



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN  
ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**PANC-1 İNSAN PANKREAS KANSERİ HÜCRE  
HATTINDA BİYOLOJİK VE KİMYASAL  
OLARAK SENTEZLENEN GÜMÜŞ  
NANOPARTİKÜLLERİN HIF-1 SİNYAL  
YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Şevval ÖZKAYA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Haziran-2023  
KONYA  
Her Hakkı Saklıdır**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# PANC-1 İNSAN PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTINDA BİYOLOJİK VE KİMYASAL OLARAK SENTEZLENEN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN HIF-1 SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Şevval ÖZKAYA

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

2023, 114 Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU

Prof. Dr. Esma MENEVŞE

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Suna BALKAN NALÇAYI

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC), en agresif ve ölümcül katı tümörler arasında yer almaktadır ve kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedeni olduğu bilinmektedir. Pankreas kanserinde erken belirti olmadığı ve her iki cinsiyette de ileri yaşlarda teşhis edilebildiği için yıllar geçtikçe sağkalım oranı düşmektedir. Pankreas kanseri tedavisinde geçtiğimiz yüzyılda cerrahi tekniklerin iyileştirilmesi, adjuvan ve neoadjuvan tedavilerdeki gelişmeler dahil olmak üzere dikkate değer ilerlemeler kaydedilmiştir. Fakat pankreas kanseri insidansı küresel olarak artmaktadır ve ölümcül bir hastalık olmaya devam etmektedir. Bundan dolayı ilerlemiş pankreas kanseri katı tümörlerini tedavi edebilmek için yeni terapötik ajanların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yeşil sentez aracılı gümüş nanopartiküllerin (AgNP), yakında insanlarda pankreas kanserini tedavi etmek için yeni kemoterapötik takviyeler veya ilaçlar olarak kullanılabilmesi öngörülmektedir. Nanopartiküller, biyoyumlu oldukları ve geniş bir yüzey alanına sahip oldukları için çeşitli hastalıklar için etkili tekniklerin geliştirilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Özellikle bitki bazlı nanopartiküller, antibakteriyel aktivite, antikanser ve antiviral aktivite sergilediği için terapötik ilaçlar dahil olmak üzere tıpta yaygın olarak kullanıma potansiyeline sahiptir. Nanopartiküllerin biyolojik olarak sentezi, bitki özlerinin ve fizyolojik olarak aktif biyomoleküllerin her yerde bulunabilmesi nedeniyle kimyasal ilaçların kullanımına göre çok daha güvenilir bir yaklaşım olduğunu göstermektedir. Diğer nanopartiküllere oranla daha düşük maliyetli olan gümüş nanopartiküller son yıllarda, pankreas ve çeşitli kanserleri tedavi etmek için modern kemoterapötik ilaçlar olarak kullanılmıştır. Bu çerçevede yapılacak olan çalışmalar pankreas kanseri tedavisine büyük ölçüde katkı sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında konvansiyonel yöntemlerden farklı olarak mikrodalga aracılı yöntem ile *Crocus sativus* (Safran) stigma kısmının ekstraktı kullanılarak biyolojik olarak gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Biyolojik olarak sentezlenen AgNP ve ticari olarak satın alınan kimyasal AgNP'ler UV-Vis, TEM, FESEM-EDX, FTIR, XRD, DLS ve Zeta potansiyel yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Panc-1 insan pankreas kanseri ve HEK293 hücreleri artan konsantrasyonlarda biyolojik olarak sentezlenen AgNP, ticari olarak satın alınan kimyasal AgNP ve *Crocus sativus* (Safran) stigma kısmının ekstraktı ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. PANC-1 insan pankreas kanseri ve HEK293 normal hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri -4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile belirlenmiştir. MTT testi ile IC<sub>50</sub> dozu belirlendikten HIF1 transkripsiyon faktörü ve invazyon, metastaz, anjiyogenez, glikoz metabolizması ile ilgili hedef genleri olan VEGFA, FLT-1, GLUT1, Bcl-2 ve pro-apoptotik Bax genlerinde mRNA seviyesindeki değişiklikler qRT-PCR ile incelenmiştir. MTT testi sonucunda hücre proliferasyonunda doza bağlı olarak azalma, qRT-PCR sonucunda HIF-1 ve onun hedef genleri olan VEGFA, FLT-1, GLUT1, Bcl-2 gen ekspresyonlarında anlamlı bir şekilde azalma ve Bax geninde anlamlı bir şekilde artış tespit edilmiştir.

Bu çalışmada gerçekleştirilen sentez, ucuz, tek adımda gerçekleşen ve evre dostu bir yöntem olduğundan dolayı bitki aracılı sentez yaklaşımlarının AgNP'leri sentezlemek için daha güvenilir ve ekonomik bir yol olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda tüm veriler değerlendirildiğinde biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin normal HEK293 hücrelerine kimyasal AgNP'lerden daha az toksik etki göstermeleri nedeniyle daha güvenli oldukları belirlenmiştir. Biyolojik olarak sentezlenen AgNP'ler, tümör ilerlemesinin agresifliğini ve şiddetini artıran hipoksi durumunda aktive olan HIF1 sinyal yolağı üzerinde etkili sonuçlar sergilediği için pankreas kanserinde radyasyon ve kemoterapi tedavilerine direnç gibi mevcut kanser tedavisinin eksikliklerini gideren umut verici bir antikanser ilacı olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antikanser aktivite, *Crocus sativus* (Safran), Gümüş nanopartikül (AgNP), Hipoksi, Mikrodalga aracılı biyolojik sentez, Pankreatik duktal adenokarsinom

## ABSTRACT

## MS THESIS

### INVESTIGATION OF EFFECTS OF SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIZED BIOLOGICALLY AND CHEMICALLY ON HIF-1 SIGNAL PATHWAY IN PANC-1 HUMAN PANCREATIC CANCER CELL LINE

Şevval ÖZKAYA

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

Advisor: Asst. Prof. Dr. Emine Nedime KORUCU

2023, 114 Pages

#### Jury

Asst. Prof. Dr. Emine Nedime KORUCU

Prof. Dr. Esmâ MENEVŞE

Asst. Prof. Dr. Ayşe Suna BALKAN NALÇAYI

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most aggressive and lethal solid tumors and is the fourth leading cause of cancer-related deaths. Since pancreatic cancer has no early symptoms and can be diagnosed at an advanced age in both sexes, the survival rate decreases over the years. There have been remarkable advances in the treatment of pancreatic cancer over the past century, including improvements in surgical techniques and advances in adjuvant and neoadjuvant therapies. However, the incidence of pancreatic cancer is increasing globally and remains a fatal disease. Therefore, there is a need to develop new therapeutic agents to treat advanced pancreatic cancer solid tumors. It is envisaged that green synthesis-mediated silver nanoparticles (AgNPs) may soon be used as novel chemotherapeutic supplements or drugs to treat pancreatic cancer in humans. Nanoparticles play a critical role in the development of effective techniques for various diseases, as they are biocompatible and have a large surface area. In particular, plant-based nanoparticles have the potential to be widely used in medicine, including therapeutic drugs, as they exhibit antibacterial activity, anticancer and antiviral activity. The biological synthesis of nanoparticles shows that it is a much more reliable approach than the use of chemical drugs due to the ubiquitous availability of plant extracts and physiologically active biomolecules. Silver nanoparticles, which have lower cost compared to other nanoparticles, have been used as modern chemotherapeutic drugs to treat pancreatic and various cancers in recent years. The studies to be carried out in this framework will greatly contribute to the treatment of pancreatic cancer.

In this thesis study, unlike conventional methods, biological synthesis of silver nanoparticles was carried out using microwave-mediated method extract of *Crocus sativus* (Saffron) stigma part. Biologically synthesised AgNPs and commercially purchased chemical AgNPs were characterised by UV-Vis, TEM, FESEM-EDX, FTIR, XRD, DLS and Zeta potential methods. PANC-1 human pancreatic cancer and HEK293 cells were treated with increasing concentrations of biologically synthesised AgNP, commercially available chemical AgNP and *Crocus sativus* (saffron) stigma extract for 24 hours. The cytotoxic effects on Panc-1 human pancreatic cancer and HEK293 normal cell lines were determined by -4,5-dimethylthiazolyl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. After the IC<sub>50</sub> dose was determined by MTT test, changes in mRNA levels of HIF1 transcription factor and VEGFA, FLT-1, GLUT1, Bcl-2 and pro-apoptotic Bax genes, which are target genes related to invasion, metastasis, angiogenesis and glucose metabolism, were analysed by qRT-PCR. As a result of MTT assay, a dose-dependent decrease in cell

proliferation, a significant decrease in HIF-1 and its target genes VEGFA, FLT-1, GLUT1, Bcl-2 gene expressions and a significant increase in Bax gene were detected by qRT-PCR.

Since the synthesis carried out in this study is a cheap, one-step and environmentally friendly method, it was determined that plant-mediated synthesis approaches are a rather reliable and economical way to synthesise AgNPs. The results of the study showed that biologically synthesised AgNPs are safer than chemical AgNPs because they have less toxic effects on normal HEK293 cells. Biologically synthesised AgNPs may be a promising anticancer drug that overcomes the shortcomings of current cancer therapy, such as resistance to radiation and chemotherapy treatments in pancreatic cancer, as it exhibits effective results on the HIF1 signalling pathway, which is activated in the event of hypoxia that increases the aggressiveness and severity of tumour progression.

**Keywords:** Anticancer activity, *Crocus sativus* (Saffron), Silver nanoparticle (AgNP), Hypoxia, Microwave-mediated biological synthesis, Pancreatic ductal adenocarcinoma

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez konumu belirlerken isteklerimi göz önünde bulundurup fikirlerime değer veren, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, beraber çalışmaktan zevk aldığım ve hep alacağım, tüm zorluklara rağmen pes etmeden yoluma devam etmemde bana destek olan ve zamanla ailemden biri olan değerli hocam ve danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Emine Nedime KORUCU'ya,

Tez çalışma sürecimde düşüncelerinden yardım aldığım ve nanopartikül sentezinde bana destek olan, tez çalışmamın sonuçlandırılmasına kadar geçen süreçte bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her zaman yol gösteren ve destek olan, her ne olursa olsun motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan Doç. Dr. Fatih ERCİ'ye

Lisans döneminde aynı sıralarda oturduğum ve aynı evde kaldığım süre boyunca da tüm samimiyetle yolumuza devam ettiğimiz, tez çalışmalarım sırasında hiçbir zaman desteklerini esirgemedi yanımda olan meslektaşım, arkadaşım Pınar Elife DOĞAN'a,

Eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini hiç esirgemeyen, bana koşulsuzca sevildiğimi hissettiren, her zaman ne olursa olsun bana güvenen ve kararlarımı sorgulamadan beni destekleyen, emeklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem ve babama, bugüne kadar ihtiyacım olan tüm zamanlarda yanımda olan kardeşime, her zaman moral ve destekleriyle yanımda hissettiğim tüm arkadaşlarıma,

Bilimin destekçisi olan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) bünyesinde faaliyet gösteren Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında bana sağlamış oldukları burs desteği için,

sonsuz teşekkür ederim.

