



**KOMPOZİT NANOPARÇACIKLAR ARACILIĞIYLA
GERÇEKLEŞTİRİLEN FOTOTERMAL TERAPİNİN MEME KANSERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Duygu Deniz USTA SALİMİ

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MART 2023

ETİK BEYAN

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

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

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

Duygu Deniz USTA SALİMİ

29/03/2023

KOMPOZİT NANOPARÇACIKLAR ARACILIĞIYLA GERÇEKLEŞTİRİLEN
FOTOTERMAL TERAPİNİN MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)

Duygu Deniz USTA SALİMİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Mart 2023

ÖZET

Meme kanseri tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olup, kanserden ölüm sebepleri arasında önemli bir yer tutmaktadır. Üçlü negatif meme kanseri (TNMK), neoadjuvan tedaviye daha iyi yanıt vermesine karşın kötü prognozla seyrederek. Buna karşın TNMK'ya karşı oluşturulmuş spesifik bir tedavi yaklaşımı henüz mevcut değildir. Non-invaziv bir yöntem olan fototermal terapide (PTT), fotosensitif ajanlar aracılığıyla uygulanan lazer ışık enerjisinin ısı enerjisine dönüşümü yoluyla kanserli bölgenin termal ablasyonunun gerçekleşmesi sağlanır. Bu amaçla en çok kullanılan inorganik malzemelerden olan altın (Au) görünür bölgedeki güçlü absorpsiyon özelliğinden dolayı tercih edilmektedir. Bir organik malzeme olan polidopamin (pDA) ise oldukça iyi olan biyouyumluluğu ve fototermal kararlılığı sayesinde en çok umut vadeden PTT ajanları arasındaki yerini almıştır. Çalışma kapsamında TNMK tedavisindeki eksik ve zorluklar göz önüne alınarak Au ve pDA'nın yeni bir sentezleme yöntemiyle bir araya getirilmesiyle nanokompozit malzeme eldesi gerçekleştirilmiştir. Fiziksel ve kimyasal analiz yöntemleri kullanılarak üretilen malzemenin karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Daha sonra 808 nm dalga boyundaki lazer kullanımıyla malzemeye ait fototermal özellikler belirlenmiştir. Uygun özelliklere sahip nanokompozit malzeme eldesi sonrası TNMK hücreleri ile *in vitro* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak TNMK hücreleri üzerinde etkili bir PTT gerçekleştirilmiş olup, üretilen malzemenin *in vitro* koşullarda başarılı şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Bilim Kodu : 1055.1
Anahtar Kelimeler : Nanokompozit Malzeme, Fototermal Terapi, Meme Kanseri
Sayfa Adedi : 83
Danışman : Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF PHOTOTHERMAL THERAPY VIA
COMPOSITE NANOPARTICLES ON BREAST CANCER

(Ph. D. Thesis)

Duygu Deniz USTA SALİMİ

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

March 2023

ABSTRACT

Breast cancer is one the most common types of cancer among women all over the world and has an important place among the causes of death from cancer. Triple negative breast cancer (TNBC) has a poor prognosis despite a better response to neoadjuvant therapy. However, a specific treatment approach to TNBC is not yet available. Photothermal therapy (PTT), which is a non-invasive approach, enables thermal ablation of the cancerous region by the conversion of laser light energy to heat energy through photosensitive agents. For this purpose, gold (Au), which is one of the most utilized inorganic photosensitive agents, is preferred due to its strong absorption in the visible region. Recently, polydopamine (pDA), an organic material, has taken its place among the most promising PTT agents thanks to its very good biocompatibility and photothermal stability. In this study, considering the deficiencies and difficulties in TNBC treatment, nanocomposite material was obtained by combining Au and pDA with a new synthesis method. The characterization of the produced materials was completed using physical and chemical analysis methods. In the next step, the photothermal properties of the materials were determined using a laser with a wavelength of 808 nm. After obtaining nanocomposite material with appropriate properties, *in vitro* studies were carried out with TNBC cells. Finally, an effective PTT was performed on TNBC cells and it was shown that the produced material could be used successfully in *in vitro* conditions.

Science Code : 1055.1

Key Words : Nanocomposite Material, Photothermal Therapy, Breast Cancer

Page Number : 83

Supervisor : Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi zorlu, yorucu ve birçok farklı duyguyu aynı anda yaşamamızı sağlayan, her gün yeni bir şeyi acısıyla tatlısıyla öğrendiğimiz ve bir ömür devam eden eğitim sürecinde belki de en çok şey öğrendiğimiz zaman dilimi.

Bu süreçte karşılaştığım tüm zorluklar ve yoruculuklarda yanımda olan, bana her gün bir şey öğretmeyi başarmış, tüm direnmelerimle sonuna kadar mücadele eden, hem deneysel anlamda bilgi ve tecrübesiyle hem kişisel tecrübeleriyle beni destekleyen danışman hocam Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a,

Değerli katkı ve görüşlerini hiçbir zaman benden esirgemeyen değerli bilim insanı Prof. Dr. Ece KONAÇ'a ve emeği geçen Anabilim Dalımız öğretim üyelerine,

Akademik hayatımda önemli bir yeri ve emeği olan, her türlü bilgi ve tecrübesini benimle paylaşıp, desteğini hiç esirgememiş olan Prof. Dr. Abdullah Ekmekçi'ye,

Laboratuvarının tüm imkanlarını kullanmama olanak vererek, bilgi ve deneyiminden her fırsatta yararlanabildiğim Doç. Dr. Urartu Özgür ŞAFAK ŞEKER ve ekibine,

Koşulsuz, şartsız hep yanımda olduğunu bildiğim, tüm süreci benimle paylaşan ve destek olan kıymetli arkadaşım Dr. Öğretim Üyesi Saadet Özen AKARCA DİZAKAR'a,

Her türlü koşulda ve zorlukta yanımda olan, hayatım boyunca beni desteklemeyi sürdüren, hiçbir fedakârlık ve yardımdan kaçınmayan canım aileme ve akademik hayatımda önemli bir yeri ve emeği olduğu kadar, hayatı paylaştığım ve tüm zorlukların üstesinden gelmemde her türlü desteği ve gücü bana sağlayan, hayat arkadaşım Doç. Dr. Kuroş SALİMİ'ye,

Ayrıca doktora dönemimde kısmi burslu öğrenci desteğini aldığım TÜBİTAK-BİDEB-2211-E Doğrudan Yurtiçi Doktora Burs Programına ve bu programın tüm değerli çalışanlarına, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) ve tüm değerli çalışanlarına, 01/2019-48 proje kodu ile Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından desteklenmiş olup, bu birime ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ.....	3
2.1. Meme Kanseri	3
2.1.1. Triple negatif meme kanseri	7
2.1.2. Üçlü negatif meme kanserinin biyolojik özellikleri	7
2.1.3. Üçlü negatif meme kanserinde MAPK ve PI3K sinyal yolağı.....	8
2.2. Fototerapi Nedir?	10
2.2.1. Fototermal terapi	11
2.2.2. Fototermal terapiyi etkileyen faktörler	12
2.3. Fototermal Terapi Tarafından Uyarılan Hücre Ölümünün Temel Mekanizmaları.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Gereçler	23
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	23
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler.....	24
3.1.3. Kullanılan kitler.....	24
3.1.4. Kullanılan kimyasallar.....	24

	Sayfa
3.1.5. Kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı	25
3.2. Yöntemler.....	28
3.2.1. Nanokompozit malzeme sentezi ve karakterizasyonu.....	29
3.2.2. Kompozit malzemeye ait fototermal özelliklerin saptanması	30
3.2.3. Nanokompozit malzeme ve hücreler arasındaki etkileşimlerin <i>in vitro</i> düzeyde uygulamaları	33
4. BULGULAR	43
4.1. Nanokompozit Malzemeye ait Karakterizasyon Çalışmaları.....	43
4.2. Nanokompozit Malzemeye ait Fototermal Özelliklerin Saptanması	46
4.3. Nanokompozit Malzeme Performansının <i>in vitro</i> Koşullarda Değerlendirilmesi	50
4.3.1. Nanokompozit malzemenin toksik etkilerinin değerlendirilmesi.....	50
4.3.2. Nanokompozit malzemenin hücre içine alımının değerlendirilmesi	53
4.3.3. Kaspaz 3/7 aktivitesinin değerlendirilmesi.....	53
4.3.4. Akım sitometri ile apoptoz/nekrozun değerlendirilmesi	54
4.3.5. DNA fragmentasyon düzeyinin değerlendirilmesi	58
4.3.6. Mitokondriyal hasarın değerlendirilmesi.....	59
4.3.7. Hücre içi ROS oluşumunun değerlendirilmesi.....	60
4.3.8. Otofajinin varlığının değerlendirilmesi	61
4.3.9. Western Blot yöntemi ile protein ifade düzeylerinin değerlendirilmesi...	63
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	81

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Meme kanseri alt türlerinin reseptör ve protein seviyesi durumu	6
Çizelge 3.1. Farklı yüzdelerde hazırlanan ayırma (seperating) jelinin kimyasal miktarları	28
Çizelge 3.2. Yığınlama (stacking) jelinin kimyasal miktarları	28
Çizelge 3.3. Au-pDA nanokompozit malzeme sentezinde kullanılan kimyasal miktarları	29
Çizelge 3.4. 96 kuyulu kültür kabı için Kaspaz-3/7 substrast solüsyonu hazırlanması	36
Çizelge 3.5. Annexin V ve PI sinyaline bağlı olarak hücrede canlılık/ölüm durumu	37
Çizelge 4.1. PTT sonunda 3 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi sonuçlarına göre % olarak değerlendirilmesi	55
Çizelge 4.2. PTT sonunda 24 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi sonuçlarına göre % olarak değerlendirilmesi	56
Çizelge 4.3. PTT sonunda 3 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi sonuçlarına göre % olarak değerlendirilmesi	57
Çizelge 4.4. PTT sonunda 24 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi sonuçlarına göre % olarak değerlendirilmesi	58

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Globocan 2020: Kanseri yeni vaka sayıları	4
Şekil 2.2. Globocan 2020: Kanserle ilgili ölüm sayıları.....	5
Şekil 2.3. Meme kanseri alt türlerinin moleküler sınıflandırılması	6
Şekil 2.4. ERK, AKT (PKB) ve mTOR'u içeren sinyal yollarının basitleştirilmiş diyagramı	8
Şekil 2.5. Nanomalzeme aracılı fototermal terapiye ait mekanizma	11
Şekil 2.6. Elektromanyetik spektrum gösterimi.....	12
Şekil 2.7. Hibrit nanomalzemelerin kullanım alanları	16
Şekil 2.8. Farklı parametrelere bağlı olarak ortaya çıkan hücre ölüm mekanizmaları	19
Şekil 2.9. Otofajinin mekanizması.....	21
Şekil 4.1. Nanokompozit malzemeye ait SEM ve TEM görüntüleri	43
Şekil 4.2. Nanokompozit malzemeye ait SEM-EDX görüntüleri.....	44
Şekil 4.3. Nanokompozit malzemeye ait Zeta-Sizer ile ölçülen boyut dağılımı	45
Şekil 4.4. Nanokompozit malzemenin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış sulu çözeltisinin UV- görünür bölge spekturumu	46
Şekil 4.5. Nanokompozit malzemenin 0,8 mg/mL derişimdeki sulu çözeltisine farklı güçlerde lazer uygulanması sonucu elde edilen sıcaklık değişim profili	47
Şekil 4.6. Nanokompozit malzemenin farklı derişimdeki sulu çözeltisine 2 W/cm ² lazer uygulanması sonucu elde edilen sıcaklık değişim profili	48
Şekil 4.7. Nanokompozit malzemenin 0,8 mg/mL konsantrasyondaki sulu dispersiyonunun, 2 W/cm ² güç yoğunluğunda; 808 nm dalga boyunda lazer kullanımı ile elde edilen zamana bağlı sıcaklık artışına ait termal kamera görüntüleri.....	48
Şekil 4.8. a) Nanokompozit malzemenin 0,8 mg/mL konsantrasyondaki sulu dispersiyonunun, 2 W/cm ² güç yoğunluğunda; 808 nm dalga boyunda lazer kullanımı ile ısıtma-soğutma periyodu grafiği (300 sn ısıtma; 600 sn soğutma) b) t-(-lnθ) grafiği.....	49
Şekil 4.9. Nanokompozit malzemeye ait ısıtma-soğutma döngülerindeki sıcaklık değişim profilleri	49

Şekil	Sayfa
Şekil 4.10. Nanokompozit malzemenin farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-436 hücre canlılığına etkileri. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir	50
Şekil 4.11. Nanokompozit malzemenin farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücre canlılığına etkileri.....	51
Şekil 4.12. Nanokompozit malzemenin farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-436 hücreleri üzerindeki sitotoksitesisi.	52
Şekil 4.13. Nanokompozit malzemenin farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksitesisi.	52
Şekil 4.14. Nanokompozit malzemenin 0,8 mg/mL konsantrasyonunun TNMK hücreleri içerisine alım miktarlarının ICP-MS ile tespiti.....	53
Şekil 4.15. PTT sonucu MDA-MB-436 hücrelerinde gözlenen aktif kaspaz 3 düzeyleri.	54
Şekil 4.16. PTT sonucu MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen aktif kaspaz 3 düzeyleri.	54
Şekil 4.17. PTT sonunda 3 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi ile değerlendirilmesi	55
Şekil 4.18. PTT sonunda 24 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi ile değerlendirilmesi	56
Şekil 4.19. PTT sonunda 3 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi ile değerlendirilmesi	57
Şekil 4.20. PTT sonunda 24 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi ile değerlendirilmesi	58
Şekil 4.21. PTT sonucu MDA-MB-436 hücrelerinde gözlenen DNA fragmentasyon oranı. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.....	59
Şekil 4.22. PTT sonucu MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen DNA fragmentasyon oranı. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.....	59
Şekil 4.23. PTT sonrası MDA-MB-436 hücrelerinin mitokondriyel membran potansiyeli, Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir	60
Şekil 4.24. PTT sonrası MDA-MB-231 hücrelerinin mitokondriyel membran potansiyeli Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir	60
Şekil 4.25. PTT sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde ROS düzeyinin belirlenmesi.	61
Şekil 4.26. PTT sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde ROS düzeyinin belirlenmesi.	61

Şekil	Sayfa
Şekil 4.27. PTT sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde otofajide rol oynayan proteinlerin ifade düzeylerini gösteren protein bantları	62
Şekil 4.28. PTT sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde otofajide rol oynayan proteinlerin ifade düzeylerindeki değişimlerin relatif gösterimi.....	62
Şekil 4.29. PTT sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde otofajide rol oynayan proteinlerin ifade düzeylerini gösteren protein bantları	63
Şekil 4.30. PTT sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde otofajide rol oynayan proteinlerin ifade düzeylerindeki değişimlerin relatif gösterimi.....	63
Şekil 4.31. PTT sonrası MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 hücrelerinde proteinlerin ifade düzeylerini gösteren protein bantları.....	64

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. PT ölçümlerde kullanılan deney düzeneği.....	31

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
μm	Mikrometre
A	Ölçüm Yapılan Kabın Yüzey Alanı
Ag	Gümüş
Au	Altın
cm	Santimetre
cm²	Santimetrekare
CO₂	Karbondioksit
CuS	Bakır Sülfür
EtOH	Etanol
h	Isı Transfer Katsayısı
HAuCl₄.3H₂O	Kloroaurik asit-trihidrat
HCl	Hidroklorik Asit
HNO₃	Nitrik Asit
I	Lazer Gücü
kDa	Kilo Dalton
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
η	Fototermal Dönüşüm Verimi
NH₄OH	Amonyum Hidroksit
nm	Nanometre
°C	Santigrat
Pd	Paladyum
rpm	Dakikada Devir
V	Volt
W	Watt

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ACTB	β -aktin
AMPK	Adenozin Monofosfat ile Aktive Olan Protein Kinaz
APS	Amonyum Persülfat
AuNR	Altın Nanorod
AuNS	Altın Nanoyıldız
AuPB	Altın Plazmonik Blackbody
BCA	Bikinkoninik Asit
BSA	Bovine Serum Albumin
D-A	Donör- Alıcı
dak	Dakika
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
Em	Emisyon
ER	Östrojen Reseptörü
Ex	Eksitasyon
FA	Folik asit
FBS	Fetal Bovine Serum
GEF	Guanin Nükleotit Değişim Faktörü
GPCR	G-protein Eşlikli Reseptör
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HRP	Horseradish Peroxidase
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer
LDH	Laktat Dehidrojenaz
LSPR	Lokalize Yüzey Plazmon Rezonansı
MAPK	Mitojen Tarafından Aktive Edilmiş Protein Kinaz
MOF	Metal Organik Çerçeve
MÖ	Milattan Önce
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür

Kısaltmalar	Açıklamalar
NCP	Nano Ölçekli Koordinasyon Polimeri
NIR	Yakın Kızılötesi Bölge
NP	Nanopartikül
PANI	Polianilin
PBS	Phosphate Buffer Saline
pDA	Polidopamin
PDT	Fotodinamik Terapi
PE	Fosfatidiletanolamin
PEDOT: PSS	Poli-(3,4-Etilendioksitiyofen):Poli(4-Stiren Sülfonat)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PIP₂	Fosfatidil İnoзит-4-5-Bifosfat
PIP₃	Fosfatidil İnoзит-3-4-5-Trifosfat
PMSF	Fenilmetilsülfonilflorid
PPy	Polipirol
PR	Progesteron Reseptörü
PT	Fototermal
PTA	Fototermal Transdüksiyon Ajanı
PTT	Fototermal Terapi
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TBS-T	Tris Buffer Saline – Tween 20
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TNMK	Üçlü Negatif Meme Kanseri
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Bilim ve teknolojiadaki gelişmeler ile pek çok hastalığa çare bulunmasına rağmen, kanser günümüzde hala dünyada en fazla ölüme yol açan hastalık sıralamasında ülkelere göre değişmekle birlikte kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan önemli bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın (IARC) GLOBOCAN veri tabanı 2020 yılı verilerine göre tüm dünyada 19,3 milyon yeni kanser vakası tanımlanmış olup, 10 milyon insan kanser dolayısıyla hayatını kaybetmiştir. [1]. Rakamların her geçen gün artışı kanserin erken tanı ve tedavisine yönelik çalışmalara da ivme kazandırmaktadır. Meme kanseri, kadınlarda görülen en yaygın ve ölümcül kanser türleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Dünyada meme kanseri görülme sıklığı 2008'den bu yana %20'den fazla artış göstermiş ve 2020 yılında 2,3 milyon kişiye meme kanseri tanısı konmuştur. Bu sayı tüm kanser vakalarının yaklaşık %12'sini oluşturmaktadır [1,2].

Günümüzde meme kanseri tedavilerinde temel olarak cerrahi eksizyon, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve immünoterapi kullanılmaktadır, ancak bu tedavi yöntemlerinin klinik uygulamalarda kendi içlerinde sınırlamaları bulunmaktadır. Örneğin cerrahi işlemler sağlıklı dokularda yaralanmalara yol açabilirken, metastaz durumunda ve tümör boyutu büyük olduğunda tercih edilmemektedir. Radyasyon tedavisinde; radyasyonun tümör hücrelerine ulaşırken geçtiği yerlerdeki sağlıklı hücrelerin ölümüne yol açması ve tedavi edici dozlardaki ışına karşı gelişen direnç tedavinin etkinliğinin önüne geçmektedir. Kemoterapide ise kemoterapötik ajanlar hala tümör dokusuna ulaşmada zayıftırlar ve toksisite sebebiyle verilen dozlarda sınırlı tutulmak zorundadır. Ayrıca uzun süreli kemoterapi ve hormon kullanımı, meme kanseri hücrelerinin ilaç direncini uyatarak, tedavi etkinliğinin azalmasına neden olabilmektedir. Son yıllarda, immünoterapi güçlü antikanser etkinliği sayesinde dünya çapında büyük ilgi görmektedir, fakat bu tedavi de uzun vadede görülen çeşitli yan etkileri nedeniyle tüm kanser hastalarında işe yaramamaktadır [3-5]. Tüm bu sebeplerden dolayı, meme kanseri tedavisi için güvenli ve etkili stratejiler geliştirmek son derece önemlidir.

Fotodinamik terapi (PDT) ve fototermal terapi (PTT) olmak üzere iki önemli kategoriden oluşan fototerapi her gün gelişmekte olan ve kanser tedavisi için umut vadeden non-invaziv bir stratejidir. Bir fototerapi çeşidi olan PTT'de yakın kızılötesi (NIR) lazer uygulanmasıyla ışık enerjisini ısı enerjisine dönüştüren fototermal transdüksiyon ajanları

(PTA) kullanılır. Böylece tümörlü bölgenin sıcaklığı artar ve kanser hücrelerinin termal ablasyonu gerçekleşir [5,6]. Farklı terapötik modellerle karşılaştırıldığında, PTT yüksek spesifiklik ve hedeflemeyle, etraftaki sağlıklı dokuya verilen zararın minimum olması, minimal invazivlik gibi oldukça önemli avantajlara sahiptir [6,7]. PTT'nin terapötik etkinliği, ışığın PT ajanlar, özellikle de nano ölçekli ajanlar ile yeterli ısıya dönüştürülmesine bağlıdır. Şimdiye kadar, soy metal nano yapılar (örn; altın ve gümüş nanopartiküller (Au ve Ag NP'ler)), karbon bazlı malzemeler (karbon nanotüp ve grafen), Pd (Paladyum) tabakaları, CuS (bakır sülfid) partikülleri, organik partiküller, organik ve inorganik malzemelerin bir araya getirilmesiyle oluşturulan nanokompozit malzemeler olmak üzere kanser hücrelerinin öldürülmesi için PTA olarak güçlü NIR absorbansı olan birçok nanomalzeme geliştirilmiştir [8,9]. Verimli ve seçici bir PTT uygulaması için üretilen ajanların bazı özellikleri taşınması amaçlanmaktadır. Bunlardan bazıları; malzemenin geniş bir soğurma alanı, yüksek fototermal dönüşüm verimliliği ve üstün fototermal kararlılığa sahip olması ile yüksek fototermal performans elde edilmesidir. Bu özellikleri taşıyan malzeme ile daha düşük lazer yoğunluğuyla daha verimli PTT sonuçları alınması hedeflenir. Biyomedikal uygulamalarda esas önemli konulardan biri de toksik olmayan, biyoyumlu, uzun vadeli biyogüvenliğe sahip malzemeler üretebilmektir. PTT ajanları uzun süre ana organlarda birikip kaldıklarında ciddi toksisite, enflamatuvar yanıt ve yan etkiler oluşturabilirler. Hassas bir tümör tedavisi için tümör hedefleme kabiliyeti gibi PTT ajanlarını çok işlevli kılan basit yüzey modifikasyonuna olanak verecek şekilde üretim gerçekleştirebilmek de son derece önemlidir [10].

Sunulan tez kapsamında, etkili bir PTT gerçekleştirmek için Au-pDA (altın-polidopamin) inorganik-organik malzemelerin bir araya getirilmesiyle oluşturulan nanokompozit malzemenin eldesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan sentez yöntemi ilk kez bu çalışmayla literatüre sunulmaktadır. Elde edilen kompozit malzemenin karakterizasyon çalışmaları fiziksel ve kimyasal analiz yöntemleri kullanılarak yapılmış, ardından 808 nm dalga boyundaki lazer kullanımıyla malzemenin PT özellikleri belirlenmiştir. Son olarak en uygun özelliklere sahip malzeme eldesinden sonra; TNMK (üçlü negatif meme kanseri) hücre hatlarıyla yapılan çalışmalar sonucu, üretilen malzemenin *in vitro* koşullarda etkinliğinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Etkili bir PTT imkânı sunan transdüksiyon ajanı bu tez çalışmasıyla literatüre sunulmuştur.

2. GENEL BİLGİ

Kanser toplumlarda oldukça sık görülmesi ve ölüm oranlarındaki yükseklikler nedeniyle günümüzün önemli bir halk sağlığı sorunudur. Yaş ve cinsiyet ayırt etmeden dünyada her 5 kişiden biri bu hastalıkla yaşamlarının herhangi bir döneminde karşılaşmaktadır. Tüm dünyada 2030 yılına kadar küresel boyuttaki yükün %20'den fazla artışı beklenmektedir. Ayrıca tanı ve tedavide yapılan milyar dolarlık harcamalar ülkelerin üzerindeki ekonomik yükü her geçen yıl daha da artırmaktadır. Dolayısıyla tanı ve tedavi yöntemlerini geliştirmeye ve bu yükü azaltmaya yönelik çalışmalar oldukça kıymetli olup her yıl katlanarak devam etmektedir [11].

Kanser, sağlıklı bir hücrede düzenleyici ve kontrol mekanizmalarının bozulması sonucu hücrelerin kontrolsüz bölünüp çoğalmasıyla ortaya çıkan oldukça ölümcül bir hastalıktır. Sağlıklı hücreler, hücre bölünmesi ile hücre ölümü arasındaki dengeyi korumak için komşu hücrelerle iletişim kurar. Fakat kanserde bu denge bozulur ve hücreler herhangi bir kontrol olmaksızın çoğalmaya başlar [12].

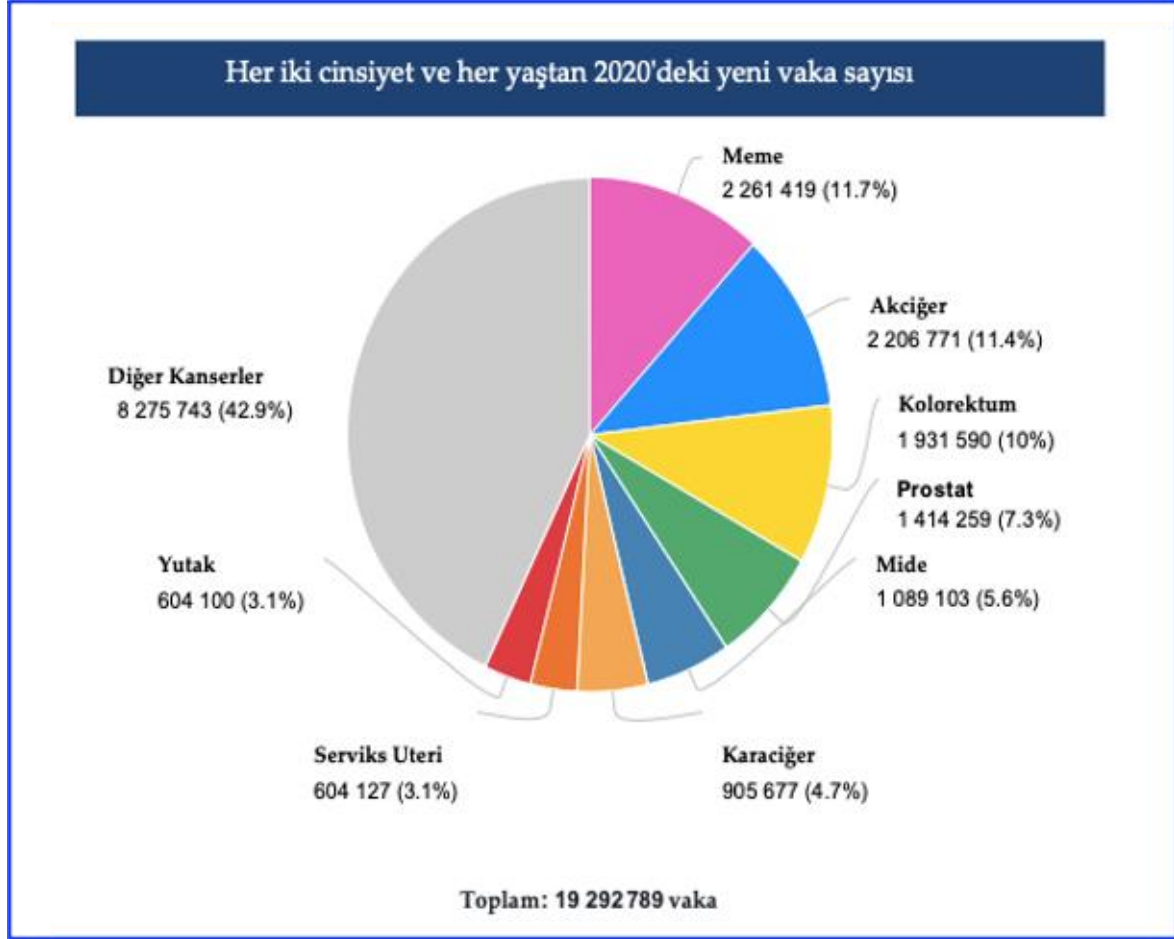
Vücuttaki her sağlıklı hücre kanserli hücreye dönüşme potansiyeline sahiptir, bu sebeple 200'den fazla farklı kanser türü tanımlanabilmektedir. Tümörler I) Köken aldığı hücre, doku, organ ve sisteme, II) Başlangıç yerine, III) Morfolojik derecesine ve IV) Kanserlin vücutta yayılım derecesine göre geleneksel olarak 4 şekilde sınıflandırılır [13].

Çok sayıda kanser türü olmasına rağmen, tüm kanser vakalarının neredeyse yarısından sorumlu olan dört kanser türü bulunmaktadır. Bunlar meme, akciğer, prostat ve kolon/rektum kanserleridir [14].

2.1. Meme Kanseri

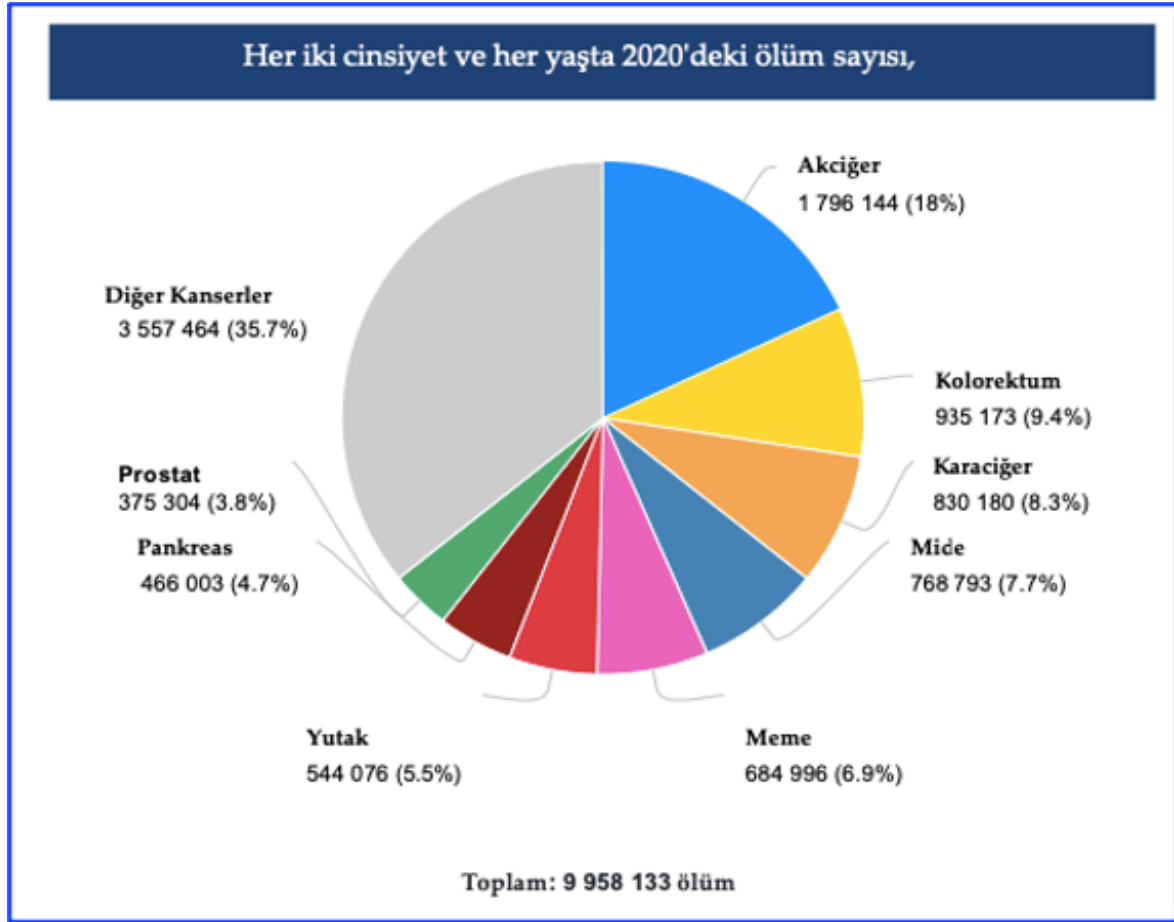
Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda en sık görülen ve en ölümcül kanser türüdür. GLOBOCAN veri tabanı 2020 yılı verilerine göre tüm dünyada her iki cinsiyet ve her yaş grubunda Şekil 2.1.'de gösterildiği gibi 19 milyonu aşan yeni vakalar arasında meme kanseri %11,7 oranıyla (~ 2,3 milyon yeni vaka) ilk kez akciğer kanserini geçmiştir. Oran, yeni tanı konan her 8 kanserden birinin meme kanseri olduğunu göstermektedir. Sıralamanın devamında ise %11,4 ile akciğer kanseri, %10 ile kolorektal kanser, %7,3 ile

prostat kanseri, %5,6 ile mide kanseri, %4,7 ile karaciğer kanseri, %3,1 ile serviks uteri ve yutak kanseri ile aşağıdaki şekilde sunulduğu gibi diğer kanserler yer almıştır [1].



