ÖZGÜN ARAŞTIRMA ORIGINAL RESEARCH

Med J SDU / SDÜ Tıp Fak Derg ▶ 2021:28(3):455-464 doi: 10.17343/sdutfd.875236

VİTİS VİNİFERA ÇEKİRDEK ÖZÜTÜ KULLANILARAK ALTIN NANOPARTİKÜLLERİN YEŞİL SENTEZİ VE KOLON KANSERİ (HT-29) HÜCRELERİNDE ANTİ-KANSER ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

GREEN SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES USING *VITIS VINIFERA* SEED EXTRACT AND EVALUATION OF ANTI-CANCER PROPERTIES IN COLON CANCER (HT-29) CELLS

Selim GENÇ[1], Suray PEHLİVANOĞLU[2], Çiğdem AYDIN ACAR[1,3], Şükriye YEŞİLOT[1,3]

[1] Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık ve Biyomedikal Bilimler Ana Bilim Dalı, BURDUR
[2] Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, KONYA
[3] Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Bucak Sağlık Yüksekokulu, BURDUR

Cite this article as: Genç S, Pehlivanoğlu S, Aydın Acar Ç, Yeşilot Ş. Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Vitis vinifera* Seed Extract and Evaluation of Anti-cancer Properties in Colon Cancer (HT-29) Cells. Med J SDU 2021; 28(3): 455-464.

Öz

Amaç

Son yıllarda metalik nanopartiküller antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser etkinlikleri ile nanotıp alanında oldukça dikkat çekmektedir. Özellikle, kanser tedavisinde farmakolojik etkinliği bilinen tıbbi bitkilerden yeşil sentez metodu ile üretilen metal nanopartiküller araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. Altın nanopartiküller; kendilerine özgü kimyasal, fiziksel ve nontoksik özellikleri ile ön plana çıkan metal nanopartiküllerden biridir. Çalışmamızda, üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği sulu ekstraktı kullanılarak yeşil sentezi gerçekleştirilen altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) tek başına ve kemoterapötik bir ajan olan Gemsitabin ile kombine kullanımının HT-29 kolon kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Altın nanopartiküllerin yeşil sentezi, *Vitis vinifera* sulu özütü kullanılarak gerçekleştirildi. Vv-AuNP'lerin UV-görünür spektrofotometre, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) gibi çeşitli analitik tekniklerle karakterizasyonu yapıldı. Vv-AuNP'ler 0–80 µg/mL doz aralığında tek başına ve Gemsitabin (100 µg/mL veya 200 µg/mL sabit doz) ile kombine olacak şekilde HT-29 hücreleri ile 72 saat süresince muamele edildi. Sitotoksik etkileri MTT testi ile değerlendirildi. Ayrıca, HT-29 hücreleri üzerine Vv-AuNP'lerin artan dozlarda (0-400µg/mL) tek başına ve Gemsitabin ile kombine antiproliferatif etkileri ise BrdU testi ile belirlendi. Altın nanopartiküllerin HT-29 hücreleri ile muamelesi sonrası Kaspaz-3 aktivasyon düzeyi Western-blot yöntemi ile analiz edildi.

Bulgular

MTT sonuçları değerlendirildiğinde Vv-AuNP'lerin 80 µg/mL doza kadar çıkıldığında HT-29 hücrelerinde istenilen düzeyde sitotoksik etkiler göstermediği belirlendi. BrdU hücre proliferasyon testi sonuçlarına dayalı olarak, Vv-AuNP'lerin tek başına ve Gemsitabin ile birlikte uygulamalarında IC50 değerleri sırasıyla 147.9 ve 39.43 µg/mL olarak belirlendi. Vv-AuNP dozlarına bağlı kaspaz-3 aktivasyonunun kontrole kıyasla arttığı, Gemsitabin ile kombine kullanımının bu etkiyi güçlendirdiği gözlendi.

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: syesilot@mehmetakif.edu.tr
Müracaat tarihi/Application Date: 05.02.2021 • Kabul tarihi/Accepted Date: 28.06.2021
ORCID IDs of the authors: S.G: 0000-0003-4966-2235; S.P: 0000-0001-7422-2974; Ç.A.A: 0000-0002-1311-2314; Ş.Y: 0000-0003-3354-8489

Sonuç
Sonuç olarak, yeşil sentezlenmiş AuNP'ler in vitro koşullarda kolon kanseri hücreleri üzerinde anti-kanser özellikler sergilemiştir. Bu çalışmanın sonuçları, Vv-AuNP'lerin kolon kanseri tedavisi için potansiyel bir seçenek olarak düşünülebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera*, Altın Nanopartikül, Gemsitabin, Kolon Kanseri, HT-29

Abstract

Objective
In recent years, metallic nanoparticles have attracted the attention in the field of nanomedicine with their antioxidant, antimicrobial and anticancer activities. Especially, metal nanoparticles produced by green synthesis method from medicinal plants with known pharmacological efficacy in cancer treatment have been spotlighted by researchers.. Gold nanoparticles; become prominentamong metal nanoparticles with their unique chemical, physical and non-toxic properties. In this study, it was aimed to perform green synthesis of gold nanoparticles using *Vitis vinifera* (grape seed) aqueous extract and to evaluate cytotoxic, anti-proliferative and apoptotic effects of gold nanoparticles (Vv-AuNP) alone and with Gemcitabine co-administration on HT-29 human colon cancer cell line.

Materials and Methods
Green synthesis of gold nanoparticles was carried out using the aqueous extract of *Vitis vinifera*. Vv-AuNPs were characterized by various analytical techniques such as UV-visible spectrophotometer, scanning electron microscope (SEM) and Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX). Vv-AuNPs were treated with HT-29 cells at a dose range of 0–80 µg / mL for 72 hours, alone and in combination with Gemcitabine (100 µg / mL or 200 µg / mL fixed dose). Cytotoxic effects were evaluated by MTT assay. In addition, the antiproliferative effects of Vv-AuNPs at increasing doses (0-400 µg / mL) alone and combined with Gemcitabine were determined by the BrdU test. After treatment of gold nanoparticles with HT-29 cells, the level of Caspase-3 activation was analyzed by Western-blot method.

Results
According to MTT results, when the dose of Vv-AuNPs was increased to 80 µg / mL, it was determined that HT-29 cells did not show the expected level of cytotoxic effect. According to the results of the BrdU cell proliferation test, IC50 values of Vv-AuNPs alone and combined with Gemcitabine were determined as 147.9 and 39.43 µg / mL, respectively. It was observed that the activation of caspase-3 due to Vv-AuNP doses increased compared to control, and its combined use with Gemcitabine reinforced this effect.

Conclusion
As a result, green synthesized AuNPs exhibited anti-cancer properties on colon cancer cells in vitro. The results of this study show that Vv-AuNPs can be considered as a potential option for colon cancer treatment.

