, R., & Peters, S. (2014). Indications and limitations of chemotherapy and targeted agents in non-small cell lung cancer brain metastases. *Cancer Treatment Reviews*, *40*(6), 716-722. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.03.005

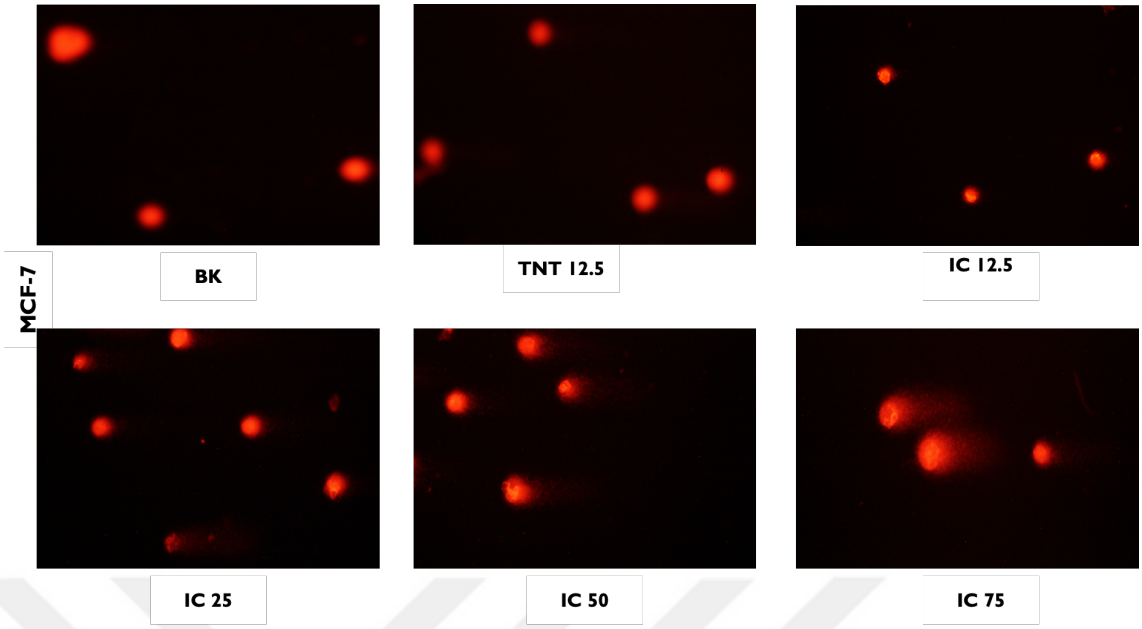
Zülfü, T. (2017). İlaç taşıyıcı sistemler ve nanoteknoloji etkileşim. *Bozok Tıp Dergisi*, *7*(3), 89-98

Zwilling, V., Aucouturier, M., & Darque-Ceretti, E. (1999). Anodic oxidation of titanium and TA6V alloy in chromic media. An electrochemical approach. *Electrochimica Acta, 45*(6), 921-929. 10.1016/S0013-4686(99)00283-2

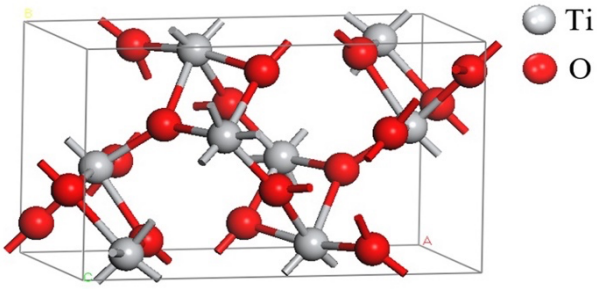
EKLER

EK 1 TNT ve AgTNT Nanotüplerin HT-29, A549 ve MCF-7 Hücre Hatlarının Komet Resimleri

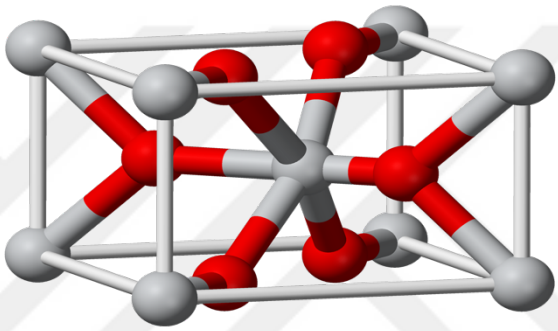



MCF-7
BK
TNT 12.5
IC 12.5
IC 25
IC 50
IC 75

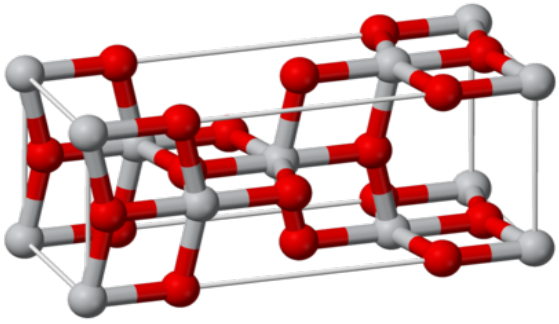
EK 2 Titanyum Dioksit Kristal Formlarının Görüntüleri