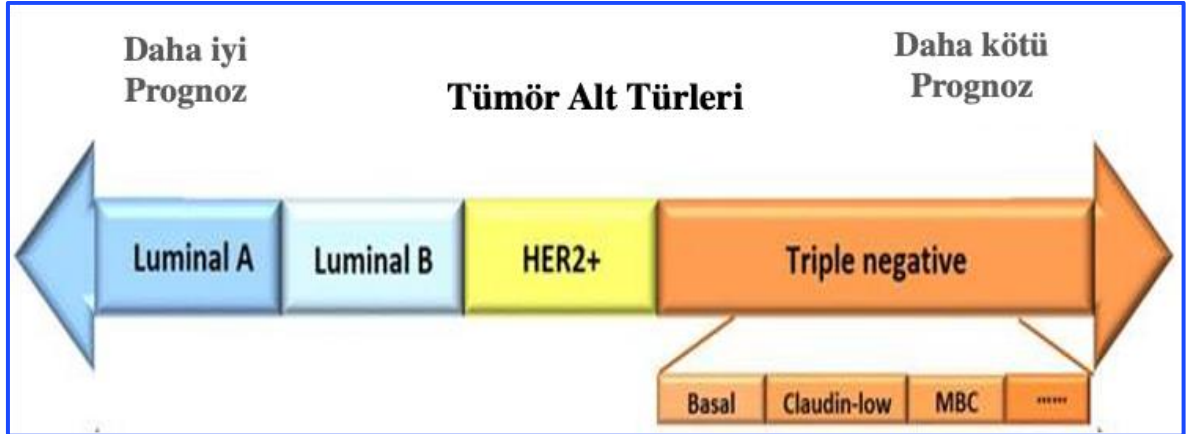
Şekil 2.1. Globocan 2020: Kanser yeni vaka sayıları [1]

Tüm dünyada kansere bağlı ölüm oranlarına baktığımızda ise; Şekil 2.2’de gösterildiği gibi %18 (~ 1,8 milyon ölüm) ile akciğer kanseri en çok ölüme yol açan tür olmadaki sırasını korumuştur. Sırayı %9,4 ile kolorektum kanseri, %8,3 ile karaciğer kanseri, %7,7 ile mide kanseri takip etmiştir. Meme kanseri ise bu sıralamada % 6,9 (~ 690.000 ölüm) ile beşinci olarak yerini almıştır [1]. Dolayısıyla bu kadar yaygın ve ölümcül bir hastalık için etkili ve güvenli tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi kritik bir öneme sahiptir.



Şekil 2.2. Globocan 2020: Kansere bağlı ölüm sayıları [1]

Meme kanseri türlerinin sınıflandırılmasında histolojik tip, tümör aşaması ve derecesi, belirteç durumu [örneğin; östrojen reseptörü (ER), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)] ve lenf nodu durumu gibi özellikler değerlendirilir. Tüm bu sınıflandırmaların yanında mikroarray tabanlı sistemlerde yaşanan ilerlemeler, gen ekspresyon profillerinin kullanımı ile tümörün moleküler-genetik özelliklerine göre de sınıflandırma yapmayı mümkün hale getirmiştir [13]. Moleküler alt tiplerine göre meme kanseri 4 sınıfa ayrılır. Bunlar sırasıyla Şekil 2.3'te gösterildiği gibi; luminal A, luminal B, HER2+ ve üçlü negatif meme kanseri (TNMK)'dir.



Şekil 2.3. Meme kanseri alt türlerinin moleküler sınıflandırılması [15]

Meme kanseri tümör moleküler türlerine ait östrojen reseptörü (*estrogen receptor*, ER), progesteron reseptörü (*progesterone receptor*, PR), insan epidermal büyüme faktörü 2 reseptörü (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) ve Ki-67 proteinini seviyelerine göre yapılan sınıflandırma Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Meme kanseri alt türlerinin reseptör ve protein seviyesi durumu [16]

Alt Türler	ER	PR	HER2	Ki-67
Luminal A	+	+/-	-	<14%
Luminal B	+	+/-	+/-	≥14%
HER2+	-	-	+	≥14%
TNBC	-	-	-	≥14%

Luminal A tip meme kanseri; ER pozitif, PR’nin pozitif veya negatif, HER2’nin negatif ve Ki-67 seviyesinin düşük olduğu bir alt türdür. Tüm meme kanseri hastalarının yaklaşık %40’ı bu sınıfa girmektedir. Büyüme hızı yavaştır ve diğer türler arasında en iyi prognoza sahiptir. Genellikle hormon tedavisi yeterli olmaktadır. **Luminal B tip meme kanseri;** ER pozitif, PR ve HER2’nin pozitif veya negatif olduğu, yüksek Ki-67 seviyelerinin görüldüğü ve tüm meme kanseri hastalarının %20’sinden azında görülen bir alt türdür. Luminal A’ya göre çoğalma hızı biraz daha hızlı olup; prognozu da biraz daha kötüdür. **HER2-güçlendirilmiş meme kanseri** ER ve PR negatif, HER2 ve proliferasyon gen kümelerinin yüksek ekspresyonuyla karakterize, Ki-67 düzeyinin yüksek olduğu bir alt türdür. Meme kanseri hastalarının %10-15’i bu gruba girmektedir. Luminal ve bazal kümelerin ifadesi düşüktür. Luminal kanserlere göre daha hızlı büyür ve daha kötü bir

prognoza sahiptir. **Triple negatif/bazal benzeri meme kanseri**; ER, PR ve HER2 reseptörlerinin üçünü de içermeyen bir alt türdür. Hastaların yaklaşık %20'si bu gruba giren kansere sahiptir. BRCA1 gen mutasyonu olan kadınlarda, 40 yaşından küçük kadınlarda ve Afrikalı-Amerikalı kadınlarda daha yaygındır. Diğer türlere göre çok daha agresif bir tür olup, temel olarak tedavide kemoterapiye başvurulmakla birlikte, tedavinin oldukça zor olması sebebiyle yeni geliştirilen tedavilerden de yararlanılmaya çalışılmaktadır [16, 17].

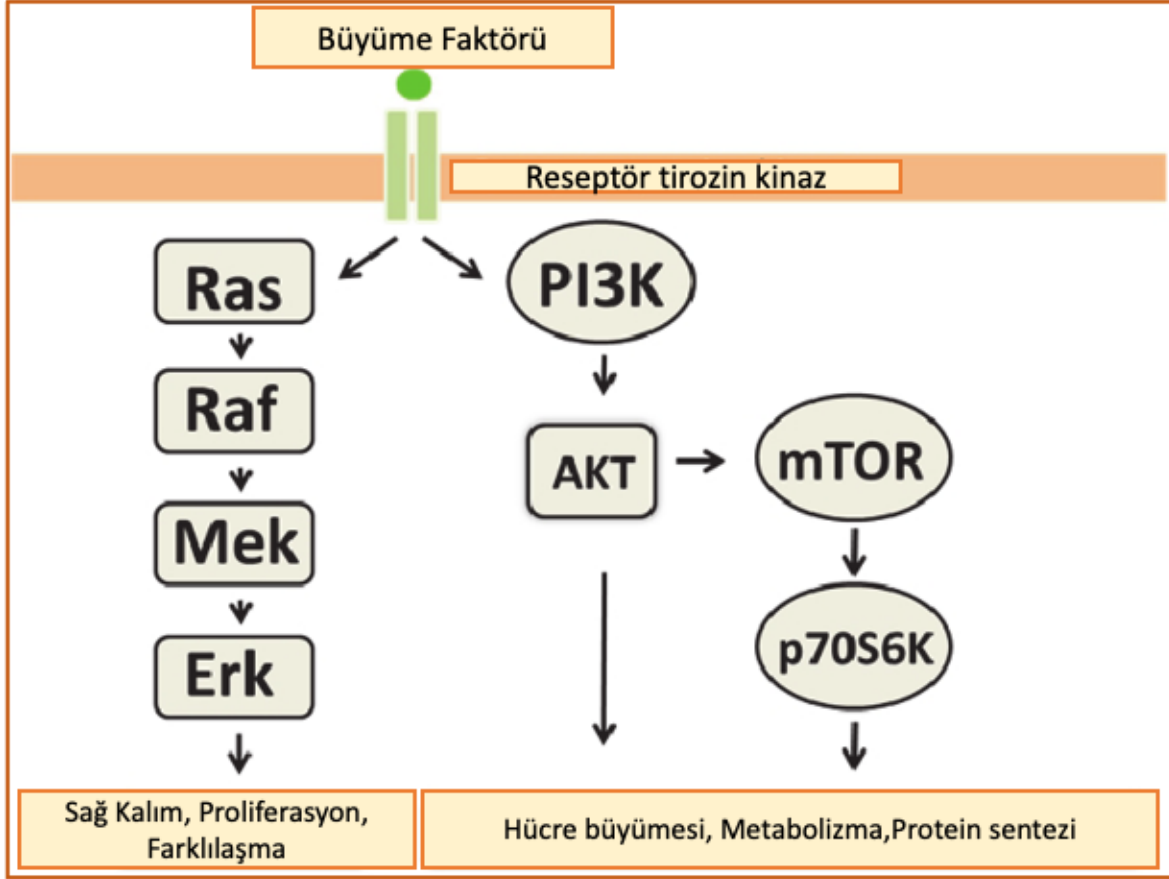
2.1.1. Triple negatif meme kanseri

Meme kanseri türleri içerisinde genetik, transkriptomik ve histolojik heterojenliği ile bilinen TNMK oldukça agresif bir fenotip ve kötü prognoza sahiptir. Gen ekspresyon analizleriyle TNMK'ine ait alt türlerin farklı sınıflandırmaları yapılmasına rağmen, rutin uygulamada tam bir sınıflandırılma için henüz yerleşik bir tanı testi yoktur. Ayrıca TNMK'nin ER, PR veya HER2'yi ifade etmediği göz önüne alındığında bu kanser türü için tedaviye karar vermek oldukça zor olmaktadır. Erken evre TNMK'li hastalar için mevcut standart tedavi, taksan- ve antrasiklin- bazlı kombine tedaviler ile sitotoksik kemoterapi uygulamalarıdır, fakat prognoz kötüdür. Birçok klinik çalışmada, TNMK'li hastalarda birinci basamak tedavi olarak platin bazlı ajanların kullanımı ile daha uzun progresyonsuz sağkalım gerçekleştirilmiştir, fakat sonunda ortaya çıkan ilaç direnci oldukça önemli bir problemdir. Günümüzde TNMK için onaylanmış hedefe yönelik herhangi bir tedavi yoktur. Hastalıkla mücadeledeki bu zorluklar yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi zorunluluğunu ortaya koymaktadır. Bu derece zorlu bir hastalığı etkili bir şekilde tedavi etmek için, hastalığın ilerlemesini sağlayan temel biyolojiyi anlamak bir başka bir zorunluluktur [17, 18].

2.1.2. Üçlü negatif meme kanserinin biyolojik özellikleri

Kanserin sahip olduğu heterojen ve kompleks yapı, etkili terapötik yöntemlerin geliştirilmesinde hala önemli zorluklar teşkil etmektedir. Hastalıkla ilgili bilgilerimiz her geçen gün aydınlatılan sinyal yolları ve mekanizmalarla daha da artmaktadır. Hücrenin proliferasyon, farklılaşma, sağ kalım gibi tüm hayatsal faaliyetlerinde etkili olan sinyal yollarında meydana gelen değişimler kanserin takibi ve önüne geçilmesi açısından oldukça önemlidir. Farklı ve önemli görevlere sahip olan pek çok sinyal yolağı olmakla

birlikte meme kanseri progresyonunda önemli yere sahip olan MAPK (mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinazlar) ve PI3K (fosfatidilinositol 3-kinaz) yolları bunlardan sadece iki tanesidir [19].



Şekil 2.4. ERK, AKT (PKB) ve mTOR’u içeren sinyal yollarının basitleştirilmiş diyagramı [19]

2.1.3. Üçlü negatif meme kanserinde MAPK ve PI3K sinyal yolağı

Fosfatidilinositol 3 kinaz/protein kinaz B (PI3K/AKT) ve mitojenle aktive olan protein kinaz/ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (MAP/ERK) sinyal yolları hücrede önemli görevleri olan iki sistemdir.

MAPK/ERK sinyal yolağı, RAS, RAF, MEK ve ERK dahil olmak üzere bir grup protein kinaz içerir. ERK aktivasyonu otokrin/parakrin olarak iletilen mitojenik büyüme faktörlerinin tirozin kinaz reseptörlerine bağlanmasıyla ve RAS, RAF ve MEK gibi yukarı akış sinyal moleküllerinin anormal aktivasyonları veya bu moleküllerde meydana gelen genetik değişiklikler sonucuyla olmak üzere genel olarak iki şekilde gerçekleşebilir. MAPK/ERK sinyal yolağında ilk önce ligandın (büyüme ve hayatta kalma faktörleri)

tirozin kinaz reseptörüne bağlanması gerçekleşir. Bu bağlanma reseptörün otofosforilasyonu ile aktifleşen tirozin kinaz bölgelerine SH₂ bölgesine sahip proteinlerin (örn; guanin nükleotit değişim faktörü (GEF)) bağlanmasına olanak verir. Böylece GEF'ler, hücre zarının sitozolik yüzeyinde inaktive konumda bulunan RAS-GDP kompleksinin aktive konumdaki RAS-GTP'lere dönüşümünü uyarır. Aktive olmuş RAS-GTP, RAF protein kinazı aktive eder. Aktif RAF ise MEK'i (MAP kinaz/ERK kinaz) fosforilleyerek aktive hale getirir. Fosforile MEK (p-MEK) treonin ve tirozin kalıntılarından ERK'i fosforilleyerek aktive eder ve MAPK ailesi üyesi olan ERK hücre proliferasyonu ve farklılaşma, epitelial-mezenkimal geçişi destekleme, hücre-matriks ilişkileri üzerindeki etkilerinden dolayı hücre göçünü kolaylaştırma, apoptoz, DNA onarımı, hücre döngüsü, otofaji, hücre sağ kalımı ve yaşlanma gibi pekçok hücrel süreçte önemli roller üstlenir [20-23].

PI3K-AKT sinyal yolağı, reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler) veya G-protein eşlikli reseptörler (GPCR'ler) tarafından aktive edilir. RTK'lar büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinlere karşı yüksek afiniteye sahiptir. Bu ligandlar ile bağlanma RTK'ların otofosforilasyon ile aktivasyonunu sağlar. Aktif haldeki RTK'lara, PI 3-kinaz sahip olduğu SH₂ bölgesinden bağlanarak aktif hale gelir ve zar fosfolipidi olup ikinci mesajcı olarak görev yapan fosfotidil inozitol-4-5-bifosfatı (PIP₂) inositolünden fosforilleyerek fosfotidil inozitol-3-4-5-trifosfata (PIP₃) dönüştürür. Aktif PIP₃'e bir serin /treonin kinaz olan AKT sahip olduğu plekstrin homoloji (PH) bölgesinden bağlanarak hücre zarına yerleşir. PH bölgelerinden PIP₃'e bağlı mTORC2 ve PDK1 protein kinazlar tarafından AKT'nin fosforillenmesi ile AKT aktivasyonu gerçekleşir. PI3K/AKT yolağı hücre büyümesi, çoğalması, sağ kalımı, hareketliliği ve invazyon gibi önemli hücrel süreçlerde rol oynar [20, 22].

Tümör oluşum sürecinde, hücre normal büyüme kontrolünden kaçır ve invazyon kabiliyeti kazanır. Meme kanserlerinde özellikle TNMK'nde PI3K/AKT ve/veya MAPK/ERK sinyal yollarındaki efektörlerin onkojenik amplifikasyonları ve/veya mutasyonları sıklıkla meydana gelir ve bu da sinyalizasyonun anormal aktivasyonuna yol açar. Bu anormal aktivasyon hücrenin hayatta kalmasını, sınırsız büyüme ve proliferasyonu indükleyerek karsinogenezi tetikler. Dolayısıyla TNMK tedavisinde bu yolların aşırı aktivasyonunu engelleyebilecek çalışmalar yapmak oldukça önemlidir [20].

Teknoloji ve özellikle de nanoteknoloji alanındaki gelişmeler hayatımızı kolaylaştıracak ve iyileştirecek tanı ve tedavi yöntemlerinin hayatımıza girmesine olanak sağlamaktadır. Bu yöntemlerden biri olan fototerapi çeşitlerinden PTT, kanser tedavisinde geleneksel yöntemlere alternatif olarak her geçen gün daha da geliştirilen nanomalzemeler aracılığıyla tedavide önemli aşamaları kat etmektedir.

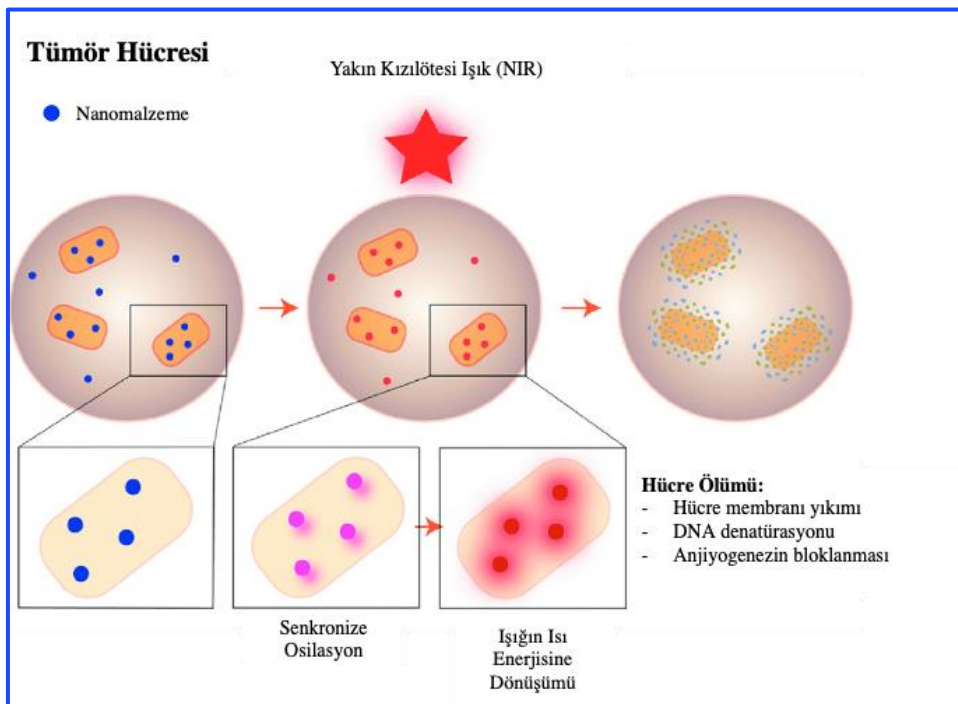
2.2. Fototerapi Nedir?

Kanser tanı ve tedavisindeki zorluklar hala devam etmekle birlikte gelişen bilim ve teknolojik imkanlar bu zorlukların üstesinden gelebilmek için mücadele etmektedir. Cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel tedavilerin sürekli iyileştirilmesi ve yenilenmesine ek olarak, immünoterapi, gen terapi, fototerapiler gibi (PDT ve PTT) yeni nesil tedaviler de umut verici yöntemler olarak tedavi protokollerine eklenilmeye çalışılmaktadır [24,25].

Isının tümör tedavisinde kullanılması aslında yeni olmayıp, MÖ 3000 ve MÖ 500 yıllarına kadar dayanmaktadır. Mısırlıların ve Yunan filozofların farklı solid tümörlerin tedavisinde ısıyı kullanarak uyguladıkları tedavilerle ilgili belgeler bulunmaktadır [25]. Tümörün termal ablasyonu için sıcak çubuklar ya da bıçak ağzı gibi yapıların kullanıldığı yöntemde ısıtma yöntemleri ve sıcaklık ölçüm teknolojileri yeterince gelişmediğinden ve yapılan tedavinin çok da kontrollü olmamasından dolayı bu tür işlemlerin başarısı ve tekrarlanabilirliği azalmıştır [25]. Geçen yüzyılın başlarında kutanöz hastalıkların tedavisinde ışığın kullanımıyla ilgili araştırmalarından Nobel ödülü almış Niels Finsen'in bilimsel katkılarıyla fototerapinin önemi daha da ön plana çıkmış olsa da, aslında sedef hastalığı, vitiligo gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için ışığın tedavi edici özellikleri eski uygarlıklar tarafından da bilinmekteydi [26]. Fototerapi, kanser hücreleri üzerinde seçici şekilde fotohasarı indüklemek için belirli dalga boylarındaki ışığı kullanan ve kanser tedavisi için umut vadeden bir yöntemdir. İki temel fototerapi türü vardır; PTT ve PDT. PTT'de malign hücreler belirli dalga boylarındaki lazer ışığın kullanımıyla aktive olan ajanların ürettikleri ısı enerjisiyle, PDT'de ise belirli dalga boylarındaki lazer ışığının uygulanmasıyla sitotoksik hale geçen fotosensitizerlar aracılığıyla yok edilmeye çalışılır [27].

2.2.1. Fototermal terapi

PTT, yakın kızılötesi bölgedeki ışığı absorbe edebilen (NIR) duyarlaştırıcılar (sensitizer) da denilen PTA'larının kullanımıyla ışık enerjisinin termal enerjiye (ısı enerjisi) dönüşümünün sağlandığı non-invaziv bir tedavi şeklidir. Burada amaç hedef bölgedeki tümör dokusunu ısıtarak tümörlü bölgenin sıcaklığının artmasını sağlamak ve kanser hücrelerinin termal ablasyonunu gerçekleştirmektir. Termal ablasyon ile hücre ölümüne yol açan üç mekanizma tanımlanmıştır. Bunlar; hücre zarı yıkımı, tümöral DNA-protein denatürasyonu ve anjiyogenez blokajıdır. Ortaya çıkan fototermik ısıнын yalnızca kullanılan duyarlaştırıcıların çevresindeki alanda meydana gelmesi ve lokal sıcaklıkların fizyolojik sıcaklığın on ya da yüzlerce derecesine (çok kısa zaman ölçeğinde) yükselebilmesi, minimal invazivlik, düşük yan etkiler, yüksek spesifiklik ve iyi bir biyogüvenliğe sahip olması PTT'nin en önemli avantajlarından [27-29].



Şekil 2.5. Nanomalzeme aracılı fototermal terapiye ait mekanizma [28]

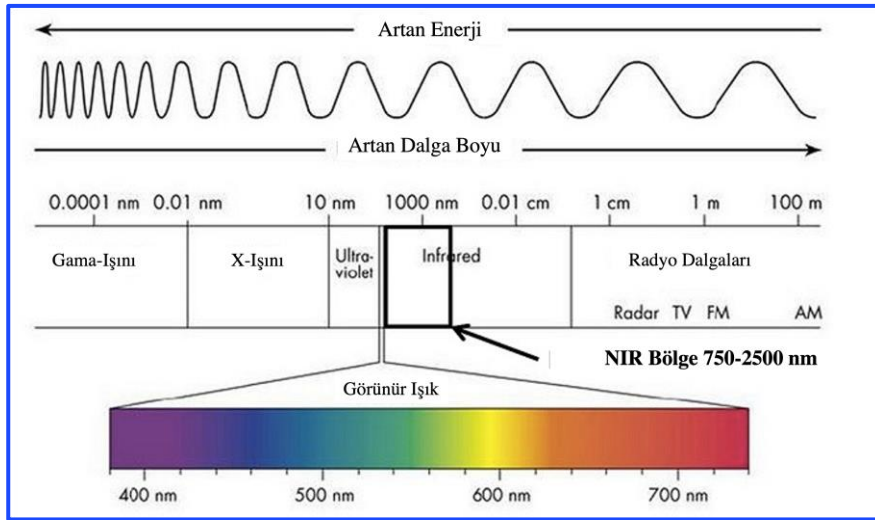
PTT'nin kanser tedavisinde etkin kullanımı için birçok yenilikçi strateji geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunlar arasında tümöre uygun özellikte seçilen ışık kaynağına ait dalga boyu, güç yoğunluğu ve zaman gibi uygun ışınlama koşullarının belirlenmesi, tümör dokusunda PTA'larının kullanılacak dozlarının belirlenmesi, uygulanan bölgede birikiminin izlenmesi ve optimizasyonu, yüzey modifikasyonlarıyla morfolojik özellikleri

veya işlevselleştirmeyi kontrol ederek fototermal dönüşüm verimliliğinde ve PTA'nın hedefleme yeteneğinde iyileştirme, NIR II bölgesinde (1000–1700 nm) absorpsiyonu olan PTA'ların geliştirilmesi sayılabilmektedir [29,30].

2.2.2. Fototermal terapiyi etkileyen faktörler

Işık kaynağı

PTT'de, kanser hücrelerini öldürmek için hedef bölgenin kimyasal ve fiziksel özellikleri dikkate alınarak belirli güçte ve dalga boyunda bir lazer ışığı kullanılır. Burada seçilecek lazerin türü, gücü, dalga boyu, lazere maruz kalma süresi tedavinin başarısını etkileyen hayati öneme sahip faktörlerdendir. Dış ortamdaki duruma benzer şekilde ışığın dokulardan geçişi sırasında ışığın yansıması, saçılması, emilmesi ve iletilmesi tamamen dokuların optik özelliklerine ve ışığın dalga boyuna bağlıdır. Şekil 2.6'da görüldüğü gibi ışığın dalga boyu arttıkça enerjisi azalmaktadır.



Şekil 2.6. Elektromanyetik spektrum gösterimi [31]

Farklı dalga boylarında yaygın olarak kullanılan üç ışık çeşidi; X-ışınları, ultraviyole (UV) ve NIR ışınlarıdır. X-ışınlarının sahip olduğu yüksek frekans ve enerji, yüksek penetrasyon sağlamakla birlikte; ışının dokularla etkileşimleri sırasında canlılarda DNA hasarı, kanser gelişimi gibi önemli hasarlara yol açabilmektedir, dolayısıyla bu ışın türüyle çalışma katı kuralları da beraberinde getirmektedir. UV ışığa baktığımızda ise; sıvı su absorpsiyonu için yüksek bir afinite göstermektedir, dolayısıyla bu yüksek afinite UV'nin dokulardan penetrasyonunun oldukça az olmasına yol açmaktadır.

Şu anda PTT'de kullanılan en yaygın lazer, 750-1350 nm dalga boyuna sahip NIR ışıktır. Biyolojik pencere (*biological window*) olarak da bilinen bu dalga boyu aralığı, birinci yakın-kızılötesi (750-1000 nm, NIR-I) penceresi ve ikinci yakın-kızılötesi (1000-1350 nm, NIR-II) penceresi olarak sınıflandırılmaktadır. NIR ışığın biyolojik sistemler tarafından minimum absorpsiyona ve saçılmaya sahip olması derin doku penetrasyonuna izin vermektedir. Işıkla doku arasındaki bu düşük biyolojik girişim derin yerleşimli lezyonların tanı ve tedavisinde NIR kullanılarak gerçekleştirilen PTT'yi ön plana çıkartmaktadır. Kullanılan ışığın dalga boyunun yanı sıra lazer ışığının gücü de ışık ve dokular arasındaki etkileşimde büyük rol oynar. PTT'de en yaygın kullanılan lazerler 808 nm, 980 nm ve 1064 nm dalga boyuna sahip olanlardır. Uygulanan lazere ait maruz kalma süresi ve odak noktası boyutu gibi ayarlar da tedavi etkinliğini etkileyen önemli faktörler arasındadır [32, 33].

PTT, darbeli mod ve sürekli mod olmak üzere iki tip lazer ayarı ile gerçekleştirilebilir. Darbeli modda ışığın lazer kaynağından homojen olmayan bir şekilde salınmasından dolayı; tümör dokusu sıcaklığını yükseltecek ve tümör dokusunda geri dönüşü olmayan hasara yol açacak, normalde >100 W olan yüksek güçlü bir lazer kullanımı gerçekleştirilir. Sürekli modda ise tümör dokusu kesintisiz olarak lazere maruz bırakılır. Lazer gücü düşükse doku için maruz kalma süresi uzarken, lazer gücü yüksek olduğunda daha kısa maruz kalma süreleri de etkin tedavi için yeterli olabilmektedir [33].

Kanser tedavisi için PTT'de absorpsiyon uzunluğu ve dalga boyu bakımından birbirinden farklılık gösteren çeşitli lazer türleri kullanılmıştır. Seçilen lazerin dalga boyunun PTA'nın absorpsiyon spektrumuyla örtüşmesi PTT'nin başarısını etkileyen önemli faktörler arasındadır. PTT'de tercih edilen lazer türleri arasında KTP lazer (Potasyum titanil fosfat, 532 nm), diyot lazerler (630–1100 nm), boya lazerleri (390–1000 nm), alexandrite lazerler (720–800 nm), Tm:YAG lazer (Thulium yttrium aluminium garnet, 2016 nm), Nd:YAG (neodimiyum katkılı itriyum alüminyum garnet, 1064 nm), Ho:YAG lazer (Holmium yttrium alüminyum garnet, 2100 nm) gibi türler bulunmaktadır. Bu lazer türleri arasından diyot lazer ve Nd:YAG lazer oldukça yaygın kullanıma sahiptir. Hem darbeli hem sürekli modda kullanılabilen diyot lazerin dalga boyu aralığı 630-1100 nm arasında değişmekle birlikte, en çok tercih edilen 808 nm dalga boyuna sahip olandır. Lazerin penetrasyon derinliği, uygulandığı dokuya bağlı olmakla beraber 1 nm ile 50 nm arasında değişkenlik

göstermektedir. Nd:YAG lazerin kullanımında ise genelde sürekli mod tercih edilir. Bu lazerin dalga boyu 1064 nm aralığında olup; penetrasyon derinliği 1 ila 10 cm'dir [33,34].

FototermaI teraIide kullanılan transdüksiyon ajanları

İlk kullanımı çok eski zamanlara dayanan fototerapi günümüzde atopik dermatit, sedef hastalığı, vitiligo, akne vulgaris ve kanser gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat tek başına fototerapi kullanımında ışığın zayıf doku penetrasyonu sebebiyle yüzeysel tedaviler gerçekleştirilebilmektedir. Bu sebeple fototerapinin etkinliğini artırmak için PDT'de singlet oksijen oluşumunu ve PTT'de fototermaI yanıtların daha güçlü oluşmasını sağlayacak PTA'lar kullanılmaktadır [35].

Etkin ve verimli PT tedaviler gerçekleştirmek için kullanılacak PTA'larının bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bunlar temel olarak aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Kullanılan PTA'nın absorpsiyon spektrumuyla lazerin dalga boyunun örtüşüyor olması gerekmektedir. Bu örtüşmeyle optik radyasyon verimli şekilde emilecek ve ışığın ısıya dönüşümü çok güçlü lazer kaynakları kullanımına gerek kalmadan da etkin bir şekilde gerçekleştirilebilecektir.
- Kullanılan PTA'nın toksisitesi PTT'nin başarısını etkileyen bir diğer faktördür. PTA'lar yalnızca optik radyasyon uygulandığında toksik hale geçmelidir. Bunun dışında herhangi bir lazer kaynağı kullanılmadığında ne sağlıklı ne de kanser hücreleri için toksik olmamalıdır. Bu minimum yan etkiye sahip seçici bir tedavinin gerçekleştirilmesinde önemli basamaklardan biridir.
- Kolay işlevselleştirme ve yüzey modifikasyonuna açık olmalıdır. Böylece tümör hedefleme mümkün kılındığından seçici bir tedaviye olanak verilecektir.
- Biyouyumlu sıvılarda iyi çözünürlüğe sahip olmalıdır. Bu, kan dolaşımında uzun dolaşım süreleri (yarı ömürler) sağlayacak ve dolayısıyla düşük dolaşım akışlarında bile tümörlere kolay erişim sağlayacaktır [36].

Bu özellikler dikkate alınarak kanser tedavisinde PTT etkinliğini artırmaya yönelik, PTA olarak pekçok inorganik, organik ve kompozit nanomateriyaller geliştirilmiştir. İnorganik PTA'lar arasında plazmonik Au nanoyapılar (nanoküreler, nanokabuklar, nanorodlar, nanoyıldızlar, nano kafesler), gümüş, paladyum ve platin gibi değerli metal NP'ler, geçiş

metali dikalkojenitleri, metal oksitler, karbon nanomalzemeler (grafen, karbon nanotüpler, kuantum noktaları, karbon noktaları, nanoelmaslar, gözenekli karbon NP'ler), silika NP'ler, zeolit NP'ler, up-conversion NP'ler bulunmaktadır [35-37].