Keywords: *Vitis vinifera*, Gold Nanoparticle, Gemcitabine, Colon Cancer, HT-29

Giriş

Kanser genellikle DNA hasarına bağlı olarak hücreler üzerinde, radikal metabolik ve davranışsal farklılaşmalar meydana getiren çok aşamalı bir süreci kapsar (1). Kolorektal kanser, akciğer ve meme kanserlerinden sonra her iki cinste de görülebilen önlenebilir üçüncü en yaygın kanser türüdür. Dünya çapında kansere bağlı ölümler arasında ikinci sırayı almakta olup, 50 yaşın altındaki genç yetişkinlerde kolorektal kanser insidansı ve ölüm oranının son 25 yılda giderek arttığı kaydedilmektedir (2, 3). Kanser tedavisinde ölüm oranını azaltmak ve sağ kalımı artırmak üzere geleneksel yöntemler olan cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve yeni tedavi yöntemlerinden immünoterapi, hedeflenmiş terapiler ve gen terapi gibi biyolojik terapiler tek başına veya birlikte kullanılmaktadır (4). Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin meydana gelişi, gelişimi ve oluşturduğu etki bakımından her hasta için oldukça fazla çeşitlilik göstermesi ve karmaşık bir yapıya sahip olması, araştırmacıları kanserli hastaların tedavisinde yeni tedavi modelleri geliştirmeye yönlendirmektedir (5).

Nanoteknoloji temel olarak çeşitli boyut, şekil ve kimyasal bileşimlerdeki nanopartiküllerin sentezi, kontrollü dağılımı ve bunların insan yararına kullanımı ile ilgilidir (6). Nanopartikül (NP) üretiminde kullanılan kimyasal ve fiziksel yöntemler, saf ve iyi tanımlanmış nanopartikülleri başarıyla üretebilseler de, bunlar oldukça pahalı ve çevre için potansiyel olarak tehlikeli-

dirler. Alg, maya, mantar, bakteri, mikroorganizmalar ile bitkilerin kök, gövde, çekirdek ve yapraklarının kullanıldığı bitki özütü gibi biyolojik kaynakların kullanımına dayalı biyosentez, çevre dostu bir şekilde NP'lerin üretimi açısından kimyasal ve fiziksel yöntemlere iyi bir alternatif olabilmektedir (7). Bu biyolojik kaynaklar içerisinde NP'lerin sentezi için bitkilerin kullanımı, bitki materyalinin kendisinin NP'leri indirgeme ve stabilize etme eğiliminin olması nedeniyle bilimsel araştırmalarda daha fazla ilgi görmektedir. Bitki özütünün türü, her bir bitkinin farklı miktarlarda indirgeyici içeriği sayesinde, NP'lerin şekli ve boyutunda oldukça önemli bir rol oynamaktadır (8-11).

Vitis vinifera (üzüm) çeşitli fenolik bileşikler, flavonoidler ve stilbenler içermektedir. Üzüm çekirdeği güçlü serbest radikal temizleme aktivitesine sahip proantosiyanidinler açısından zengindir (12). Çok sayıda in vitro ve in vivo çalışma, üzüm çekirdeği proantosiyanidinlerinin farmakolojik etkiler sergilediğini göstermiştir (13). Üzüm çekirdeği özütünün, antioksidatif, anti-enflamatuar ve antimikrobiyal aktiviteler gibi geniş bir farmakolojik ve terapötik etki profiline sahip olmasının yanında kardiyoprotektif, hepatoprotektif ve nöroprotektif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (14).

Kanser tedavisinde özellikle farmakolojik etkinliği olan tıbbi bitkilerden yeşil sentez metodu ile üretilen metal nanopartiküllerin antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser etkileri ön plana çıkmaktadır (9, 15-17). Altının kimyasal yapı olarak bir soy metal olması ve toksik olmayan karakteristiğe sahip olması, yapılan çalışmalarda yaygın olarak tercih edilen nanomateryallerden biri olmasını sağlamaktadır (18). Son dönemdeki çalışmalarda yeşil sentez altın nanopartiküllerin (AuNP), çeşitli kanser türleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkinliği bildirilmiştir (19-22) .

Gemsitabin (2′-deoksi-2, 2′-diflorositidin monohidroklorür), orijinal olarak antiviral etkileri için araştırılan, sonrasında antikanser tedavi seçeneği olarak geliştirilen bir ajandır (23). Gemsitabin (GEM), tek başına veya diğer antikanser ajanlar ile kombine olarak kullanılan ve hematolojik malignensiler ve çeşitli solid tümörlere karşı aktivite gösteren bir deoksiribonükleosit analoğudur (24).

Yapmış oluğumuz bu çalışmada, *Vitis vinifera* çekirdeği sulu özütü kullanılarak altın nanopartiküllerin biyosentezinin gerçekleştirilmesi ve aynı zamanda biyosentezlenmiş altın nanopartiküllerin tek başına ve Gemsitabin ile kombine kullanımının HT-29 insan kolon kanseri hücreleri üzerindeki anti-kanser aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Vitis vinifera Çekirdeği Sulu Özütünün Hazırlanması

Kurutulmuş üzüm çekirdekleri havanda dövülerek toz haline getirildi. Özütünhazırlanması için 1 gr üzüm çekirdeğine 100 mL deiyonize su eklenerek mikrodalga fırında 1 dakika (1200W, 50Hz) kaynatıldı. Elde edilen sulu özüt whatman no. 1 filtre kağıdı ile süzülerek, tekrar kullanıma kadar 4° C'de saklandı.

Altın Nanopartiküllerin (Vv-AuNP) Biyosentezi

Hazırlanan 1mM $HAuCl_4$ (Alfa Aesar by Thermo Fisher Scientific) çözeltisinden 45 mL alınarak, 5 mL *Vitis vinifera* çekirdeği sulu özütü ile karıştırıldı. Karışım karanlıkta bekletilerek, zamana bağlı renk değişimi gözlendi.

Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sarı renkten koyu kahverengiye doğru olan değişim AuNP'lerin oluşumunu göstermektedir. Sentezlenmiş altın nanopartiküllerin spektrumları Shimadzu UV-1801 UV-VIS (görünür) spektrofotometre kullanılarak izlendi. AuNP solüsyonunun spektrumu 300-700 nm dalga boyu aralığında absorbans taraması yapıldı. Elde edilen AuNP'lerin boyutu ve morfolojisini belirlemek üzere taramalı elektron mikroskobu (SEM), kimyasal karakterizasyonunu belirlemek için Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) kullanıldı.

Hücre Kültürü

Çalışmada Hayvan Hücre Kültürü Koleksiyonundan (HUKUK, Sap Enstitüsü, Ankara, Türkiye) temin edilen insan kolon kanserini temsilen HT-29 hücre hattı kullanıldı. Hücrelerin tamamı esansiyel olmayan amino asitler, sodyum prüvat, L-glutamin, %10 fetal sığır serumu (FBS) içeren Penisilin /Streptomisin eklenmiş DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) (PAN-biotech) besi ortamı içerisinde 37ºC sıcaklık ve %5 CO_2' li %95 nemli kültür ortamına alınarak monolayer kültürler olarak inkübatörde çoğaltıldı.