Şevval ÖZKAYA  
KONYA-2023

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ .....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>4</b>
2.1. Pankreas Anatomisi ve Pankreas Kanseri.....	4
2.2. Pankreas Kanseri Öncü Lezyon Tipleri .....	5
2.3. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi .....	8
2.4. Pankreas Kanseri Etiyolojisi.....	10
2.5. Pankreas Kanseri Evreleme Sistemi .....	12
2.6. Pankreas Kanseri Teşhis ve Tedavisi.....	13
2.7. Hipoksi.....	15
2.7.1. HIF (Hipoksi ile indüklenebilir faktör) Ailesi ve Yapıları .....	18
2.7.2. HIF-1 Sinyal Yolağı.....	20
2.7.3. HIF-1 Hedef Genleri .....	23
2.8. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller .....	25
2.8.1. Gümüş Nanopartiküller.....	27
2.9. Nanopartikül Sentezi İçin Yaklaşımlar .....	28
2.10. Nanopartikül Sentez Yöntemleri .....	30
2.10.1. Fiziksel Sentez .....	30
2.10.2. Kimyasal Sentez .....	31
2.10.3. Biyolojik Sentez.....	31
2.11. Nanopartikül Sentezini Etkileyen Faktörler .....	33
2.12. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	35

2.13. Gümüş Nanopartiküllerin Biyolojik Sentezi.....	38
2.14. Gümüş Nanopartiküllerin Antikanser Etkisi.....	39
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>42</b>
3.1. <i>Crocus sativus</i> (Safran) Bitkisinin Stigma Ekstraktının Hazırlanması.....	42
3.2. Gümüş Nitrat (AgNO <sub>3</sub> ) Sulu Çözeltilisinin Hazırlanması.....	42
3.3. Gümüş Nanopartiküllerin Biyolojik Sentezi ve Saflaştırılması.....	42
3.4. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu .....	43
3.5. Hücre Kültürü .....	43
3.5.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Pasajlanması.....	44
3.5.2. Hücrelerin Sayılması.....	44
3.6. Nanopartikül Dozlarının Uygulanması.....	44
3.7. Hücre Canlılık Analizi .....	45
3.8. RNA İzolasyonu ve Miktar Ölçümü .....	45
3.9. Agaroz Jel Hazırlanması, Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi .....	46
3.10. cDNA Sentezi .....	46
3.11. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) .....	47
3.12. İstatistiksel Analiz.....	48
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>48</b>
4.1. Araştırma Sonuçları .....	48
4.1.1. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi.....	48
4.1.2. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu .....	49
4.1.3. Doz Uygulaması Sonrası Hücrelerin Morfolojisi .....	56
4.1.4. Hücrelerin Canlılık Analizi.....	56
4.1.5. Jel Elektroforezinde RNA Örneklerinin Tayini.....	60
4.1.6. Panc-1 Hücre Hattına Uygulanan Dozların HIF1 $\alpha$ , GLUT1, FLT-1, VEGFA, Bcl-2 ve Bax Gen Ekspresyonlarına Etkisi.....	60
4.2. Tartışma .....	65
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>73</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>75</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kanserin ayırt edici özellikleri diyagramı.....	2
Şekil 2.1. Pankreasın anatomisi .....	4
Şekil 2.2. Pankreas kanserinde öncü lezyonların oluşum süreci .....	6
Şekil 2.3. Cinsiyete göre tahmini yeni kanser vakaları ve ölüm sayıları.....	9
Şekil 2.4. Pankreas kanserinde hipoksinin ayırt edici özellikleri.....	16
Şekil 2.5. Kronik ve döngüsel hipoksi oksijen-zaman grafiği.....	17
Şekil 2.6. Tümörde gözlenen hipoksi türleri.....	17
Şekil 2.7. HIF izoformlarının fonksiyonel domain yapıları.....	19
Şekil 2.8. HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijene bağlı düzenlenmesi.....	21
Şekil 2.9. Kanser hücrelerinde HIF-1 ekspresyon artışından etkilenen fizyolojik yanıtlar.....	22
Şekil 2.10. Nanopartiküllerin kullanıldığı alanlar.....	26
Şekil 2.11. Nanopartiküllerin sınıflandırılması.....	27
Şekil 2.12. Nanopartikül sentez yaklaşımları.....	29
Şekil 2.13. Bitki ekstrakt içeriği.....	32
Şekil 2.14. Biyolojik sentezin avantajları.....	33
Şekil 2.15. Nanopartiküllerin karakterizasyon yöntemleri.....	36
Şekil 2.16 AgNP'lerin bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenme süreci.....	39
Şekil 2.17 AgNP'lerin antikanser mekanizmalarının şematik diyagramı.....	40
Şekil 3.1. (A) <i>Crocus sativus</i> (safran) stigma ekstraktı, (B) gümüş nitrat sulu çözeltisi, (C) reaksiyon öncesi karışım ve (D) reaksiyondan sonraki gümüş nanopartikül karışımı görüntüsü.....	43
Şekil 4.1 <i>Crocus sativus</i> (safran) bitki stigma kısımlarından biyolojik AgNP sentezi .....	49
Şekil 4.2. UV-Vis spektrum analizi sonucu.....	49
Şekil 4.3. AgNP <sub>(b)</sub> (A) ve AgNP <sub>(k)</sub> (B) TEM analizi sonucu.....	50
Şekil 4.4. AgNP <sub>(b)</sub> (A) ve AgNP <sub>(k)</sub> (B) FE-SEM-EDX analizi sonucu.....	51
Şekil 4.5. AgNP <sub>(b)</sub> ve AgNP <sub>(k)</sub> XRD analizi sonucu.....	52
Şekil 4.6. Ekstrakt (A) ve AgNP <sub>(b)</sub> (B) FTIR analiz görüntüsü.....	53
Şekil 4.7. AgNP <sub>(b)</sub> (A) ve AgNP <sub>(k)</sub> (B) DLS analiz sonuçları.....	54

Şekil 4.8. AgNP <sub>(b)</sub> (A) ve AgNP <sub>(k)</sub> (B) Zeta potansiyel analiz sonuçları.....	55
Şekil 4.9. Doz uyguladıktan 24 saat sonra hücre morfoloji görüntüleri.....	56
Şekil 4.10. Hücre canlılık analizi aşamaları.....	57
Şekil 4.11. PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarına uygulanan AgNP <sub>(b)</sub> dozlarının hücre canlılığına etkisi.....	57
Şekil 4.12. PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarına uygulanan AgNP <sub>(k)</sub> dozlarının hücre canlılığına etkisi.....	58
Şekil 4.13. PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarına uygulanan ekstrakt dozlarının hücre canlılığına etkisi.....	59
Şekil 4.14. PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarına uygulanan AgNO <sub>3</sub> dozlarının hücre canlılığına etkisi.....	59
Şekil 4.15. RNA örneklerinin bant profili.....	60
Şekil 4.16. PANC-1 hücre hattına AgNP <sub>(b)</sub> , AgNP <sub>(k)</sub> ve ekstrakt IC <sub>50</sub> doz uygulanmasından 24 saat sonra HIF1 $\alpha$ gen ekspresyon değişimi.....	61
Şekil 4.17. PANC-1 hücre hattına AgNP <sub>(b)</sub> , AgNP <sub>(k)</sub> ve ekstrakt IC <sub>50</sub> doz uygulanmasından 24 saat sonra GLUT1 gen ekspresyon değişimi.....	62
Şekil 4.18. PANC-1 hücre hattına AgNP <sub>(b)</sub> , AgNP <sub>(k)</sub> ve ekstrakt IC <sub>50</sub> doz uygulanmasından 24 saat sonra FLT-1 gen ekspresyon değişimi.....	62
Şekil 4.19. PANC-1 hücre hattına AgNP <sub>(b)</sub> , AgNP <sub>(k)</sub> ve ekstrakt IC <sub>50</sub> doz uygulanmasından 24 saat sonra VEGFA gen ekspresyon değişimi.....	63
Şekil 4.20. PANC-1 hücre hattına AgNP <sub>(b)</sub> , AgNP <sub>(k)</sub> ve ekstrakt IC <sub>50</sub> doz uygulanmasından 24 saat sonra Bcl-2 gen ekspresyon değişimi.....	64
Şekil 4.21. PANC-1 hücre hattına AgNP <sub>(b)</sub> , AgNP <sub>(k)</sub> ve ekstrakt IC <sub>50</sub> doz uygulanmasından 24 saat sonra Bax gen ekspresyon değişimi.....	64

## TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Pankreas adenokarsinomu için önerilen AJCC evreleme sistemi.....	13
Tablo 2.2. Nanopartikül sentez yöntemleri.....	30
Tablo 3.1. Ekspresyon analizinde kullanılan genlere spesifik primer dizileri.....	47
Tablo 3.2. RT-PCR program özellikleri.....	48

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\delta$	Delta
$\varepsilon$	Epsilon
nm	Nanometre
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
rpm	Dakikada devir sayısı

### Kısaltmalar

NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü
SEER	Sürveyans, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar
NPCR	Ulusal Kanser Kayıt Programı
PDAC	Pankreatik Duktal Adenokarsinom
EMT	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
PanIN	Pankreatik İntraepitelyal Neoplazi
PANC-1	Pankreas Kanseri Hücre Hattı
MCN	Müsinöz Kistik Neoplazm
IPMN	İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazm
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
KRAS	Kristen Virüsü Ras
GNAS	Adenilat siklaz uyarıcı G alfa proteini
SMAD4	SMAD Aile Üyesi 4
CDKN2A	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
STK11	Serin Treonin Kinaz 11
PALB2	BRCA2'nin ortağı ve yerelleştiricisi
PRSS1	Serin Proteaz 1
AJCC	Amerikan Birleşik Kanser Komitesi
HIF-1	Hipoksi indüklenebilir faktör-1
NF- $\kappa$ B	Nükleer Faktör kappa B

VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
GLUT-1	Glukoz Taşıyıcı 1
FLT-1	Fms İlişkili Reseptör Tirozin Kinaz 1
Bcl-2	B-hücreli lenfoma 2
HRE	Hipoksi Cevap Elemanı
mRNA	Mesajcı RNA
AIF	Apoptozu İndükleyen Faktör
Bax	Bcl-2 ile ilişkili X apoptoz düzenleyici
Ag <sup>+</sup>	Gümüş iyonları
AgNP	Gümüş Nanopartiküller
SPR	Yüzey Plazmon Rezonansı
AgNO <sub>3</sub>	Gümüş Nitrat
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNA	Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FBS	Fetal Dana Serumu
FT-IR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
UV-Vis	Ultraviyole görünür bölge spektroskopisi
SPR	Yüzey plazmon rezonans
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
XRD	X Işını Kırınımı
EDX	Enerji Dağılımlı X- ışını Spektroskopisi
MTT	3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür
DMSO	Dimetil Sülfoksit
IC50	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon

## 1. GİRİŞ

Normal gelişim sırasında ve yetişkin yaşamı boyunca genetik kontrol sistemleri, büyüme sinyallerine, büyümeyi engelleyen sinyallere ve ölüm sinyallerine yanıt olarak hücre yaşamı ve ölümü arasındaki dengeyi düzenlemektedir (Lodish et al. 2003). Fakat proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğraması ya da epigenetik değişiklikler sonucu yanlış ifade edilmeleri ile gen yapısında hasar meydana gelmektedir. Dolayısıyla oluşan hasarlar sonucunda normal hücrelerdeki proliferasyon, büyüme, yaşlanma ve ölüm gibi biyolojik düzen bozulmaktadır ve hücrelerin kontrolsüz bölünme yeteneği kazanıp vücudun diğer bölgelerine yayılması sonucu kanser meydana gelmektedir (Baykara 2016).

Kanser hücrelerinin en bilinen ayırt edici özelliği kontrolsüz bölünme yeteneklerinin olmasıdır. 2000 yılında Hanahan ve Weinberg tarafından ufuk açıcı bir inceleme makalesinde, kanserin ilk 6 ayırt edici özelliği karakterize edilmiştir. Bu özellikler büyüme sinyallerinde kendi kendine yetme, büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçınmak, metastaz ve invazyonu aktiveleştirme, sınırsız bölünme potansiyeli geliştirme, anjiyogenezi (yeni damar oluşumu) tetikleme ve apoptoza karşı direnç gösterme başlıkları altında toplanmıştır (Hanahan and Weinberg 2000). Aynı araştırmacılar tarafından 2011 yılında yayımlanan makalede, enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi, immün sistemden kaçınma, iltihaplanma ve genomik kararsızlık olarak kanserin 4 özelliği daha bildirilmiştir (Hanahan and Weinberg 2011). Yıllar boyunca yapılan birçok deney doğrultusunda tümör gelişiminden sorumlu olduğu gösterilen önemli değişiklikleri içeren epigenetik yeniden programlama, yaşlanan hücreler, fenotipik plastisite kilidini açma ve polimorfik mikrobiyomlar olarak kanser hücrelerine 4 yeni özellik daha eklenmesiyle 14 ayırt edici özelliği olduğu bildirilmiştir (Şekil 1.1.) (Hanahan 2022). Bu son yayın tümör biyolojisinin karmaşıklığına önemli ölçüde ışık tutmaktadır. Ayırt edici özellikler diyagramının genişlemesi ise kanser biyolojisi hakkındaki bilgimizin son yıllarda nasıl geliştiğinin bir göstergesidir.

2020 yılında kanser tanı ve tedavisi, koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) pandemisinden olumsuz etkilenmiştir. Sağlık hizmeti ortamlarının kapanması ve COVID-19'a maruz kalma korkusu nedeniyle bakıma erişimin azalması, kanser insidansında kısa süreli bir düşüşe ve ardından ölüm ile sonuçlanacak ileri evre hastalıkta bir artışa neden olabilecek tanı ve tedavide gecikmelere sebep olmuştur (Siegel et al. 2022). Kanser, 20. yüzyılın en korkulan hastalıklarından biridir ve 21. yüzyılda insidansın

artmasıyla daha da yayılmaktadır. Dolayısıyla her dört kişiden biri yaşam boyu kanser riski taşımaktadır (Roy and Saikia 2016).

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki popülasyona dayalı kanser insidansı verileri, 1973'ten beri Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (NCI) SEER (Sürveyans, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar) programı ve 1995'ten beri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri'nin (CDC) Ulusal Kanser Kayıt Programı (NPCR) tarafından toplanmaktadır. Bu programlar aracılığıyla elde edilen verilere göre 2022 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 1.918.030 yeni kanser vakası ve 609.360 kansere dayalı ölümünün meydana geleceği tahmin edilmektedir ve bu da günde yaklaşık 1700 ölüme denk gelmektedir (Siegel et al. 2022). Bu verilere ek olarak Dünya genelinde 2030 yılına kadar 24.6 milyon, 2040 yılına kadar ise 30,2 milyon yeni kanser vakası ile karşı karşıya kalınacağı tahmin edilmektedir (<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>, erişim : 12/01/23).



Şekil 1.1. Kanser ayırt edici özellikleri diyagramı (Hanahan 2022).

Erkeklerde ve kadınlarda Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) akciğer, prostat veya meme ve kolon kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen ölüm nedeni pankreas kanseridir. Ancak, pankreas kanserinin herhangi bir katı tümörün aşamalarına göre en kötü hayatta kalma oranına sahip olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte 2030'da ABD'de kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olacağı tahmin edilmektedir (Rahib et al. 2014). Dolayısıyla hedefli kontrol edilebilen müdahaleler, gelişmiş erken teşhis ve tedaviye yönelik önlemlerin kanser mortalitesindeki azalmayı kolaylaştıracağı bilinmektedir. Önümüzdeki yıllarda mevcut kanser kontrol müdahalelerinin yaygın uygulamasına yatırımların artmasıyla, ileri tedavi seçenekleri temel ve klinik araştırmaların kanser ileri tedavisi seçeneklerinde ilerlemeyi hızlandıracağı düşünülmektedir (Siegel et al. 2022).

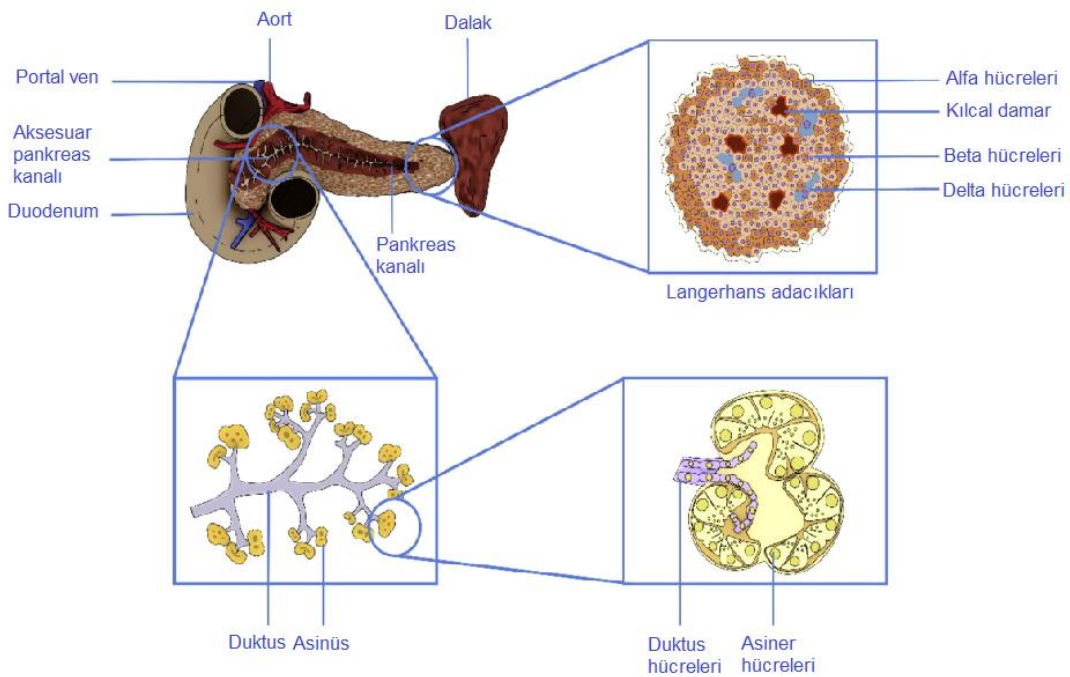
Nanopartiküller 1-100 nm arasında değişen boyutlardaki nanomalzemelerdir ve ambalajlama, tekstil, tarım, yenilenebilir enerji, ilaç taşınması, biyosensör ve kanser terapisi gibi kullanım alanlarına sahiptir. Ayrıca nanopartiküller hücre membranından kolay bir şekilde geçebilir ve intraselüler metabolizma ile etkileşebilir. Hücre ile nanopartikülün etkileşmesi ile mitokondriyal solunum, NADPH-bağımlı enzim sistemleri ve ROS üretimine yol açan prooksidan etkiler indüklenir. Nanopartiküllerin içselleştirilmesi üzerine de ROS üretimi indüklenir. Dolayısıyla biyolojik sistemlerde nanopartiküller toksik etkilere sebep olabildiği için toksisite çalışmalarının iyi yapılması gerekmektedir (Kumar, Sharma, and Maitra 2017). Bu doğrultuda yapılan çalışmalar ile gümüş nanopartiküllerin normal hücreler için sitotoksik olmadığı ve meme kanseri, servikal kanser, karaciğer kanseri, kolorektal adenokarsinoma, prostat karsinoma ve pankreatik duktal adenokarsinoma gibi çeşitli kanserlere karşı hem *in vitro* hem de *in vivo* antikanser etkisi olduğu anlaşılmıştır (Xu et al. 2020).