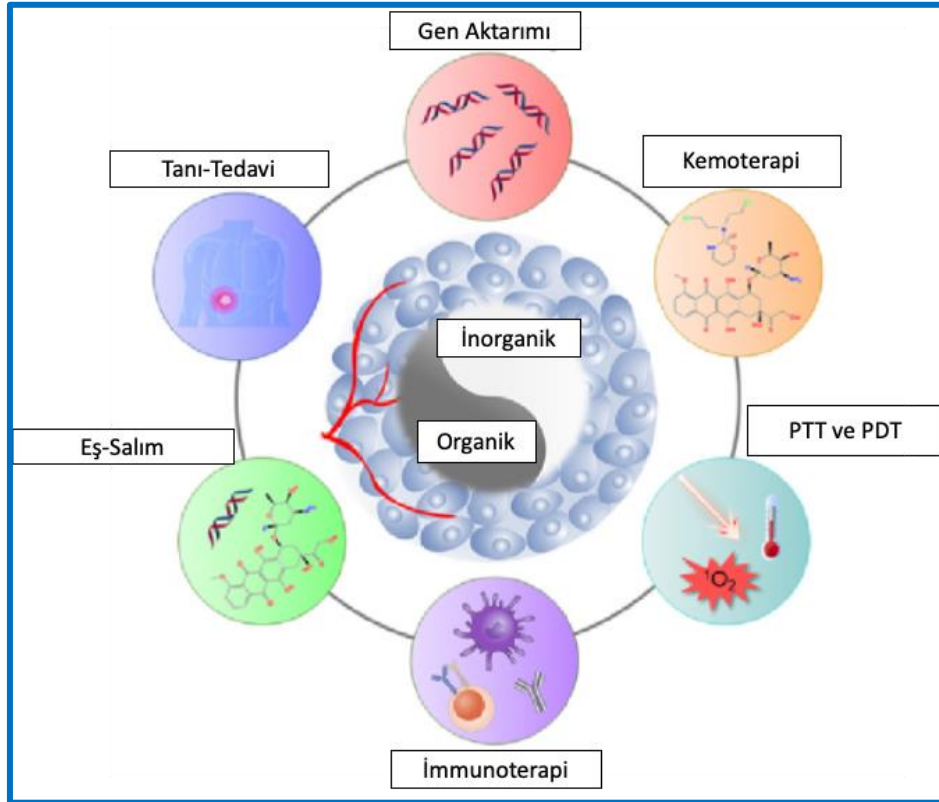
Organik PTA'lar arasında ise; miseller, lipozomlar, dendrimerler, polimerik hidrojel NP'ler, siyanin boyaları, porfirinler, ftalosiyeninler, bor dipirrometen ve diketopirolopirol gibi küçük moleküllü nanomalzemeler, konjuge polimer nanomalzemeler olan polipirol (PPy), polianilin (PANI) ve poli-(3,4-etilendioksitiyofen):poli(4-stiren sülfonat) (PEDOT:PSS) gibi donör-alıcı (D-A)-konjuge polimerler, ayrıca pDA ve yarı iletken polimerler yer almaktadır. İnorganik ve organik bileşenler arasındaki koordinasyon bağları yoluyla oluşturulan kompozit nanomateriyaller arasında ise; çekirdek-kabuk NP'ler, metal-organik çerçeveler (MOFs), nano ölçekli koordinasyon polimerleri (NCP'ler) bulunmaktadır [35,37].

Bu PT ajanlar arasında, organik nanomalzemeler genellikle iyi biyouyumluluk ve biyobozunurluğa sahiptir; fakat bu malzemelerin fototermal dönüşüm verimliliği düşük, fototermal stabiliteleri zayıf ve sentez basamakları karmaşıktır. Buna karşılık inorganik malzemeler genellikle mükemmel NIR ışık absorpsiyonuna sahiptir. Au nanomalzemelerde olduğu gibi güçlü lokalize yüzey plazmon rezonansı, dar emisyon spektrumları gibi içsel optik özellikleri sayesinde yüksek fototermal verim ve fotostabiliteye sahiptirler. Ayrıca sahip oldukları yapısal özellikler sayesinde sentezlenmeleri ve farklı fonksiyonel gruplar üzerinden yüzey modifikasyonlarına (örneğin; karboksil, hidroksil, epoksi, vb.) olanak vermeleri de diğer avantajları arasında sayılabilir. Fakat biyolojik olarak parçalanamayan yapıları ve uzun dönem toksisiteleri bu malzemelerin kullanımını sınırlayan önemli problemler arasındadır. Bu sebeple organik ve inorganik malzemelerin biraraya getirilmesiyle oluşturulan nanokompozit malzemeler aracılığıyla bu problemlerin üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır [30].

Fototermal transdüksiyon ajanı olarak nanokompozit malzemeler

Hibrit malzemeler, organik ve inorganik bileşiklerin farklı kombinasyonlarını aynı anda yapısında barındırmalarıyla gelişmiş yapısal ve biyolojik özellikler sergilerler. Çekirdek kabuk yapısında veya nanokompozit biçimde olabilen hibrit malzemeler her iki yapının fiziksel ve kimyasal özelliklerini tek malzemedeki barındırmalarından dolayı üstün

özelliklere sahiptirler. Bu üstün özelliklere sahip nanomalzemeler gen aktarımı, kemoterapi, tanı-tedavi, aynı anda farklı ilaçların, ilaç ve biyolojik maddelerin, ilaçlar ve görüntüleme ajanlarının birlikte salımı için ideal bir dağıtım sistemi olarak, immünoterapi, PDT ve PTT gibi oldukça geniş bir alanda kendisine kullanım alanı bulmuştur [38-40].



Şekil 2.7. Hibrit nanomalzemelerin kullanım alanları [39]

PTT alanında kullanılmak üzere pek çok üstün özellikli hibrit malzeme geliştirilmiş olmakla beraber bunlardan biri olan Au ve DA'nın bir araya getirilmesiyle oluşturulan malzemeler de büyük ilgi çekmektedir.

PTT'de soy metallerin kullanımıyla üretilen pek çok farklı inorganik bazlı nanomalzeme bulunmaktadır. Au bazlı PTA'lar sahip oldukları üstün fiziksel ve kimyasal özellikler sebebiyle PTT'de en çok tercih edilen nanomalzemelerdendir. Sentez aşamalarındaki ilerlemeler, kolay yüzey modifikasyonları, ince ayarlanmış absorpsiyonları, biyolojik koşullarda iyi bir stabilitiye sahip olmaları, biyolojik olarak inert olmaları, düşük sitotoksititeye sahip olmaları, biyoyumlu olmaları, yapı, şekil ve büyüklüklerine oldukça bağlı olan lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) sayesinde sahip oldukları üstün optik özellikler Au malzemeleri bir adım öne çıkarmıştır [6,38,41]. İlk kez 2003 yılında J. L. West ve ark. tarafından silika-Au nanokabuğun insan meme epitel karsinoma SK-BR-3

hücre hattı üzerindeki PT etkileri araştırılmıştır [42]. Aynı grup 2004 yılındaki bir başka araştırmalarında ürettikleri malzemeyi *in vivo* model üzerinde denemiş ve seçici şekilde PTT aracılığıyla tümör ablasyonunu başarılı şekilde gerçekleştirmiştir [43]. Böylece bu çalışmalarla Au nanorod, Au nanokabuk, Au nanokafes, Au nanoyüzük, Au nanoveziküller, Au nanoyıldız, Au nanoçerçeve ve kiral Au NP'ler gibi pek çok Au-bazlı nanoyapının PTT alanında kullanımı literatüre sunulmuştur [6]. El-Sayad ve ark. tarafından rapor edilen Au nanorodlar, kanserli hücreleri seçici olarak öldürmek için kullanılmıştır. Çalışmada nanorodların yüzeyi malign kanser türlerinde aşırı ifade edilmiş olan epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) uygun anti-EGFR antikolları ile konjuge edilmiştir. Böylece Np'ler seçici olarak tümör bölgesinde lokalize olmuş ve NIR lazerle ablasyona spesifik şekilde izin vermiştir. Farklı gruplar tarafından da melanom ve skuamöz hücreli karsinom için Au nanorodlar PTT için kullanılmıştır [44]. Au NP aracılı PTT'nin ilk verileri, kanser tedavisi için Au NP'lerin kullanıldığı çalışmalarda önemli bir artışa neden olmuştur. Günümüzde farklı şekillerde ve boyutlarda üretilen Au NP'lerin fototermal dönüşüm verimlerini, PTT'den sonra gözlenen hücre ölümü mekanizmalarını, kanser hücrelerinin daha seçici şekilde hedeflenmesi ile artırılmış PT yıkım için ileri düzeyde yüzey modifikasyonlarını yoğun şekilde araştıran pek çok çalışma yapılmaya devam etmektedir.

Gelişmiş biyouyumlulukları ve düşük toksisiteleri nedeniyle PTT'de etkin şekilde kullanılabilecek pek çok organik nanomalzeme bulunmaktadır. Bunlardan biri olan pDA deniz midyelerinin katı yüzeylere tutunmak için salgıladıkları dopamin, lizin ve 3,4-hidroksiprolin içeren adhezyon proteinlerinden ilham alınarak, ilk kez 2007 yılında Messermith ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir. Biyomimetik bir polimer olarak geliştirilen pDA, yapısındaki katekol, amin ve imin gibi fonksiyonel grupları içermesi sayesinde sahip olduğu eşsiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Yüksek kimyasal reaktiviteleri, çok yönlü yapışma özellikleri, mükemmel biyouyumluluğa sahip olmaları, biyolojik bozunabilirlik, suda dağılma özelliğine sahip olmaları, düşük sitotoksitite, PT etkiler üretme yeteneğine sahip olmaları pDA bazlı materyallerin PTT'de tercih sebebi olmasını sağlamıştır. pDA'daki fototermal dönüşüm etkinliği (%40) diğer birçok PTT ajanından daha yüksektir. Bu nedenle meme kanseri gibi kanserlerin tedavisi için uygun bir PTT ajanı olarak kabul görmüştür. Araştırmalar ve biyolojik uygulamalar için oldukça önemli avantajlardan biri de pDA sentezi sırasında organik çözücülere ihtiyaç duyulmamasıdır. Ayrıca alkali koşullar altında kendiliğinden oksidatif polimerizasyon

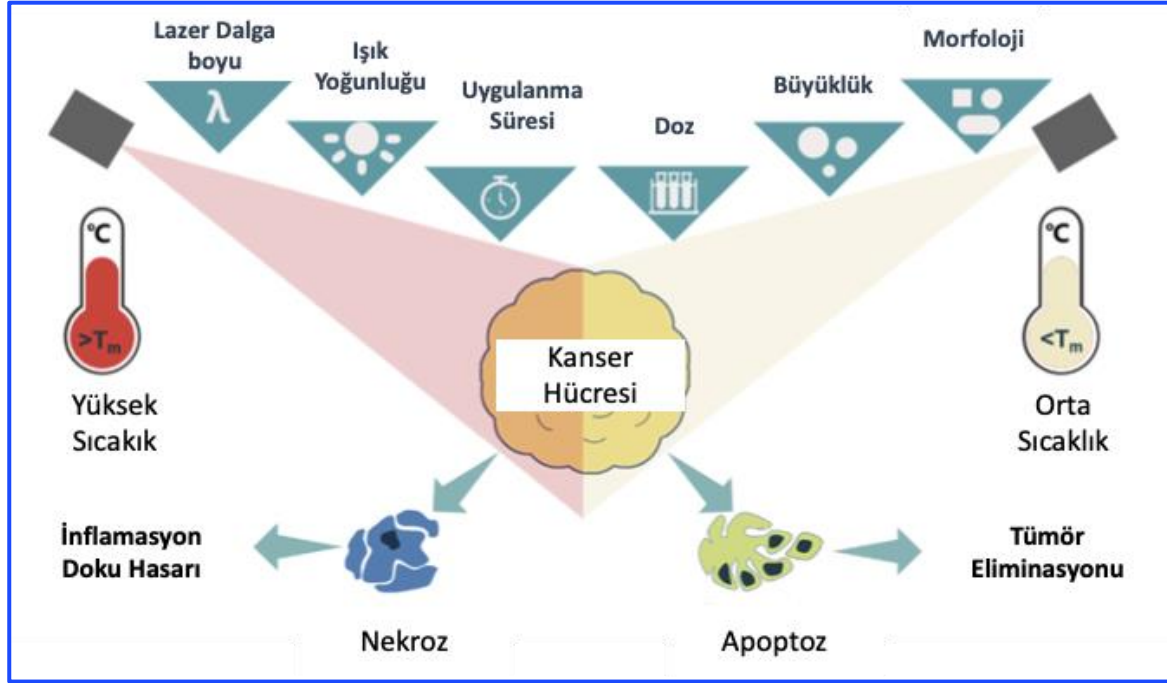
yoluyla eş boyutta pDA NP'lerin oluşması basit reaksiyon koşulu sağlamaktadır. Literatürde pDA NP'lerin, pDA kaplı organik NP'lerin, pDA kaplı inorganik NP'lerin PTT uygulamalarına yönelik pek çok çalışma rapor edilmiştir [38,45-49].

Black ve ark. tarafından rapor edilmiş olan pDA kaplı AuNR'lar meme kanseri hücreleri üzerinde uygulanan PTT'nin ilk örneklerindendir. 60 nm uzunluk ve yaklaşık 10 nm PDA katmanı içeren nanorodlar, anti-EGFR antikoru ile işlevselleştirilmişlerdi. Antikor ve pDA katmanı içermeyen nanorodlara kıyasla modifiye edilmiş rodlar çok daha iyi bir PTT performansı gösterdi. Çünkü antikorla modifiye etmek rodların hücre içine alımını önemli ölçüde artırdı. Ayrıca araştırmacılar tarafından NR'ların takip edilmesi için optik tomografiden yararlanılmış, böylece malzemenin tanı ve tedavi olmak üzere ikili mod sistemler için uygun olduğu da gösterilmiştir [50]. Başka bir çalışmada Liu ve ark. tarafından Au NP çekirdek etrafında pDA kabuk içeren Au NP@pDA'ların sentezi gerçekleştirilmiş ve üretilen malzemenin *in vivo* koşullarda biyouyumluluk ve uzun dönem stabilitesi araştırılmıştır [47]. Sahip oldukları dallı yapıları ile spesifik şekle sahip Au nanoyıldızlar (AuNS) Au NP'ler içinde bir adım öne çıkmaktadır. Oldukça dallanmış yapıya sahip olma onlara daha yüksek bir fototermal transdüksiyon verimliliği sağlamaktadır. Bu özellikler göz önüne alınarak Du ve ark. tarafından yaklaşık 50 nm boyuta sahip polietilenimin-folik asit modifiye AuNS@pDA-PEI-FA'ların sentezi gerçekleştirilmiştir. 0.33W gibi düşük lazer gücü ve düşük nanomalzeme konsantrasyonunda bile hem *in vitro* hem de *in vivo*'da üretilen malzeme ile etkin bir PTT gerçekleştirilmiştir [51]. Li ve ark. tarafından pDA kaplı Au nanoyıldızların sentezi gerçekleştirilmiştir. Malzeme sahip olduğu yüksek kontrast ve NIR absorpsiyon özelliğiyle tümörlerin hem bilgisayarlı tomografide görüntülenmesine hem de PTT'de kullanılabilmesine olanak vermesiyle grup tarafından teranostik bir nanoplatform olarak literatüre sunulmuştur. Sahip olduğu pDA kabuk malzemeye çıplak AuNS'a göre çok daha fazla biyouyumluluk sağlamıştır [52].

2.3. Fototermal Terapi Tarafından Uyarılan Hücre Ölümünün Temel Mekanizmaları

PTT tarafından uyarılan hücre ölümünün temel mekanizmasını anlamak, tedavi etkinliğini en üst düzeye çıkarmak ve istenmeyen yan etkileri en aza indirgeyebilmek açısından oldukça önemlidir. Kullanılan PTA'nın kimyasal ve fiziksel özelliklerine, dozuna, büyüklüğüne, morfolojisine, kullanılan lazerin dalga boyuna, gücüne, ışık yoğunluğuna ve

uygulanma süresine bağlı olarak ortaya çıkan sıcaklıklar sonucu hücre farklı ölüm yollarından birini tercih eder [29].

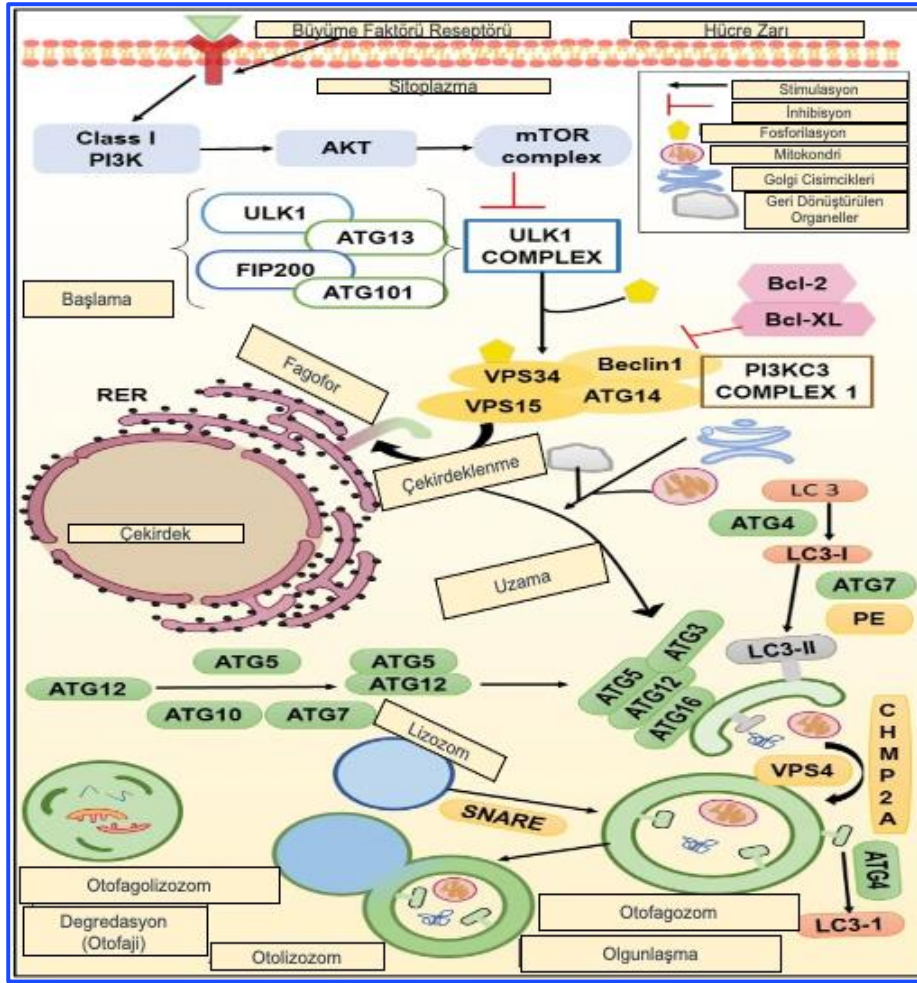


Şekil 2.8. Farklı parametrelere bağlı olarak ortaya çıkan hücre ölüm mekanizmaları [29]

Son yıllarda yapılan araştırmalarla ferroptoz, nekroptoz, piroptoz, otofajik hücre ölümü, paraptoz, lizozomal bağımlı hücre ölümü ve onkoz dahil olmak üzere birçok yeni apoptotik olmayan (non-apoptotik) programlı hücre ölümü formu tanımlanmıştır [54]. PTT ve PTT ile uygulanan kombine terapiler hücreyi bu ölüm yollarından birine götürebileceği gibi yapılan çalışmalarda en fazla apoptotik ve nekrotik ölüm mekanizmalarının kullanıldığı görülmüştür. Nekroz hücre membran bütünlüğünün kaybı ve hücre içeriğinin hücre dışı ortama salınması ile karakterize, enflamasyon ve doku hasarı ile sonuçlanan patolojik bir süreçtir. Bu anormal salınım yerine, hücre zar bütünlüğünün korunduğu programlanmış bir hücre ölüm yolu olan apoptozda enflamatuvar yanıt ve sağlıklı dokuya zarar minimumdur. Hücre zarında fosfotidilserin aracılığıyla oluşturulan 'beni ye' sinyali fagositozu gerçekleştiren fagositik hücreler için bir işaretlenmedir. Bu işaretlenme sebebiyle apoptoz güçlü bir enflamatuvar yanıtı indüklemeyi [29, 54, 55]. PTT sırasında ulaşılan sıcaklıklara bağlı olarak, hücre bu iki ölüm yolundan birini tamamen bağımsız, sıralı veya eş zamanlı olarak tercih edebilir. Yapılan çalışmalarla genelde yüksek sıcaklıklarda (genelde 49 °C ve üzeri sıcaklıklar) hücre nekroza giderken, daha düşük sıcaklıklarda (genelde 43-49 °C arası) apoptotik ve non-apoptotik ölüm yollarını tercih etmektedir [29, 54, 56].

Apoptoz; DNA hasarı veya farklı hücre stres tipleri tarafından uyarılan içsel yolak veya diğer hücrelerden gelen sinyaller aracılığıyla uyarılan dışsal yolak üzerinden aktive olabilir [55]. PTT'de özellikle içsel yolak üzerinden (mitokondriyal yolak) apoptoz aktivasyonu gerçekleşmektedir [56]. Hücre içinde apoptotik sinyallerin oluşmasıyla birlikte 3 fonksiyonel gruba ayrılan Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) ailesi üyeleri devreye girerek apoptotik yolağın düzenlenmesini sağlar. Bcl-2 ailesi üyelerinden bazıları apoptozu engelleyen Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva, Nrf3 ve Bcl-B gibi anti-apoptotik proteinlerdir. Diğerleri ise kaspaz aktivasyonunu sağlayan ve hücre ölümünü iletten pro-apoptotik düzenleyici proteinler (Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, PUMA ve Bcl-G) ve pro-apoptotik efektör (Bax, Bak, Bok/Mtd) proteinlerdir [57]. Pro-apoptotik bir protein olan Bid BCL-2'yi inaktive ederek, Bax ve Bak'ı aktifleştirerek mitokondri dış zarında oligomerler oluşturmaya olanak sağlar. Böylece sitokrom c mitokondriden sitozole salınır ve Apaf-1'e bağlanmasıyla apoptozom oluşumu ve kaspaz aktivasyonu (kaspaz-9) tetiklenir. Kaspaz-9 aşağı yöndeki kaspaz-3 ve kaspaz-7 efektör kaspazlarını etkinleştirerek hücre ölümüne yol açar [14, 56].

Otofaji, hücrelerin yaşlanma, mikrobiyal enfeksiyon ve insan hastalıkları ile ilişkili hasarlı organelleri, yaşlanmış proteinleri ve diğer gereksiz bileşenleri lizozom aracılı parçalayarak kendi kendini yediği programlanmış bir hücre ölüm türüdür [29, 58]. Parçalanacak içerik otofagozom denilen çift katlı veziküller içerisine alınır ve lizozomlarla birleşme sonucunda yok edilir [54, 58]. Süreç ilgili uyarıların reseptörlerine bağlanmasıyla başlar, Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK) sinyali indüklenirken, mTor sinyali baskılanır. mTor'un baskılanması ULK1 ve farklı ATG'leri içeren aşağı yöndeki protein kinazları uyararak çekirdeklenme sürecini başlatır. ULK kompleksi ayrıca PI3K sınıf III kompleksi 1'i (Beclin 1, Vps 15, Vps 34 ve ATG 14L) aktive eder ve fagofor gelişimini başlatır. Geliştirilen fagoforun uzamasının yanı sıra olgunlaşmasına, ATG5-ATG12, ATG16, vb. gibi birçok ATG'nin etkileşimi aracılık eder. Bu etkileşimler otofagozomların yüzeyine bağlanacak fosfatidiletanolamin (PE)-konjuge LC3 (LC3II) oluşumunu katalizleyen sistemin de oluşmasını sağlar. Yapı, hücresel substratların otofagozomlar içinde internalizasyonuna yardımcı olur. Daha sonra olgunlaşan otofagozomlar, SNARE proteinlerinin varlığında lizozomlarla birleşir ve otolizozomları oluşturur. Lizozomlarda bulunan asidik hidrolazlar, otofajik kargo içindeki metabolitlerin yanı sıra besinlerin degradasyonunu sağlar. Bu ürünler daha sonra daha fazla geri dönüşüm için sitoplazmaya yönlendirilir [59].



Şekil 2.9. Otofajinin mekanizması [59]

Otofaji hem tümörü baskılama hem de hücre yaşamını sürdürmeyi destekleme görevi üstlenebilen iki zıt işleve açık bir süreçtir. Otofajinin bu ikili işlevi, tümör tipi, neoplazi aşaması, tümör mikroçevresi ve kullanılan nanomalzemelerin içerikleriyle yakından ilgilidir. Uygulanan hafif sıcaklıklardaki PTT sonucu uyarılan otofaji tümör hücrelerini hayatta kalmaya yönlendiriyorsa, kullanılan otofaji inhibitörleri ya da otofaji ile ilgili genlerin ifadesinin azaltılması (knock-down) gibi yollarla PTT etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır. Fakat PTT sonrası uyarılan otofaji, hücreleri ölüme götürüyorsa otofajiyi en üst düzeye çıkarmak için seçimler yapılmaktadır [29,54].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Çoklu manyetik karıştırıcı (IKA, Almanya)
- Terazî (Precisa, İsviçre)
- Ultrasonik su banyosu (Bandelin electronic, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya)
- Mikroplaka ELISA okuyucu (Spectra Max M3, Molecular Devices, USA)
- Tüp Çalkalama Cihazı (Vortex; REAMIX 2789, Almanya)
- Derin dondurucu, -80°C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo, Japonya)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Biyogüvenlik Kabini (CLANLAF VFRS 1206, Danimarka)
- Karbondioksit Etüv (Sanyo, Japonya)
- Invert mikroskop (Zeiss, Almanya)
- İnkübatör (NÜVE EN 500, Türkiye)
- Mikropipet seti 10-100-1000 µl (Brand, Almanya)
- Akım Sitometri Cihazı (Beckman Coulter Navios, USA)
- UV-vis Spektrofotometre (Schimadzu 1700, Japonya)
- Lazer (Newport 843-R, USA)
- Termal Kamera (Flir E50, USA)
- Western Blot Sistemi (Bio-Rad, USA)
- Jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 2200 Pro-Carestream Health, Bio-Rad, USA)
- pH metre (Mettler-Toledo, İsviçre)
- Spin Vorteks (Biosan, Letonya)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan, Letonya)

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

- Beher (10 ml'lik)
- Manyetik balık
- Santrifüj tüpleri (50 ml ve 15 ml'lik)
- Ependorf (1,5 ve 2 ml'lik)
- Steril pipet uçları
- Steril 6'lık well plate
- Steril 96'lık well plate
- PVDF membran (0,45 um)
- 25 cm²-75 cm² steril hücre kültürü flaskları
- 1 ml'lik steril insülin enjektörü

3.1.3. Kullanılan kitler

- Cytotoxicity Detection Kit PLUS (LDH), Roche
- BCA Protein Assay Kit, (Thermo Scientific)
- SensoLyte® Homogeneous AFC Caspase-3/7 Assay Kit, (Anaspec)
- Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche
- DHE (Dihydroethidium) Assay Kit - Reactive Oxygen Species (Abcam)
- Human Autophagy Array C1 AAH- ATG-1-4 (RayBiotech)
- Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit II (Cell Signaling Technology)
- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences)

3.1.4. Kullanılan kimyasallar

- Dopamin hidroklorür (Sigma Aldrich)
- Kloroaurik asit-trihidrat (HAuCl₄.3H₂O; Sigma Aldrich)
- Amonyum hidroksit (NH₄OH, Sigma Aldrich)
- Mutlak etanol (CH₃CH₂OH, EtOH, Merck)
- 2-Propanol (IsOH; Sigma Aldrich)
- Hücre kültürü besiyeri; L-Glutamin içeren yüksek glukozlu DMEM (Wisent)
- Fetal Sığır Serum (Biological Industries)
- Penisilin-Streptomisin antibiyotik (Biological Industries)

- Amfoterisin B antimikotik (Biological Industries)
- Tripsin (Biological Industries)
- MTT (Calbiochem)
- Dimetil sülfoksid (DMSO, AppliChem)
- Tripan mavisi boyası (BioFroxx)
- Trizol Reagent (Molecular Research Center)
- RIPA Buffer (Serva)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF, Merck)
- Tris base (Sigma)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS, Merck)
- Tris-Glycine SDS Running Buffer (10X, Wisent)
- Tris-Glycine Transfer Buffer (10X, Wisent)
- Tris Buffered Saline (TBS, 10X, Wisent)
- BSA Blocking Buffer (10X, Thermo Scientific)
- Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- Merkapttoetanol (Acros)
- Amonyum persülfat (APS, Sigma)
- AKT primer antikoru (Cell Signaling Technology)
- Fosfo-AKT primer antikoru (Cell Signaling Technology)
- ERK primer antikoru (Cell Signaling Technology)
- Fosfo-ERK primer antikoru (Cell Signaling Technology)
- β -Aktin primer antikoru (Cell Signaling Technology)
- ColorPlus Protein Standardı (Cell Signaling Technology)
- ECL Western Blotting Substrate (Millipore)

3.1.5. Kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı

%10 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması

Önceden ısı ile inaktive edilmiş 50 ml FBS, daha sonra 5 ml penisilin-streptomisin ve 500 ul amfoterisin B kullanılarak toplam hacim 500 ml olacak şekilde besiyeri hazırlanmıştır.

%1 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması

Önceden ısı ile inaktive edilmiş 5 ml FBS, daha sonra 5 ml penisilin-streptomisin ve 500 ul amfoterisin B kullanılarak toplam hacim 500 ml olacak şekilde besiyeri hazırlanmıştır.

PMSF solüsyonu hazırlanması

1 ml isopropanol içerisinde 0,0174 g PMSF çözündürülerek hazırlanmıştır.

%10'luk (w/v) SDS hazırlanması (100 ml)

10 gram sodyum dodesil sülfat 100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1,5 M Tris-HCl çözeltisi hazırlanması (pH: 8,8) (200 ml)

36,342 g Tris base tartıldıktan sonra 150 ml distile suda çözülmüştür. Ardından pH metre ile HCl kullanılarak pH 8,8'e ayarlanmıştır. Daha sonra toplam hacim distile su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

0,5 M Tris-HCl çözeltisi hazırlanması (pH: 6,8) (200 ml)

12,114 g Tris base tartıldıktan sonra 150 ml distile suda çözülmüştür. Ardından pH metre ile HCl kullanılarak pH 6,8'e ayarlanmıştır. Daha sonra toplam hacim distile su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Akrilamid / Bisakrilamid çözeltisi hazırlanması (%30, 100 ml)

29 g akrilamid ve 1 g bisakrilamid 50 ml distile su içerisinde çözülmüştür. En son toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti ve +4 °C'de koyu renkli cam şişe içerisinde muhafaza edilmiştir.

Amonyum Persülfat (APS) çözeltisi hazırlanması (%10, 1 ml)

0,1 g APS tartılıp 1 ml distile su içinde çözülmüştür ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

1X Jel Yürütme Tamponu (Running Buffer) hazırlanması

10X'lik yürütme tamponu ana stoğundan, 100 ml alınıp üzerinin 900 ml distile su eklenerek 1000 ml'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1X Jel Transfer Tamponu hazırlanması

10X'lik transfer tamponu ana stoğundan, 100 ml alınıp üzerine 700 ml distile su ve 200 ml metanol eklenerek 1000 ml'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

1X Tris Buffer Saline-Tween 20 hazırlanması (TBS-T)

10X'lik TBS ana stoğundan, 100 ml alınıp üzerine 900 ml distile su ve 1 ml Tween 20 eklenerek hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1X BSA Bloklama çözeltisinin hazırlanması (15 ml)

10X'lik BSA Bloklama solüsyonu ana stoğundan, 1,5 ml alınıp üzerine 13,5 ml distile su ve eklenerek hazırlanmıştır. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Primer Antikorların hazırlanması

1X'lik 13,5 ml TBS-T içerisine, 1,5 ml 10X BSA bloklama solüsyonu eklenmiş ve kullanılan primer antikorun dilüsyon faktörü göz önüne alınarak hazırlanan çözeltiye eklenmiştir.

Sekonder Antikorların hazırlanması

1X 'lik 13,5 ml TBS-T içerisine, 1,5 ml 10X BSA bloklama solüsyonu eklenmiş ve kullanılan sekonder antikorun dilüsyon faktörü göz önüne alınarak hazırlanan çözeltiye eklenmiştir.

SDS-PAGE için Jel hazırlanması

Tüm proteinlerin negatif yüklenererek sadece boyutlarına göre ayırımına olanak veren SDS-PAGE yönteminde yığınlama (stacking) ve ayırma (seperating) jeli olmak üzere 2 kısımdan oluşan jel Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de verilen içerikler kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Farklı yüzdelerde hazırlanan ayırma (seperating) jelinin kimyasal miktarları

Kullanılan Kimyasallar	%8	%10	%12
H₂O	4,6	4	3,3
%30 Akrilamid Karışımı	2,7	3,3	4
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,5	2,5	2,5
%10 SDS	0,1	0,1	0,1
%10 APS	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,006	0,004	0,004
Toplam	10 ml	10 ml	10 ml

Çizelge 3.2. Yığınlama (stacking) jelinin kimyasal miktarları

Kullanılan Kimyasallar	%4
H₂O	3,075
%30 Akrilamid Karışımı	0,67
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1,25
%10 SDS	0,05
%10 APS	0,025
TEMED	0,005
Toplam	5 ml

3.2. Yöntemler

Sunulan tez kapsamında PTT için etkin bir yeni PTA ajanı geliştirilmiştir. Au ve pDA’nın bir araya getirilmesiyle üretilen nanokompozit ajanın tek basamaklı ve tek aşamada, tek bir ortam içerisinde sentezi gerçekleştirilmiş olup, yöntem ilk kez literatüre sunulmuştur. Bu amaçla yürütülen çalışma üç kısımdan oluşmaktadır. İlk kısımda; etkin bir PTT için kompozit malzemenin sentezi ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. İkinci kısımda; kompozit malzemeye ait PT özelliklerin saptanması gerçekleştirilmiştir. Son kısımda ise; kompozit malzemenin TNMK hücre hatlarıyla yapılan çalışmalar sonucu *in vitro* koşullarda etkinliğinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Nanokompozit malzeme sentezi ve karakterizasyonu

Nanokompozit malzeme sentezi

Sentez yöntemi bakımından literatüre ilk kez sunulan PTT ajanının sentezi sırasında tek basamakta, tek bir ortam içerisinde, çekirdek oluşumu gerçekleşmeden ve sürfaktan kullanımı olmaksızın kısa süre içerisinde Au-pDA nanokompozit malzemenin eldesi gerçekleştirilmiştir. Malzeme aşağıdaki Çizelgede gösterilen kimyasal miktarları kullanılarak sentezlenmiştir.