MTT Testi

Sentezlenen Vv-AuNP'lerin HT-29 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile değerlendirildi. Hücreler Thoma lamında sayılarak 3000 hücre/kuyu/100 µL besiyeri olacak şekilde 96 kuyulu kültür kabına ekimi gerçekleştirildi. Hücreler %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 37ºC sıcaklık ve %5 CO_2' li %95 nemli kültür ortamına alınarak ve 24 saat inkübe edildi. HT-29 hücreleri biyosentez ile oluşturulmuş Vv-AuNP'ler ve GEM ile tek başına ve kombine olacak şekilde (Vv-AuNP (0-80 µg/mL), GEM (0-400 µg/mL), Vv-AuNP (0-80 µg/mL) + 100µg/mL GEM, Vv-AuNP (0-80 µg/mL) + 200µg/mL GEM) 4

farklı grupta muamele edildi. Kontrol grubu olarak herhangi bir ajanla muamele edilmemiş HT-29 hücreleri kullanıldı. 5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan MTT, her bir kuyucuğa 10 µL olacak şekilde ilave edilerek 4 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında meydana gelen mor renkli formazon kristalleri, 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Thermo Multiscan GO) ölçüm yapılarak optik dansite (OD) verileri elde edildi. Sonuçlar, üç bağımsız deneyin ortalaması alınarak belirlendi. Hücre canlılığı, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

Hücre canlılığı (%) = (Örnek Absorbansı / Kontrol Absorbansı) x100

BrdU Hücre Proliferasyon Testi

Kültüre edilen HT-29 hücreleri, Bromodeoksiüridin (BrdU) hücre proliferasyon deneyinin bir gün öncesinde 96-kuyucuklu hücre kültürü kaplarına 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Ertesi gün, kuyucuklarda tutunan hücrelerin besiyerleri aspire edildikten sonra, kontrol grubu %5 fosfat tamponlu salin (PBS) içeren DMEM besiyeri ve test örnekleri ise 25, 50, 100, 200, ve 400 µg/mL Vv-AuNP'ler ve Vv-AuNP+GEM (200 µg/mL) içeren besiyeri ile muamele edildi. Her deney örneği 100'er µL/kuyucuk hacimde 3'lü tekrar olacak şekilde çalışılarak, söz konusu test bileşikleri 72 saat boyunca HT-29 hücrelerinde uygulandı. Süre sonunda, BrdU hücre proliferasyonu deney kiti (BioVision cat#K306-200) uygulandı. Muamele edilen hücreler üzerine sonkonsantrasyonu 1X olacak şekilde 10 µL kit içeriğinde mevcut olan BrdU (10X) solüsyonu ile 4 saat boyunca 37ºC kültür sıcaklığında muamele edildi. Spektrofotometrik ölçüm için her kuyucuğa 100 µL tetrametilbenzidin (TMB) substratı ilave edildi. Yaklaşık 30 dakika içerisinde renk değişimi gözlemlendiğinde TMB substratı içeren örnekler üzerine 100 µL/kuyucuk stop solüsyonu ilave edilerek 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Elde edilen optik dansite (OD) verileri excel programı kullanılarak analiz edildi ve konsantrasyona bağlı hücre proliferasyon grafiği çizildi. Hücre canlılığında %50 azalma gösteren Vv-AuNP ve Vv-AuNP+GEM (200 µg/mL) konsantrasyonu (IC50 değeri) GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak belirlendi.

Hücre Lizatlarının Hazırlanması: Petri kültür kaplarında 72 saat boyunca Vv-AuNP ve Vv-AuNP+GEM ile muamelesi yapılan HT-29 hücrelerinin besi ortamı uzaklaştırılarak, hücreler 10 mL soğuk steril 1XPBS ile iki defa yıkandı. 1XPBS solüsyonu da uzaklaştırılarak 1 mL proteinaz inhibitör kokteyli içeren (Roche cat# 11 836 145 001) Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) tamponu (Sigma cat# 0278) hücrelerin üzerine eklenerek, hücreler hücre kazıyıcısı yardımı (Falcon cat# 353085) ile steril 1,5 mL'lik ependorf tüplerine toplandı. Örnekler buzda 15 dakika bekletildikten sonra 1 dakika boyunca vortekslendi ve 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant lizat steril bir ependorf tüpe transfer edildi. Örnekler kullanılana kadar -80ºC'de dondurucuda (Nüve 490) saklandı.

Protein Miktar Tayini: Elde edilen hücre lizatlarının protein miktarı hesaplaması Bradford (BioRad 500-0006) reaktifi kullanılarak Sığır Serum Albumin (BSA) standartına karşı gerçekleştirildi. BSA standardı ile birlikte test edilecek lizat örnekleri spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okundu. Verilerin ortalaması alınarak oluşturulan standart eğriden hesaplanan formüle göre örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

Western-Blot Analizi

Bradford yöntemiyle protein konsantrasyonları belirlenen örneklerden 50'şer µg alınarak Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıldı ve ardından bir Poli-viniliden florür (PVDF) membranına aktarıldı. Transfer aşamasının devamında membran %1 BSA ve %0.1 Tween-20 içeren Tris-tuz çözeltisi (TBST) tamponunda bloklandı. Bu bloklama tamponu içerisinde 1:1000 dilüe edilen primer antikor (Caspase-3 Bioss cat# bs-2593R; p53 Santacruz cat.# sc-393031; beta-Aktin Sigma cat.# A1978) ile membran gece boyu 4ºC'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, tüm membranlar % 0.1 Tween-20 içeren TBST yıkama tamponunda 15'er dakika iki kez yıkandı ve daha sonra oda sıcaklığında ikincil antikor (anti-mouse ProteinTech cat.# SA00001-1; anti-rabbit Santrcruz cat.#sc-2357) ile 2 saat süresince işaretlendi. Membranları iki kez TBST ile tekrar yıkadıktan sonra, Western Bright Sirius kiti (kat. K-12043-D20) (Advansta Inc., San Jose, CA, ABD) kullanılarak immünoreaktivite saptandı. β-aktin proteini yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Proteinlere ait immünoblotlama sinyalleri, Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Chicago, Illinois, ABD) kullanılarak belirlendi. İmajlarda elde edilen sinyaller imageJ yazılımı (https://imagej.nih.gov) yardımı ile analiz edildi.