Son yıllarda literatürde bildirilmiş olan çalışmalar sonucunda bitkilerin farklı kısımları kullanılarak biyolojik olarak metal nanopartiküllerin sentezinin ve özellikle gümüş nanopartiküllerin (AgNP) pankreas kanserinin tedavisi için umut vadettiği bilinmektedir. Dolayısıyla elde edilen veriler doğrultusunda biyolojik olarak sentezlediğimiz AgNP'lerin antikanser etki sergilediği ve hipoksi durumunda pankreas kanseri gelişimini destekleyen HIF-1 sinyal yolağındaki HIF-1 gen ekspresyonu ve onun hedef genleri olan GLUT1, VEGFA, FLT-1, Bcl-2 gen ekspresyonlarının downregülasyonu ayrıca pro-apoptotik Bax gen ekspresyonunun upregülasyonu ile sonuçlarımızın pankreas kanseri tedavisi çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Pankreas Anatomisi ve Pankreas Kanseri

Pankreas, üst retroperitoneal boşlukta derin ve transvers olarak yer alır, birçok organla çevrilidir ve birçok önemli büyük damara yakın bulunmaktadır. Pankreas, zengin vasküler ve lenfatik sistemlere sahiptir. Yetişkin pankreası 15-20 cm uzunluğunda, 75-100 g ağırlığındadır ve dört bölümden (baş, boyun, gövde ve kuyruk) oluşmaktadır (Shi and Liu 2014). Pankreasın baş kısmı, oniki parmak bağırsağının yanında yer alır. Boyun, portal venin önünde bulunur, baş ve gövdeyi birbirine bağlar. Pilonun arkasında yer alan gövde boyundan devam eder ve splenik hiluma doğru uzanan kuyrukta son bulur (Şekil 2.1.) (Aier et al. 2019).



Şekil 2.1. Pankreasın anatomisi (Aier et al. 2019).

Pankreas, enerji tüketimi ve metabolizmanın kontrolünde merkezi bir role sahiptir. Ayrıca ekzokrin pankreas (asiner hücreler ve duktal hücreler) ve endokrin pankreas (Langerhans adacıkları) olmak üzere morfolojik ve işlevsel olarak farklı iki yapıdan oluşmaktadır. Ekzokrin pankreasta asiner hücreler; lipazlar, proteinazlar ve amilazlar dahil olmak üzere bir dizi sindirim enzimi üretir ve bu enzimler pankreas kanallarına salgılanarak yağları, proteinleri ve karbonhidratları emilim için parçalamak üzere ince bağırsağa akar. Enzimlerin ince bağırsağa akmasında ise duktal hücreler görev almaktadır. Endokrin pankreas, pankreasın toplam %5'inden daha azını temsil eder fakat yine de insanlarda bir milyardan fazla hücreye sahiptir. Beş ana adacık hücresi tipi

bulunmaktadır ve her biri bir temel hormonu sentezleyerek salgılamaktadır. Bu adacık hücreleri ve hormonlar şunlardır: insülin ( $\beta$ -hücreleri), glukagon ( $\alpha$ -hücreleri), somatostatin ( $\delta$ -hücreleri), pankreas polipeptidi (PP hücreleri) ve grelin ( $\epsilon$ -hücreleri). Bu hormonlar arasından insülin ve glukagon, yoğun bir adacık içi damar ağı aracılığıyla doğrudan kan dolaşımına salınarak kan şekeri seviyelerinin düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir (Zhou and Melton 2018).

Pankreas kanseri, pankreas duktal hücrelerinde adenokarsinom olarak adlandırılan glandüler yapıların epitel hücrelerinde oluşan tümörün genel adıdır ve tüm katı tümörlerin en ölümcül olanıdır. Pankreas kanseri, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen sebebidir ve insidansı giderek artmaktadır. Ayrıca pankreas kanserinin 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %5'tir. Vakaların büyük çoğunluğu sadece ileri aşamada teşhis edilebildiği için hastaların prognozu oldukça kötüdür. İlerleyen yıllarda pankreas kanserinin meme, prostat ve kolorektal kanserlerini geçeceği ve 2030 yılına kadar ABD'de kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olacağı tahmin edilmektedir (Rahib et al. 2014; Zhu et al. 2018).

Pankreas tümörlerinin büyük çoğunluğu ekzokrin pankreasta ortaya çıkmaktadır ve pankreatik duktal adenokarsinomu (PDAC) tümörlerin yaklaşık %95'ini oluştururken endokrin pankreasta (pankreatik nöroendokrin tümörler) ortaya çıkan tümörler, tüm pankreas tümörlerinin %5'inden azını temsil etmektedir (Amundadottir 2016).

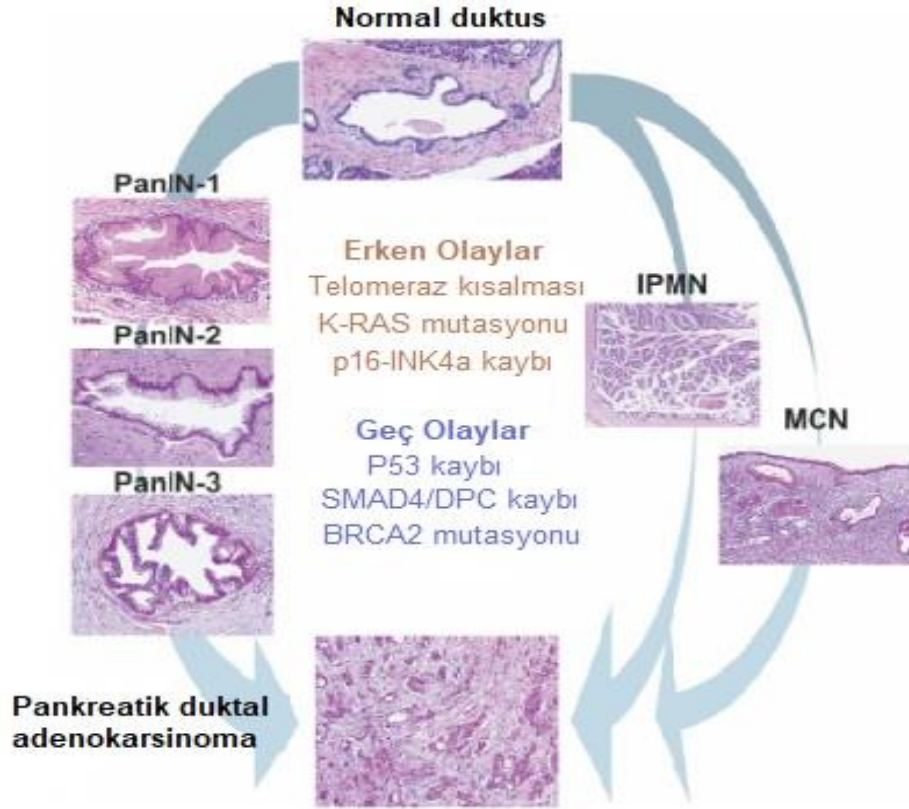
Pankreas kanserinin %80'inden fazlası sporadik mutasyonlardan kaynaklanır ve az sayıda vaka spesifik genetik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Pankreas kanseri kök hücrelerinde, esas olarak kromatin düzenleyici proteinlerdeki mutasyonlar ve epitel-mezenkimal geçişin (EMT) kontrolü sürecinde ortaya çıkan belirgin epigenetik değişiklikler vardır fakat bu değişiklikler genetik dizideki değişiklikleri içermemektedir (Perusina Lanfranca et al. 2019).

## 2.2. Pankreas Kanseri Öncü Lezyon Tipleri

Pankreas adenokarsinomu, normal mukozadan spesifik öncü lezyonlara ve nihayetinde invaziv maligniteye kadar bir dizi aşamalı mutasyonun ardından gelişmektedir. Bu malignitenin klinik ve histopatolojik çalışmalar ile pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN), müsinöz kistik neoplazm (MCN) ve intraduktal papiller müsinöz neoplazm (IPMN) olmak üzere üç PDAC öncü lezyonu tanımlamıştır. Bunlar, PDAC'e dönüşüm riski olan invaziv olmayan epitelyal neoplazmlardır. Bu üç öncü

lezyonun her biri kendine özgü klinik, patolojik ve moleküler özelliklere sahiptir (Şekil 2.2.)(Hezel et al. 2006; Smith, Singhi, and Maitra 2012).

MCN, 2010 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından epiteli çevreleyen bir yumurtalık stromasının varlığıyla tanımlanmıştır. Pankreatik MCN'ler doğal seyri tam olarak bilinmeyen premalign lezyonlardır (le Baleur et al. 2011). Hemen hemen sadece yaşı ortalama 40'ların başı ve sonlarında olan orta yaşlı kadınlarda %90-95 ihtimalle pankreasın kuyruğunda ve gövdesinde yerleşik olarak ortaya çıkmaktadır (Crippa et al. 2008; Jang et al. 2015). Pankreasın rezeke edilen kistik tümörlerinin yaklaşık %23'ünü oluşturmaktadır ve rezeksiyonu cerrahi kontrendikasyonu olan hastalar dışında rutin olarak önerilmektedir (le Baleur et al. 2011; Valsangkar et al. 2012).



Şekil 2.2. Pankreas kanserinde öncü lezyonların oluşum süreci (Hezel et al. 2006).

Gen mutasyonlarının %50-66'sını KRAS mutasyonu oluşturmaktadır ve literatürde RNF43 (Yüzük parmağı proteini 43), TP53 (tümör proteini p53) ve MUC4 (Müsin-4) gibi diğer mutasyonlar da bildirilmiştir. KRAS (Kristen virüs rat) mutasyonlarına sahip MCN'lerin yüksek dereceli lezyonlara ve invaziv kanser

bileşenlerine sahip olma olasılığının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, KRAS mutasyonlarının bu tümörlerin malign transformasyonunda yer aldığı düşünülmektedir (Fujikura et al. 2017).

IPMN, duktal tiplere ve morfolojik alt tiplere ayrılabilen pankreasın kistik neoplazmalarından biri olan heterojen bir lezyondur. Papiller çıkıntılar oluşturan hücre proliferasyonu ve kistik genişleme ile sonuçlanan müsin salgısıyla karakterizedir. Ayrıca pankreatik duktal sistemi kaplayan epitel hücrelerinden köken almaktadır ve epitel hücreleri, hafif, orta ve yüksek dereceli displaziden invaziv karsinoma kadar geniş bir displazi spektrumu sergilemektedir (Dumlu, Karakoç, and Özdemir 2015). Multifokal olmasına rağmen %20-40'ında pankreas başı kısmında tümör yerleşmektedir. Tüm pankreas tümörlerin %1-2'sinden daha azını oluşturan nadir pankreas tümörleridir (Castellano-Megías 2014). Erkekleri ve kadınları eşit derecede etkiler ve genellikle 60-70 yaşlarında teşhis edilir (Geramizadeh et al. 2021). Erken evrelerde belirlenmesi, uygun tedavi yaklaşımlarının uygulanması ve daha iyi prognoz için takip edilmesi önem arz etmektedir. Ana pankreatik kanalla (Wirsung kanalı) doğrudan iletişim kurmaları ve yumurtalık tipi stromanın olmaması ile MCN lezyonundan farklılık göstermektedir (Dumlu et al. 2015).