Brookite Formu

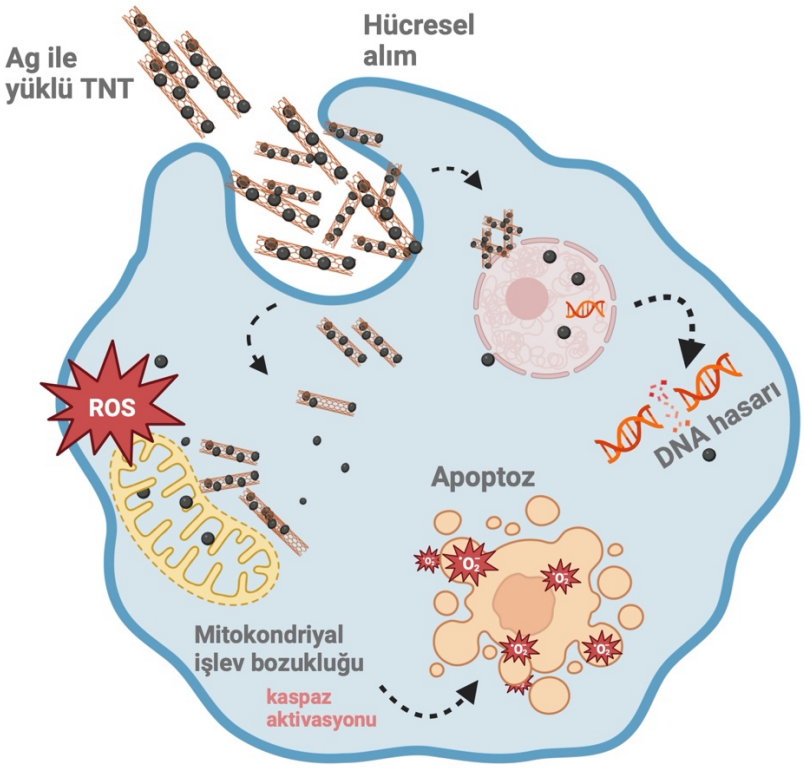


Rutile Formu



Anatase formu

EK 3 Gümüş Yüklü Nanotüplerin Antikanser Etki Mekanizmasını Açıklayan Şema



Created with BioRender.com

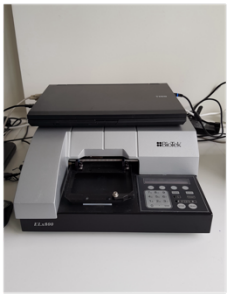
EK 4 Araştırma Laboratuvarımızdaki Bazı Ekipmanların Tanıtımı



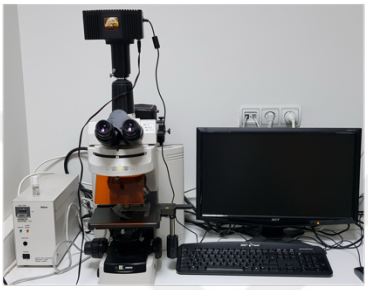
Soğutmalı Santrifüj



Hücre Sayım Cihazı



Mikroplaka Okuyucu



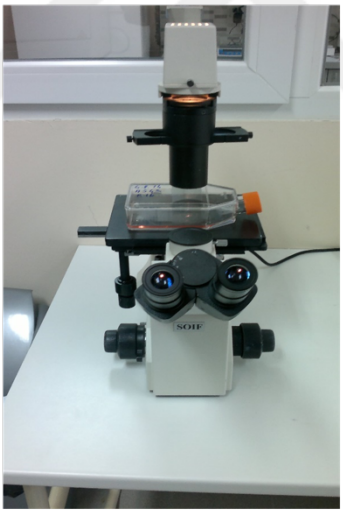
Floresans Mikroskop



Guava Muse Cihazı



Steril Kabin



İnvert Mikroskop



Sıvı Azot Tankı



Temel lab. Cihazları