İstatistiksel Analiz

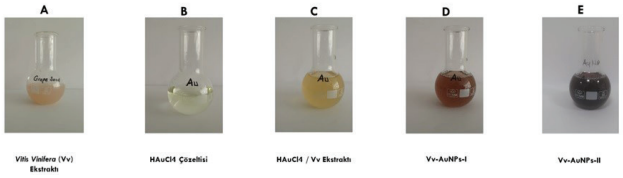
Çalışmanın sonuçları istatistiksel olarak GraphPad Prism (v8) ve SPSS (v20) paket programları yardımı ile değerlendirilmiştir. Yapılan analizler iki uçlu (two-tailed) ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

Altın Nanopartiküllerin Biyosentezi

Ekstraksiyon işlemi sonrası elde edilen üzüm çekirdeği sulu özütü açık pembe renkli, $HAuCl_4$ çözeltisi

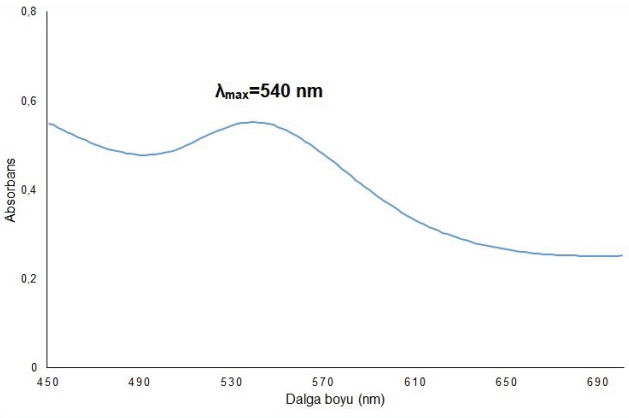
açık sarı renkliydi. 1 mM $HAuCl_4$ çözeltisine üzüm çekirdeği sulu ekstraktının eklenmesini takiben karışım karanlıkta bekletilerek, zamana bağlı renk değişim süreci takip edildi. Vv-AuNP'lerin oluşumunun bir göstergesi olan sarı-kırmızı renkten koyu kahverengiye doğru oluşan renk değişimi gözlendi (Şekil 1).



Şekil 1
Üzüm çekirdeği (*Vitis vinifera*) özüt kullanılarak altın nanopartiküllerin biyosentezi; (A) Vitis vinifera (Vv) ekstraktı, (B) $HAuCl_4$ çözeltisi, (C) $HAuCl_4$/Vitis vinifera ekstraktı, (D) Altın nanopartiküllerin ilk görüntüsü (Vv-AuNP-I), (E) Altın nanopartiküllerin son görüntüsü (Vv-AuNP-II)

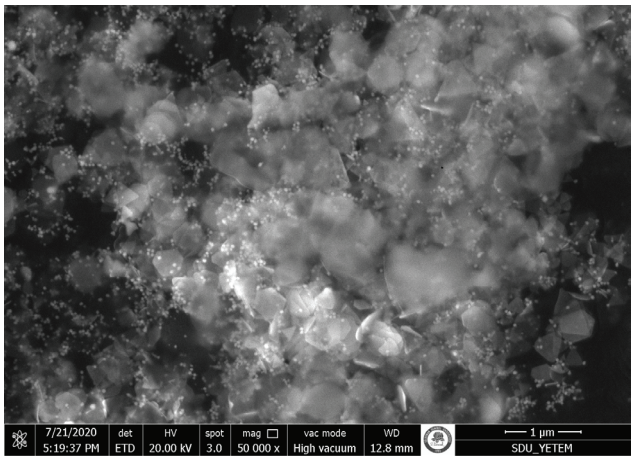
Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Başarılı bir altın nanopartikül sentezinde, altın nanopartiküllerin UV-vis spektrofotometrede 500-600 nm dalga boyu aralığında pik vermesi beklenmektedir. Hazırlanan Vv-AuNP'ler, UV-vis spektrofotometrede 300-700 nm dalga boyu aralığında tarandı. Üzüm çekirdeği sulu özütü kullanılarak hazırlanan Vv-AuNP'ler için 540 nm'de güçlü bir absorbans piki gözlendi (Şekil 2).

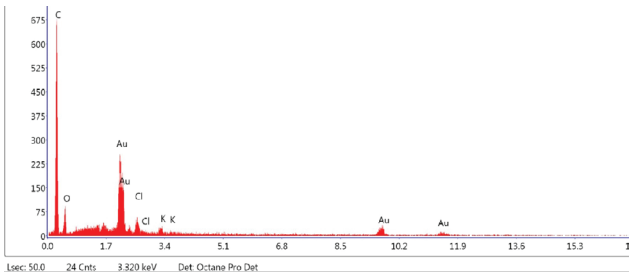


Şekil 2
Altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) UV-vis spektrumu

Vv-AuNP'lerin boyut ve yüzey morfolojisinin görüntülenebilmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile yapılan görüntüleme sonucunda Vv-AuNP'lerin genellikle küresel ve kübik bir morfolojiye sahip ve 100 nm'den daha küçük boyutlarda olduğu belirlendi (Şekil 3). Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX)'ne göre, Vv-AuNP'lerin elementel bileşiminde Au metal piklerinin olduğu görüldü (Şekil 4).



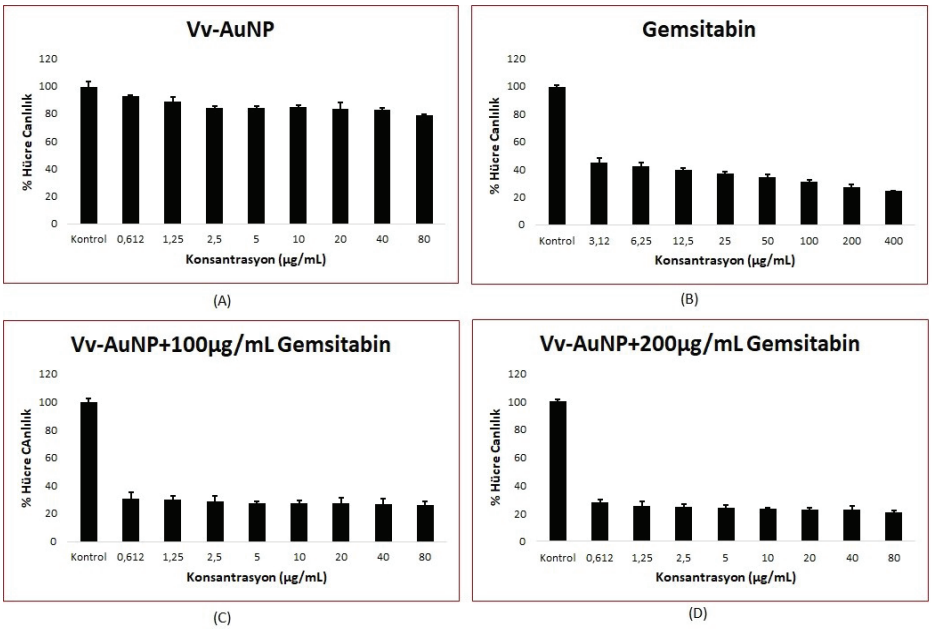
Şekil 3
Vitis vinifera çekirdek özütü ile sentezlenmiş altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) SEM görüntüsü



Şekil 4
Vitis vinifera çekirdek özütü ile sentezlenmiş altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) EDX spekrumu

Vv-AuNP'lerin in vitro Antikanser Aktivitesi

Yapmış olduğumuz çalışmada, yeşil sentezlenmiş altın nanopartiküllerin sitotoksisitesi MTT testi kullanılarak analiz edilmiştir. Vv-AuNP'ler 0–80 µg/mL aralığında değişen konsantrasyonlarda 72 saat süreyle kolon kanseri (HT-29) hücrelerine uygulandığında artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir. Ancak, hücre canlılığındaki bu azalma beklenen düzeyde olmayıp en yüksek konsantrasyonda bile (80 µg/mL) hücrelerin canlılığında sadece %20 oranında bir azalmaya yol açmıştır (Şekil 5A). Gemsitabin tek başına uygulandığında ise artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir (Şekil 5B). Vv-AuNP'ler (artan konsantrasyonda olmak üzere) GEM (100 µg/mL veya 200 µg/mL sabit doz) ile kombine olacak şekilde HT-29 hücrelerine uygulanmış ve birlikte etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar her iki grupta