GNAS (adenilat siklaz uyarıcı G alfa proteini) geninde mutasyonları içeren nadir bir hastalık olan McCune-Albright sendromu gibi bazı genetik bozuklukların IPMN'e zemin hazırladığı bildirilmiştir (Gaujoux et al. 2014). IPMN'de GNAS (%58) ve KRAS (%78) genlerindeki mutasyonların, invaziv hastalık gelişmeden önceki erken karsinojenezde bile sıklıkla bulunduğu tespit edilmiştir. Daha az sıklıkla RNF43 (%38), TP53 (%9), SMAD4 (SMAD Aile Üyesi 4) (%5) ve CDKN2A (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A) (%3) mutasyonları saptanmıştır. GNAS geninde meydana gelen mutasyonlar, IPMN ile ilişkili olmayan diğer kistik neoplazma veya invaziv adenokarsinom ile karşılaştırıldığında özellikle IPMN için spesifik olduğu görülmektedir (Springer et al. 2015; Tan et al. 2015).

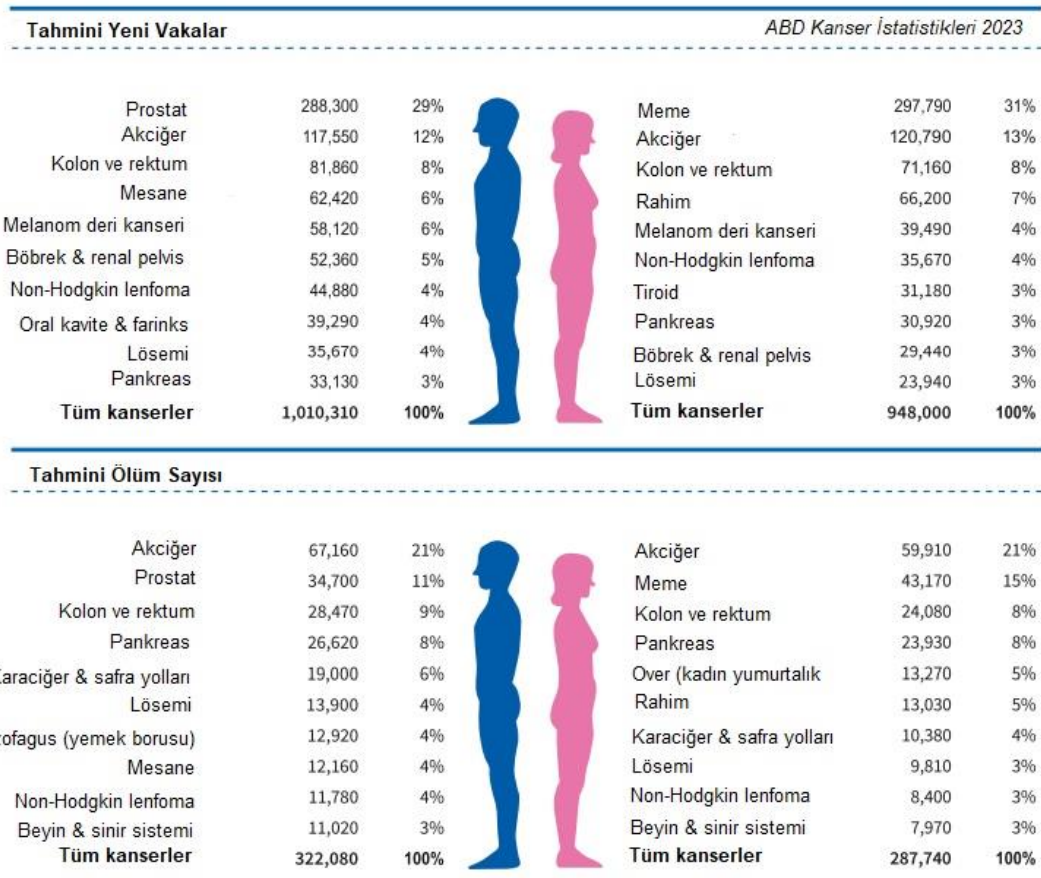
PanIN, genellikle 0.5 cm'den az olarak küçük pankreas kanallarında ortaya çıkan non-invaziv mikroskopik bir lezyondur ve küçük boyutlu oldukları için radyolojik yöntemler kullanılarak tanımlanamamaktadır. Değişen miktarlarda müsin içeren kolumnar epitel hücrelerinden oluşur ve düşük veya yüksek dereceli olarak en yüksek yapısal ve sitolojik atipi derecesine göre derecelendirilir (Basturk et al. 2015). PanIN-1 ve PanIN-2 düşük dereceli, PanIN-3 ise yüksek dereceli PanIN olarak sınıflandırılır.

Düşük dereceli PanIN'ler yaygın olarak gözlenir ve 50 yaşın üzerindeki genel popülasyonlarda tesadüfen gözlenir. KRAS mutasyonu ve telomer kısalması ise düşük dereceli PanIN'de meydana gelen en erken olaylardır. Hemen hemen tüm düşük dereceli PanIN'ler (>%99), KRAS mutasyonları içerir ve yüksek dereceli PanIN'lerde mutant alel frekansı önemli ölçüde artar. İnsan PDAC dokuları üzerine yapılan çalışmalar, KRAS kodon 12 mutasyonlarının, yüksek dereceli PanIN'de olduğu kadar düşük dereceli PanIN'de de oldukça yaygın olduğunu defalarca göstermiştir (Murphy et al. 2013; Pittman, Rao, and Hruban 2017). CDKN2A/p16 mutasyonu düşük dereceli PanIN'de bulunur fakat yüksek dereceli PanIN'lerde bu mutasyon daha sık görülür.

Genel olarak, TP53 geninin fonksiyon kaybının tümörlerin %75'inden fazlasında meydana geldiği ve yanlış anlamlı mutasyonlardan ve heterozigotluk kaybından kaynaklandığı bilinmektedir. TP53 mutasyonu, DNA hasarına veya hücresel strese yanıt olarak hücre döngüsü durmasını veya apoptozu teşvik edebilen spesifik genlerin eksprese edilememesiyle sonuçlanır. Çok erken dönemde meydana gelen ve PanIN'lerin gelişimini başlatan aktive edici KRAS mutasyonlarının aksine, TP53'teki mutasyonlar sadece yüksek dereceli PanIN lezyonlarında nadiren saptanabilir (Hoe, Verma, and Lane 2014). Ayrıca SMAD4'ün genetik değişiklikleri ilerlemiş PanIN lezyonlarında nadiren bulunur ve tümör gelişimini tanımlamak için son adımı temsil eder. (Yokode et al. 2018).

### **2.3. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi**

2023 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 1.958.310 yeni kanser vakası olacağı ve 609.820 kanser ölümünün meydana geleceği tahmin edilmektedir (Şekil 2.3.) (Siegel et al. 2023). Pankreas kanseri, çoğunlukla erkeklerde ve 60-85 yaş aralığındaki yaşlı erişkinlerde görülen, ölümcül bir risk taşıyan, oldukça invaziv bir malign tümördür. 2012-2018 yılları arasında toplanan istatistiksel verilere göre 5 yıllık sağkalım oranı %11.5 olarak tespit edilmiştir. Sağkalım düşük olduğu için pankreas kanserinden ölen insanların nüfus dağılımı, hastalık teşhisi konan insanlara benzer bir durum sergilemektedir. Erken teşhis zor olduğundan, pankreas kanserinden ortalama hayatta kalma süresi oldukça düşüktür (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>, erişim: 20/01/2023). Pankreas kanseri için yüksek ölüm oranı, neoplazmin teşhis edildiği ileri evreden kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı, PDAC'de sağkalımı artırmak amacıyla, hastalığı erken ve potansiyel olarak invaziv olmayan bir aşamada yani öncü lezyonlar aşamasında tespit etmek gerekmektedir (Singh and Maitra 2007).



**Şekil 2.3.** Cinsiyete göre tahmini yeni kanser vakaları ve ölüm sayıları (Siegel et al. 2023).

Pankreas kanserinde sıklıkla görülen belirtiler arasında asteni, kilo kaybı, anoreksiya, karın ağrısı, koyu renkli idrar, sarılık, bulantı, sırt ağrısı, ishal, kusma, steatore ve tromboflebit bulunmaktadır (Porta M. et al. 2005). Pankreas kanseri artık genç hastalarda giderek daha fazla görülmektedir. Bunun nedeni hastalığın erken belirtilerinin olmaması ve ek olarak çevre doku ve organları hızla istila edebildiği için en ölümcül kanserlerden biri olmasıdır (Zhao and Liu 2020).

Pankreas kanseri insidansı 2001'den bu yana giderek artmıştır ve yeni vakaların % 3.2'sini oluşturmaktadır. Ayrıca Amerika Birleşik Devletleri'ndeki hastalar için kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen ölüm nedeni olduğu saptanmıştır. ([https://seer.cancer.gov/report\\_to\\_nation/statistics.html#factors](https://seer.cancer.gov/report_to_nation/statistics.html#factors), erişim: 20/01/23). Yapılan araştırmalar sonucunda Türkiye'de tahmin edilen yeni kanser vakası (1000 kişide) 2020 yılında kadınlarda 3.57 ve erkeklerde 4.82 olarak bilinirken bu sayının 2040 yılında kadınlarda 6.7'e ve erkeklerde 9.16'a yükseleceği tahmin edilmektedir (<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>, erişim: 20/01/23).

## 2.4. Pankreas Kanseri Etiyolojisi

Pankreas kanseri için çok sayıda risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar değiştirilemeyen risk faktörleri (yaş, cinsiyet, bölge, kan grubu, aile öyküsü ve genetik yatkınlık, toksik maddelere maruz kalma) ve değiştirilebilir risk faktörleri (bağırsak mikroflorası, sigara, alkol, kronik pankreatit, obezite, diyet faktörleri, enfeksiyon) olarak iki genel başlık altında incelenmektedir. Bazı risk faktörleri tanımlanmış olmasına rağmen, bugüne kadar pankreas kanserinin nedenleri hala yeterince bilinmemektedir (Zhao and Liu 2020).