Çizelge 3.3. Au-pDA nanokompozit malzeme sentezinde kullanılan kimyasal miktarları

	ddH ₂ O (mL)	EtOH (mL)	NH ₄ OH (mL) (%2,5)	Dopamin (mg/mL)	HAuCl ₄ .3H ₂ O (mg/0,25 mL)	Zaman (saat)
1	6	4	3,5	5	1,5	8

Yöntemde sürekli bir manyetik karışma altında ortama ilk önce 6 ml ddH₂O eklenmiştir. Daha sonra sırasıyla 4 ml EtOH ve %2,5 olarak hazırlanan NH₄OH'dan 3,5 ml eklenmiştir. ~ 5 dakikalık karıştırma sonrası ortama DA eklenmiştir. En son ortama HAuCl₄.3H₂O eklendi ve 8 saatlik reaksiyon süresi sonunda, üretilen nanokompozitler 12000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjleme-dekantasyon yoluyla çöktürülmüştür. Daha sonra 2 kez de ddH₂O ile santrifüjleme-dekantasyon gerçekleştirilerek yıkama işlemi yapılmıştır. Üretilen malzeme +4 °C'de muhafaza edilmiştir [53].

Nanokompozit malzeme karakterizasyonu

Üretilen nanokompozit malzemenin boyut, yüzey morfolojisi ve boy dağılımının belirlenebilmesi için taramalı elektron mikroskobu (scanning electron microscope, SEM; FEI, Quanta 200 FEG, USA) ve transmisyon elektron mikroskobu (transmission electron microscope, TEM, FEI Tecnai, 200 kV) kullanılmıştır. İnceleme için ddH₂O içerisinde bulunan nanokompozit malzemeden alınıp içerisine %0,1 (w/v)'lik SDS çözeltisi eklenerek nanomalzemenin iyice dağılması sağlanmıştır. Bu dispersiyondan ~10 ul alınıp SEM cihazının örnek diski üzerine yayıldıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan örnekler plazma ortamında fiziksel buhar biriktirme yöntemiyle yaklaşık 10 nm kalınlığında Au ile kaplanıp; SEM cihazında boy dağılımı tespiti için farklı büyütme yapılarak görüntülenmiştir. Ayrıca aynı cihazla nanokompozit malzeme için SEM-EDX yardımıyla elementel analiz yapılarak nanokompozit malzemedeki Au miktarı da ağırlıkça

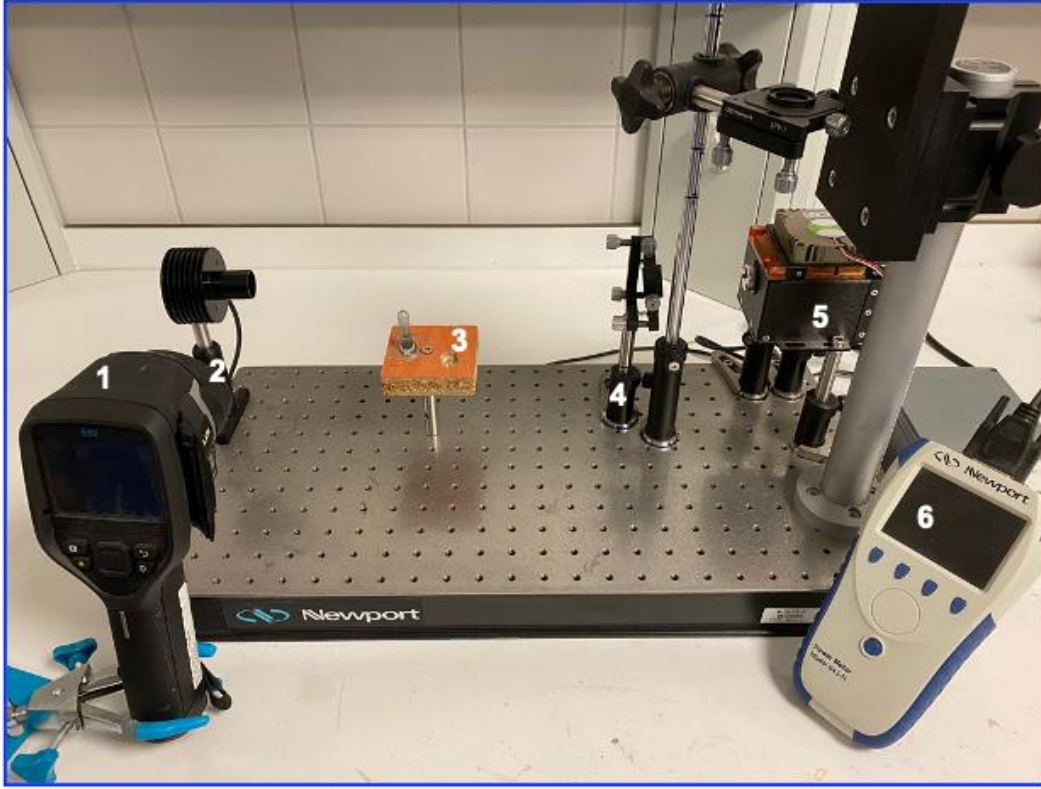
belirlenmiştir. TEM için ise gene yaklaşık ~10 ul örnek alınıp gridler üzerine konulduktan sonra oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Kurutulan örnekler TEM cihazında farklı büyütme altlarında incelenmiştir.

Sentezlenen nanokompozit malzeme ait boyut dağılımının incelenmesi için Zeta-Sizer ölçümünden yararlanılmıştır. İyice dispers edilmiş örneklerimizden 1-1,5 ml’lik kuvars küvetlere alınarak oda sıcaklığında analiz yapılmıştır. 3 tekrarlı yapılan analiz kendi içerisinde de 20 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Nanokompozit malzemeye ait optik özelliklerin karakterizasyonu için UV-vis-NIR bölge spektrumu olan SHIMADZU UV 1601 spektrofotometresi kullanılmıştır. Ölçüm sırasında yol uzunluğu 1 cm olan kuvars küvetlerin kullanımıyla spektrumlar 380-1100 nm dalga boyu arasında su içerisinde alınmıştır. Dispersiyondaki ışık geçirgenliği konsantrasyona bağlıdır.

3.2.2. Kompozit malzemeye ait fototermal özelliklerin saptanması

Tez kapsamında sentezlenmiş nanokompozit malzemeye ait PT özelliklerin saptanması için farklı derişimlerde (0,05-0,8 mg/mL) ve farklı lazer gücü yoğunluklarında (1,5 – 2,5 W/cm²) 808 nm lazer dalga boyuna sahip NIR lazer (Newport 843-R, USA, 10 W yüksek güçlü diyot modülü) kullanılmıştır. Nanokompozit malzemeye 5 dakika boyunca 808 nm dalga boyundaki lazer uygulanmasıyla ısıtma ve 10 dakika soğuma döngüleri uygulanmış, ortaya çıkan sıcaklık değışimleri termal kamerayla (FLIR E50, USA) izlenerek takip edilmiştir. PT ölçümlerde kullanılan NIR lazer deney düzeneği Resim 3.1’de gösterilmiştir.



Resim 3.1. PT ölçümlerde kullanılan deney düzeneği

(1- Termal kamera, 2- Dedektör, 3- Örnek Tablası, 4- Lens, 5- Lazer diyotu, 6- Güç ölçer)

Nanokompozit malzemeye ait fototermal dönüşüm verimi (η) aşağıda verilen denklemlere göre hesaplanmıştır [60]:

$$\eta = \frac{hA(T_{max} - T_{\infty}) - Q_{DI}}{I(1 - 10^{-\lambda_{808}})} \quad (3.1)$$

h ; ısı transfer katsayısı

A ; ölçüm yapılan kabın yüzey alanı

T_{max} ; PTA'yı içeren dispersiyonun maksimum sıcaklığı

T_{∞} ; ortam sıcaklığı

Q_{DI} ; deiyonize su olan dispersiyon ortamına giren enerji

I ; lazerin gücü

λ_{808} ; PTA'yı içeren dispersiyonun 808 nm'deki absorbans

Q_{DI} , DI'nın max sıcaklık verisi kullanılarak aşağıdaki denklemle hesaplanabilir:

$$Q_{DI} = mC_p (T_{max,DI} - T_{\infty}) \quad (3.2)$$

m ; kütle

C_{p_x} ; suyun ısı kapasitesi

$T_{max,DI}$; DI'nın maksimum sıcaklığı

Denklemin $(T_{max,DI} - T_{\infty})$ değerinin nispeten düşük olması sebebiyle (2.1. °C), mC_p değeri sabit kabul edilebilir. Fototermal dönüşüm verimini hesaplamak için hA , boyutsuz sıcaklık farkı θ kullanılarak belirlenmelidir:

$$\theta = \frac{T - T_{\infty}}{T_{max} - T_{\infty}} \quad (3.3)$$

Soğutma periyodu boyunca sisteme enerji girişi sıfırdır ve atmosfere sadece taşınım ile ısı kaybı gerçekleşir. Soğutma periyodu için enerji dengesi şu şekilde ifade edilebilir:

$$mC_p \frac{dT}{dt} = -hA(T - T_{\infty}) \quad (3.4)$$

Denklem 3.3'ün denklem 3.4.'te yerine konmasıyla aşağıdaki denklem elde edilir.

$$\frac{d\theta}{dt} = -\frac{1}{\tau} \theta \quad (3.5)$$

τ ; sistemin zaman sabiti

$\tau = mC_p/hA$ 'nın denklem 3.5'de $\theta(0) = 0$ sınır koşulu ile denkleme konması Denklem. 3.6 ile $-\ln\theta$ 'ya karşı zaman grafiğinin eğiminden τ 'nin hesaplanmasını sağlar:

$$t = \tau(-\ln\theta) \quad (3.6)$$

Üretilen malzemenin fototermal kararlılığının tespit edilmesi için belirli konsantrasyonda hazırlanmış örneğe, 2,0 W/cm² gücünde 5 dk lazer uygulaması ile ısıtma, ardından 10 dk boyunca oda sıcaklığında beklenerek soğutma gerçekleştirildi. Bu döngü 10 kez tekrarlanarak fototermal kararlılık belirlendi.

3.2.3. Nanokompozit malzeme ve hücreler arasındaki etkileşimlerin *in vitro* düzeyde uygulamaları

Üretilen nanokompozit malzemenin *in vitro* koşullardaki etkisinin değerlendirilebilmesi için TNMK hücre hatlarından olan BRCA1 (-/-) null MDA-MB-436 ve BRCA1(+/+) yabanıl MDA-MB-231 ile araştırmalar yürütülmüştür. Bu kapsamda ilk önce malzemenin toksik etkilerinin değerlendirilmesi için MTT ve LDH'dan yararlanılmıştır. Bu deneyler sonrası seçtiğimiz uygun dozlarla PTT gerçekleştirmiştir. Hücrelerde PTT sonrası meydana gelen değişikliklerin saptanması için kaspaz-3/7 aktivitesinin belirlenmesi, DNA fragmentasyon düzeyinin belirlenmesi, mitokondriyal hasarın belirlenmesi, hücre içi ROS oluşumunun ölçülmesi, otofajinin varlığının belirlenmesi, akış sitometresi ile apoptoz-nekroz durumlarının belirlenmesi, protein düzeylerinde meydana gelen değişimlerin tespiti gerçekleştirilmiştir.

Nanokompozit malzemenin toksik etkilerinin değerlendirilmesi

Üretilen kompozit malzemenin toksik etkilerini belirlemek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) ve laktat dehidrojenaz (LDH) yöntemleri uygulanmıştır. Bu amaçla MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücre hatları kullanılmıştır. Her iki hücre hattı da %10 fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS), penisilin/streptomisin ve amfoterisin B gibi antibiyotik ve antimikotiklerle desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerinde %5 CO₂ içeren etüvde, 37 °C'de yeterli sayıya ulaşana kadar 75 cm²'lik flasklarda 2-3 günde bir besiyeri tazelenerek çoğaltılmıştır. Daha sonra hücreler 96 kuyulu hücre kültür kabına 2x10⁴ hücre/kuyu ve her bir konsantrasyon için 6 tekrarlı olacak şekilde ekilmiş, hücrelerin yüzeye tutunmaları ve morfoloji kazanmaları için 24 saat beklenilmiştir. 24 saat sonunda hücreler ile nanokompozit malzeme etkileşimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla +4 °C'de bekletilen malzeme UV altında sterilize edildikten sonra, 13.000 rpm'de santrifüj edilerek supernatan kısmı uzaklaştırılmıştır. Malzemenin üzerine DMEM eklenerek 2 kez santrifüj-dekantasyon yoluyla partiküller besiyerinin bulunduğu ortama geçirilmiştir. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda hazırlanan malzeme (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg/mL) hücrelerle 4 saat boyunca etkileştirilmiştir. Etkileşim sonunda malzemenin hücre canlılığına olan etkilerine bakmak için MTT ve sitotoksik etkileri değerlendirmek için LDH yapılmıştır. Bu amaçla inkübasyon süresi bittikten sonra 10 µl MTT (5 mg/ml) her bir kuyucuğa eklenmiş

ve 4 saat inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda, her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklenmiş ve formazan kristalleri çözüldükten sonra 570 nm’de Spectramax M3 cihazı ile ölçüm yapılmıştır. Her bir doz için 6 tekrarlı yapılan deneyde ortalama absorbans değerleri belirlenmiştir. Elde edilen ortalama absorbans değerleri, kompozit malzeme uygulaması yapılmayan kontrol ile kıyaslanmış ve oluşturulan sonuçlara göre malzemenin hücre canlılığı üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

Üretilen nanokompozit malzemenin TNMK hücre hatları üzerinde sitotoksik etki ve/veya etkilerinin olup olmadığının belirlenmesinde Cytotoxicity Detection kit Plus (LDH) (Roche) kiti kullanılmıştır. Bu amaçla gene 4 saatlik nanokompozit-hücre etkileşimi yukarda anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş ve süre sonunda aşağıdaki protokol izlenmiştir:

1. Nanokompozit malzemeyle etkileşim süresi sonrasında hücreler üzerindeki besiyerinden 100 ul alınıp başka bir 96 kuyulu hücre kültür kabına aktarılmıştır.
2. Deney protokülünde aynı zamanda aşağıdaki kontrol grupları da hazırlanmış ve bunlar da yeni 96 kuyulu kültür kabına eklenmiştir.

- Kör kontrol: Besiyeri
- Düşük kontrol: Besiyeri+ Hücre
- Yüksek kontrol: Lizis Tamponu+ Besiyeri+ Hücre

Yüksek kontrole lizis tamponu eklenmesinden sonra 20 dak., 37 °C’de CO₂ inkübatöründe ışık görmeden bekletilmiştir.

3. Kuyuların içerisindeki besiyerinin üzerine kit içerisinde bulunan kimyasallar yardımıyla hazırlanan reaksiyon karışımından 100 ul eklenmiştir. Burada kuyu başına 2,5 ul şişe 1 ve 112,5 ul şişe 2’den alarak reaksiyon karışımı her seferinde taze olarak hazırlanmıştır. Kültür kabı 15 dak., oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda bekletilmiştir.
4. Süre sonunda 490 nm dalga boyunda, Spectramax M3 cihazı ile ölçüm yapılarak absorbans değerleri elde edilmiştir.
5. Sitotoksitite aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Sitotoksitite (\%)} = \frac{\text{Örnek abs.} - \text{Düşük kontrol abs.}}{\text{Yüksek kontrol abs.} - \text{Düşük kontrol abs.}} \times 100$$

Nanokompozit malzemenin hücre içine alımının belirlenmesi

Üretilen nanokompozit malzemenin MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücrelerinin içerisine alımının belirlenmesi için ICP-MS yapılmıştır. Bu amaçla hücreler ilk önce 6 kuyulu kültür kaplarında 10% FBS, penisilin/streptomisin ve amfoterisin B antibiyotik ve antimikotiklerle desteklenmiş DMEM besiyeri kullanılarak her grup için 3 tekrarlı ve her bir kuyuya 5×10^5 hücre gelecek şekilde ekilmiştir. 37 °C'lik %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildikten sonra, hücreler nanokompozit malzeme (0,8 mg/mL) ile 2 saat boyunca etkileştirilmiştir. Süre sonunda kültür kabındaki nanokompozit malzeme ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkamadan sonra hücreler tripsin ile muamele edilip kaldırılmış ve 1500 rpm'de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hücreler Neubauer lamı ile, tripan mavisini kullanılarak sayılmıştır. Daha sonra hücreler 36 saatlik kral suyu (HCl:HNO₃, 3:1 v/v) ile muamele edilmelerinin ardından ICP-MS analizi için hazırlanmıştır.

Kaspaz 3/7 aktivitesinin belirlenmesi

Üretilen nanokompozit malzemelerin MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücreleri ile PTT uygulamalarına geçilmiş ve bu uygulamanın TNMK hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozu uyarıp uyarmadığının tespitini gerçekleştirmek için SensoLyte® Homogeneous AFC Caspase-3/7 Assay (AnaSpec) kiti kullanılmıştır. Bu amaçla hücreler ilk önce 6 kuyulu kültür kaplarında 4 farklı grup için (Grup I; Kontrol (K), Grup II; Kontrol+ Partikül (K+P), Grup III; Kontrol+Lazer (K+L), Grup IV; Partikül+Lazer (P+L)) 3 tekrarlı olarak, 10% FBS, penisilin/streptomisin ve amfoterisin B antibiyotik ve antimikotiklerle desteklenmiş DMEM besiyeri kullanılarak her bir kuyuya 5×10^5 hücre gelecek şekilde ekilmiş ve 37 °C'lik %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler nanokompozit malzeme (0,8 mg/mL) ile 4 saat boyunca etkileştirilmiştir. Süre sonunda kültür kabındaki nanokompozit malzeme ortamdan uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine taze besiyeri eklenmiştir. Taze besiyeri eklenmiş hücreler 4 dak., 2W/cm² gücünde 808 nm dalga boyundaki lazerle etkileştirilmiştir. Bu etkileşim sonrası 24 saat boyunca hücreler tekrar 37 °C'lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İlk önce hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler soğuk 1X PBS ile hızlıca yıkanmıştır. Her kuyuya 1 mM PMSF içeren 1X hücre lizis tamponundan eklenmiş ve 5 dak. inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüm

lizat bir kazıyıcı yardımıyla kazılarak toplanmış ve mikrosantrifüj tüpüne alınarak 15 dak., +4 °C'de 12.000 g'de, santrifüj edilmiştir. Ayrılan supernatan kısmı başka bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve farklı analizlerde kullanılmak için -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Protein izolasyonu gerçekleştirilen örneklerin içindeki protein miktarının belirlenmesi için BCA Protein Assay kit kullanılmıştır. İlk önce BSA (bovine serum albumin) ile farklı konsantrasyonlarda (0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg/mL) standartların hazırlanması gerçekleştirilmiştir. Standartların hazırlanması sırasında ultra saf su kullanılmıştır. Tüm standartlar ve örnekler (K, K+P, K+L, P+L) 3 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyulu kültür kabına konulmuştur. Kit içerisinde bulunan A ve B çözeltileri 50:1 oranında hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımı standartların ve örneklerin bulunduğu her kuyuya toplam hacim 100 ul olacak şekilde eklenmiştir. 37 °C'de, 30 dak. inkübe edildikten sonra 562 nm dalga boyunda Spectramax M3 cihazı ile okuma yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleriyle BSA için bir standart eğrisi oluşturulmuş ve bu eğri üzerinden her bir hücre lizatının içindeki protein miktarının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Protein miktarı belirlenmiş örneklerden SensoLyte® Homogeneous AFC Caspase-3/7 Assay (AnaSpec) kitindeki protokol gereği her örnekten 150 ul alınıp içerisine 50 ul substrat solüsyonu eklenmiştir. Substrat solüsyonun hazırlanması için gerekli bileşenler Çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. 96 kuyulu kültür kabı için Kaspaz-3/7 substrat solüsyonu hazırlanması (100 kuyu için)

Bileşenler	Hacim
Kaspaz-3/7 substratı (İçerik A)	50 ul
1 M DTT (İçerik E)	200 ul
Analiz tamponu (İçerik D)	4.75 ul
Toplam hacim	5 mL

Substrat solüsyonu eklenmesinden sonra kültür kabı ışık görmeyecek şekilde karıştırıcıya yerleştirilmiş ve 1 saat boyunca karıştırmaya devam edilmiştir. Süre sonunda floresan yoğunluğu eksitasyon/emisyon= 380/500 nm (Ex/Em) dalga boylarında olacak şekilde ölçüm yapılmıştır.

Akış sitometri ile apoptoz/nekroz analizi

PTT uygulaması sonrası hücrelerde meydana gelen hücre ölümünü belirlemek amacıyla akış sitometrisinden yararlanılmıştır. Bu yöntemde amaç hücrelerde ortaya çıkan apoptoz/nekroz durumunun kantitatif olarak belirlenmesini gerçekleştirmektir. Bunun için MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücreleri, 6 kuyucuklu kültür kaplarında her bir kuyucuğa 5×10^5 hücre gelecek şekilde ekilmiş ve bir gece bekledikten sonra hücreler üretilen nanokompozit malzeme ile daha önce belirlenen doz ve sürelerde muamele edilmiştir. Bu muamele sonrası PTT gerçekleştirilmiş ve daha sonra hücreler, 3 ve 24 saatlik inkübasyon sonunda, soğuk PBS ile 2 defa yıkandıktan sonra 2000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Supernatan kısım uzaklaştırıldıktan sonra pellet kısmı FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I içeriğindeki 100ul $1 \times$ Binding tamponu, 5 µl FITC Annexin V ve 10 µl PI içeren floresan reaktifi ile süspanse edilmiştir. Hafifçe vortekslenerek 15 dk oda sıcaklığında (25 °C)'de ve karanlıkta bekletilmiş ve her bir tüpe 400 µl PBS eklenmiştir. Akım sitometri cihazında uygun filtreler kullanılarak 1 saat içinde analiz edilmiştir. Hücreler tarafından Annexin V ve PI ışıma miktarlarına bağlı olarak analiz edilen ölüm durumu Çizelge 3.5'de gösterildiği belirlenmekte ve cihazın programı tarafından diyagram halinde sunulmaktadır. Diyagramlarda verilen ortalama yüzdelere grafiğe geçirilmiş ve PTT'nin etkinliği grafikler üzerinden değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.5. Annexin V ve PI sinyaline bağlı olarak hücrede canlılık/ölüm durumu

	Canlı	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz
Annexin V	-	+	+	-
PI	-	-	+	+

DNA fragmentasyon düzeyinin belirlenmesi

Nanokompozit malzeme ile gerçekleştirilen PTT sonrası MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücrelerinin hangi ölüm yolağını seçtiğinin belirlenmesi için CDD (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}) kiti kullanılmıştır. Kit sitoplazmik mono ve oligo nükleozomların miktarlarının ELISA yöntemi ile saptanmasını sağlayarak örnekler arasında apoptozun oransal olarak değerlendirilmesine olanak vermektedir. Bu amaçla kullanılan kit protokolü aşağıda verilmiştir;

1. MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücreleri 96 kuyulu kültür kaplarına 2×10^4 hücre/ well olacak şekilde ekilmiş ve nanokompozit malzemeyle etkileşimi belirlenen doz ve sürede gerçekleştirilmiştir.
2. Süre sonunda PTT uygulamasına geçilmiştir. Uygulama sonrası 24 saatlik inkübasyondan sonra, her kuyuya 200 ul lizis tamponu eklenmiş ve kültür kapları oda sıcaklığında 30 dak. bekletilmiştir.
3. Oluşan lizatlar mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve oda sıcaklığında, 1000 rpm'de 10 dak. santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonrası supernatan kısmından 20 ul alınıp dikkatlice streptavidin kaplı mikropalakaya aktarılmıştır.
5. Her kuyucuğa 80 ul immünreaktif eklenmiş ve oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 2 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
6. Süre sonunda kuyucuklar 300 ul yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır.
7. Her kuyucuğa kit içinde bulunan ABST solüsyonundan (perosksidaz substrat solüsyonu) 100 ul eklenmiş ve renk değişimi gözlenene kadar oda sıcaklığında, çalkalayıcıda ~ 20 dak. inkübe edilmiştir.
8. Süre sonunda her bir kuyucuğa 100 ul ABST durdurma solüsyonunun eklenmiş ve kültür kabı 405 nm dalga boyunda Spectramax M3 cihazında okunmuştur.

Mitokondriyal hasarın belirlenmesi

Sağlıklı ve işlevsel bir hücrenin önemli göstergelerinden olan mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen bozulmalar apoptoz sürecinin erken belirteçlerinden biridir. Uygulanan PTT sonrası mitokondriyal hasarın belirlenmesi için Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit II (Cell Signaling Technology) kullanılmıştır. Kit canlı hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinin saptanmasını sağlayan floresan bir yöntemdir. Kullanılan kit protokolü aşağıda verilmiştir;

1. MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücreleri 96 kuyulu kültür kaplarına 2×10^4 hücre/ kuyu olacak şekilde ekilmiş ve nanokompozit malzemeyle etkileşimi belirlenen doz ve sürede gerçekleştirilmiştir.
2. Süre sonunda PTT uygulamasına geçilmiştir. Uygulama sonrası 24 saatlik inkübasyondan sonra, her kuyuya 2 uM TMRE'den 10 ul eklenmiş ve 20 dak. 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir.

3. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklar 3 kez ılık 1X PBS ile yıkanmıştır.
4. En son kuyucuklara 100 ul 1X PBS eklenmiş ve Spectramax M3 cihazında Ex/Em=550/580 nm dalga boyunda olacak şekilde ölçüm yapılmıştır.

Hücre içi ROS oluşumunun ölçülmesi

Üretilen nanokompozit malzeme ile gerçekleştirilen PTT'nin MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla DHE Assay-Reactive Oxygen Species kiti kullanılmıştır. Süperoksit ve hidrojen peroksite spesifik bir floresan prob olan DHE'nin (dihidroetidyum) kullanıldığı kit canlı hücrelerde doğrudan ROS ölçümüne olanak vermektedir. Kit prosedürü aşağıda sunulmuştur;

1. MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücreleri 96 kuyulu kültür kaplarına 2×10^4 hücre/ kuyu olacak şekilde ekilmiş ve nanokompozit malzemeye etkileşimi belirlenen doz ve sürede gerçekleştirilmiştir.
2. Süre sonunda PTT uygulamasına geçilmiştir. Uygulama sonrası 24 saatlik inkübasyondan sonra, her kuyudaki besiyeri aspire edilmiş ve 150 ul cell-based assay tamponu eklenmiştir.
3. ~10-20 µL cell-based assay tamponu kuyuda bırakılarak geri kalan kısım aspire edilmiş ve her kuyuya 130 ul ROS staining tamponu eklenmiştir.
4. Negatif kontrol için kit içeriğinde yer alan N-acetyl Cysteine Assay Reagent'dan 3 tekrarlı olacak şekilde ilgili kuyulara 10 ul eklenmiştir.
5. 96 kuyulu kültür kabı ışıktan korunacak şekilde 37 °C'de, 30 dak. bekletilmiştir.
6. Süre sonunda pozitif kontrol için kit içeriğinde yer alan Antimycin A Working Reagent'dan 3 tekrarlı olacak şekilde ilgili kuyulara 10 ul eklenmiş ve ışıktan korunacak şekilde 37 °C'de, 1 saat bekletilmiştir.
7. Kuyulardan ROS staining buffer dikkatlice aspire edilmiş ve 100 ul Cell-Based Assay tamponu eklenmiştir.
8. Kültür kabı Spectramax M3 cihazında Ex= 480-520 nm, Em=570-600 nm dalga boyları arasında olacak şekilde okunmuştur.

Otofajinin varlığının belirlenmesi

Üretilen nanokompozit malzeme ile gerçekleştirilen PTT'nin MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde otofaji üzerine etkilerinin araştırılması için Human Autophagy Array C1 AAH- ATG-1-4 (RayBiotech) kullanılmıştır. Otofajik yolda görev aldığı bilinen 20 farklı protein düzeyinin ELISA yöntemiyle belirlenmesi ve görüntülenmesine olanak vermekte olan kitle ait protokol aşağıda verilmiştir;

1. MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücreleri 96 kuyulu kültür kaplarına 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve nanokompozit malzemeye etkileşimi belirlenen doz ve sürede gerçekleştirilmiştir.
2. Süre sonunda PTT uygulamasına geçilmiş ve 24 saatlik inkübasyon sonrası TNMK hücrelerinden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ve kullanılan kitle izole edilen proteinlerden ~ 500 ug olacak şekilde kullanılmıştır.
3. Kit içeriğindeki tüm bileşenler oda sıcaklığında kullanılmıştır.
4. Antibody içeren membranların her biri inkübasyon kuyularına yerleştirilmiş ve her kuyuya 2 ml blocking tamponu eklenerek 30 dak., oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
5. Inkübasyon sonrası her kuyudaki blocking tamponu aspire edilmiş ve belirlenen protein miktarlarının 1'er ml'leri uygun kuyulara eklenmiştir. +4 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.
6. Inkübasyon sonrası kuyular içerisindeki sıvı kısım aspire edilmiş ve membranlar ilk önce yıkama tamponu I ile 3 kez 5 dak., daha sonra yıkama tamponu II ile 2 kez 5.dak süre ile yıkanmıştır.
7. Yıkama sonrası membranlar biotinlenmiş antikor karışımının 1 ml'si ile +4 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.
8. Süre sonunda antikor karışımı aspire edilmiş ve tekrar yıkama tamponu I ile 3 kez 5 dak., daha sonra yıkama tamponu II ile 2 kez 5.dak süre ile yıkanmıştır.
9. Yıkama sonrası membranlar 2 ml 1X HRP-Streptavidin çözeltisi ile +4 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.
10. Süre sonunda HRP-Streptavidin çözeltisi aspire edilmiş ve yıkama tamponu I ile 3 kez 5 dak., daha sonra yıkama tamponu II ile 2 kez 5.dak süre ile yıkanmıştır.
11. Yıkama sonrası her membran için deteksiyon tamponu C ve D 250'şer ul olacak şekilde karıştırılmış ve membranların üzerine eklenmiştir. 2 dak.'lık inkübasyondan

sonra jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 2200 Pro-Carestream Health, Bio-Rad, USA) ile görüntüleme yapılmıştır.

12. Görüntüleme sonrası proteinlere ait noktalar Image J programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Western Blot yöntemi

MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücrelerine PTT uygulaması yapılmasından sonra, hücrede protein düzeyinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi için Western Blot yönteminden yararlanılmıştır. Bu amaçla hücrelerden kısım 3.2.3.3.'de anlatıldığı gibi protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen total protein miktarı BCA kiti ile belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra pAKT, AKT, pERK, ERK proteinlerine ait ifade düzeylerinde meydana gelen değişimlerin tespiti Western Blot ile gerçekleştirilmiştir. House keeping olarak β -aktin (ACTB) proteininin ifade düzeyi belirlenmiştir.

Seçilmiş proteinlerin molekül ağırlıkları sırasıyla pAKT 60 kDa, AKT 60 kDa, ERK 42-44 kDa, pERK 44-42 kDa'dur. Proteinler için %8, %10 ve %12'lik jel ile yapılan çalışmalardan sonra %10 ile çalışmaya karar verilmiştir. Bu amaçla Çizelge 3.1. ve 3.2. de belirlenen oranlarla yığınlama ve ayırma jelleri hazırlanmıştır. Jellerin hazırlanmasından sonra 30 ug protein örnekleri 1X'lik yükleme tamponuyla karıştırılıp; 95 °C'de, 5 dak. kuru blok ısıtıcıda denatürasyon için bekletilmiştir. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra ilk kuyuya uygun ladder yüklenmesiyle, sırayla örneklerimiz 3 tekrarlı olacak şekilde jele yüklenmiştir. Örnekler 1X yürütme tamponu içeren tankın içerisinde, 120 V- 250 mA'de 2 saat boyunca yürütülmüştür. Süre sonunda proteinlerin jelden ıslak transfer yöntemi ile PVDF membrana transferleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan transfer kaseti tanka yerleştirilmiş ve tank 1X transfer tamponu ile doldurulduktan sonra 250 mA, 100 V'da ortalama 2 saat boyunca jelden membrana protein geçişi sağlanmıştır. Süre sonunda membranlar 1X BSA ile bloklanmıştır. Bloklama sonrası pAKT, AKT, pERK, ERK ve β -aktin primer antikörlerine uygun seyreltmeler yapılmıştır. Membranlar; +4°C'de, çalkalayıcı yardımıyla karıştırılarak gece boyunca primer antikörlerle inkübe edilmiştir. Süre sonunda membranlar TBS-T ile yıkanmıştır. Ardından uygun seyreltmelerin yapıldığı sekonder antikör ile oda sıcaklığında, çalkalayıcı yardımıyla sürekli karıştırılarak 1,5 saat inkübe edilmiştir. Membranlar tekrar TBS-T ile yıkanmış ve görüntüleme işlemine geçilmiştir. Membranlar ECL Western Blotting Substrate (Millipore)

ile muamele edildikten sonra Kodak Gel Logic 2200 Pro cihazı ile görüntüleme yapılmıştır. Görüntüleme sonrası proteinlere ait bant kalınlıkları Image J programı kullanılarak hesaplanmış ve PTT'nin protein ifade düzeylerine olan etkisi araştırılmıştır.