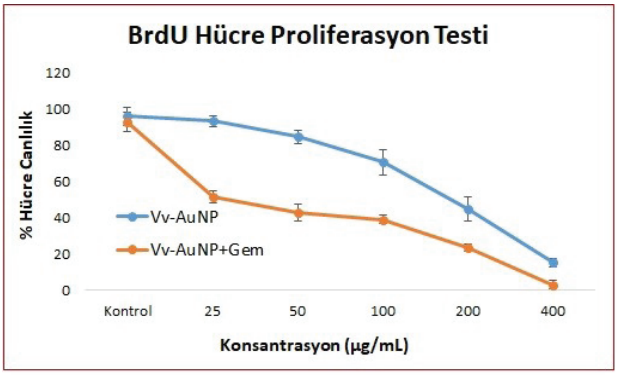


Şekil 5

(A) Altın nanopartiküller (Vv-AuNP), (B) Gemsitabin, (C) Vv-AuNP+100 µg/mL Gemsitabin, (D) Vv-AuNP+200 µg/mL Gemsitabin ile muamele edilen HT-29 kolon kanseri hücrelerinin MTT sitotoksisite testi ile belirlenen yüzde canlılık grafiği (hata çubukları standart sapmayı (SD)'yi gösterir, n = 3).

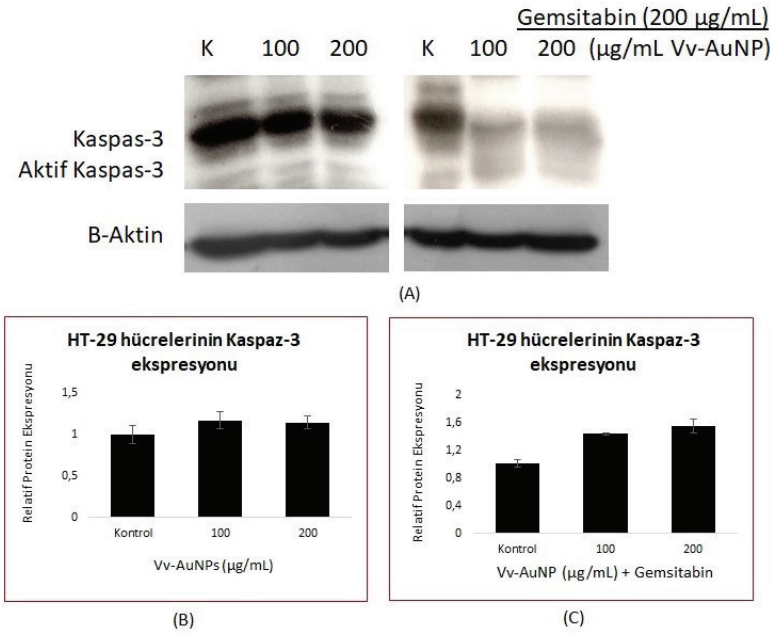
da hücre canlılığının yaklaşık %80 civarında azaldığını göstermiştir. Ancak hücre canlılığındaki bu azalma kombine etkiden ziyade Gemsitabinin etkisini ön plana çıkarmaktadır (Şekil 5C-5D).

BrdU, bölünen hücrelerde DNA sentezi sırasında yeni sentezlenen DNA'nın yapısına katılan bir timidin analoğudur. Bu sayede BrdU hücre proliferasyon testi ile in vitro aktif olarak prolifere olan hücreleri kantitatif olarak belirlemek mümkündür. Yapmış olduğumuz çalışmada, Vv-AuNP'lerin hücre proliferasyonu üzerine etkisini değerlendirmek üzere HT-29 kolon kanseri hücreleri farklı konsantrasyonlarda (0-400 µg/mL) hazırlanarak Vv-AuNP'lerle ve 200 µg/mL sabit dozda GEM ile birlikte ile 72 saat boyunca muamele edildi. Vv-AuNP ile muamele edilmemiş HT-29 hücreleri kontrol grubu olarak kabul edildi. Çalışmadan elde etmiş olduğumuz sonuçlar kontrole göre Vv-AuNP'lerin HT-29 hücre hattında doz bağımlı olarak hücre canlılığında azalma oluşturduğunu gösterdi. İnkübasyonun 72. saatinde Vv-AuNP'lerin 200 µg/mL ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında %50'den fazla azalma görüldü. 200 µg/mL dozunda görülen bu azalma kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.000). Kontrole göre 200 µg/mL sabit dozda GEM ile birlikte Vv-AuNP'lerin artan dozlarda kullanımında, 25 µg/mL ve üzeri dozda Vv-AuNP uygulandığında hücre canlılığında kontrol grubuna kıyasla %50'den fazla azalma belirlendi. Vv-AuNP'ler GEM ile birlikte kullanıldığında hücre canlılığı üzerine kombine etkide artış görüldü (Şekil 6). Vv-AuNP'lerin tek başına ve GEM ile birlikte uygulamalarında IC50 değerleri sırasıyla 147.9 ve 39.43 µg/mL olarak belirlendi.



Şekil 6

HT-29 kolon kanser hücrelerinde altın nanopartiküllerin (Vv-AuNP) tek başına ve Gemsitabin (200 µg/mL) ile kombine uygulamalarının hücre proliferasyonu üzerine etkilerinin BrdU yöntemi ile karşılaştırılması (hata çubukları standart sapmayı (SD)'yi gösterir, n = 3).



Şekil 7
(A) HT-29 hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonu western blot bantlarının görüntüsü
(B) Vv-AuNP'in Kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi.
(C) Vv-AuNP ve Gemsitabinin birlikte kullanımının Kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi
(hata çubukları standart sapmayı (SD)'yi gösterir, n = 3).

Kaspaz-3 Aktivasyon Düzeyi
Kaspazlar, programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) önde gelen aracılarıdır. Bunların arasında kaspaz-3, DNA parçalanması veya hücre iskeleti proteinlerinin bozulması gibi hücresel yapıların yıkımını koordine etmekteki rolü nedeniyle apoptozda bir yürütücü kaspaz olarak bilinir. Kaspaz-3, hem ekstrinsik hem de intrinsik yolaklar için ortak bir kaspazdır ve bu nedenle apoptozun göstergesidir. Apoptoz ilişkili protein seviyelerinin belirlenmesi için yapılan Western-blot analizlerinde kaspaz-3 proteini için şekil 7'de verilen jel görüntüleri elde edilmiştir. Protein seviyesinin karşılaştırılması için referans olarak β-aktin kullanılmıştır. Artan Vv-AuNP dozlarına bağlı kaspaz-3 aktivasyonunun kontrole kıyasla arttığı, GEM ile kombine kullanımının Kaspaz-3 protein ekspresyonu üzerindeki etkisini kontrole kıyasla güçlendirdiği gözlenmiştir.