Pankreas kanseri erkeklerde kadınlara göre %30 daha fazla görülmektedir. Genel insidans hızı (100.000 kişide) erkekler için 13.9 iken kadınlar için 10.9'dur (Ferlay et al. 2015). 2022 Kanser İstatistiklerine göre Amerikan Kanser Derneği, Amerika Birleşik Devletleri'nde pankreas kanseri için erkeklerde yaklaşık olarak 32,970 yeni vaka, kadınlarda 29,240 yeni vaka tespit etmiştir. Tahmini ölüm ise erkeklerde 25,970 iken kadınlarda 23,870 olarak bildirilmiştir (Siegel et al. 2022). Erkekler ve kadınlar arasındaki pankreas kanseri oranlarındaki farklılıkların, sigara içmek gibi çevresel faktörlerden kaynaklanabileceğini, ancak erkeklerde ve kadınlarda kanser insidansını ve mortalitesini etkileyen henüz keşfedilmemiş genetik faktörlerin olabileceğini düşündürmektedir (Ferlay et al. 2015).

Diabetes mellitus hem kanserin sonucunda gelişir hem de pankreas kanseri için bir risk faktörüdür. Yeni teşhis konulan pankreas kanseri olan çoğu hastada diyabet başlangıcı veya diyabetlilerde hastalığın kötüleştiği bildirilmiştir. 3 yıl ve daha uzun devam eden diyabet, pankreas kanseri riskinin 1.5 ila 2.4 kat arasında artması ile ilişkilendirilmiştir (Hu et al. 2021).

Diyabet gibi, pankreatit de pankreas kanseri için bir risk faktörüdür. Çünkü pankreatitten kaynaklanan iltihaplanma ve hasar pankreas kanseri gelişimine yol açabilmektedir fakat pankreatit, pankreas kanserinin altında yatan bir sonuç olarak da gelişebilir (Yadav and Lowenfels 2013).

ABO kan grubunun karsinogenez veya pankreas kanserinin ilerlemesi ile ilişkili olabileceğine dair kanıtlar artmaktadır. Yapılan değerlendirmeler ile O olmayan kan grubunun, O kan grubuna kıyasla pankreas kanseri riskinin artmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu ilişkinin Asya ve Avrupa kökenli popülasyonlarda benzer olduğunu öne sürülmektedir. Fakat bu bulgular, daha geniş nüfusa dayalı ileriye dönük bir çalışma ile daha fazla desteklenmelidir (Ben et al. 2011).

Pankreas karsinomu olan hastaların yaklaşık %10'unda bilinen bir aile öyküsü vardır. Birinci derece akrabası pankreas kanseri olan bireylerin pankreas kanseri gelişme riskinde iki kat artış olduğu düşünülmektedir ve bu risk, pankreas kanseri öyküsü olan her birinci derece akraba ile artmaktadır. Pankreas kanserinin ailesel agregasyonuna yakınlık oluşturan birkaç gen tanımlanmıştır ve bunlar arasında BRCA2, CDKN2A/p16, STK11 (Serin Treonin Kinaz 11), PALB2 (BRCA2'nin ortağı ve yerleştiricisi) ve PRSS1 (Serin Proteaz 1) bulunmaktadır. Bu bilinen genler, ailesel pankreas kanseri vakalarının sadece küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Pankreas kanserinin ailesel kümelenmesinin çoğunluğunun genetik temeli halen tam olarak bilinmemektedir. (Smith et al. 2012). Shi ve arkadaşları tarafından yayınlanan makalede invaziv olmayan öncü lezyonların, pankreas kanseri aile öyküsüne sahip hastalarda daha sık görüldüğü ve ayrıca sporadik hastalığı olan hastalara göre pankreas kanseri öyküsü ve öncü lezyonların pankreas kanseri aile öyküsü olan hastalarda daha yüksek dereceli olduğu bildirilmiştir. Bu bulguların, pankreas neoplazisinin erken tespiti için tarama testlerinin tasarımı için bir temel oluşturabileceği düşünülmektedir (Shi et al. 2009).

2019 yılında yapılan bir meta-analiz çalışmasında pankreas kanseri, pankreatit ve pankreas kisti dahil olmak üzere ekzokrin pankreas hastalığının çeşitli etnik kökenler arasında farklılık gösterdiği ve Afrikalı-Amerikalılar ve bazı yerli popülasyonların bu hastalıkları geliştirme açısından daha fazla risk altında oldukları bildirilmiştir (Cervantes, Waymouth, and Petrov 2019). Huang ve ark., Afrikalı-Amerikalıların, Yerli Amerikalıların ve Japon-Amerikalıların pankreas kanseri gelişme oranlarının daha yüksek olduğunu, ancak Latin ve Avrupalı-Amerikalılar arasında bir fark olmadığını gözlemlemiştir ve Afrikalı-Amerikalıların, bilinen risk faktörlerine uyum sağladıktan sonra bile Avrupalı-Amerikalılardan %20 daha fazla pankreas kanseri riskine sahip olduğunu yayınlamıştır (Huang et al. 2019).

Pankreas kanserine neden olan tüm faktörler arasında en zararlı olanı sigaradır. Tütünde bulunan karsinojenler kan dolaşımı yoluyla kolayca pankreasa ulaşır. Birçok çalışma, tütün ürünlerinin pankreas kanserinin başlıca nedeni olduğunu ve sigara içenler için sigara içmeyenlere kıyasla iki kattan fazla risk oluşturduğunu doğrulamıştır. Halen sigara içen bireylerde pankreas kanseri riski %66, daha önce sigara içenlerde pankreas kanseri riski hiç sigara içmeyenlere göre %40 daha fazladır (Korc et al. 2017).

Pankreas kanserli 2187 hastada gerçekleştirilen kohort çalışması ile, günde 30 g'dan fazla alkol alımı ya da günde yaklaşık 2 alkollü içecek alımı ile hastalık riskinin

anlamli derecede arttiğı bulunmuştur. Ek olarak dűřuk ve orta derecede alkol alımının pankreas kanseri riski ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir (Genkinger et al. 2009).

Viral enfeksiyonlar ve pankreas arasındaki iliřkiye dair yapılan çalıřmada karaciđer kanseri için gűlű bir risk faktűrű olan Hepatit B'nin pankreas kanserine de yol açtıđı bildirilmiřtir (Ben et al. 2012). *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun PDAC geliřimine katkıda bulunduđu sistem tam olarak bilinmemekle birlikte kronik enfeksiyonla iliřkili inflamatuvar mediatűrler ve anjiyojenik faktűr sekresyonu ile iliřkili olabileceđi ve dolayısıyla pankreas kanseri insidansını artırabileceđi dűřűnűlmektedir fakat bu bulguları dođrulamak için daha fazla arařtırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Xu et al. 2022).

řu anda, pankreas kanserinin etiyolojisi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır ve arařtırmacıların pankreas kanseri ile iliřkili risk faktűrlerini daha iyi anlamak ve pankreas kanseri hastalarının hayatta kalmasını uzatacak yeni tanı ve tedavi yűntemleri bulmak için daha bűyűk ۆlekli arařtırmaların yapılması gerekmektedir.

## **2.5. Pankreas Kanseri Evreleme Sistemi**

Pankreas kanserinde uygun tedavi yaklařımını belirlemek amacıyla ۆncelikle tűműr evrelemesinin yapılması gerekmektedir űnkű kanserin evresine bađlı olarak uygulanacak tedavi yűntemleri deđiřkenlik gűstermektedir. Amerikan Birleřik Kanser Komitesi (AJCC), katı tűműr evrelemesi için genellikle ű faktűre dayanan ortak bir TNM evreleme sistemi geliřtirmiřtir. T tűműrűn boyutunu ve geniřliđini, N kanserin komřu lenf dűđűmlerine yayılıp yayılmadıđını ve M kanserin vűcudun uzak bűlgelerine yayılıp yayılmadıđını ifade etmek için kullanılmaktadır (Edge, Byrd, and Compton 2010). T1, T2, T3 ve T4 olarak kategorize edilmesi ile primer tűműrűn çapı ve rezeke edilip edilemeyeceđi hakkında ayrıntılı bilgi edinilir. N0, N1 ve N2 bűlgesel lenf dűđűmű olup olmadığını eđer varsa kaç lenf dűđűműnde bűlgesel lenf dűđűmű olduđunu ifade eder. M0 ve M1 ise uzak metastaz olup olmaması ile ilgili ayrıntılı bilgi sađlar. Bu bilgiler dođrultusunda pankreas kanserinde TNM evrelemesi ile kanserin hangi ařamada olduđu tespit edilmektedir. Bundan dolayı tedavi stratejisinin belirlenmesinde ve terapűtik klinik deneyler için benzer prognoza sahip hastaların seçiminde evre tespiti kritik rol oynamaktadır (Allen et al. 2017; Edge and Compton 2010).

2016 yılının Ekim ayında yayınlanan AJCC Kanser Evreleme Kılavuzunun 8. Baskısı, klinik olarak önemli tüm anatomik bölgeler için yetişkin pankreas kanserinin evrelenmesine ilişkin mevcut tüm bilgilerin bir özeti niteliğindedir (Tablo 2.1.) (Allen et al. 2017).

**Tablo 2.1.** Pankreas adenokarsinomu için önerilen AJCC evreleme sistemi (8. baskı).

Primer Tümör (T)	Bölgesel Lenf Dğümleri (N)	Uzak Metastaz (M)
T1 Tümör çapı 2cm den küçük ve pankreasta sınırlı	N0 Bölgesel lenf nodlarına metastaz yok	M0 Uzak metastaz yok
T2 Tümör çapı >2 ≤4 ve pankreasta sınırlı	N1 1-3 bölgesel lenf nodu metastazı var	M1 Uzak metastaz var
T3 Tümör çapı 4 cm den büyük	N2 ≥4 bölgesel lenf nodu metastazı var	
T4 Tümörün çölyak aksı veya superior mezenterik arteri tutması (rezeke edilemeyen primer tümör)		

EVRE			
Evre IA	T1	N0	M0
Evre IB	T2	N0	M0
Evre IIA	T3	N0	M0
Evre IIB	T1-T3	N1	M0
Evre 3	T1-T4	N2	M0
	T4	N0-N1	M0
Evre 4	T1-T4	N0-N1	M1

AJCC, Amerikan Birleşik Kanser Komitesi

## 2.6. Pankreas Kanseri Teşhis ve Tedavisi

Pankreas kanserinin artık genç hastalarda görülme sıklığı giderek artmaktadır. Hastalığın erken belirtileri olmadığından ve çevredeki dokuları ve organları hızla istila edebildiğinden, en ölümcül kanserlerden biridir. Dolayısıyla pankreas kanserinin saptanma ihtimalini ve hayatta kalma oranlarını artırmak için erken tanı seçeneklerinin belirlenmesi gerekmektedir ki bu da bu alanda daha fazla araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir (Zhao and Liu 2020). Bu nedenle, pankreas kanserini potansiyel olarak tedavi edilebilmesi mümkün olan en erken aşamada saptamak ve öncü lezyonları belirlemeye odaklanılmıştır.