İstatistiksel analiz yöntemleri

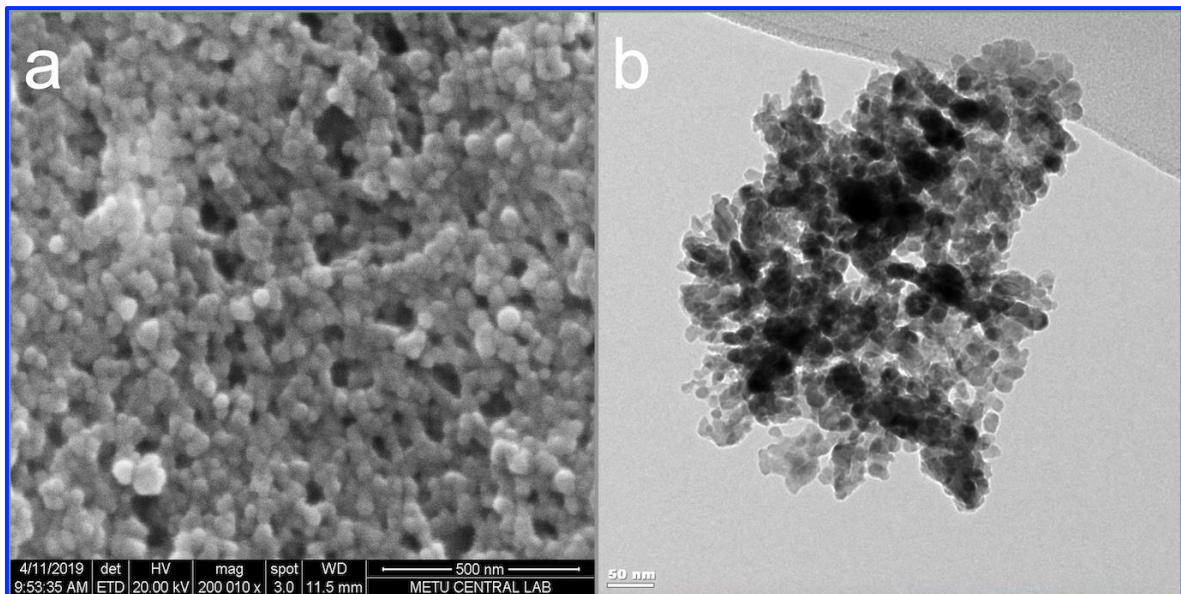
Sunulan çalışma kapsamında gruplar arasındaki farklılıklar elde edilen verilerin SPSS 24.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Sürekli verilerin karşılaştırılmasında Student's t testi kullanılmıştır. p değerinin hesaplanmasıyla istatistiksel anlamlılık saptanmış ve $*p<0.05$, $**p<0.01$ ve $***p<0.001$ bulunan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Tez kapsamında, meme kanserleri arasında tedaviye oldukça dirençli bir tür olan TNMK'ne yönelik etkin bir PTT gerçekleştirmek için nanokompozit malzeme eldesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla üretilen Au-pDA nanokompozit malzemenin sentez yöntemi literatüre ilk kez bu çalışma ile sunulmuştur. İlk önce malzemenin sentez ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Uygun malzeme eldesinden sonra, PT özelliklerin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. En son üretilmiş en uygun malzemeyle *in vitro* deneyler tamamlanarak, TNMK'de başarılı bir PTT ile kanser hücreleri ortadan kaldırılarak, üretilen malzemenin etkin bir PTT için kullanılabileceği literatüre sunulmuştur.

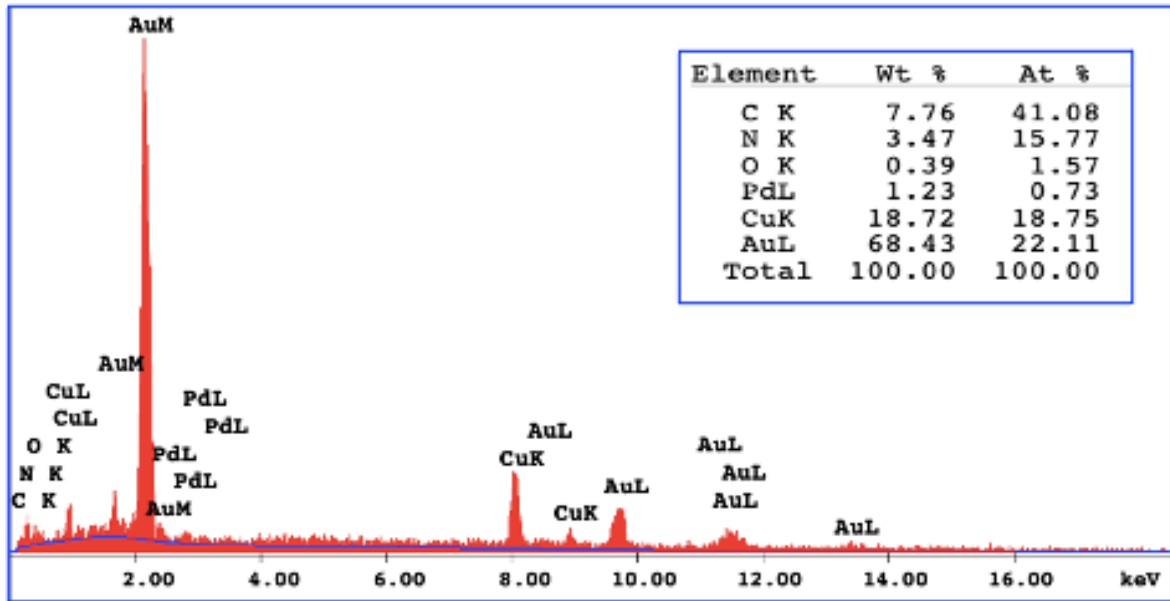
4.1. Nanokompozit Malzemeye ait Karakterizasyon Çalışmaları

TNMK için etkin bir PTT gerçekleştirmek için tek basamakta ve tek bir ortam içerisinde çekirdek oluşumu gerçekleşmeden ve sürfaktan kullanımı olmaksızın, kısa süre içerisinde Au-pDA nanokompozit eldesi ilk kez sunulan yöntemle tez kapsamında gerçekleştirilmiştir. Malzemeye ait boy dağılımı, büyüklük ve morfolojilerini gösteren SEM ve TEM görüntüleri Resim 4.1 a ve b'de sunulmuştur. Tek düze yapı ve hiper dallanmaya (hyper-branched) sahip nanokompozit malzemenin ortalama boyutu 70 nm olarak saptanmıştır.



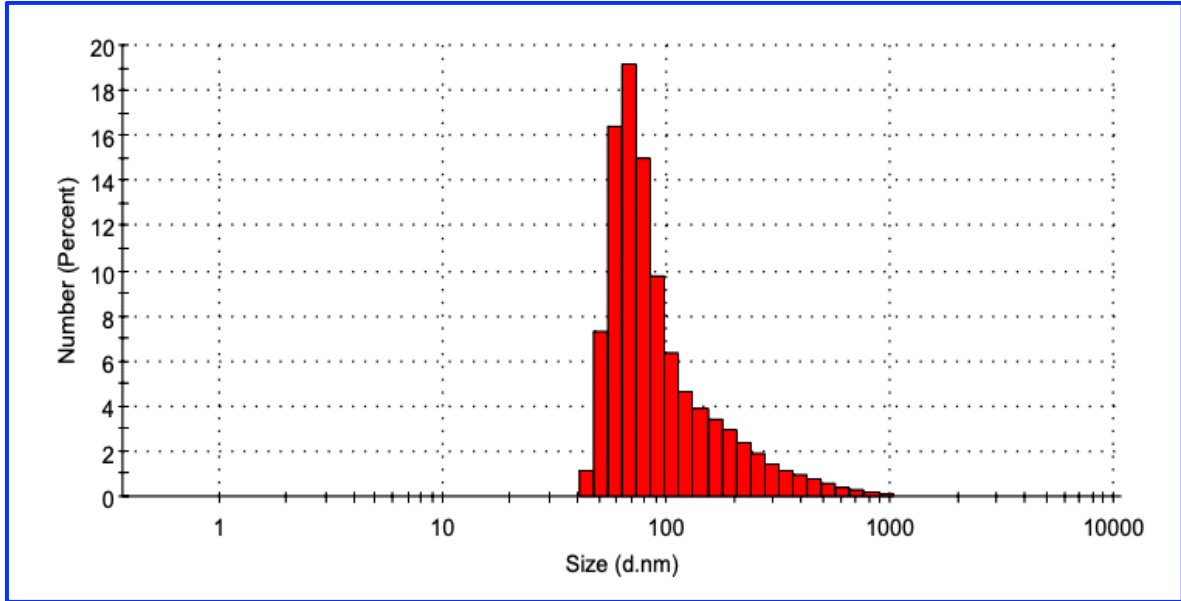
Şekil 4.1. Nanokompozit malzemeye ait SEM ve TEM görüntüleri

SEM-EDX yardımıyla elementel analiz yapılarak nanokompozit malzemedeki Au miktarı Resim 4.2’de gösterildiği gibi ağırlıkça %68,43, atomik olarak %22,11 bulunmuştur. Ek olarak polidopamin yapısında bulunan karbon ve nitrojen elementlerine ait ağırlıkça % değerleri sırasıyla 7,76 ve 3,47 olarak belirlenmiştir. Atomik ağırlıkları ise sırasıyla %41,08 ve %15,77 olarak ölçülmüştür.



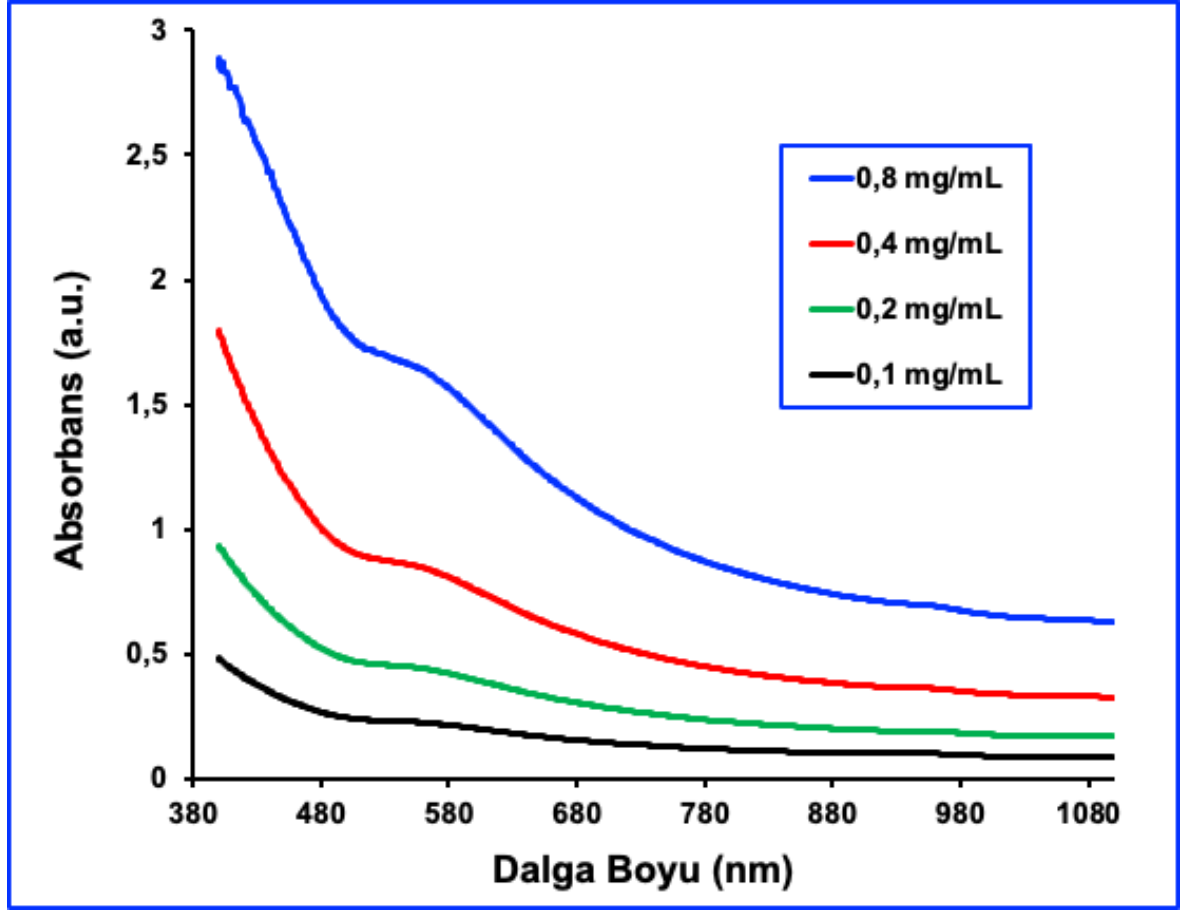
Şekil 4.2. Nanokompozit malzemeye ait SEM-EDX görüntüleri

Sentezlenen kompozit malzeme ait boyut dağılımının incelenmesi için Zeta-Sizer ölçümünden yararlanılmıştır. Yapılan ölçümlerde ortalama 70 nm boyuttaki nanokompozit malzemenin en çok yüzdeye sahip olduğu Resim 4.3’te gösterilmiştir. Zeta-Sizer ölçümlerinde görülen boyut dağılımının kısmen geniş olmasının nedeni; ölçüm sırasında nanomalzemenin bir araya gelme eğiliminden kaynaklanmaktadır. Bu da 100 nm ve üzeri boyut dağılımına yol açmıştır. Fakat SEM görüntülerinde görüldüğü gibi sentezlenen malzemenin oldukça dar boyut dağılımına sahip olduğu kanıtlanmıştır.



Şekil 4.3. Nanokompozit malzemeye ait Zeta-Sizer ile ölçülen boyut dağılımı

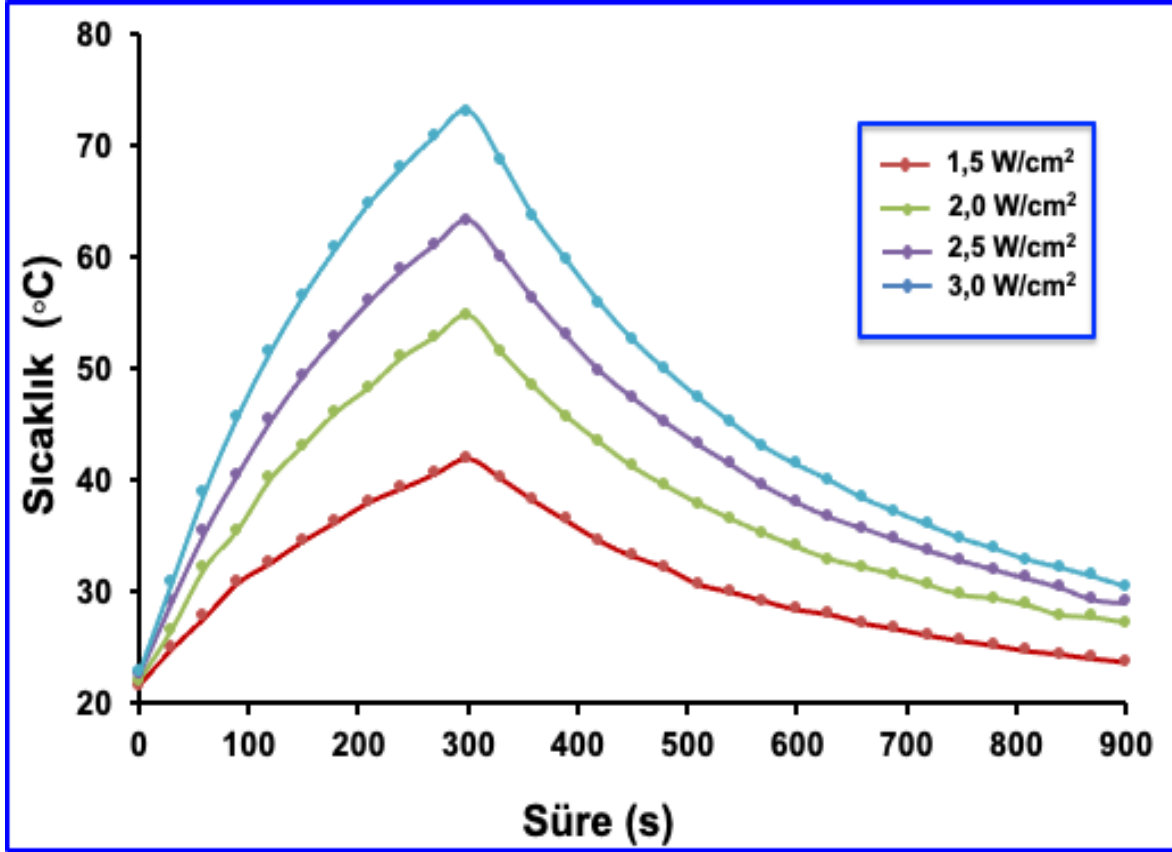
Tez kapsamında PTT’de kullanılmak üzere üretilen PT ajanın farklı derişimlerde sulu çözeltisi hazırlanmış ve UV-görünür bölge spektrumu alınarak Resim 4.4’te sunulmuştur. Spektrumda görüldüğü gibi 480-630 nm aralığındaki pik nanokompozit yapısının başarılı şekilde oluşturulduğunu göstermektedir. Pik Au nanoparçacıklara özgü yüzey plazmon rezonansı (SPR) sayesinde oluşmakta olup maksimum değere 550 nm civarında ulaşılmaktadır. Farklı konsantrasyonda hazırlanan örneklerin (0,8; 0,4; 0,2; 0,1 mg/mL) 808 nm dalga boyundaki absorbans değerleri (NIR bölgedeki absorbans değerleri) sırasıyla 0,826; 0,427; 0,224; 0,115 olarak ölçülmüştür. Bu absorbans değerleri seyreltme oranlarıyla korele olarak elde edilmiştir. Kompozit nanomalzemenin 808 nm dalga boyunda sahip olduğu absorbans değerleri, malzemenin PTT ajanı olarak kullanılmasının uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4. Nanokompozit malzemenin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış sulu çözeltisinin UV- görünür bölge spektrumu

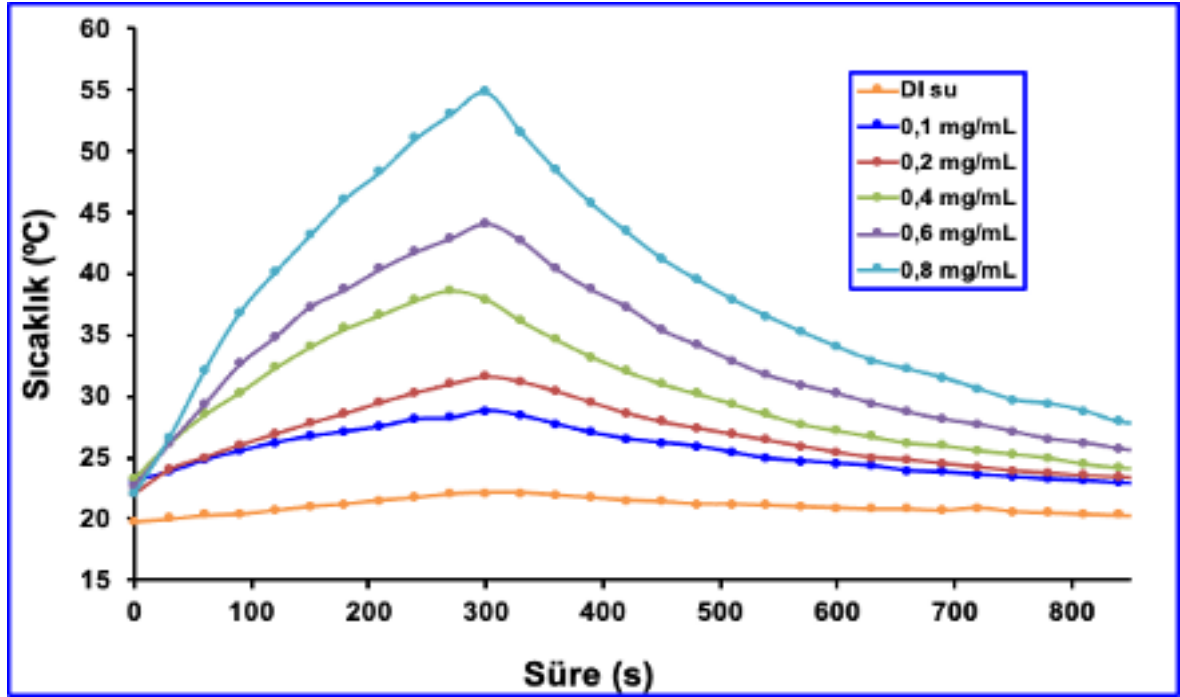
4.2. Nanokompozit Malzemeye ait Fototermal Özelliklerin Saptanması

Sentezi ve karakterizasyonları tamamlanan malzemenin PT özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla malzemenin fototermal etkinliği, fototermal dönüşüm verimi ve fototermal kararlılığı belirlenmiştir. İlk önce farklı lazer güçleri ($1,5$ - $3,0$ W/cm^2) kullanılarak malzemenin fototermal etkinliği araştırılmıştır. $0,8$ mg/mL derişimdeki nanokompozit malzemenin sulu çözeltisi; 808 nm dalga boyundaki lazer ile yaklaşık 22 $^{\circ}\text{C}$ başlangıç sıcaklığında, 5 dakika boyunca farklı güçlerde ($1,5$ W/cm^2 ; 2 W/cm^2 ; $2,5$ W/cm^2 ; 3 W/cm^2) muamele edilmiş ve ardından 10 dakika boyunca soğuma döngüsüne geçilmiştir. 5 dakikalık süre sonunda Şekil 4.5.'de gösterildiği gibi $1,5$ W/cm^2 için 42 $^{\circ}\text{C}$, 2 W için 54 $^{\circ}\text{C}$, $2,5$ W için $63,3$ $^{\circ}\text{C}$, 3 W içinse $73,1$ $^{\circ}\text{C}$ 'ye ulaşılmıştır. 42 $^{\circ}\text{C}$ ve üzerindeki sıcaklıklar hücre ölümü üzerinde etkili olduğundan 2 W ile çalışmalara devam edilmiştir [53].

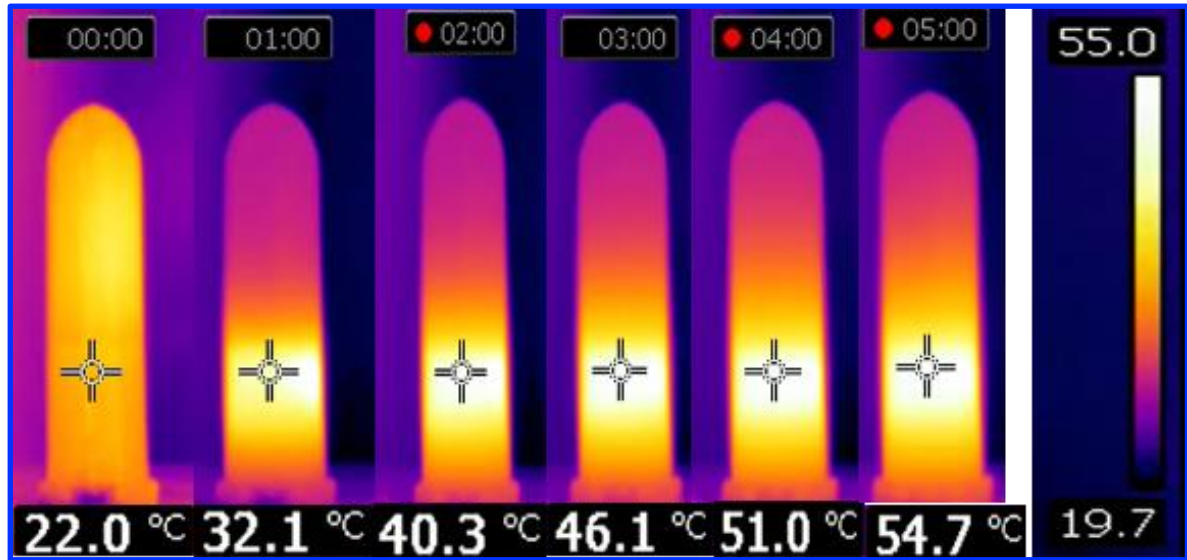


Şekil 4.5. Nanokompozit malzemenin 0,8 mg/mL derişimdeki sulu çözeltilisine farklı güçlerde lazer uygulanması sonucu elde edilen sıcaklık değışim profili

Çalışılacak güce karar verilmesinden sonra farklı konsantrasyonlarda (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 mg/mL) hazırlanan nanokompozit malzemenin sulu dispersiyonunun 808 nm dalga boyundaki lazer ile 2 W/cm² güçte yaklaşık 22 °C başlangıç sıcaklığında, 5 dakika boyunca muamele edilmiş ve ardından 10 dakika boyunca soğuma döngüsüne geçilmiştir. Şekil 4.6'da gösterildiği gibi 5 dakikalık süre sonunda 0,1 mg/mL için 28,8 °C, 0,2 mg/mL için 31,6 °C, 0,4 mg/mL için 38,6 °C, 0,6 mg/mL için 44,1 °C, 0,8 mg/mL içinse 54,8 °C'ye ulaşılmıştır. Şekil 4.7.'de 0,8 mg/mL konsantrasyondaki nanomalzemeyi içeren sulu dispersiyona ait 5 dak.'lık ısınma döngüsündeki zamana bağlı sıcaklık artışının termal kamera görüntüleri verilmiştir. 42 °C ve üzerindeki sıcaklıklar hücre ölümü üzerinde etkili olduğundan 0,8 mg/mL nanokompozit derişimiyle hücre çalışmalarına devam edilmeye karar verilmiştir [53]. Farklı lazer güçlerinde ve farklı konsantrasyonlarda elde edilen sonuçlar yüksek fototermal etkinliğe sahip bir nanomalzemenin elde edildiğini göstermiştir.



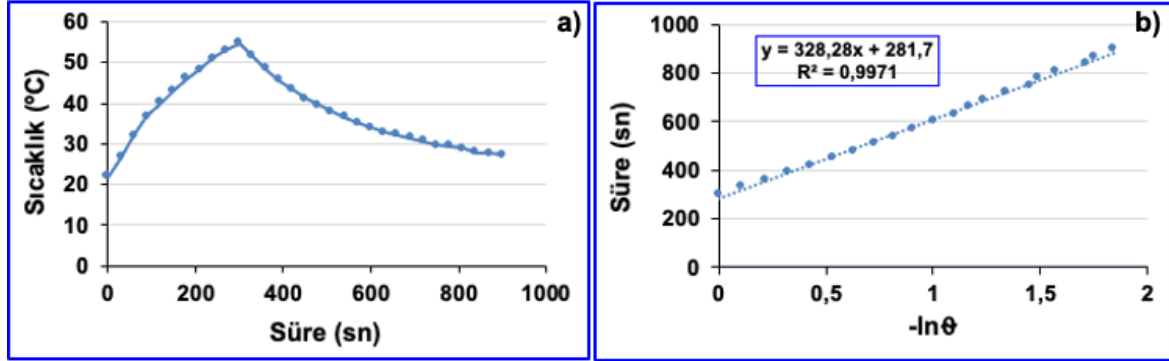
Şekil 4.6. Nanokompozit malzemenin farklı derişimdeki sulu çözeltilisine 2 W/cm² lazer uygulanması sonucu elde edilen sıcaklık değışim profili



Şekil 4.7. Nanokompozit malzemenin 0,8 mg/mL konsantrasyondaki sulu dispersiyonunun, 2 W/cm² güç yoğunluğunda; 808 nm dalga boyunda lazer kullanımı ile elde edilen zamana bağlı sıcaklık artışına ait termal kamera görüntüleri

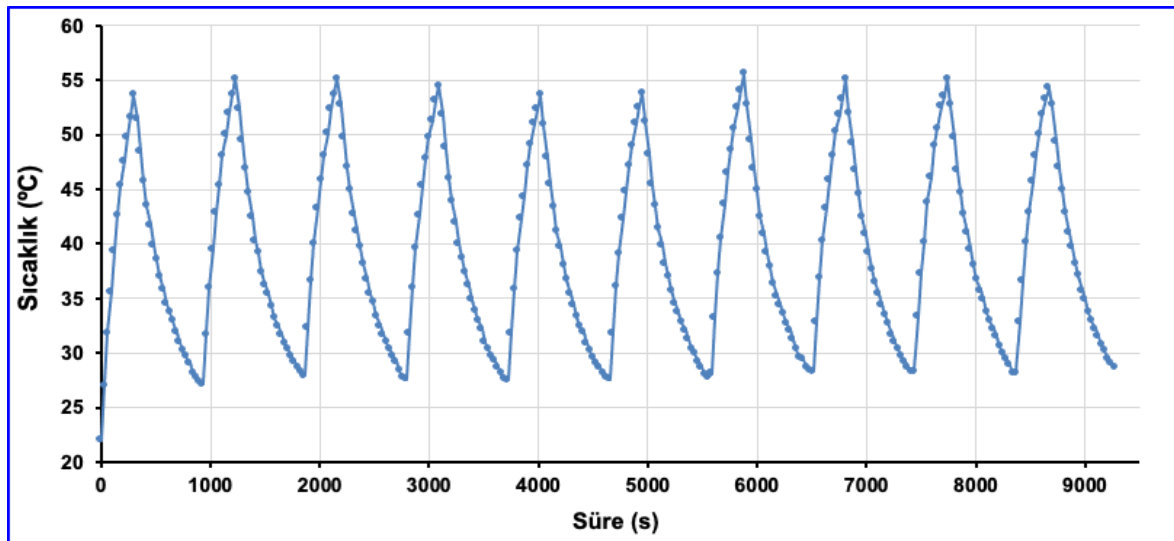
PTT için üretilen bir nanomalzemenin PT özellikleri incelenirken bir önemli parametrede fototermal dönüşüm verimi (η)'nin hesaplanmasıdır. η eşitlik 3.1'e göre hesaplanmaktadır. Denklem göre hA değerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu sebeple Şekil 4.8.a'da 0,8 mg/mL konsantrasyona sahip nanokompozitin sulu dispersiyonuna 2,0 W/cm² güç yoğunluğunda lazer uygulanmasıyla elde edilen örneğin soğuma periyodu verilerinden

hazırlanan zamana bağlı $t(-\ln\theta)$ grafiği çizilmiştir (Şekil 4.8.b). Elde edilen doğrunun eğimi bize zaman sabiti (τ)'yi vermekte olup; $328,28 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Eşitlikte yerine konarak hA değeri hesaplanmasıyla η değerinin %47,7 olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.8. a) Nanokompozit malzemenin 0,8 mg/mL konsantrasyondaki sulu dispersiyonunun, 2 W/cm^2 güç yoğunluğunda; 808 nm dalga boyunda lazer kullanımı ile ısınma-soğutma periyodu grafiği (300 sn ısıtma; 600 sn soğutma) b) $t(-\ln\theta)$ grafiği

Üretilen nanokompozit malzemenin fototermal kararlılığının belirlenmesi için tekrarlayan lazer uygulaması yapılarak, bunun ısıtma-soğutma döngüsü üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 0,8 mg/mL derişimdeki nanokompozit malzemenin sulu çözeltisi, 2 W/cm^2 gücünde 808 nm dalga boyundaki lazer ile etkileştirilmiştir. Malzeme lazer ile 5 dakika ısıtılmış; ardından lazer kapatılarak 10 dakika soğutma gerçekleştirilmiştir. Isıtma-soğutma döngüsü 10 kez tekrar edilmiştir. Bu tekrarlar sonucu üretilen malzemenin Şekil 4.7'de görüldüğü gibi mükemmel bir fotokararlılık gösterdiği ortaya konmuştur.