Tartışma

Nanoteknoloji son yıllarda endüstri, sağlık ve tıp alanları ile bilimsel araştırmalara yönelik uygulama alanlarında kendisine önemli bir kullanım alanı bulmaktadır (25). Çalışmalarda farklı kanser hücre hattı uygulamalarının nanoteknoloji bilimi ile birleşmesi neticesinde kanser hücrelerini öldüren, normal (sağlıklı) hücrelere ise zarar vermeyen metal nanopartiküllerle üretilen yeni nesil ajanlarla, hedef odaklı kanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır (11, 26, 27).

Özellikle altın nanopartiküller kendilerine özgü kimyasal, fiziksel ve nontoksik özellikleri nedeni ile kanser tedavisi ve görüntülemesinde kullanımlarının araştırılması yönünden en yaygın çalışılan nanometallerden biridir. Son yıllarda, altın nanopartiküller basit bir şekilde sentezlenebilmeleri, yüzey modifikasyonlarının yapılabilmesi, ayarlanabilir çekirdek boyutu ve şekline sahip olmaları ve benzersiz optik özellikleri nedeniyle görüntüleme ajanları, teranostik ajanlar ve ilaç taşıyıcı sistemler olarak bilimsel araştırmalarda ilgi odağı haline gelmiştir (27-29).

Altın nanopartiküllerin sentezi için birbirinden farklı fiziksel ve kimyasal metotlar kullanılmakta olup, bunlar hem ekonomik açıdan oldukça pahalı hem de zararlı kimyasalların kullanımı nedeniyle çevre için oldukça toksiktir. Biyolojik yöntemler ise diğer yöntemlerin aksine oldukça ekonomik ve çevre dostudur. Biyolojik yöntemlerde kullanılan bitki özütleri, metal iyonlarını girdikleri etkileşim sonucunda metalik nanopartiküllere indirgeme potansiyeline sahiptir (30). Üzüm çekirdeği özütünün, antioksidatif, anti-enflamatuar ve antimikrobiyal aktiviteleri ile geniş farmakolojik ve terapötik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (14).

Çalışmamızda, bilinen bu özellikleri ve sahip olduğu içerik, üzüm çekirdeği özütünün altın nanopartiküllerin biyosentezinde tercih edilmesinde en önemli etken olmuştur.

Yapmış olduğumuz çalışmada, üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği sulu ekstraktı kullanılarak biyosentezi gerçekleştirilen altın nanopartiküllerin tek başına ve Gemsitabin ile kombine kullanımının insan kolon kanseri hücre hattı HT-29 üzerindeki sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptototik etkileri ilk kez değerlendirilmiştir. Çalışmamızın ilk basamağında Vv-AuNP oluşumunun bir göstergesi olan zamana bağlı renk değişim süreci takip edilerek sarı-kırmızı renkten koyu kahverengiye doğru oluşan renk değişimi gözlendi. Altın nanopartiküllerinin biyosentezine yönelik yapılan benzer çalışmalarda da AuNP'lerin oluşumunda zaman bağlı olarak renk değişikliği gösterdiği ortaya konulmuştur (31-33).

Yapmış olduğumuz çalışmada, UV-vis ölçümlerine göre biyosentezlenmiş altın nanopartiküllerin 500-600 nm dalga boyu aralığında pik vermesi beklenmekte olup, hazırladığımız Vv-AuNP'ler için 540 nm'de güçlü bir absorbans piki gözlenmiştir. Biyosentez metodu uygulanan farklı altın nanopartikül çalışmalarının spektrofotometrik UV-vis analizinde AuNP'lerin 540 nm dalga boyunda güçlü bir pik verdiği görülmüştür (34-36).

Vv-AuNP'lerin boyut ve yüzey morfolojisinin görüntülenebilmesi için yapılan SEM analizleri sonucunda Vv-AuNP'lerin genellikle küresel ve kübik bir morfolojiye sahip ve 100 nm'den daha küçük boyutlarda olduğu belirlenmiştir. SEM verilerine göre hazırlanan altın nanopartiküllerin 100 nm'nin altında bulunması, benzer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak belirlenmiştir (31, 35, 37). Yapılan benzer çalışmalarda da olduğu gibi Vv-AuNP'lerin element analizi, EDX ile doğrulanmış ve altının temel kurucu element olduğunu gösteren yaklaşık 2 keV'de tipik bir optik absorpsiyon zirvesi gözlenmiştir (38).

Çalışmamızda, biyosentez ile hazırlanan Vv-AuNP'leri in vitro sitotoksik etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Vv-AuNP'ler ile muamele edilmeyen HT-29 hücreleri kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. MTT analizi sonucu elde etmiş olduğumuz bulgular, biyosentezlenmiş Vv-AuNP'lerin artan dozuna bağlı olarak 72. saatte HT-29 hücrelerinde sitotoksik etkilerin varlığını göstermiştir. Ancak, en yüksek konsantrasyon olarak kullanılan 80 µg/mL'de hücre canlılığında %20 oranında bir azalma gözlenmiştir. Vv-AuNP'ler, GEM (100 µg/mL veya 200 µg/mL sabit doz) ile kombine olarak HT-29 hücrelerine uygulanmış ve birlikte etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar her iki grupta da hücre canlılığının yaklaşık %80 civarında azaldığını göstermiştir. Ancak hücre canlılığındaki bu azalma kombine etkiden ziyade Gemsitabinin etkisini ön plana çıkarmaktadır.

Çalışmamızda, ayrıca HT-29 hücrelerinde hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi amacıyla BrdU deneyi yapılmış, Vv-AuNP konsantrasyonu 400 µg/mL konsantrasyona kadar çıkılmış ve etkileri değerlendirilmiştir. BrdU deneyi sonucunda Vv-AuNP'lerin HT-29 hücrelerinde doza bağımlı bir şekilde hücre proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir. İnkübasyonun 72. saatinde Vv-AuNP'lerin 200 µg/mL ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında %50'den fazla azalma belirlenmiştir. Bu sonuç MTT sonuçları ile karşılaştırıldığında sentezlemiş olduğumuz Vv-AuNP'lerin düşük dozlarda yeteri kadar etkin olmadığını, etkili bir sonuç için 200 µg/mL ve daha yüksek dozların kullanılması gerektiğini gözler önüne sermektedir. 200 µg/mL sabit dozda GEM ile birlikte Vv-AuNP'lerin artan dozlarda kullanımında 147.9 µg/mL ve üzeri dozda kullanıldığında hücre canlılığında %50'den fazla azalma görüldü. Vv-AuNP'ler GEM ile birlikte kullanıldığında kontrole kıyasla sitotoksisite üzerine kombine etkide artış görüldü (IC50: 39.43 µg/mL). Altın nanopartiküllerinin sitotoksisitesine ilişkin literatür değerlendirildiğinde; Abu-Tahon ve ark. yapmış oldukları araştırmada *Aspergillus flavus* kültür supernatantlarından biyosentezlenen AuNP'lerin sırasıyla 53.5, 60.7 ve 100 µg/mL IC50 değerleri ile A549, HepG2 ve MCF7 hücre hatlarına karşı güçlü bir antikanser ajan olduğu doğrulanmıştır (39). Ejderha meyvesi özütü (DF) ve DF-AuNP'lerin sitotoksik etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada, sentezlenen AuNP'lerin MCF-7 meme kanseri hücrelerinin büyümesini önemli derecede inhibe ettiği, ancak MDA-MB-231 hücreleri üzerinde ise önemli bir toksik etkinin gözlenmediği belirtilmiştir (40). Shahriari ve ark. A. *noeanum* bitkisinin sulu özütü ile hazırlanmış oldukları AuNP'ler için HUVEC hücre hattında 1000 µg/mL'ye kadar çıkıldığında bile olağanüstü hücre canlılığının varlığını rapor etmişlerdir (41). Wedelia trilobata sulu özütü ile biyosentezlenen AuNP'lerin HCT-15 insan kolon hücreleri üzerinde doza bağlı toksisite gösterdiği ve verimliliğin ortalama yüzde 30'a kadar çıktığı bulunmuştur (42).