Pankreas kanseri genellikle bilgisayarlı tomografi (CT) ve manyetik rezonans kolanjiyopankreatografi (MRCP) ile birlikte manyetik rezonans görüntüleme (MRI), endoskopik retrograd kolanjiyopankreatografi (ERCP), endoskopik ultrasonografi (EUS), pozitron emisyon tomografisi (PET), çok dedektörlü bilgisayarlı tomografi (MDCT) gibi radyolojik yöntemler ve laboratuvar tetkikleri ile saptanmaktadır (Yamaue H (Ed) 2017).

Pankreas kanserli hastalarda gözlenen semptomları hafifletmek ve yaşam kalitesini artırmak için palyatif tedavi uygulanmaktadır. Klinik olarak pankreas kanseri hastalarında ya pankreas yatağındaki nosiseptörlere doğrudan invazyon ya da çölyak

pleksus iltihabına yol açan pankreas dokusunun harabiyeti nedeniyle sırtta yayılan şiddetli epigastrik ağrı görülür. Genellikle pankreas kanserine bağlı bu kronik ağrılar için narkotik analjezikler ve çölyak pleksus nörolizisi ilk tedavi seçeneği olarak tercih edilmektedir (Wiebe 2012). Pankreas kanseri ilerlemiş hastaların sıklıkla beslenme sorunu bulunmaktadır ve yarısından fazlasında yavaş mide boşalması ile seyreden malign gastroparezi (mide felci) görülmektedir. Bu sebeplerden dolayı hastalarda erken doyma, kilo kaybı, bulantı, kusma meydana gelmektedir ve bu sorunların üstesinden gelebilmek için antiemetik bir ilaç olan metoklopramid kullanılması önerilmektedir (Sakamoto et al. 2022).

Whipple ameliyatı (Pankreatikoduodenektomi), tümör veya tümörlerin anatomik yerleşimine bağlı olarak pankreas kanseri rezeksiyonu için kullanılan cerrahi bir yöntemdir. Cerrahi, pankreatik kanserin tedavisinde kritik bir rol oynamaktadır ve günümüzde cerrahi teknik kadar cerrahi uygulama modellerindeki birçok ilerleme de perioperatif morbidite ve mortalitenin azalmasına katkı sağlamıştır (Mohammed, van Buren, and Fisher 2014).

Pankreas kanseri tedavisinde palyatif ve cerrahi tedaviye ek olarak radyasyon tedavisi ve sistemik tedaviler (kemoterapi, immünoterapi, hedefe yönelik tedavi) de kullanılmaktadır. Radyasyon tedavisi rezeke edilemeyen tümörlerde tek başına veya kemoterapi ile kombine edilerek kemoradyoterapi olarak uygulanabilmektedir. Kemoterapi tedavisinde sisplatin, irinotekan, paklitaksel ve oksaliplatin gemitabin veya 5-florourasil (5-FU) ile birlikte ya da tek başına kullanılan ilaçlardır. Çeşitli hücresel yolları hedefleyen bu ilaçlar, kanser ve sağlıklı hücreler arasında ayırım yapamadığı için önemli yan etkilere neden olmaktadır (Conroy et al. 2011; Ercan, Karlitepe, and Ozpolat 2017; Ettrich and Seufferlein 2021; Gupta, Amanam, and Chung 2017). Geleneksel gemitabin veya 5-fluorourasil (5FU) kemoterapisi yalnızca %0-10'luk bir yanıt oranına sahiptir ve bu nedenle tümörlerin evresini düşürmek için yeterli değildir. Modifiye edilmiş FOLFIRINOX (5-fluorourasil+oksaliplatin+irinotekan+ lökovorin) gibi mevcut çok ajanlı tedavi seçenekleri, metastatik pankreas kanseri olan hastaların uzun süreli sağkalımını iyileştirmektedir fakat daha etkili sistemik tedavilere ve tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Conroy et al. 2011).

Pankreas kanseri tedavisinde geçtiğimiz yüzyılda cerrahi tekniklerimizin iyileştirilmesi ve adjuvan ve neoadjuvan tedavilerdeki gelişmeler dahil olmak üzere dikkate değer ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu gelişmelere rağmen, pankreas kanseri

insidansı küresel olarak artmakta ve ölümcül bir hastalık olmaya devam etmektedir (Torphy, Fujiwara, and Schulick 2020).

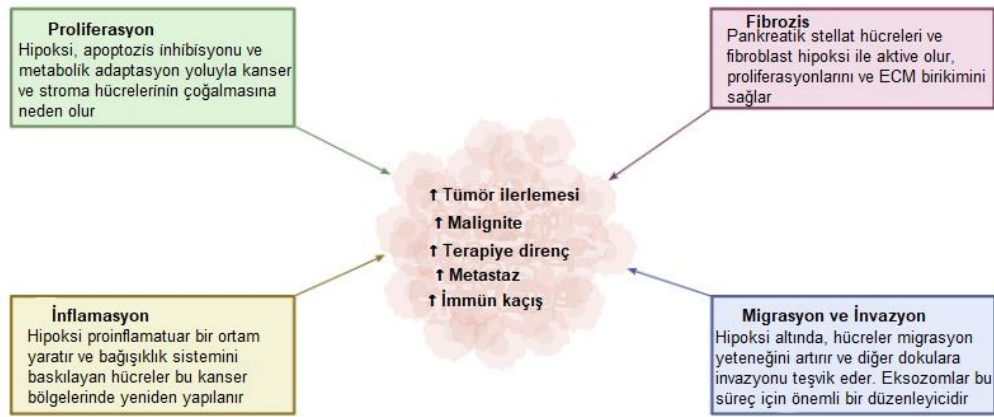
Son yıllarda, gümüş nanopartiküller pankreas, meme, prostat ve kan kanserleri gibi çeşitli kanserleri tedavi etmek için modern kemoterapötik ilaçlar olarak kullanılmıştır. Yeşil sentez aracılı gümüş nanopartiküllerin, yakında insanlarda pankreas kanserini tedavi etmek için yeni kemoterapötik takviyeler veya ilaçlar olarak kullanılabilceği öngörülmektedir (J. Guo et al. 2020). Bilim adamları şifalı bitkilerin yeşil sentezlenmiş metalik nanopartiküllerinin mükemmel antikanser özelliklerine sahip olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Bundan dolayı da metalik nanopartiküller son yıllarda tıp alanında kayda değer bir ilgi görmüştür. Günümüzde yapılan bazı çalışmalar, bazı nanopartiküllerin tedavi edici özelliklere sahip olduğunu ve fizikokimyasal olarak farklı metal destekli nanopartiküllere, antibakteriyel ve özellikle kanser önleyici ilaçlara mükemmel bir alternatif olduğunu göstermiştir (Liu et al. 2022).

## 2.7. Hipoksi

Vücuttaki oksijen ( $O_2$ ) seviyesi, belirli dokunun konumuna ve fizyolojik durumuna bağlı olarak büyük ölçüde değişiklik göstermektedir (Carreau et al. 2011). Sağlıklı dokularda,  $O_2$  konsantrasyonu akciğerlerde %20 iken alveollerde ~%13'e ve dolaşımında ~%5'e düşmektedir (Hung et al. 2012). Memeli hücreleri hayatta kalmak için  $O_2$  ve besin maddelerine ihtiyaç duymaktadır ve memeli dokusunda  $O_2$  seviyesinin ortalama %2-%9 (ortalama 40 mmHg) civarında olduğu bilinmektedir (Carmeliet P. and Jain R. K. 2000).

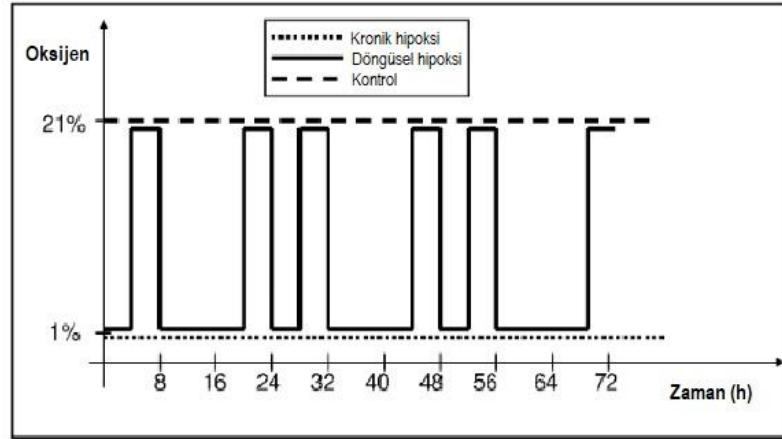
Hipoksi ilk olarak 1950'lerde Thomlinson ve Gray tarafından akciğer karsinomunda gözlenmiştir (Thomlinson and Gray 1955). Genellikle  $\leq$ %2  $O_2$  olarak tanımlanırken, şiddetli hipoksi veya anoksi  $\leq$  %0,02  $O_2$  olarak tanımlanır (Bertout, Patel, and Simon 2008). Dokuların oksijen seviyelerinin normal fizyolojik oksijenlenmesinden daha düşük olduğu bir durum olan hipoksi, pankreas kanseri dahil olmak üzere lokal olarak ilerlemiş solid tümörlerin %50-60'ında ortak bir özelliktir ve pankreas, prostat, serviks, meme, baş ve boyun kanserleri dahil olmak üzere birçok kanserde kötü prognozun bir göstergesidir (Tan et al. 2020; Vaupel and Mayer 2007). Pankreas kanserinde hipoksik durum iyi belgelenmiştir ve yapılan çalışmalarda sağlıklı pankreasta ortalama  $O_2$  düzeyi %6,8 iken pankreas kanserinde ise %0,4 olduğu saptanmıştır.  $O_2$  seviyesindeki bu 17 kat azalmanın diğer tümörlerle karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu anlaşılmaktadır (Koong et al. 2000).

Normal hücreler uzun süreli hipoksiye dayanamaz, besin yetersizliği ve oksijen yoksunluğuna bağlı olarak apoptoz veya nekroza maruz kalır. Kanser hücreleri ise kanserin çeşitli ayırt edici özellikleri olan metabolik yeniden programlama, proliferasyon ve anjiyogenez gibi çeşitli hücresel süreçlerde yer alan genlerin ekspresyonunu değiştirerek hipoksiye uyum sağlamaktadır (Şekil 2.4.) (Hanahan and Weinberg 2011).