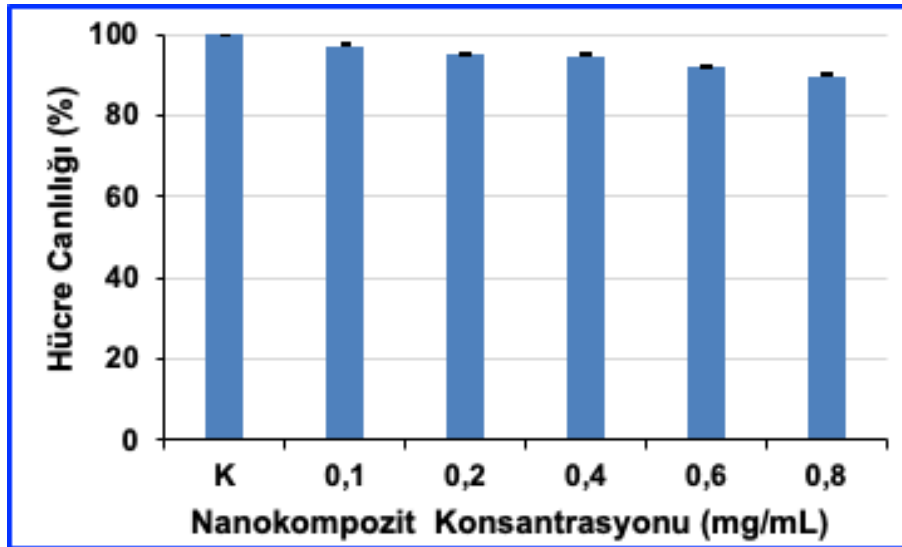
Şekil 4.9. Nanokompozit malzemeye ait ısıtma-soğutma döngülerindeki sıcaklık değişim profilleri

Başarılı şekilde üretimi tamamlanmış Au-pDA nanokompozit malzemenin, yüksek fototermal performans ve fototermal dönüşüm verimliliği, mükemmel bir fototermal kararlılığa sahip olduğu gösterilmiştir. Sentez yöntemiyle literatürde bir ilk olan bu özelliklere sahip malzemenin PTT için oldukça yüksek bir potansiyele sahip olacağı öngörülmüş ve çalışmanın son kısmında *in vitro* ortamda uygulamalar yapılarak bu düşünce kanıtlanmıştır.

4.3. Nanokompozit Malzeme Performansının *in vitro* Koşullarda Değerlendirilmesi

4.3.1. Nanokompozit malzemenin toksik etkilerinin değerlendirilmesi

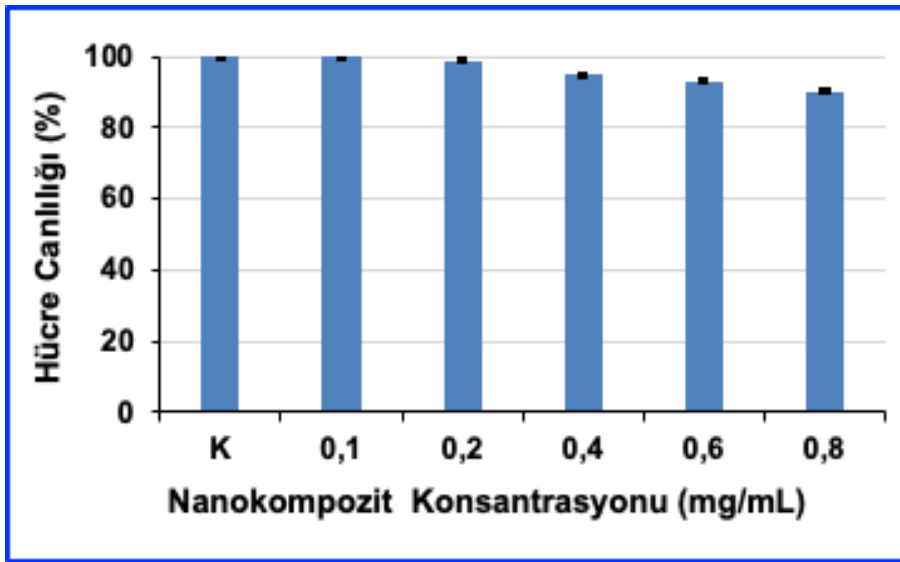
Üretilen nanokompozit malzemenin TNMK hücreleri üzerindeki canlılığa ve sitotoksositeye etkilerinin belirlenmesi için MTT ve LDH yönteminden yararlanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nanokompozit malzemenin MDA-MB-436 ile MDA-MB-231 hücre hatlarıyla 4 saatlik inkübasyonundan sonra MTT yapılmıştır. Şekil 4.8’de görüldüğü gibi 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,8 mg/mL konsantrasyondaki nanomalzeme için sırasıyla; %97,4; %95,1; %94,9; %92 ve %89,9 oranında canlılık elde edilmiştir.



Şekil 4.10. Nanokompozit malzemenin farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-436 hücre canlılığına etkileri. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=6)

Şekil 4.9’de ise malzemenin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki canlılığına etkileri gösterilmiştir. 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,8 mg/mL konsantrasyondaki nanomalzeme için sırasıyla; %99,89; %98,9; %95; %93 ve %90,4 oranında canlılık elde edilmiştir.

Sonuçlara göre; üretilen nanokompozit malzemenin, her iki hücre hattında, yüksek konsantrasyonlarda dahi hücreler üzerindeki canlılığa etkileri oldukça düşük kalmıştır. Ayrıca malzemenin her iki hücre hattında da kontrole göre artan konsantrasyonlarda hücreler üzerindeki canlılıkta anlamlı bir fark yaratmadığı gözlenmiştir. ($p>0,05$).

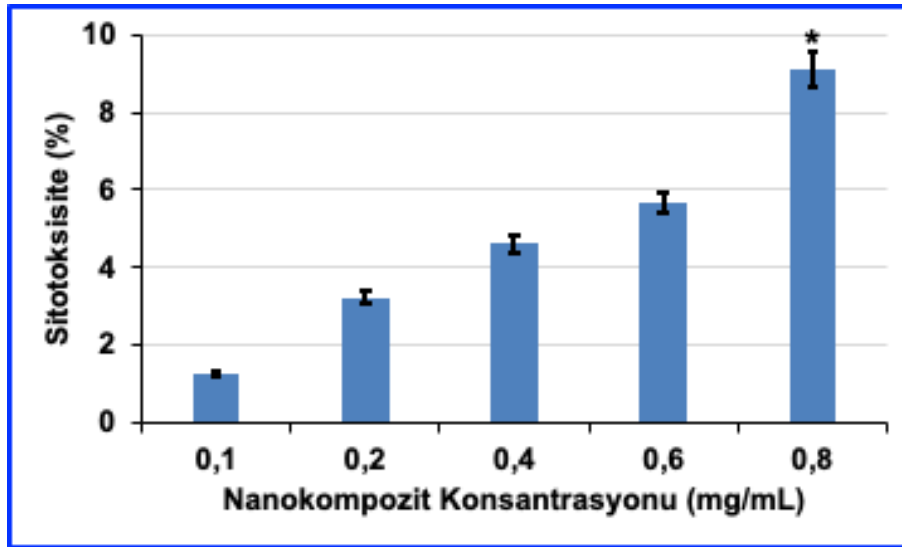


Şekil 4.11. Nanokompozit malzemenin farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücre canlılığına etkileri. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=6)

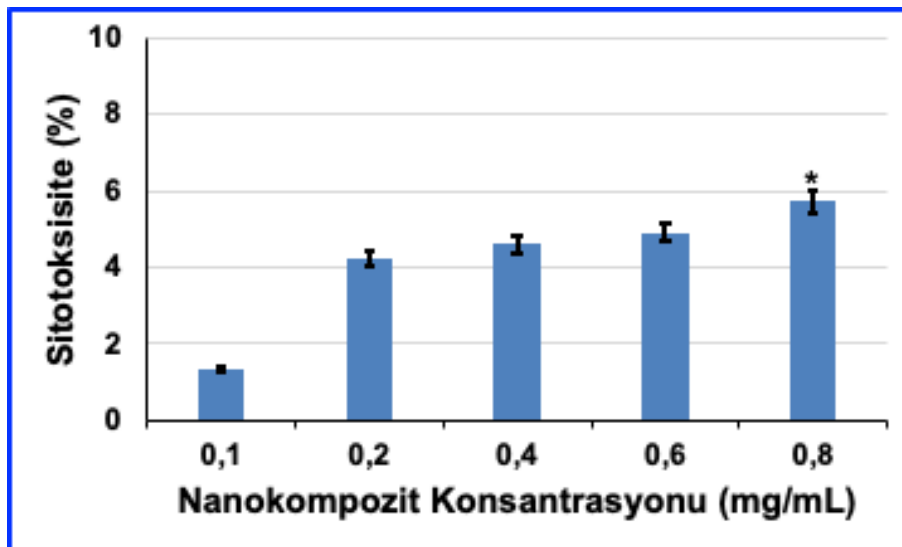
PTT uygulamasına geçilmeden önce üretilen nanokompozit malzemenin hücreler üzerindeki toksik etkilerinin saptanması için besiyerine salınan laktat dehidrojenaz miktarının ölçülmesi için LDH deneyi yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nanokompozit malzemenin MDA-MB-436 ile MDA-MB-231 hücre hatlarıyla 4 saatlik inkübasyonundan sonra gerçekleştirilen LDH sonuçları Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de paylaşılmıştır. MDA-MB-436 hücreleri için sitotoksosite 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,8 mg/mL konsantrasyondaki nanomalzeme için sırasıyla; %1,25; %3,2; %4,6; %5,7 ve %9,1 olarak belirlenmiştir. MDA-MB-231 hücreleri içinse sitotoksosite 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,6 mg/mL; 0,8 mg/mL konsantrasyondaki nanomalzeme için sırasıyla; %1,3; %4,2; %4,6; %4,9 ve %5,7 olarak belirlenmiştir. Artan nanomalzeme konsantrasyonlarında düşük konsantrasyona göre

anamlı bir artış meydana gelmiştir ($p < 0,05$). Fakat her iki hücre hattı için de üretilen malzemenin toksik etkilerinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir.

MTT ve LDH sonuçlarına göre üretilen nanokompozit malzemenin TNMK hücreleri üzerindeki toksik etkileri oldukça düşük olup her iki hücre hattı üzerindeki sitotoksik etki arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). PTT uygulamaları için kullanımı uygun bir malzeme üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir.



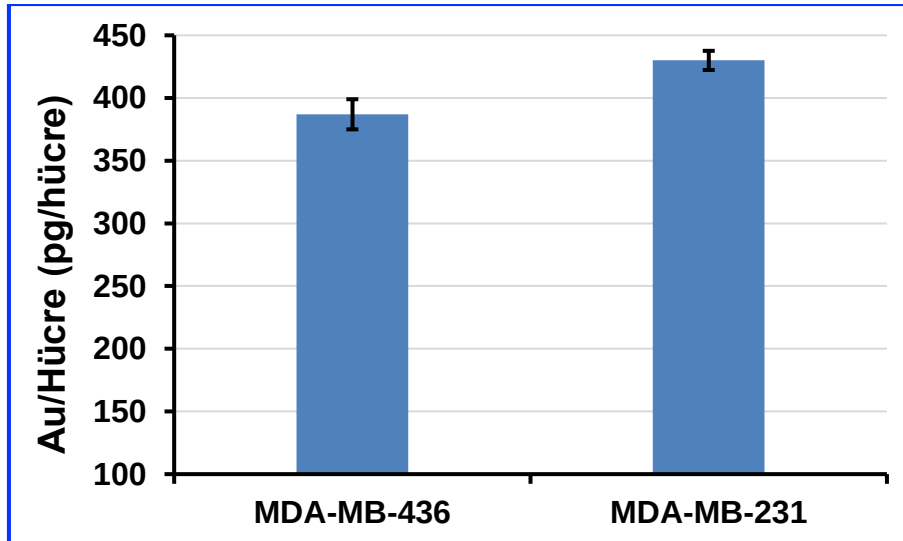
Şekil 4.12. Nanokompozit malzemenin farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-436 hücreleri üzerindeki sitotoksitesisi. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=3)



Şekil 4.13. Nanokompozit malzemenin farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksitesisi. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=3)

4.3.2. Nanokompozit malzemenin hücre içine alımının değerlendirilmesi

MDA-MB-436 ile MDA-MB-231 hücre hatlarıyla 0,8 mg/mL konsantrasyondaki nanokompozit malzemenin 2 saatlik etkileşiminden sonra, malzemenin hücre içine alımının belirlenmesi için ICP-MS yapıldı. Hücre içine alım üretilen malzemelerin büyüklük, şekil, yüzey özellikleri gibi parametrelere bağlıdır [61]. Her hücre hattının sahip olduğu özelliklere göre de hücre içerisine alım mekanizmaları değişmektedir. Çalışmada kullanılan 2 hücre hattı da TNMK hücre ailesinde bulunup; MDA-MB-231 hücrelerinde hücre içine alımın ~ % 10 oranında daha fazla olduğu gözlenmiştir. İki hücre hattı arasında; hücre içine alımdaki bu anlamlı farklılığın, MDA-MB-231 hücrelerinde daha etkili bir PTT uygulamasının gerçekleşmesini sağlayacağı düşünülmüştür ($p < 0,05$).

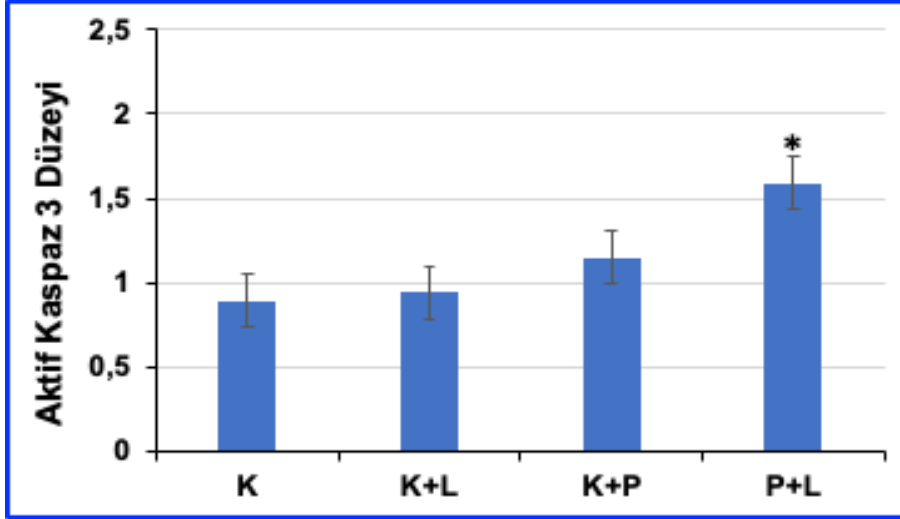


Şekil 4.14. Nanokompozit malzemenin 0,8 mg/mL konsantrasyonunun TNMK hücreleri içerisine alım miktarlarının ICP-MS ile tespiti. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=6)

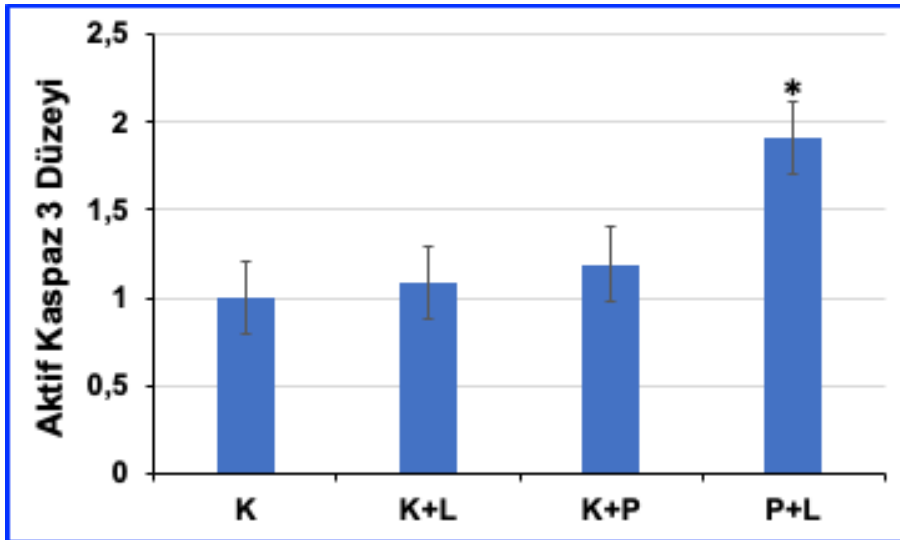
4.3.3. Kaspaz 3/7 aktivitesinin değerlendirilmesi

Üretilen nanokompozit malzemenin 0,8 mg/mL konsantrasyonu MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 hücre hatlarıyla 4 saat etkileştirilmiş, etkileşim sonrası her gruptan protein izole edilmiş ve bu proteinler üzerinden kaspaz 3/7 aktivasyonu değerlendirilmiştir. Bu aktivasyon hücrelerin kaspaz bağımlı ya da bağımsız olarak apoptoza gidişinin değerlendirilmesinde önemli bir göstergedir. MDA-MB-436 hücrelerine uygulanan PTT sonrası P+L grubunda diğer gruplara göre artış olduğu gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde de PTT sonrası P+L grubunda diğer gruplara göre ~2 katlık bir artışın olduğu

olduğu gözlenmiştir. K+L ve K+P gruplarında kaspaz düzeyinde anlamlı bir artışı meydana gelmemiştir. Sonuç olarak uygulanan PTT her iki hücre hattında da kaspaz-3 aktivasyonunda etkili olmuştur ve K grubuna göre P+L gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.15. PTT sonucu MDA-MB-436 hücrelerinde gözlenen aktif kaspaz 3 düzeyleri. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=6)

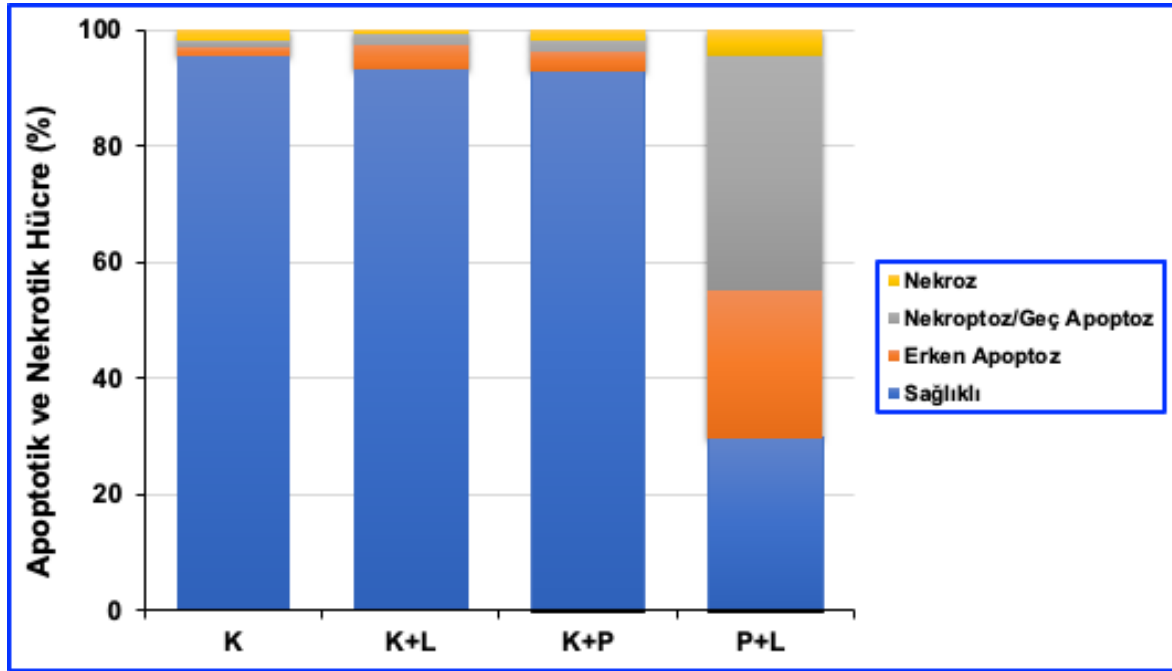


Şekil 4.16. PTT sonucu MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen aktif kaspaz 3 düzeyleri. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=6)

4.3.4. Akım sitometri ile apoptoz/nekrozun değerlendirilmesi

Üretilen nanokompozit malzemeye MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan PTT sonrası, hücrelerin 3 ve 24 saatlik inkübasyonlarından sonra akış sitometri ile apoptoz/nekroz durumlarının değerlendirilmesine geçilmiştir. 3 saatlik inkübasyon

sonrası MDA-MB-436 hücrelerinin PTT uygulaması yapılan P+L grubunda diğer gruplara göre erken apoptoz ve nekroptoz/geç apoptoz gruplarında K grubuna göre anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($p < 0,05$). Meydana gelen artış 24 saatlik inkübasyondan sonra çok daha fazla olup; hücreler büyük oranda erken apoptoza ve nekroptoz/geç apoptoza girerek K grubuna göre anlamlı bir artış göstermişlerdir ($p < 0,05$).



Şekil 4.17. PTT sonunda 3 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi ile değerlendirilmesi

Çizelge 4.1. PTT sonunda 3 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi sonuçlarına göre % olarak değerlendirilmesi

MDA-MB-436 (3 saat) (%)	Sağlıklı	Erken Apoptoz	Nekroptoz/Geç Apoptoz	Nekroz
Kontrol	95,65	1,45	1,175	1,75
Kontrol+Lazer	93,4	3,87	2	0,77
Kontrol+Partikül	92,93	3,5	1,87	1,7
Partikül+Lazer	26,77	25,37	40,27	4,6

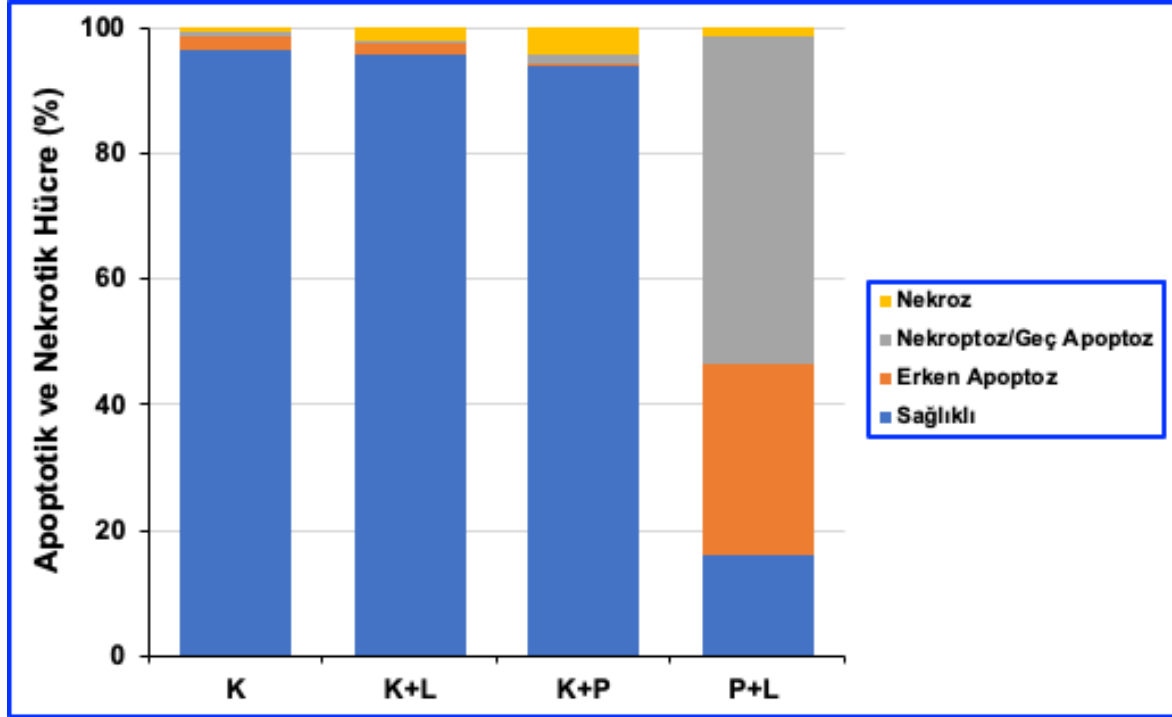


Şekil 4.18. PTT sonunda 24 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi ile değerlendirilmesi

Çizelge 4.2. PTT sonunda 24 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi sonuçlarına göre % olarak değerlendirilmesi

MDA-MB-436 (24 saat) (%)	Sağlıklı	Erken Apoptoz	Nekroptoz/Geç Apoptoz	Nekroz
Kontrol	95,75	1,575	1,525	1,15
Kontrol+Lazer	96,7	1,63	1,3	0,4
Kontrol+Partikül	95	1,4	1,2	2,37
Partikül+Lazer	7,2	12,9	71,3	8,57

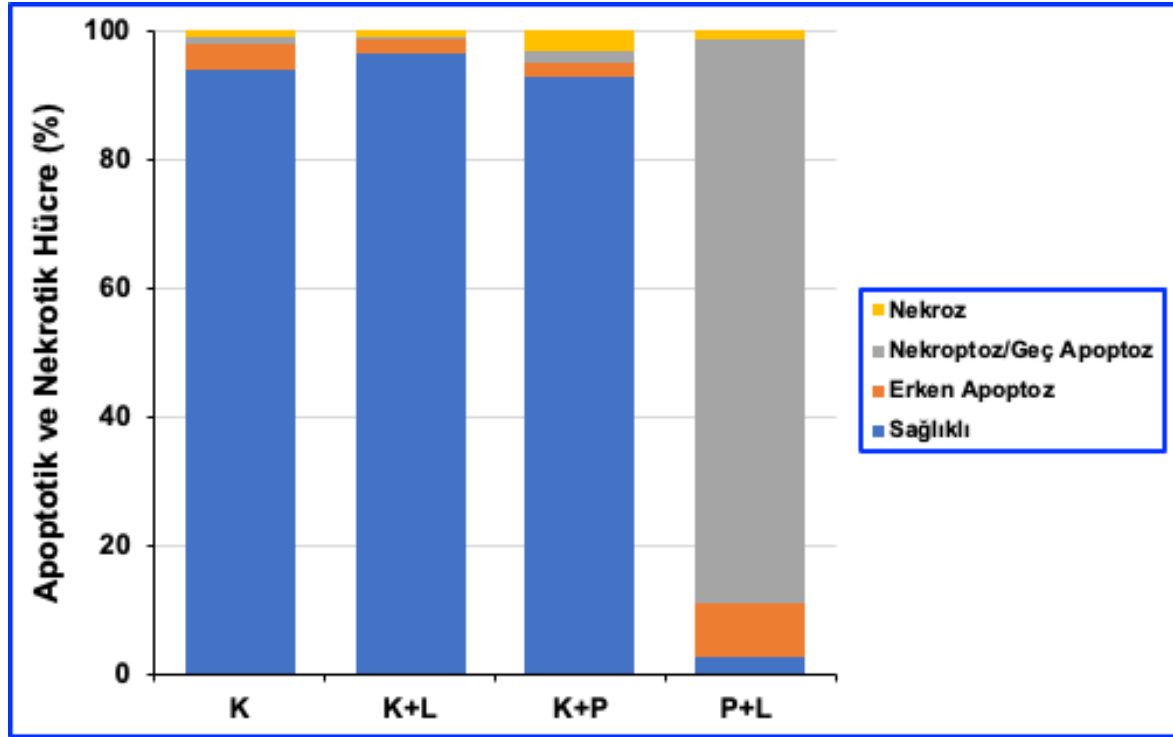
3 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücrelerinin PTT uygulaması yapılan P+L grubunda diğer gruplara göre erken apoptoz ve nekroptoz/geç apoptoz gruplarında K grubuna göre anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($p < 0,05$). Meydana gelen artış 24 saatlik inkübasyondan sonra çok daha fazla olup; hücreler büyük oranda erken apoptoza ve nekroptoz/geç apoptoza girerek K grubuna göre anlamlı bir artış göstermişlerdir ($p < 0,05$). PTT sonrası hücrelerin ölüm sebebinin apoptotik hücre ölümü olduğu açıkça görülmektedir. MDA-MB-231 hücrelerinde 24 saatlik süre sonunda daha fazla apoptoza girme oranının olması hücrenin nanomalzeme alışının fazla olmasıyla da paralellik göstermektedir.



Şekil 4.19. PTT sonunda 3 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi ile değerlendirilmesi

Çizelge 4.3. PTT sonunda 3 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi sonuçlarına göre % olarak değerlendirilmesi

MDA-MB-231 (3 saat) (%)	Sağlıklı	Erken Apoptoz	Nekroptoz/ Geç Apoptoz	Nekroz
Kontrol	96,43	2,067	0,7	0,8
Kontrol+Lazer	95,8	1,67	0,6	1,97
Kontrol+Partikül	93,97	0,4	1,4	4,23
Partikül+Lazer	15,87	30,7	52	1,43



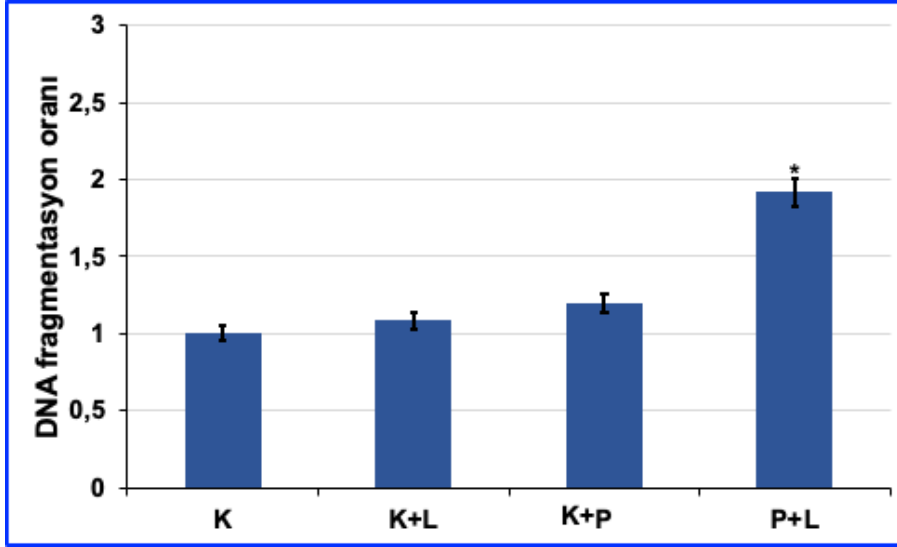
Şekil 4.20. PTT sonunda 24 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi ile değerlendirilmesi

Çizelge 4.4. PTT sonunda 24 saatlik inkübasyon sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde görülen apoptoz ve nekrozun akış sitometrisi sonuçlarına göre % olarak değerlendirilmesi

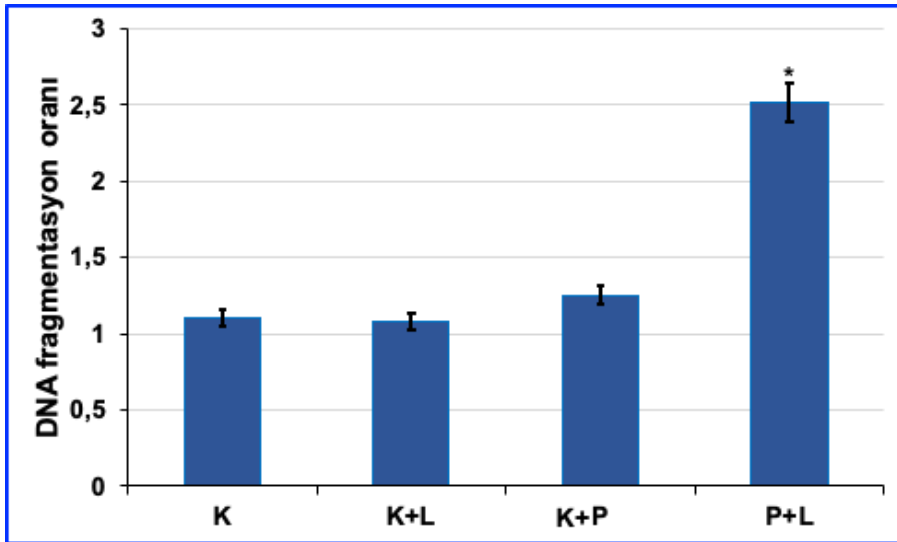
MDA-MB-231 (24 saat) (%)	Sağlıklı	Erken Apoptoz	Nekroptoz/Geç Apoptoz	Nekroz
Kontrol	94,067	3,77	1,23	0,97
Kontrol+Lazer	96,57	2,03	0,6	0,77
Kontrol+Partikül	92,97	2	1,88	3,15
Partikül+Lazer	2,57	8,6	87,5	1,3

4.3.5. DNA fragmentasyon düzeyinin değerlendirilmesi

TNMK hücrelerine uygulanan PTT sonrası, hücrelerde meydana gelen DNA fragmentasyonu oluşan mono ve oligo nükleozomların miktarının bir göstergesidir. Hem MDA-MB-436 hücrelerinde hem de MDA-MB-231 hücrelerinde K, K+L ve K+P gruplarına göre anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). PTT uygulamasının her iki hücre hattında da apoptozu indüklediği görülmekte birlikte, PTT uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde daha etkili olduğu görülmüştür.