Gemsitabin, geniş bir antitümör aktivite spektrumuna sahip, iyi bilinen bir sitotoksik ajandır. Bununla birlikte, ilaç direnci, in vivo olarak verimsiz uygulanması ve sistemik toksisitesi nedeni ile klinik kullanımı kısıtlanmaktadır. Gemsitabinin çeşitli kemoterapötik ilaçlarla birlikte uygulanması, klinik düzeyde önemli etkiler ve olumlu sonuçlar göstermesinin yanı sıra, hidrofilikten hidrofobiye, farmakokinetik, toksisite ve diğer ilaçlarla

birlikte uygulandıklarında etki profillerindeki farklılık gibi bazı sorunlar ile karşılaşılmıştır (43, 44). Kemoterapötik ajanın kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini iyileştirmek için ön ilaç olarak modifiye edilerek kullanımı, çeşitli nanotaşıyıcılara yükleyerek kullanımı, nanopartiküllerle kombine kullanımı şeklinde çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Gemsitabinin, akciğer epitel kanseri hücre hattı A549 hücrelerine konjuge kitosan nanopartiküller kullanılarak nano formülasyon yoluyla verildiği bir çalışmada, önemli sitotoksisite ve serbest Gemsitabin'den daha etkili hücresel etkileşme gösterdiği bulunmuştur (45). Gemsitabinin gümüş nanopartiküllerle kombine kullanımının insan yumurtalık kanseri hücre hattı A2780'de sinerjik sitotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada GEM ve Ag-NP'lerin, hücre canlılığını ve proliferasyonunu azaltarak, artan LDH sızıntısı ve ROS oluşumunu indükleyerek antikanser etkiler uyguladıkları gösterilmiştir (46). Akasya sakızı (GA) kullanılarak hazırlanan altın nanopartiküllerin GEM ile birlikte kullanıldığı bir başka çalışmada, serbest GEM ile karşılaştırıldığında, GEM-GA AuNP'lerin insan meme adenokarsinomu (MDA-MB-231) hücre hattında daha fazla sitotoksisite gösterdiği bulunmuştur (47). Bu çalışmalar, bizim çalışmamızla paralel bir şekilde kanser tedavilerinde kombinasyon bazlı tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin faydalı olacağını desteklemektedir.

Apoptozisin göstergelerinden biri olan Kaspaz-3 aktivasyonunu belirlemek üzere yapmış olduğumuz western-blot analizlerinde ise artan Vv-AuNP dozlarına bağlı olarak kaspaz-3 aktivasyonunun arttığı, Gemsitabin ile kombine kullanımın apoptotik etkinliği güçlendirdiği gözlenmiştir. Baharara ve ark. yaptıkları çalışmada yeşil sentez altın nanopartiküllerin HeLa hücrelerinde apoptozu indükleme kabiliyetine sahip olduğunu göstermiştir (48). Mata ve ark. yeşil sentez altın nanopartiküller ile muamele edilmiş HT-29 hücrelerinde bölünmüş Kaspaz-9, Kaspaz-8, Kaspaz-3, Lamin A / C ve PARP ekspresyonu ile apoptoz yollarının indüksiyonunu göstermişlerdir (49).

Sonuç olarak, altın nanopartiküller bu çalışmada üzüm çekirdeği ekstraktı kullanılarak başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Biyosentezlenen AuNP'lerin HT-29 kolon kanseri hücrelerine karşı Gemsitabin ile birlikte kullanılmasının sitotoksik ve apoptotik etkiler sergilediği gösterilmiştir. Bu bulgulara dayanarak yeşil sentez AuNP'lerin kolorektal kanser tedavisi için umut vaat edici yeni bir terapötik ajan olduğunu düşünmekteyiz. Ancak bu çalışmanın in vitro bir çalışma olması nedeniyle bulgularımızı desteklemek için in vivo kolon kanseri modellerinde denenmesi ve etki mekanizmasının moleküler düzeyde açıklanabilmesi için daha ileri çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektir.

Çıkar Çatışması

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Teşekkür

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0595-YL-19 proje numarası ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. Nat Rev Cancer 2006;6(12):924-935.
2. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi M. Colorectal Carcinoma. A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. Int J Mol Sci 2017;18(1):197.
3. Ahmed M. Colon cancer: a clinician's perspective in 2019. Gastroenterology Res 2020;13(1):1–10.
4. Baykara O. Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. Balikesir Saglik Bil Derg 2016;5(3):154-165.
5. Aydın Acar Ç, Pehlivanoğlu S. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Rosa canina Extract and Its Anti-cancer and Anti-metastatic Activity on Human Colon Adenocarcinoma Cell Line HT29. MAKU J. Health Sci. Inst. 2019;7(2):124-131.
6. Osuwa JC, Anusionwu PC. Some advances and prospects in nanotechnology: a review. Asian J Inf Technol 2011;10:96-100.
7. Rana A, Yadav K, Jagadevan S. A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. Journal of Cleaner Production 2020;272:122880.
8. Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. J Nanopart Res 2008;10:507–517.
9. Kumar V, Yadav SK. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. J Chem Technol Biotechnol 2009;84:151–157.
10. Kamran U, Bhatti HN, Iqbal M, Nazir A. Green synthesis of metal nanoparticles and their applications in different fields: a review. Zeitschrift für Physikalische Chemie 2019;233(9):1325-1349.
11. Yesilot S, Aydin CA. Silver nanoparticles; a new hope in cancer therapy?. Eastern Journal of Medicine 2019;24(1):111-116.
12. Kwatra B. A review on potential properties and therapeutic applications of grape seed extract. World J. Pharm. Res 2020;9:2519-2540.
13. Unusan N. Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. Journal of Functional Foods 2020;67:103861.
14. Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the Pharmacological Effects of Vitisvinifera (Grape) and its Bioactive Constituents:An Update. Phytother. Res. 2016;30:1392–1403.
15. Akhtar M, Panwar J, Yun YS. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. ACS Sustain Chem Eng 2013;1:591-602.
16. Conde J, Doria G, Baptista P. Noble metal nanoparticles applications in cancer. J Drug Deliv 2012;2012:751075.
17. Singh P, Kim YJ, Wang C, Mathiyalagan R, El-Agamy Farh M, Yang DC. Biogenic silver and gold nanoparticles synthesized using red ginseng root extract, and their applications. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2016;44(3):811-6.
18. Tan G, Onur MA, Sağlam N. Utilization of gold nanostructures in biomedical applications. Turk J Biol 2012; 36:607- 621.
19. Biao L, Tan S, Meng Q, Gao J, Zhang X, Liu Z, Fu Y. Green synthesis, characterization and application of proanthocyanidins-functionalized gold nanoparticles. Nanomaterials