Şekil 4.21. PTT sonucu MDA-MB-436 hücrelerinde gözlenen DNA fragmentasyon oranı. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=3)

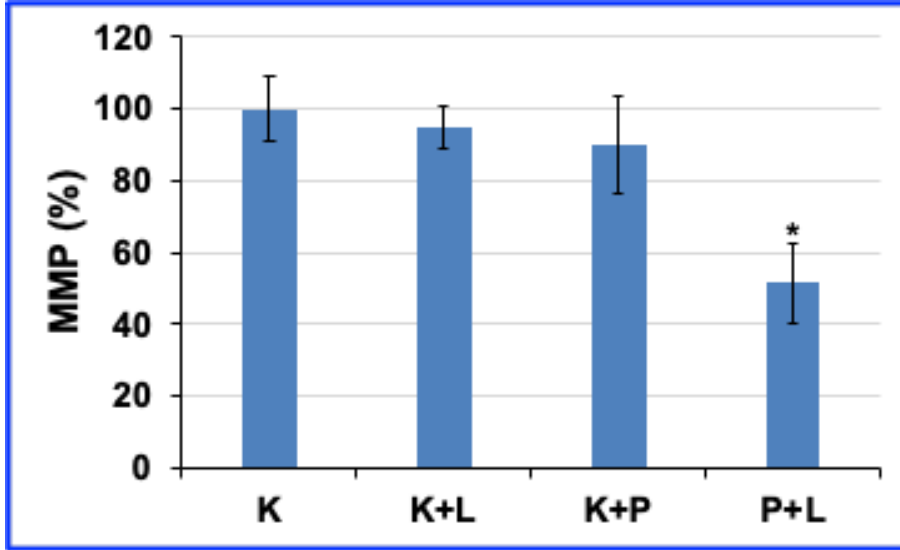


Şekil 4.22. PTT sonucu MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen DNA fragmentasyon oranı. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=3)

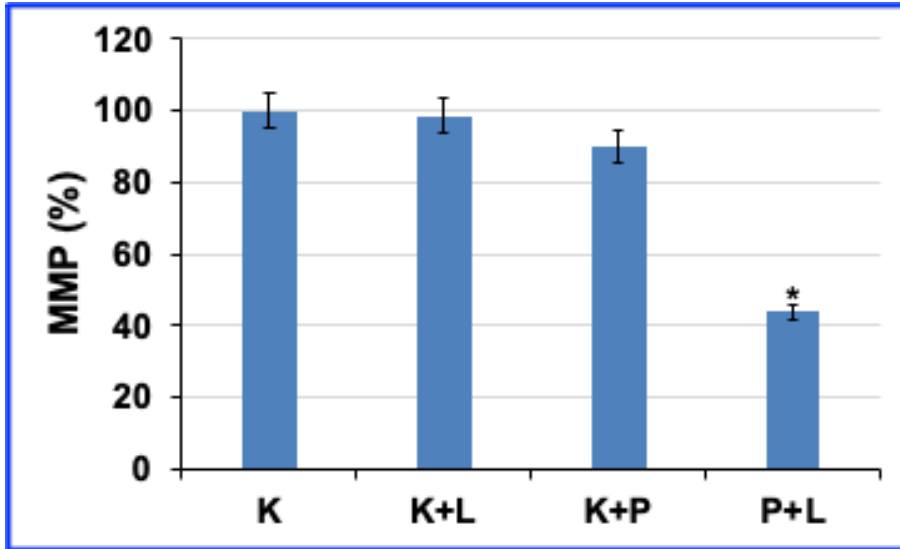
4.3.6. Mitokondriyal hasarın değerlendirilmesi

Apoptozu tetiklemede önemli bir düzenleyici olan mitokondriyal fonksiyon bozukluğunda; mitokondriyal membran potansiyelindeki azalmalar sürecin erken evrelerindeki önemli belirteçlerden biridir [62]. Bu sebeple PTT uygulaması sonrası TNMK hücrelerinin sahip olduğu mitokondriyal membran potansiyelleri ölçülmüştür ve her iki hücre hattında da P+L grubunda MDA-MB-436 hücrelerinde %51,5; MDA-MB-231 hücrelerinde %43,8 hesaplanmıştır; diğer gruplara kıyasla anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir ($p < 0,05$). Bu da uygulanan tedavinin mitokondrilerde fonksiyon bozukluğuna yol açarak; membran

potansiyelinin azalmasına ve böylece hücrelerin apoptoza girmesine sebep olmuştur. Dolayısıyla üretilen nanokompozit malzeme ile başarılı bir PTT uygulamasının gerçekleştirildiği bu yöntemle de kanıtlanmıştır.



Şekil 4.23. PTT sonrası MDA-MB-436 hücrelerinin mitokondriyel membran potansiyeli, Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=3)

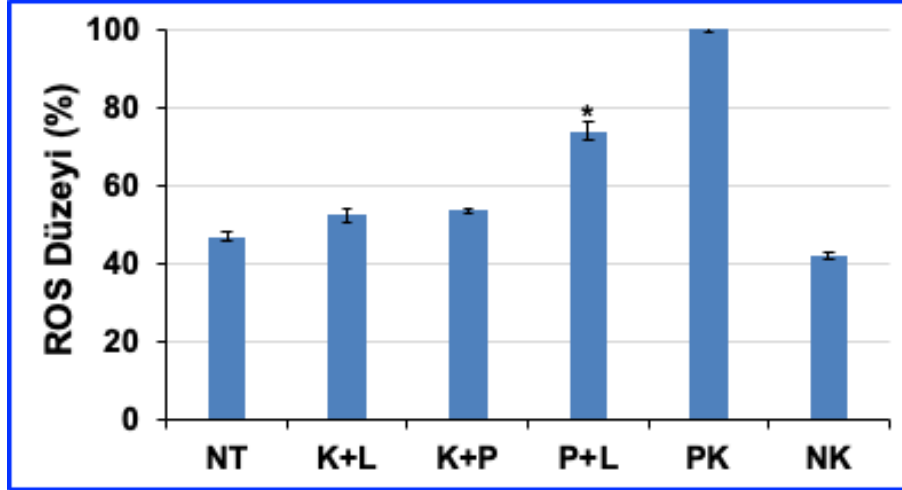


Şekil 4.24. PTT sonrası MDA-MB-231 hücrelerinin mitokondriyel membran potansiyeli, Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=3)

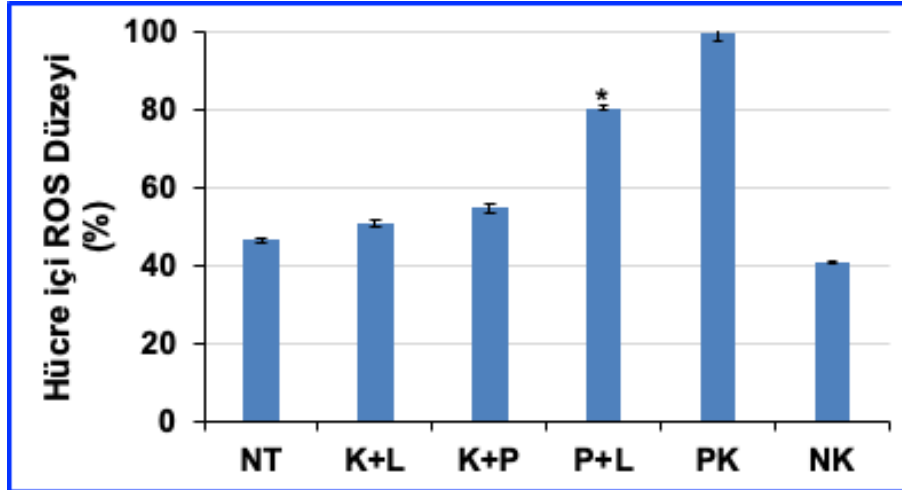
4.3.7. Hücre içi ROS oluşumunun değerlendirilmesi

TNMK hücrelerine uygulanan PTT işlemi sırasında ısı stresine yanıt olarak üretilen ROS'un farklı gruplar arasındaki etkileri araştırılmıştır. NT (non-treatment) grubuna göre kıyaslama yaptığımızda uygulama sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde ROS düzeyi %74'e

çıkmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise ROS düzeyi %80,4'e kadar ulaşmıştır. NT gruba göre P+L grubunda meydana gelen anlamlı artışlar her iki hücre hattı içinde uygulanan PTT'nin; hücrelerde ısı stresini tetikleyerek; ROS oluşumuna yol açtığını göstermektedir ($p < 0,05$).



Şekil 4.25. PTT sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde ROS düzeyinin belirlenmesi. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=3)

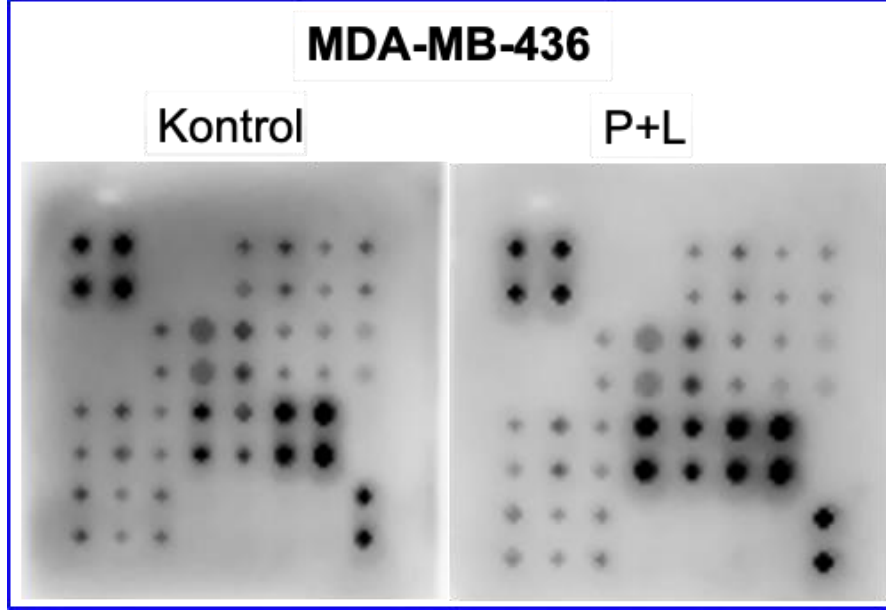


Şekil 4.26. PTT sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde ROS düzeyinin belirlenmesi. Hata çubukları standart sapmaları göstermektedir (n=3)

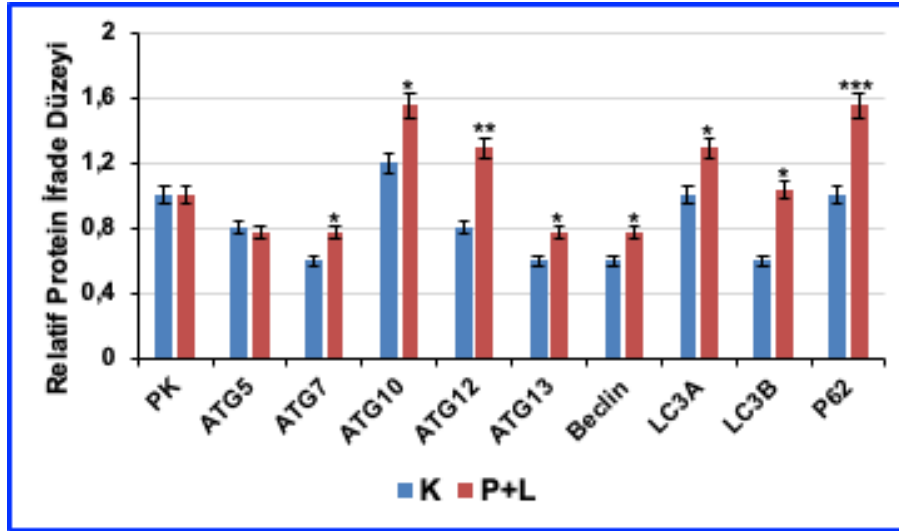
4.3.8. Otofajinin varlığının değerlendirilmesi

PTT uygulaması sonrası TNMK hücreleri üzerinde oluşan ısı stresinin hücrelerin otofajik yolaktaki proteinlerine olan etkisi araştırılmıştır. MDA-MB-436 hücrelerinde ATG7; ATG10; ATG 12; ATG13; Beclin; LC3A; LC3B ve p62 proteinlerinin relatif düzeyleri K grubuna göre P+L gruplarında anlamlı bir artış göstermiştir. MDA-MB-436 hücrelerinde

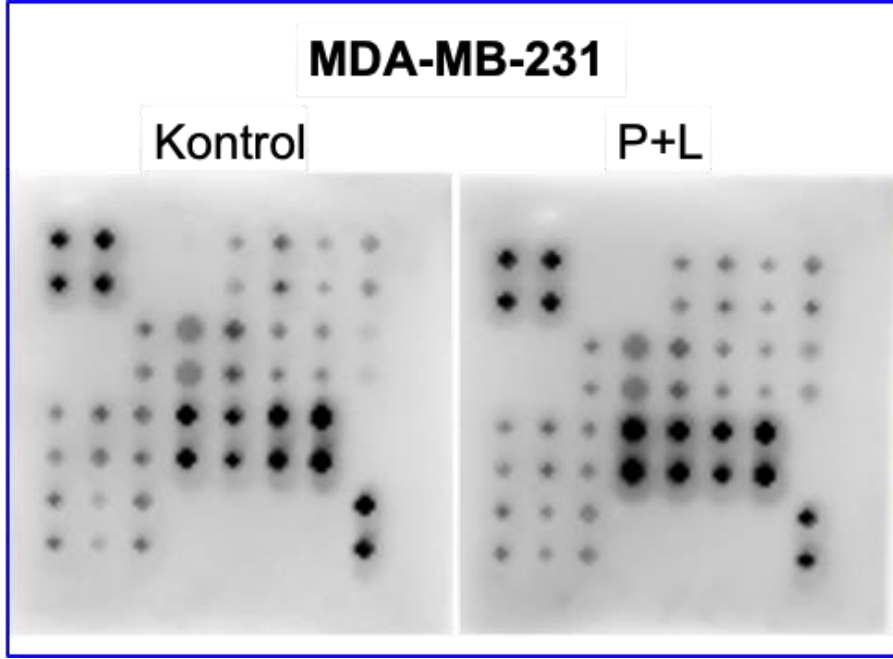
ise ATG5; ATG7; ATG10; ATG 12; ATG13; Beclin; LC3A; LC3B ve p62 proteinlerinin relatif düzeyleri K grubuna göre P+L gruplarında anlamlı bir artış göstermiştir. (n=2, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



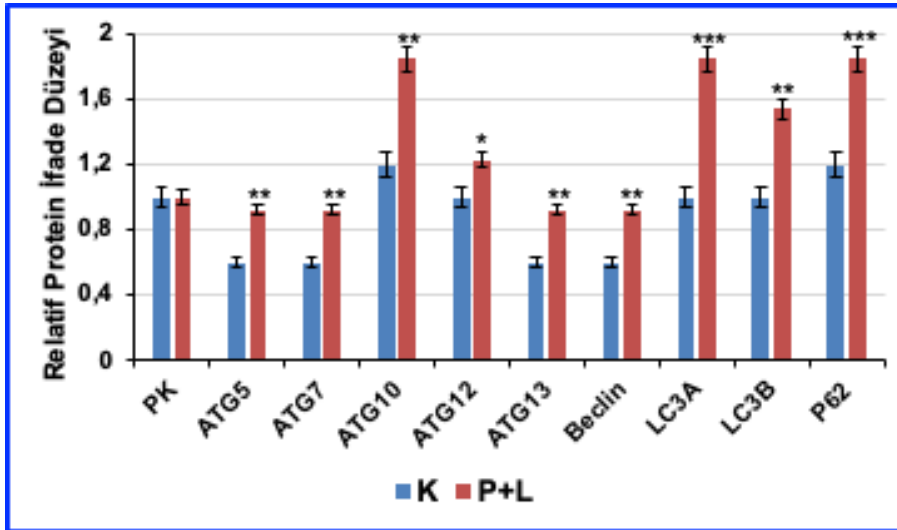
Şekil 4.27. PTT sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde otofajide rol oynayan proteinlerin ifade düzeylerini gösteren protein bantları (n=2)



Şekil 4.28. PTT sonrası MDA-MB-436 hücrelerinde otofajide rol oynayan proteinlerin ifade düzeylerindeki değişimlerin relatif gösterimi (n=2, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)



Şekil 4.29. PTT sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde otofajide rol oynayan proteinlerin ifade düzeylerini gösteren protein bantları (n=2)

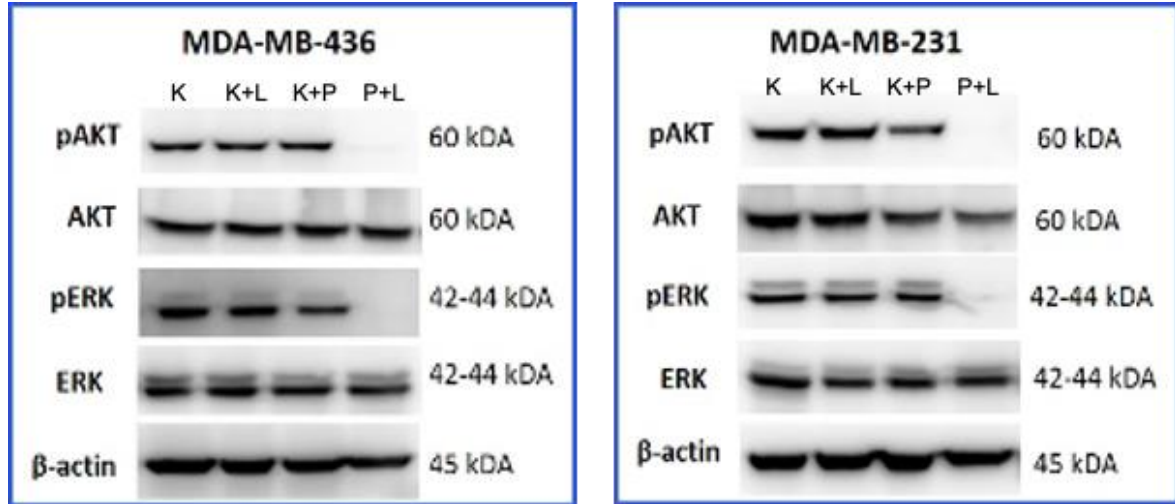


Şekil 4.30. PTT sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde otofajide rol oynayan proteinlerin ifade düzeylerindeki değişimlerin relatif gösterimi (n=2, *p< 0,05, ** p< 0,01,*** p< 0,001)

4.3.9. Western Blot yöntemi ile protein ifade düzeylerinin değerlendirilmesi

PTT sonrası, TNMK hücrelerinde; sağkalım, proliferasyon, farklılaşma, hücre büyümesi, metabolizma ve protein sentezi gibi hayati öneme sahip süreçlerle ilgili protein ifade düzeylerindeki değişimin saptanması için Western Blot yönteminden yararlanıldı. Bu amaçla PTT sonrası pAKT, AKT, pERK ve ERK proteinlerinin ifade düzeyleri belirlenmiştir. TNMK'nde PI3K/AKT ve/veya MAPK/ERK sinyal yollarının aşırı

aktivasyonu proteinlerin sürekli ifade olmasına yol açmaktadır. Uygulanan PTT sonrası her iki TNMK hücre hattında da p-AKT ve p-ERK proteinlerinin ifade artışlarının önüne başarılı şekilde geçilmiştir. Bu da bize üretilen nanokompozit malzeme ile moleküler düzeyde başarılı bir PTT gerçekleştirildiğini göstermiştir.



Şekil 4.31. PTT sonrası MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 hücrelerinde proteinlerin ifade düzeylerini gösteren protein bantları (n=2)

5. TARTIŞMA

Kanser, dünya çapında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm sebebidir. Kanser türlerine baktığımızda ise son yıllarda sıralama değişmeye başlamakla birlikte akciğer kanseri en çok görülen tür olup, bunu özellikle kadınlarda ilk sıraya yerleşmiş olan meme kanseri takip etmektedir. TNMK, östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER) olmak üzere üç reseptörün olmamasıyla karakterize bir tür olup; meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'si bu gruba girmektedir. Oldukça heterojen ve son derece agresif olan bu türün tedavisi de oldukça güç olup, diğer meme kanseri alt türlerine kıyasla ölüm oranları da daha yüksektir. TNMK, hastalığın geleneksel yöntemlerle (örn; mamografi, ultrason, manyetik rezonans görüntüleme gibi) tanınmasının önüne geçen aşırı agresif yapısı nedeniyle, tümör lezyonlarının boyutu ancak 2,5 cm'den büyük olduğunda (hastalığın geç evrelerinde) saptanır hale gelir. Bu da uygulanacak tedavinin başarı şansını oldukça düşürmektedir. Tümörlerin oldukça heterojen yapıya sahip olması, TNMK hücrelerinin dirençli hale gelmesini sağlayarak onları kemoterapiye karşı duyarsız hale getirir. Tanı ve tedavisi büyük zorlukları barındıran bu kanser türünde yeni sistemlerin geliştirilmesi zorunlu bir ihtiyaçtır [1, 2, 17, 18, 63]. Bu anlamda pek çok çalışma devam etmekle birlikte bunlardan biri de PDT ve PTT olmak üzere fototerapilerde kaydedilen gelişmelerdir. Fototerapilerin kullanımı aslında çok eski zamanlara dayanmakla birlikte zamanın teknolojisindeki eksikler tedavilerde devamlılığı getirememiştir. Fakat günümüzde özellikle nanoteknoloji alanındaki ilerlemeler fototerapi alanındaki hızlı gelişmeleri de beraberinde getirmiştir [25].

Nanoteknolojik gelişmeler pek çok yeni malzemenin geniş kullanım alanıyla hayatımıza girmesini sağlamıştır. Bu kullanım alanlarından biri de bir fototerapi çeşidi olan PTT'dir. PTT, PTA'lar aracılığıyla, absorbe edilen ışık enerjisinin ısı enerjisine dönüşümüyle; kanser hücrelerinin termal ablasyonunu sağlayan non-invaziv bir yöntemdir. PTT'nin başarısı kullanılan PTA'nın özelliklerine doğrudan bağlı olup, bunun dışında kullanılan ışık kaynağının özellikleri de başarıyı etkileyen bir değer önemli parametredir [29,30,32,33,64].

Düşük toksisite, yüksek biyouyumluluk, yüksek fototermal dönüşüm verimliliği, kolay işlevselleştirme ve yüzey modifikasyonuna olanak verme, biyouyumlu sıvılarda iyi dağılma özelliklerini barındırması beklenen pek çok farklı PTA (inorganik, organik,

kompozit malzemeler) üretilmiştir [36]. Bu yöntem, çalışması basit, tedavi süresinin kısa, hızlı iyileşme sağlaması gibi avantajlara sahiptir.

Kompozit malzemeler sahip oldukları üstün fiziksel ve kimyasal özellikleri sebebiyle PTT için oldukça tercih edilmektedir. Au ve DA'nın biraraya getirilmesiyle oluşturulan kompozit malzemeler de bunlar arasındadır. Bu kapsamda Khurana ve ark. tarafından pDA kaplı Au nanoblackbodyler (AuNB'ler) üretilmiştir. 124 nm boyuta sahip malzemenin oldukça dallanmış yapıya sahip rastgele yönelmiş Au nanorodlar şeklinde olduğu gösterilmiştir. Bu yapıda malzemeye geniş bir absorpsiyon spektrumu sağlamıştır. AuNB'lerin NIR bölgede güçlü absorpsiyona sahip olması ve biyolojik dokuların NIR absorpsiyonunun düşük olmasından, grup tarafından üretilen malzeme PTT ajanı olarak ideal hale getirmiştir. Tümör bölgesi denemelerinde üretilen malzeme 2,5 dak. gibi kısa bir sürede 50 °C'nin üzerine çıkmış ve bu sıcaklığı tümör bölgesinde 6 dak. korumuştur. Bunun da tümör ablasyonu için yeterli bir süre olduğu rapor edilmiştir [65].

Zhou ve ark. tarafından ilk kez 50 nm'den daha küçük kompakt boyuta sahip hiper dallanma gösteren Au plazmonik blackbody'leri (AuPB) içeren bir blackbody sınıfı geliştirilmiştir. AuPB'ler çekirdek oluşumu gerçekleşmeden ve sürfaktan kullanımı olmaksızın dopamin kullanılarak üretilmiştir. Hiper dallanmaya sahip yapısı sayesinde NIR bölgede absorbansa sahip olup PTT için yapılan karakterizasyonlarla uygun bir malzeme üretildiği gösterilmiştir. Daha sonra PTT özelliklerinin belirlenmesine geçilmiştir. Bu amaçla 1,0 W/cm² güç yoğunluğunda, 5 dakikada 1064 nm (NIR-II) dalga boyunda lazer kullanımıyla sıcaklık 93.3 °C'ye; 808 nm (NIR-I) dalga boyunda lazer kullanımıyla 91,7 °C'ye kadar çıkmıştır. AuPB'lerin sahip oldukları yapı sayesinde 808 nm dalga boyunda lazer kullanımıyla %88,6 ve 1064 nm dalga boyunda lazer kullanımında ise %80,8 gibi oldukça yüksek fototermal dönüşüm verimliliğine sahip olan nanoyapılar üretildiği gösterilmiştir. Malzemenin kararlılığının belirlenmesi için 6 kez lazer aracılı ısıtma ve soğutma döngülerinden geçirilmiş ve yapıda bir değişikliğin meydana gelmediği kanıtlanmıştır. Malzemenin PT özelliklerinin uygunluğunun belirlenmesinden sonra *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara geçilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda dahi malzemenin 4T1 hücreleri üzerinde toksik etkisi bulunmamıştır. *In vivo* koşullarda 1064 nm (NIR-II) dalga boyunda lazer uygulamasıyla tümör boyutlarında 808 nm (NIR-I) dalga boyundaki lazere göre çok daha fazla küçülme olmuştur. Fotoakustik görüntüleme ve PTT için başarılı

şekilde kullanılan AuPB'ler geniş spektrumdaki ışık aracılı farklı uygulamalarda kullanılabilme olanağını da araştırmacılara sunmuştur [53].

Li ve ark. tarafından üretilen PEG ile stabilize edilmiş pDA modifiye çekirdek-kabuk yapısına sahip Au nanoyıldızların (AuNSs@pDA-PEG) üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan TEM ve DLS ile ortalama 114 nm boyuta sahip nanokompozit eldesi gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Alınan Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ve X-Işını Difraksiyonu (XRD) analizleriyle de pDA'nın AuNS'ların etrafına başarılı şekilde kaplandığı gösterilmiştir. pDA kaplanması sonra AuNS'ların etrafındaki plazmon pikinin partiküllerin etfindaki kırılma indeksindeki artış nedeniyle 768 nm'den 806 nm'ye kaydığı UV-VIS—NIR spektrumuyla gösterilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarının tamamlanmasından sonra malzemenin PTT özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla ilk önce farklı konsantrasyonlarda (153; 306; 460; 612 ug/mL) nanomalzeme ile 2,0 W/cm² güç yoğunluğunda, 808 nm dalga boyunda lazer kullanımıyla, 10 dak.'lık süre boyunca oluşan sıcaklık farkı araştırılmıştır. 50 °C'nin üzerine çıkmayı başaran 460 ug/mL konsantrasyon ile çalışmalara devam edilmiştir. Daha sonra farklı güç yoğunluklarında (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 W/cm²), 808 nm dalga boyunda lazer kullanımıyla, 460 ug/mL konsantrasyonda nanokompozit için 10 dak.'lık süre boyunca oluşan sıcaklık farkı araştırılmıştır ve 2.0 W/cm² güç yoğunluğunda uygulanan lazer ile 50 °C'nin üzerine çıkan sıcaklıklar elde edilmiştir. Dolayısıyla çalışmaya 2.0 W/cm² güç yoğunludaki lazer kullanımıyla devam edilmiştir. Malzemenin iyi bir fotostabiliteye sahip olduğu 4 kez tekrarlanan ısıtma-soğutma döngüsüyle gösterilmiştir. En son üretilen malzemenin *in vitro* çalışmalarına geçilmiştir. Bu amaçla ilk önce Hela hücreleri içine alım TEM ile değerlendirilmiştir ve malzemenin çoğunun hücre içinde sitoplazmada bulunduğu gösterilmiştir. Malzemenin toksik etkileri değerlendirilmiş ve 460 ug/ml konsantrasyonda dahi %90'a yakın bir hücre canlılığı elde edilmiştir. Tripan mavisi ile boyama sonucu PTT uygulamasının hücreleri ölüme götürdüğü gözlenmiştir. Akridin turuncusu (AO) ve propidyum iyodür (PI) ile yapılan boyama, akış sitometrisi analizleriyle de PTT uygulamasının hücreleri %84'lere çıkan apoptoza götürdüğü gösterilmiştir. Mitokondriyal membran potansiyel ölçümlerinde potansiyeldeki azalma da mitokondriyal aracılı apoptozun aktivasyonunu göstermiştir. AO kullanılarak akış sitometrisi ile PTT sonrası HeLa hücrelerinin lizozomal membran geçirgenliği değerlendirilmiş ve tedavinin lizozomlarda sızıntıları tetiklediği gösterilmiştir. Otofajik vakuol-spesifik floresan prob kullanımıyla, PTT'nin hücrelerde otofajiyi uyardığı gösterilmiştir. En son apoptozda önemli görevleri olan pro-apoptotik

(Bax) ve anti-apoptotik (Bcl-2) proteinlerin ifade düzeylerine bakılmıştır. Bax protein ifade düzeyi yükselirken, Bcl-2 protein ifade düzeyinin azalmasıyla, PTT uygulamasının HeLa hücrelerinde apoptozu uyardığını protein seviyesinde de göstermişlerdir. Sonuç olarak grup tarafından üretilen malzemenin başarılı bir PTT gerçekleştirdiği kanıtlanmıştır [62].

Literatürde yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak sentez yöntemi ilk kez bu tezle sunulan Au-pDA nanokompozit malzemenin eldesi ve üretilen bu malzeme ile tedavisinde pek çok sıkıntıyı barındıran TNMK'nin PTT ile tedavisine katkıda bulunmayı amaçlayan çalışma bu kapsamda gerçekleştirilmiştir. Etanol, ddH₂O ve amonyağın bulunduğu ortama DA ve Au eklenmiş, 8 saatlik reaksiyon sonunda ortalama 70 nm boyuta sahip hiper dallanma gösteren Au-pDA nanokompozit eldesi gerçekleştirilmiştir. Sentez yöntemi ilk kez bu tez kapsamında literatüre sunulan çalışmada; amonyak katalizör, DA hem bir monomer hem de Au³⁺'nın indirgenmesini sağlayan indirgeyici ajan olarak görev yapmaktadır. Burada geleneksel çekirdek-kabuk oluşumundan farklı olarak indirgenme ve birlikte büyüme prosesi DA üzerinde bulunan katekol ve amin grupları sayesinde gerçekleşmektedir. Malzemenin sıvı ortamdaki dağılımından yararlanılarak Zeta-Sizer ölçümleri yapılmış ve hidrodinamik büyüklükler yüksek oranda 70-80 nm boyutuna sahip nanomalzemenin varlığını göstermiştir. Yapılan çalışmalar hücre içine alım için ortalama 50-90 nm partikül boyutunun ideal olduğunu göstermiştir [61]. Üretilen malzeme yapısı gereği geniş bir absorpsiyon spektrumuna sahiptir. Bu da malzemenin NIR bölgede de güçlü absorpsiyona sahip olmasını, böylece PTT için ideal bir malzeme adayı olmasını sağlamıştır [65].

Sentez ve karakterizasyon çalışmalarıyla en ideal malzeme üretimi sonrası, PT özelliklerin incelenmesine geçilmiştir. Bu amaçla hücreler için kullanılacak nanokompozit dozu ve lazer gücünün belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda (0,1; 0,2; 0,4; 0,6 ve 0,8 mg/mL) ve farklı lazer güç yoğunluğunda (1,5; 2,0; 2,5; 3,0 W/cm²) denemeler yapılmıştır. Malzemenin 5 dak. içerisinde 2 W/ cm² güç yoğunluğunda 0,8 mg/mL konsantrasyon için 55 °C sıcaklığa ulaştığı gözlenmiştir. Kanser hücrelerinde 42°C'de 15-60 dak. veya 50°C üzerindeki sıcaklıklarda 4-6 dakikaya kadar düşen sürelerin hücreyi ölüme götürmede yeterli olduğu gösterilmiştir [66]. Dolayısıyla elde edilen nanokompozit kanser hücrelerini etkin bir şekilde öldürebilecek özelliklere sahiptir. Üretilen malzemenin fotokararlılığı incelendiğinde 10 kez tekrarlanan ısınma-soğuma döngüsü sonrası malzemenin özelliklerinde bir değişiklik meydana gelmemiştir. Dolayısıyla üretilen malzeme

literatürdeki diğer malzemelerle de karşılaştırıldığında yüksek bir fotokararlılığa sahiptir [53, 62]. PT özelliklerin bir diğer önemli ayağı fototermal dönüşüm verimi (η)'dir. Bu kapsamda üretilen malzemenin η değeri %47,7 bulunmuştur. Literatürde Chen ve ark. tarafından 808 nm lazer kullanımıyla Au nanorod'lara ait η değeri; %22; Au nanokafeslere ait η değeri; %63; Au hekzapodlara ait η değeri; %26,6; Au nanospikellere ait η değeri; %50,3 olarak rapor edilmiştir [69]. Zhou ve ark. tarafından 808 nm lazer kullanımıyla AuPB'lere ait η değeri; %88,6 bulunmuştur [53]. Usta ve ark. tarafından 808 nm lazer kullanımıyla Au-pDA(çekirdek)@pDA(kabuk) nanomalzemeye ait η değeri; %55,2 olarak rapor edilmiştir [60]. Dolayısıyla literatürdeki diğer çalışmalarla da karşılaştırıldığında üretilen nanokompozit malzemenin üstün fototermal dönüşüm verimliliğine sahip olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda üretilen malzemenin uygun PT özellikler taşıdığının belirlenmesinden sonra *in vitro* çalışmalara geçilmiştir. İlk önce MTT ve LDH yapılarak MDA-MB-436 ve MDA-MB-231 TNMK hücreleri üzerindeki toksik etkiler değerlendirilmiştir. Bu amaçla ilk önce üretilen nanokompozitin farklı konsantrasyonlarının TNMK hücre hatları üzerindeki canlılığa etkisi araştırılmış ve her iki hücre hattında da malzemenin 4 saatlik uygulaması sonrası 0,8 mg/mL konsantrasyonunda dahi ~ % 90 oranında bir canlılık kaydedilmiştir. Ardından besiyerine sızan LDH miktarının ölçümüne geçilmiştir. Hücre membranında bir bozulma olduğunda sitoplazmadan dışarı sızan bu enzimin ölçümü bize uygulanan maddenin sitotoksitesi hakkında bilgi vermiştir. Her iki hücre hattı için de en yüksek konsantrasyonda dahi %10 sitotoksite değerinin altında kalan oranlar, üretilen malzemeyi PTT için uygun aday yapan göstergelerden biri olmuştur [53,62]. ICP-MS ile nanokompozit malzemenin hücre içine alım çalışmaları yapılmış ve MDA-MB-436 için; 387 pg/hücre (Au/hücre), MDA-MB-231 için; 431 pg/hücre (Au/hücre) olarak bulunmuştur. Hücre içine alımı etkileyen pek çok parametre olmakla birlikte; sonuçlar alımın başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermektedir [61]. Bu çalışmalardan sonra PTT uygulamalarına geçilmiş ve hücrelerin terapiye verdiği yanıt moleküler anlamda değerlendirilmiştir. Uygulanan tedavinin hücreleri öldürüp öldürmediği, eğer hücrelerin ölümüne yol açıyorsa bunda hücre ölüm mekanizmalarından apoptozun mu yoksa nekrozun mu etkin olduğunun gösterilmesi için deneyler yapılmış ve ilgili yolaklardaki değişimler araştırılmıştır. Bu süreci değerlendirebilmek için tez kapsamında mitokondriyal membran potansiyelinin ve kaspaz-3 aktivite düzeyinin belirlenmesi gerçekleştirilmiş daha sonra da akış sitometri ile apoptoz/nekroz durumları saptanmıştır. Ayrıca ROS üretiminin

saptanması, DNA fragmentasyonunun belirlenmesi, otofaji ile ilgili proteinler ile AKT/ERK sinyal yollarındaki proteinlerin ifade düzeylerindeki değişimler araştırılmıştır.

Bir hücre ölüm mekanizması olan apoptoz içsel (mitokondriyal) ve dışsal yolları hedefleyen bileşikler tarafından aktive edilebilir. Dışsal yolak, Fas ve TNF-R gibi hücre yüzeyi ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile ilgilidir. Kemoterapötik ajanlar ve ilaçlar gibi birçok stres yaratan durumun mitokondri bağlantılı sinyal proteinlerinin salınımını tetikleyerek mitokondri aracılı içsel yolağı uyardığıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Apoptozda önemli bir düzenleyici olan mitokondrilerin disfonksiyonu sonucu azalan mitokondriyal membran potansiyeli ile sitokrom c'nin sitozole salınması, apoptozom oluşumu ve kaspaz ailesinin aktivasyonu için esastır. Uygulayıcı (kaspaz-3, -6, -7) ve başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9, -10) olarak 2 gruba ayrılan kaspaz enzimlerinden; içsel ve dışsal apoptotik yolların aktivasyonu sırasıyla kaspaz-8 ve -9 tarafından gerçekleştirilir. Her iki başlatıcı kaspaz da uygulayıcı kaspaz-3 veya -7 aktivasyonuna yol açarak hücre apoptozunu başlatır [67]. TNMK hücrelerine uygulanan PTT'nin hücreleri hangi ölüm yolağına götürdüğünün belirlenmesi için apoptotik yolda önemli bir belirteç olan spesifik sistein proteaz aktivitesine sahip bir proteaz enzim ailesi üyesi olan kaspaz-3 düzeyinde meydana gelen değişimin ölçülmesi ve mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir [68]. Her iki hücre hattında da kontrole göre PTT uygulanan P+L gruplarında kaspaz-3 düzeyinde yaklaşık 2 katlık bir artış gözlemlenmişken, MMP'de yaklaşık 2 katlık bir azalış oluşmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Literatürde PTT için uygulanan nanomalzemelerin mitokondri disfonksiyonuna yol açarak, MMP'de azalmaların görülmesine sebep olduğu ve kaspaz bağımlı yolak üzerinden apoptozu uyardığıyla ilgili pek çok çalışma rapor edilmiştir [67-70]. Sunulan tez kapsamında da kontrole göre P+L gruplarında MMP'de meydana gelen azalma ve kaspaz-3 düzeylerindeki artış ile uygulanan PTT'nin apoptozu uyardığı gösterilmiştir. Daha sonra akış sitometrisi ile TNMK hücrelerindeki apoptoz ve nekroz durumları değerlendirilmiştir. PTT uygulaması sonrası 3 ve 24 saatlik sürelerin sonunda TNMK hücrelerinin büyük oranda apoptozla gittikleri gösterilmiştir. Üretilen malzemenin şekli, malzemenin hücre içerisinde koumlandığı alan, uygulanan lazerin gücü gibi pek çok etkenin hücrenin hangi ölüm yolağını tercih edeceğiyle ilgili farklı çalışmalar bulunmaktadır. Sunulan çalışmadaki sonuçlar literatürde farklı malzemeler ile yapılan ve hücrelerin apoptozla gittiği çalışmalarla

uyumlu olarak bulunmuştur [67, 71, 72]. Apoptoz sürecindeki hücrelerde meydana gelen bir değişimde aktiveleşen kaspaz-3'ün CAD (kaspaz aktive edici DNaz) enzimi aktive etmesi bunun da çekirdekte kromatin yoğunlaşması ve DNA'nın nükleozomal alt birimler halinde fragmente olmasıyla sonuçlanmaktadır [73]. PTT sonrası TNMK hücrelerinde DNA fragmentasyonunun kantitatif değerlendirilmesi gerçekleştirilmiş ve her 2 hücre hattında da K grubuna göre P+L gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlenmiştir. Bu da PTT sonrası hücrelerin apoptotik yolağa girdiğinin bir başka göstergesi olmuştur. Literatüre baktığımızda PTT sonrası DNA fragmentasyonunun kantitatif ve kantitatif olarak değerlendirildiği ve sonuçları yapılan çalışmamıza paralel pek çok çalışma yapılmıştır [74, 75]. Birçok sinyal iletim yolunu düzenleyen kritik sinyal moleküllerinden biri olan ROS'un aşırı üretimi, hücresel sinyal yollarına müdahale ederek, apoptotik ve hücrenin kaderinin belirlenmesinde önemli bir rol oynayan başka bir antiproliferasyon yolu olan otofajik süreçleri aktive edebilir. Ayrıca ROS üretimi, AKT/ERK sinyal yolağının aktivitesini düzenleme ve LC3'ün uyarılması ile LC3-I'ın LC3-II'ye dönüştürülmesi gibi klasik otofaji belirteçleri ile de ilişkilendirilmiştir [67]. Uygulanan PTT'nin ROS üzerine etkileri araştırılmış ve NT gruba göre P+L grubunda meydana gelen istatistiksel olarak anlamlı artışlar her iki hücre hattı içinde uygulanan PTT'nin; hücrelerde ısı stresini tetikleyerek, ROS oluşumuna yol açtığını göstermiştir. Sunulan tez kapsamında son olarak PTT uygulaması sonrası otofajik proteinlerin ifade düzeyleri ve proliferasyon, sağkalım, apoptoz ve otofaji dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel yanıtta önemli rolleri olan AKT/ERK sinyal yolundaki proteinlerin ifade düzeyleri incelenmiştir. Uygulanan PTT sonrası otofajik yoldaki proteinlerin ifade düzeylerinde her iki TNMK hücre hattında da artış olduğu gözlenmiştir. Özellikle otofagozomların moleküler bir belirteci olarak kullanılan LC3 protein düzeylerindeki artışlar PTT'nin otofajiyi indüklediğini göstermiştir. Son olarak AKT/ERK sinyal yollarındaki protein düzeyleri araştırılmış ve PTT uygulamasının AKT ve ERK fosforilasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Normal koşullarda fosforile formda bulunan bu proteinler apoptoz ve otofajiyi baskırlar. Bununla birlikte fosforile edilmiş AKT ve ERK seviyeleri aşağı yönlü düzenlendiğinde, apoptoz ve otofaji tetiklenmektedir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre de PTT uygulaması sonrası bu yolun bloke edilmesi sonucu hücrelerde apoptoz ve otofajinin uyarıldığını göstermiştir. Elde edilen sonuçlar literatürde farklı nanomalzemelerle yapılmış çalışmalarla kıyaslandığında üretilen nanokompozit malzemenin başarılı bir PTT gerçekleştirmek için yeterli koşulları taşıdığı yapılan *in vitro* çalışmalarla da gösterilmiştir [53, 62, 67, 71, 72, 76].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

TNMK, meme kanseri türleri arasında tanı ve tedavide pek çok zorluğu barındıran bir alt türdür. Bu zorluklar araştırmacıları yeni tanı ve tedavi yöntemlerini geliştirmeye itmektedir. Gelişen teknolojik ilerlemeler nanoteknoloji alanına da katkı yapmış bu sayede pek çok yeni malzeme ve uygulama hayatımıza girmiştir. Bunlardan biri olan PTT’de kullanılan malzemeler her geçen gün daha da geliştirilmekte olup, bu malzemelerin klinik uygulamalara da geçirilebilmesi için yoğun bir çaba bulunmaktadır. Tüm ihtiyaçlar göz önünde bulundurularak tez kapsamında literatüre ilk kez sunulan bir yöntemle PTT’de efektif şekilde kullanılabilecek bir nanokompozit üretilmiştir. Bu kapsamda;

- İlk kez bu çalışmada sunulan sentez yöntemiyle 70 nm boyuta sahip hiper dallanma gösteren Au-pDA nanokompozit eldesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan TEM, SEM, SEM-EDX, Zeta Sizer ve UV-vis-NIR karakterizasyon çalışmalarıyla ilk kısmı tamamlanan tezde PTT için uygun bir nanokompozit eldesinin gerçekleştirildiği belirlenmiştir.
- İkinci kısımda üretilen nanokompozit malzemenin PT özellikleri incelenmiş ve en uygun özelliklere sahip malzemeyle *in vitro* çalışmalara geçilmiştir.
- Son kısımda malzemenin toksik özellikleri incelenmiş, hücre içine alım ve PTT uygulaması sonrası hücrede meydana gelen değişimler moleküler anlamda araştırılmıştır.
- Yapılan çalışmalar sonucunda üretilen nanokompozit malzeme ile TNMK hücrelerinde PTT etkin bir şekilde gerçekleştirilmiş ve tedavisi oldukça zor olan bu kanser türü için başarılı bir tedavi prosedürü literatüre sunulmuştur.

Yapılacak yeni çalışmalarda üretilen malzemenin modifiye edilerek hücre içine alım oranlarının artırılması bu amaçla özellikle biyomimetik sistemlerden yararlanılması, uygulanan PTT’nin apoptozda ekstrinsik yolak üzerine etkilerinin araştırılması, farklı hücre ölüm yolları üzerine moleküler anlamda daha fazla araştırmanın yapılması başlıca amaçlarımızdandır. Ayrıca çalışmayı *in vivo* ortama taşıyarak, üreteceğimiz yeni malzemelerle tedavisi oldukça zorlu kanser türlerinde etkin tedaviler gerçekleştirebilmekte diğer hedeflerimiz arasındadır.

KAYNAKLAR

1. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal For Clinicians*, 71(3), 209-249.
2. Wu, D., Si, M., Xue, H. Y., and Wong, H. L. (2017). Nanomedicine applications in the treatment of breast cancer: current state of the art. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 5879.
3. Rocha, M., Chaves, N., and B  o, S. (2017). Nanobiotechnology for breast cancer treatment. *Breast Cancer-From Biology to Medicine*.
4. Israel, B. E. B., Tilghman, S. L., Parker-Lemieux, K., and Payton-Stewart, F. (2018). Phytochemicals: Current strategies for treating breast cancer. *Oncology Letters*, 15(5), 7471-7478.
5. Wan, G., Chen, B., Li, L., Wang, D., Shi, S., Zhang, T., and Wang, Y. (2018). Nanoscaled red blood cells facilitate breast cancer treatment by combining photothermal/photodynamic therapy and chemotherapy. *Biomaterials*, 155, 25-40.
6. Liu, Y., Bhattarai, P., Dai, Z., and Chen, X. (2019). Photothermal therapy and photoacoustic imaging via nanotheranostics in fighting cancer. *Chemical Society Reviews*, 48(7), 2053-2108.
7. Zou, L., Wang, H., He, B., Zeng, L., Tan, T., Cao, H., and Li, Y. (2016). Current approaches of photothermal therapy in treating cancer metastasis with nanotherapeutics. *Theranostics*, 6(6), 762.
8. Pierini, F., Nakielski, P., Urbanek, O., Paw  owska, S., Lanzi, M., De Sio, L., and Kowalewski, T. A. (2018). Polymer-based nanomaterials for photothermal therapy: from light-responsive to multifunctional nanoplatforms for synergistically combined technologies. *Biomacromolecules*, 19(11), 4147-4167.
9. Chen, Y. W., Su, Y. L., Hu, S. H., and Chen, S. Y. (2016). Functionalized graphene nanocomposites for enhancing photothermal therapy in tumor treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 105, 190-204.
10. Hu, J. J., Cheng, Y. J., and Zhang, X. Z. (2018). Recent advances in nanomaterials for enhanced photothermal therapy of tumors. *Nanoscale*, 10(48), 22657-22672.
11. Ward, Z. J., Scott, A. M., Hricak, H., and Atun, R. (2021). Global costs, health benefits, and economic benefits of scaling up treatment and imaging modalities for survival of 11 cancers: a simulation-based analysis. *The Lancet Oncology*, 22(3), 341-350.
12. Kashyap, A. K., and Dubey, S. K. (2022). Molecular mechanisms in cancer development. In *Understanding Cancer* (pp. 79-90). *Academic Press*.
13. Carbone, A. (2020). Cancer classification at the crossroads. *Cancers*, 12(4), 980.

14. Geoffrey M. Cooper, and Robert E. Hausman. (2018). *The cell: a molecular approach*. Oxford University Press.
15. Dai, X., Cheng, H., Bai, Z., and Li, J. (2017). Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16), 3131.
16. He, L., Lv, Y., Song, Y., and Zhang, B. (2019). The prognosis comparison of different molecular subtypes of breast tumors after radiotherapy and the intrinsic reasons for their distinct radiosensitivity. *Cancer Management and Research*, 11, 5765.
17. Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., and Tsang, J. F. (2019). Cardoso. Breast cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 5, 66.
18. Liu, C. Y., Chu, P. Y., Huang, C. T., Chen, J. L., Yang, H. P., Wang, W. L., and Tseng, L. M. (2019). Varlitinib downregulates HER/ERK signaling and induces apoptosis in triple negative breast cancer cells. *Cancers*, 11(1), 105.
19. Baguley, B. C., and Leung, E. (2011). Heterogeneity of phenotype in breast cancer cell lines. Breast Cancer-Carcinogenesis, *Cell Growth and Signalling Pathways*, 245-256.
20. Cao, Z., Liao, Q., Su, M., Huang, K., Jin, J., and Cao, D. (2019). AKT and ERK dual inhibitors: the way forward? *Cancer Letters*, 459, 30-40.
21. Lu, Y., Liu, B., Liu, Y., Yu, X., and Cheng, G. (2020). Dual effects of active ERK in cancer: A potential target for enhancing radiosensitivity. *Oncology Letters*, 20(2), 993-1000.
22. Tuncer, Z., and Kozacı, L. D. Büyüme faktörleri, reseptörleri ve sinyal iletim yolları. *KTO Karatay Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(2), 91-107.
23. Bartholomeusz, C., Gonzalez-Angulo, A. M., Liu, P., Hayashi, N., Lluch, A., Ferrer-Lozano, J., and Hortobágyi, G. N. (2012). High ERK protein expression levels correlate with shorter survival in triple-negative breast cancer patients. *The Oncologist*, 17(6), 766-774.
24. Deng, X., Shao, Z., and Zhao, Y. (2021). Solutions to the drawbacks of photothermal and photodynamic cancer therapy. *Advanced Science*, 8(3), 2002504.
25. Hannon, G., Tansi, F. L., Hilger, I., and Prina-Mello, A. (2021). The Effects of Localized Heat on the Hallmarks of Cancer. *Advanced Therapeutics*, 4(7), 2000267.
26. Juarranz, Á., Jaén, P., Sanz-Rodríguez, F., Cuevas, J., and González, S. (2008). Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology*, 10(3), 148-154.
27. Oh, J., Yoon, H., and Park, J. H. (2013). Nanoparticle platforms for combined photothermal and photodynamic therapy. *Biomedical Engineering Letters*, 3(2), 67-73.

28. Pinto, A., and Pocard, M. (2018). Photodynamic therapy and photothermal therapy for the treatment of peritoneal metastasis: a systematic review. *Pleura and Peritoneum*, 3(4).
29. Cao, Y., Ren, Q., Hao, R., and Sun, Z. (2022). Innovative strategies to boost photothermal therapy at mild temperature mediated by functional nanomaterials. *Materials and Design*, 110391.
30. Han, H. S., and Choi, K. Y. (2021). Advances in nanomaterial-mediated photothermal cancer therapies: toward clinical applications. *Biomedicines*, 9(3), 305.
31. O'Connor, B., and Secades, C. (2013). *Review of the use of remotely-sensed data for monitoring biodiversity change and tracking progress towards the Aichi Biodiversity Targets*.
32. Chen, J., Ning, C., Zhou, Z., Yu, P., Zhu, Y., Tan, G., and Mao, C. (2019). Nanomaterials as photothermal therapeutic agents. *Progress in Materials Science*, 99, 1-26.
33. Kumari, S., Sharma, N., and Sahi, S. V. (2021). Advances in cancer therapeutics: Conventional thermal therapy to nanotechnology-based photothermal therapy. *Pharmaceutics*, 13(8), 1174.
34. Li, X., Lovell, J. F., Yoon, J., and Chen, X. (2020). Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(11), 657-674.
35. Lan, G., Ni, K., and Lin, W. (2019). Nanoscale metal–organic frameworks for phototherapy of cancer. *Coordination Chemistry Reviews*, 379, 65-81.
36. Jaque, D., Maestro, L. M., del Rosal, B., Haro-Gonzalez, P., Benayas, A., Plaza, J. L., and Solé, J. G. (2014). Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale*, 6(16), 9494-9530.
37. Shi, X., Tian, Y., Liu, Y., Xiong, Z., Zhai, S., Chu, S., and Gao, F. (2022). Research Progress of Photothermal Nanomaterials in Multimodal Tumor Therapy. *Frontiers in Oncology*, 12.
38. Alamdari, S. G., Amini, M., Jalilzadeh, N., Baradaran, B., Mohammadzadeh, R., Mokhtarzadeh, A., and Oroojalian, F. (2022). Recent advances in nanoparticle-based photothermal therapy for breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 349, 269-303.
39. Chen, G., Qian, Y., Zhang, H., Ullah, A., He, X., Zhou, Z., and Shen, J. (2021). Advances in cancer theranostics using organic-inorganic hybrid nanotechnology. *Applied Materials Today*, 23, 101003.
40. Rajana, N., Mounika, A., Chary, P. S., Bhavana, V., Urati, A., Khatri, D., and Mehra, N. K. (2022). Multifunctional hybrid nanoparticles in diagnosis and therapy of breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 352, 1024-1047.

41. Wei, W., Zhang, X., Zhang, S., Wei, G., and Su, Z. (2019). Biomedical and bioactive engineered nanomaterials for targeted tumor photothermal therapy: a review. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109891.
42. Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., and West, J. L. (2003). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13549-13554.
43. O'Neal, D. P., Hirsch, L. R., Halas, N. J., Payne, J. D., and West, J. L. (2004). Photothermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Letters*, 209(2), 171-176.
44. Doughty, A. C., Hoover, A. R., Layton, E., Murray, C. K., Howard, E. W., and Chen, W. R. (2019). Nanomaterial Applications in Photothermal Therapy for Cancer. *Materials*, 12(5), 779.
45. Ma, H., Li, S., Zhang, H., Wei, Y., and Jiang, L. (2019). Fabrication of polydopamine-based layer-by-layer nanocomposites for combined pH-sensitive chemotherapy and photothermal therapy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 561, 332-340.
46. Wang, Z., Duan, Y., and Duan, Y. (2018). Application of polydopamine in tumor targeted drug delivery system and its drug release behavior. *Journal of Controlled Release*, 290, 56-74.
47. Liu, X., Cao, J., Li, H., Li, J., Jin, Q., Ren, K., and Ji, J. (2013). Mussel-inspired polydopamine: a biocompatible and ultrastable coating for nanoparticles in vivo. *ACS Nano*, 7(10), 9384-9395.
48. Orishchin, N., Crane, C. C., Brownell, M., Wang, T., Jenkins, S., Zou, M., and Chen, J. (2017). Rapid deposition of uniform polydopamine coatings on nanoparticle surfaces with controllable thickness. *Langmuir*, 33(24), 6046-6053.
49. Farokhi, M., Mottaghitalab, F., Saeb, M. R., and Thomas, S. (2019). Functionalized theranostic nanocarriers with bio-inspired polydopamine for tumor imaging and chemo-photothermal therapy. *Journal of Controlled Release*, 309, 203-219.
50. Black, K. C., Yi, J., Rivera, J. G., Zelasko-Leon, D. C., and Messersmith, P. B. (2013). Polydopamine-enabled surface functionalization of gold nanorods for cancer cell-targeted imaging and photothermal therapy. *Nanomedicine*, 8(1), 17-28.
51. Du, B., Gu, X., Zhao, W., Liu, Z., Li, D., Wang, E., and Wang, J. (2016). Hybrid of gold nanostar and indocyanine green for targeted imaging-guided diagnosis and phototherapy using low-density laser irradiation. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(35), 5842-5849.
52. Li, D., Zhang, Y., Wen, S., Song, Y., Tang, Y., Zhu, X., and Shi, X. (2016). Construction of polydopamine-coated gold nanostars for CT imaging and enhanced photothermal therapy of tumors: an innovative theranostic strategy. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(23), 4216-4226.

53. Zhou, J., Jiang, Y., Hou, S., Upputuri, P. K., Wu, D., Li, J., and Duan, H. (2018). Compact plasmonic blackbody for cancer theranosis in the near-infrared II window. *Acs Nano*, 12(3), 2643-2651.
54. Wang, X., Hua, P., He, C., and Chen, M. (2022). Non-apoptotic cell death-based cancer therapy: Molecular mechanism, pharmacological modulators, and nanomedicine. *Acta Pharmaceutica Sinica B*.
55. Melamed, J. R., Edelstein, R. S., and Day, E. S. (2015). Elucidating the fundamental mechanisms of cell death triggered by photothermal therapy. *ACS Nano*, 9(1), 6-11.
56. Kumar, A. V. P., Dubey, S. K., Tiwari, S., Puri, A., Hejmady, S., Gorain, B., and Kesharwani, P. (2021). Recent advances in nanoparticles mediated photothermal therapy induced tumor regression. *International Journal of Pharmaceutics*, 606, 120848.
57. Gökhan, A., Kılıç, K. D., Gülle, K., Uyanıkgil, Y., and Çavuşoğlu, T. (2020). Apoptotik yollar ve hedefe yönelik tedaviler. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 27(4).
58. Kadkhoda, J., Tarighatnia, A., Tohidkia, M. R., Nader, N. D., and Aghanejad, A. (2022). Photothermal therapy-mediated autophagy in breast cancer treatment: Progress and trends. *Life Sciences*, 120499.
59. Negi, S., Chaudhuri, A., Kumar, D. N., Dehari, D., Singh, S., and Agrawal, A. K. (2022). Nanotherapeutics in autophagy: A paradigm shift in cancer treatment. *Drug Delivery and Translational Research*, 1-24.
60. Usta, D. D., Celebi, N., Soysal, F., Saglam, A. S. Y., Yildiz, N., and Salimi, K. (2021). Bio-inspired NIR responsive Au-pDA@ pDA sandwich nanostructures with excellent photo-thermal performance and stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 611, 125758.
61. Foroozandeh, P., and Aziz, A. A. (2018). Insight into cellular uptake and intracellular trafficking of nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 13, 1-12.
62. Li, Y., Wang, X., Yang, D., Hu, P., Gao, L., Chen, D., and Li, G. (2019). Polydopamine-coated gold nanostars for near-infrared cancer photothermal therapy by multiple pathways. *Journal of Materials Science*, 54(18), 12036-12048.
63. Pawar, A., and Prabhu, P. (2019). Nanosoldiers: A promising strategy to combat triple negative breast cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 110, 319-341.
64. Zhao, L., Zhang, X., Wang, X., Guan, X., Zhang, W., and Ma, J. (2021). Recent advances in selective photothermal therapy of tumor. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1-15.
65. Khurana, D., Shaw, A. K., and Soni, S. (2021). Polydopamine coated gold nano blackbodies for tumor-selective spatial thermal damage during plasmonic photothermal cancer therapy. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 21(4), 482-489.

66. Ke, K., Lin, L., Liang, H., Chen, X., Han, C., Li, J., and Yang, H. H. (2015). Polypyrrole nanoprobe with low non-specific protein adsorption for intracellular mRNA detection and photothermal therapy. *Chemical Communications*, 51(31), 6800-6803.
67. Zhao, X., Qi, T., Kong, C., Hao, M., Wang, Y., Li, J., and Jiang, J. (2018). Photothermal exposure of polydopamine-coated branched Au–Ag nanoparticles induces cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy in human bladder cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 6413.
68. Badroon, N. A., Abdul Majid, N., and Alshawsh, M. A. (2020). Antiproliferative and apoptotic effects of cardamomin against hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Nutrients*, 12(6), 1757.
69. Mei, C., Wang, N., Zhu, X., Wong, K. H., and Chen, T. (2018). Photothermal-controlled nanotubes with surface charge flipping ability for precise synergistic therapy of triple-negative breast cancer. *Advanced Functional Materials*, 28(45), 1805225.
70. Cheng, L., Wang, C., Feng, L., Yang, K., and Liu, Z. (2014). Functional nanomaterials for phototherapies of cancer. *Chemical Reviews*, 114(21), 10869-10939.
71. Pattani, V. P., Shah, J., Atalis, A., Sharma, A., and Tunnell, J. W. (2015). Role of apoptosis and necrosis in cell death induced by nanoparticle-mediated photothermal therapy. *Journal of Nanoparticle Research*, 17, 1-11.
72. Marasini, R., and Aryal, S. (2022). Indocyanine-type Infrared-820 Encapsulated Polymeric Nanoparticle-Assisted Photothermal Therapy of Cancer. *ACS Omega*, 7(14), 12056-12065.
73. Coşkun, G., and Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158.
74. Xing, Y., Cai, Z., Xu, M., Ju, W., Luo, X., Hu, Y., and Zhu, J. J. (2019). Raman observation of a molecular signaling pathway of apoptotic cells induced by photothermal therapy. *Chemical Science*, 10(47), 10900-10910.
75. Wang, J., Zhao, H., Song, W., Gu, M., Liu, Y., Liu, B., and Zhan, H. (2022). Gold nanoparticle-decorated drug nanocrystals for enhancing anticancer efficacy and reversing drug resistance through chemo-/photothermal therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 19(7), 2518-2534.
76. Hao, M., Kong, C., Jiang, C., Hou, R., Zhao, X., Li, J., and Jiang, J. (2019). Polydopamine-coated Au-Ag nanoparticle-guided photothermal colorectal cancer therapy through multiple cell death pathways. *Acta Biomaterialia*, 83, 414-424.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : USTA SALİMİ, Duygu Deniz
 Uyruğu : T.C.
 Doğum Tarihi ve Yeri :
 Medeni hali :
 Cep Telefonu :
 e-mail :

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	2016
Yüksek Lisans	Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyomühendislik Anabilim Dalı	2014
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi/ Biyoloji Bölümü	2011

İş Deneyimi

Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2013-devam ediyor	Gazi Üniveristesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Usta, D. D., Celebi, N., Soysal, F., Sağlam, A. S. Y., Yıldız, N., and Salimi, K. (2021). Bio-inspired NIR responsive Au-pDA@ pDA sandwich nanostructures with excellent photo-thermal performance and stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 611, 125758.
2. Salimi, K., Kip, Ç., Çelikkıçak, Ö., Usta, D. D., Pınar, A., Salih, B., and Tuncel, A. (2019). Ti (IV) attached-phosphonic acid functionalized capillary monolith as a

- stationary phase for in-syringe-type fast and robust enrichment of phosphopeptides. *Biomedical Chromatography*, 33(6), e4488.
3. Kip, Ç., Gülüşür, H., Çelik, E., Usta, D. D., and Tuncel, A. (2019). Isolation of RNA and beta-NAD by phenylboronic acid functionalized, monodisperse-porous silica microspheres as sorbent in batch and microfluidic boronate affinity systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 333-342.
 4. Salimi, K., Usta, D. D., Koçer, İ., Celik, E., and Tuncel, A. (2018). Protein A and protein A/G coupled magnetic SiO₂ microspheres for affinity purification of immunoglobulin G. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 178-185.
 5. SalmanOgli, A., Salimi, K., Farhadnia, F., and Usta, D. D. (2017). Sensitive plasmonic-photonics nanosensor as a morphologic mask. *Optical Materials*, 70, 73-82.
 6. Salimi, K., Usta, D. D., Çelikkıçak, Ö., Pınar, A., Salih, B., and Tuncel, A. (2017). Highly selective enrichment of phosphopeptides by titanium (IV) attached monodisperse-porous poly (vinylphosphonic acid-co-ethylene dimethacrylate) microspheres. *Journal of Chromatography A*, 1496, 9-19.
 7. Salimi, K., Usta, D. D., Çelikkıçak, Ö., Pınar, A., Salih, B., and Tuncel, A. (2017). Ti (IV) carrying polydopamine-coated, monodisperse-porous SiO₂ microspheres with stable magnetic properties for highly selective enrichment of phosphopeptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 153, 280-290.
 8. Günel, G., Kip, Ç., Öğüt, S. E., Usta, D. D., Şenlik, E., Kibar, G., and Tuncel, A. (2017). Human genomic DNA isolation from whole blood using a simple microfluidic system with silica-and polymer-based stationary phases. *Materials Science and Engineering, C*, 74, 10-20.
 9. Salimi, K., Usta, D. D., Kocer, I., Celik, E., and Tuncel, A. (2017). Highly selective magnetic affinity purification of histidine-tagged proteins by Ni²⁺ carrying monodisperse composite microspheres. *RSC advances*, 7(14), 8718-8726.

Ulusal/Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan

Bildiriler

1. D.D. Usta, C. Kip, K. Salimi, O. Celikbicak, A. Pınar, B. Salih, A. Tuncel. Phosphopeptide enrichment from human-serum via immobilized metal affinity chromatography using phosphonic acid functionalized capillary monolith as a stationary phase in a microfluidic system. *45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2017)*, June 18-22, 2017 at Prague, Czech Republic.
2. M. Durmaz, D. D. Usta, K. Salimi, A. Kuban, A. Tuncel. Monodisperse-porous titania microspheres with biomodal pore-size distribution as a new stationary phase for DNA microextraction. *45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2017)*, June 18-22, 2017 at Prague, Czech Republic.

Sözlü Bildiriler

1. D. D. Usta, F. Soysal, N. Çelebi, K. Salimi, N. Yıldız. Photothermal performance of Bio-inspired Au@PDOP Nanocomposites. (2019), *5th International Conference on Engineering Sciences: Proceedings of the ICES 2019*, Sep.2019, Ankara Yıldırım Beyazıt University, Ankara, Turkey, ISBN: 978-1-68418-668-6.
2. D. D. Usta, F. Soysal, N. Çelebi, K. Salimi, N. Yıldız. Fabrication of Plasmonic Core-shell Nanostructures for Potential Photothermal Cancer Therapy Applications. (2019), *5th International Conference on Engineering Sciences: Proceedings of the ICES 2019*, Sep.2019, Ankara Yıldırım Beyazıt University, Ankara, Turkey, ISBN: 978-1-68418-668-6.

Ulusal/Uluslararası Kitaplarda Bölümler

1. K. Salimi, D. D. Usta, A. Tuncel*. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Surface Functionalization, and Applications. (2018), Publisher: Hacettepe University, ISBN: 978-975- 491-485-6.

Ulusal/Uluslararası Projeler

1. “Kompozit Nanoparçacıklar Aracılığıyla Gerçekleştirilen Fototermal Terapinin Meme Kanseri Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP), Doktora Tez Projesi, 2022, Proje No: 01/2019-48, Araştırmacı, Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM, Tamamlandı.
2. “Metal-Organik İskeletlerin Fototermal Özelliklerinin Belirlenmesi ve Hücre Ölümü Üzerine Olan Etkilerinin Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Araştırılması”, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP), Bağımsız Bilimsel Araştırma Projesi, 2023, Proje No: 01/2020-35, Araştırmacı, Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM, Tamamlandı.
3. “Fonksiyonel Gruplu Formda Manyetik Silika Mikrokürelerin Sentezi ve Biyoteknolojik Uygulama Performanslarının Belirlenmesi ”, Ulusal Yeni Fikirler ve Ürünler Araştırma Destek Programı (TÜBİTAK), 1005 Projesi (No: 115M615), Ankara, Türkiye, Bursiyer, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. S. Ali Tuncel, Tamamlandı.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..