2018;8(1):53.
20. Hamelian M, Hemmati S, Varmira K, Veisi H. Green synthesis, antibacterial, antioxidant and cytotoxic effect of gold nanoparticles using Pistacia Atlantica extract. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 2018;93:21-30.
21. Usman AI, Aziz AA, Noqta OA. Application of green synthesis of gold nanoparticles: A review. Jurnal Teknologi 2019;81(1):171-182.
22. Noah N. Green synthesis: Characterization and application of silver and gold nanoparticles. Micro and Nano Technologies 2019;111-135.
23. Noble S, Goa KL. Gemcitabine. Drugs 1997;54(3):447-472.
24. Guo X, Xu B, Pandey S, Goessl E, Brown J, Armesilla AL, Wang W. Disulfiram/copper complex inhibiting NFκB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. Cancer letters 2010;290(1):104-113.
25. Ramsden J. Essentials of nanotechnology. Nanotechnology © 2009 Jeremy Ramsden & Ventus Publishing ApS, ISBN 978-87-7681-418-2; 2009.
26. Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. Nanotechnol Sci Appl 2008;1(1):17-32.
27. Nejati K, Dadashpour M, Gharibi T, Mellatyar H, Akbarzadeh A. Biomedical Applications of Functionalized Gold Nanoparticles: A Review. Journal of Cluster Science 2021.https://doi.org/10.1007/s10876-020-01955-9
28. Datkhile KD, Patil SR, Durgawale PP. et al. Biogenic synthesis of gold nanoparticles using Argemone mexicana L. and their cytotoxic and genotoxic effects on human colon cancer cell line (HCT-15). J Genet Eng Biotechnol 2021;19:9.
29. Zhang Y, Elechalawar CK, Hossen MN, Francek ER, Dey A, Wilhelm S, et al. Gold nanoparticles inhibit activation of cancer-associated fibroblasts by disrupting communication from tumor and microenvironmental cells. Bioactive materials 2021;6(2):326-332.
30. Kuppusamy P, Yusoff MM, Maniam GP, Govindan N. Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. Saudi Pharm J 2016;24(4):473-84.
31. Baran MF, Saydut A. Altın nanomalzeme sentezi ve karekterizasyonu. DÜMF Müh Der. 2019;10(3):1033-1040.
32. Umamaheswari C, Lakshmanan A, Nagarajan NS. Green synthesis, characterization and catalytic degradation studies of gold nanoparticles against congo red and methyl orange. J Photoch Photobio B 2018;178:33-39.
33. Zhang P, Wang P, Yan L, Liu L. Synthesis of gold nanoparticles with Solanum xanthocarpum extract and their in vitro anticancer potential on nasopharyngeal carcinoma cells. In j nanomed 2018;13:7047.
34. Asariha M, Chahardoli A, Karimi N, Gholamhosseinpour M, Khoshroo A, Nemati H, et al. Green synthesis and structural characterization of gold nanoparticles from Achillea wilhelmsii leaf infusion and in vitro evaluation. Bull Mater Sci 2020;43:57.
35. Islam NU, Jalil K, Shahid M, Muhammad N, Rauf A. Pistacia integerrima gall extract mediated green synthesis of gold nanoparticles and their biological activities. Arab J Chem 2019;12(8):2310-2319.
36. Zhang X, Fan L, Cui Y, Cui T, Chen S, Ma G, et al. Green synthesis of gold nanoparticles using longan polysaccharide and their reduction of 4-nitrophenol and biological applications. Nano 2020;15(1):2050002.
37. Kumar PV, Kala SMJ, Prakash KS. Green synthesis of gold nanoparticles using Croton Caudatus Geisel leaf extract and their biological studies. Mater Lett 2019;236:19-22.
38. Izadiyan Z, Shameli K, Hara H, Taib SHM. Cytotoxicity assay of biosynthesis gold nanoparticles mediated by walnut (Juglans regia) green husk extract. Journal of Molecular Structure 2018;1151:97-105.
39. Abu-Tahon MA, Ghareib M, Abdallah WE. Environmentally benign rapid biosynthesis of extracellular gold nanoparticles using Aspergillus flavus and their cytotoxic and catalytic activities. Process Biochemistry 2020;95:1-11.
40. Divakaran D, Lakkakula JR, Thakur M, Kumawat MK, Srivastava R. Dragon fruit extract capped gold nanoparticles: Synthesis and their differential cytotoxicity effect on breast cancer cells. Materials Letters 2019;236:498-502.
41. Shahriari M, Hemmati S, Zangeneh A, Zangeneh MM. Biosynthesis of gold nanoparticles using Allium noeanum Reut. ex Regel leaves aqueous extract; characterization and analysis of their cytotoxicity, antioxidant, and antibacterial properties. Applied organometallic chemistry 2019;33(11):e5189.
42. Dey A, Yogamoorthy A, SM S. Green synthesis of gold nanoparticles and evaluation of its cytotoxic property against colon cancer cell line. Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences 2018;4:1-17.
43. Carmichael J. The role of gemcitabine in the treatment of other tumours. Br J Cancer 1998;78:21-25.
44. Sarvepalli D, Rashid MU, Rahman AU, Ullah W, Hussain I, Hasan B, et al. Gemcitabine: a review of chemoresistance in pancreatic cancer. Critical Reviews™ in Oncogenesis 2019;24(2).
45. Wang F, Wang Y, Ma Q, Cao Y, Yu B. Development and characterization of folic acid-conjugated chitosan nanoparticles for targeted and controlled delivery of gemcitabinein lung cancer therapeutics. Artif Cells Nanomed B 2017;45(8):1530-1538.
46. Yuan YG, Peng QL, Gurunathan S. Silver nanoparticles enhance the apoptotic potential of gemcitabine in human ovarian cancer cells: combination therapy for effective cancer treatment. Int J Nanomedicine 2017;12:6487–6502.
47. Devi L, Gupta R, Jain SK, Singh S, Kesharwani P. Synthesis, characterization and in vitro assessment of colloidal gold nanoparticles of Gemcitabine with natural polysaccharides for treatment of breast cancer. J Drug Deliv Sci Tec 2020;56:101565.
48. Baharara J, Ramezani T, Divsalar A, Mousavi M, Seyedarabi A. Induction of Apoptosis by Green Synthesized Gold Nanoparticles Through Activation of Caspase-3 and 9 in Human Cervical Cancer Cells. Avicenna J Med Biotechnol. 2016;8(2):75-83.
49. Mata R, Nakkala JR, Sadras SR. Polyphenol stabilized colloidal gold nanoparticles from Abutilon indicum leaf extract induce apoptosis in HT-29 colon cancer cells, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016;143:499-510.