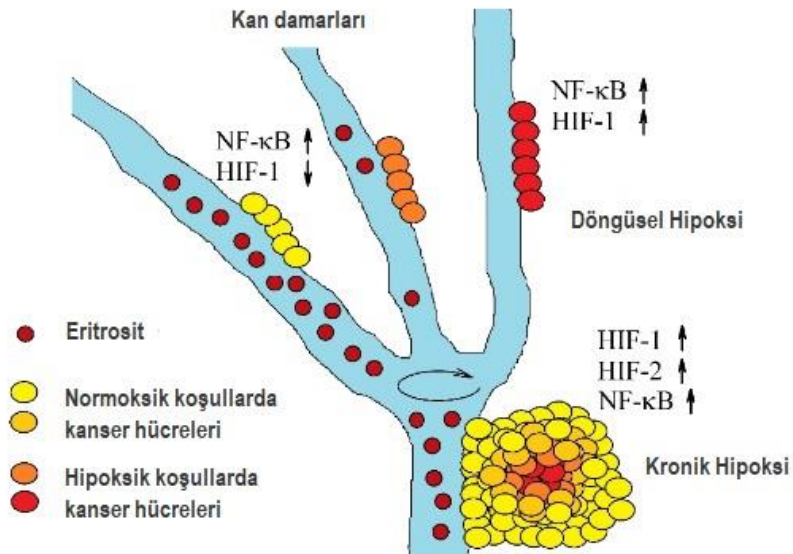
**Şekil 2.4.** Pankreas kanserinde hipoksinin ayırt edici özellikleri (Estaras and Gonzalez 2021).

Hipoksi, tümör ilerlemesinin agresifliğini ve şiddetini arttırmaktadır. Tümör kitlesi içinde kronik (sürekli, kesintisiz) ve döngüsel (geçici, aralıklı) hipoksi olmak üzere iki tür hipoksi meydana gelebilir. Tümör gelişiminin erken evrelerinde, kan damarlarının sağladığı oksijen yetersiz kalır ki bu da kronik hipoksiye sahip alanların oluşmasına neden olmaktadır. Tümör gelişiminin ileri aşamalarında ise tümör tarafından tümörün çeşitli kısımlarında periyodik ve döngüsel oksijen eksikliklerine yol açan yapısal anormalliklere sahip kan damarları üretilmektedir. Bu tür hipoksi de döngüsel hipoksi olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.5.). Her iki hipoksi türü de kanser hücrelerinin anjiyogenezine ve migrasyonuna yol açtığı için kanserin gelişiminde önemli olan birçok çeşitli genin ifadesinde değişikliklere neden olmaktadır. İki tip hipoksi kıyaslandığında döngüsel hipoksinin agresif tümör hücre fenotipini ve radyodirenci kronik hipokside daha belirgin şekilde indüklediği gösterilmiştir fakat bu fenomenin altında yatan moleküler mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılmamıştır (Lanzen et al. 2006; Olbryt et al. 2014).



Şekil 2.5. Kronik ve döngüsel hipoksi oksijen-zaman grafiği (Olbryt et al. 2014).

Kronik hipoksi aşamasında HIF-1 (Hipoksi indüklenebilir faktör-1) ve HIF-2 (Hipoksi indüklenebilir faktör-2)'nin aktivasyonunda ve hipoksi ile indüklenebilir genlerin ekspresyonunda artış görülürken döngüsel hipoksi aşamasında HIF-1'in aktivasyonuna NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonu eşlik etmektedir (Şekil 2.6.). Bununla birlikte, bireysel transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon mekanizmasında önemli ölçüde farklılık gösterirler. Döngüsel hipokside, HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu sonraki döngülerle daha güçlü ve daha uzun sürmektedir. Kronik hipokside HIF- $\alpha$  ekspresyonundaki artış oksijendeki azalmaya bağlıken döngüsel hipokside reaktif oksijen türlerine (ROS) bağlı olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla kronik hipokside çok daha yüksek bir proinflamatuvar gen ekspresyonunu indüklemektedir (Hsieh et al. 2010; Mahon, Hirota, and Semenza 2001; Ravenna et al. 2014; Tellier et al. 2015).



Şekil 2.6. Tümörde gözlenen hipoksi türleri (Korbecki et al. 2020).

HIF-1 $\alpha$ , intratümöral hipoksinin yanı sıra onkogenlerdeki fonksiyon kazancı mutasyonları (örneğin, ERBB2 ve SRC) ve tümör baskılayıcı genlerdeki fonksiyon kaybı mutasyonları (örneğin VHL, PTEN, p53 ve ARF) gibi genetik değişikliklerin bir sonucu olarak insan kanserlerinde aşırı eksprese edilmektedir (Semenza 2003).

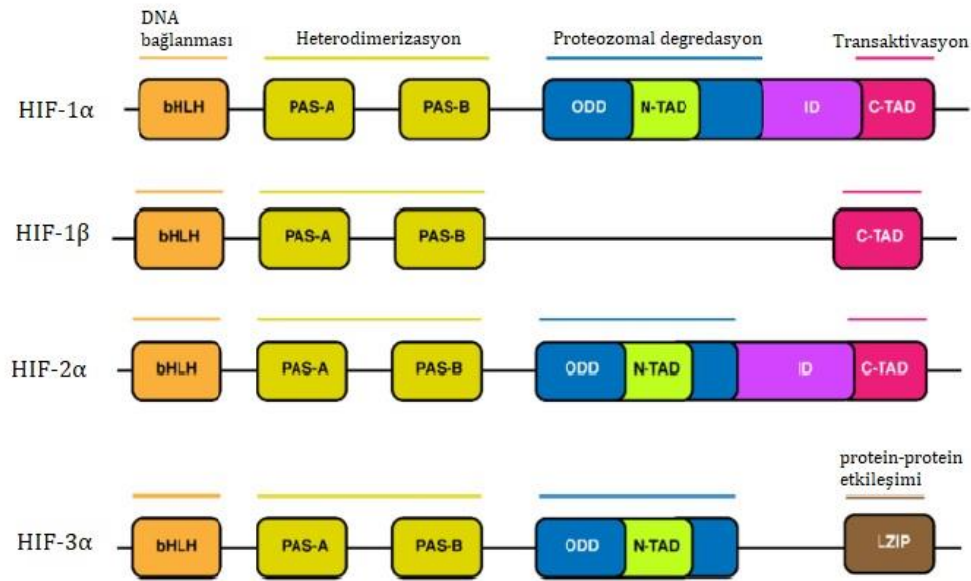
### 2.7.1. HIF (Hipoksi ile indüklenebilir faktör) Ailesi ve Yapıları

Kanser hücreleri, hipoksiye uyum sağlama yeteneklerinden yararlanarak onları daha agresif biyolojik davranışlar sergiler hale getiren özel bir transkripsiyonel program başlatmaktadır. Hipoksi ile indüklenebilir faktörler (HIF'ler), kanser progresyonunda ve tedavi direncinde rol oynayan çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyerek hipoksi ile indüklenebilir yolları kontrol eden anahtar faktörlerdir (Yu, Tang, and Sun 2017).

HIF ailesinde üç üye (HIF-1, HIF-2 ve HIF-3) bulunmaktadır. HIF'ler oksijene duyarlı  $\alpha$  alt birimlerinden ve oksijene duyarlı olmayan aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokatorü (ARNT) olarak da bilinen HIF-1 $\beta$  alt biriminden oluşan heterodimer yapılarıdır (Şekil 2.6). Bu üyeler arasında HIF-1 $\alpha$ , memeliler üzerinde yapılan yapısal ve fonksiyonel çalışmalar ile en iyi karakterize edilen izoformdur. Kromozom 14q21-24 içinde bulunan HIF1A geni tarafından kodlanmaktadır ve 15 ekzondan oluşan bir transkripsiyon faktördür. HIF-1 $\alpha$  826 amino asitten ve HIF-1 $\beta$  789 amino asitten oluşmaktadır. 120-kDa'luk bir polipeptit alt birimi olan HIF-1 $\alpha$ , transkripsiyon faktörü HIF-1'i oluşturmak için 91-94-kDa'luk bir polipeptit alt birimi olan HIF-1 $\beta$  ile heterodimerize olmaktadır. HIF-1 $\alpha$ 'nın protein stabilizasyonu, hücre içi lokalizasyonu ve transkripsiyonu oksijen seviyesinden etkilenirken;  $\beta$  (ARNT) alt birimi yapısal olarak ifade edilmektedir ve oksijen seviyelerinden etkilenmemektedir (Şahin Calapoğlu 2016).

HIF izoformları ve HIF-1 $\beta$ , bir bHLH (temel sarmal-döngü-sarmal, basic helix loop helix) domaini ve iki PAS (PER-ARNT, arilhidrokarbon reseptörü nükleer translokator) -SIM) domaini bulundurmaktadır. PAS dizisine karboksi-terminalde bulunan 40-45 amino asit bölgesinden oluşan ve muhtemelen PAS yapısal alanına katkıda bulunan PAS ile ilişkili COOH-terminal (PAC) alanı da bulunmaktadır. HIF'ler arasında bHLH ve PAS domainleri yüksek sekans benzerliğine sahiptir. Ayrıca bHLH ve PAS domainleri, HIF-1 $\alpha$  ve HIF-1 $\beta$  arasında heterodimerizasyona aracılık ederken, bHLH alanının N terminalinden önceki alanlar HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  heterodimerinin hedef gen promotorlarının HRE-DNA (Hipoksi cevap elemanı- Deoksiribonükleik asit) (5'-TACGTG-3') motifine bağlanmasında görev almaktadır (Fath et al. 2023; Infantino et al. 2021; Martin, Castaneda Patlan, and Robles Flores 2017).

HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  hem N-terminal transaktivasyon (N-TAD) hem de C-terminal transaktivasyon (C-TAD) alanı içermektedir. Bu iki alan normoksik koşullarda transkripsiyonel aktivitenin baskılanmasından sorumlu olan inhibitör alan (ID) olarak bilinen bir bölge ile ayrılmaktadır. HIF-3 $\alpha$  sadece N-TAD alanı, HIF-1 $\beta$  alt ünitesi ise C-TAD alanı bulundurmaktadır. Ayrıca HIF-1 $\alpha$ 'nın hedef gen aktivasyonuna aracılık eden transaktivasyon kabiliyeti C-terminal bölgesinde (C-TAD) bulunmaktadır. N-TAD alanı ise, ek transkripsiyonel kofaktörlerle etkileşime girerek hedef gene özgüllük vermektedir. C-TAD alanına CBP (CREB-binding protein), p300, SRC-1 (Steroid Reseptörü Koaktivatörü-1) ve TIF-2 (Transkripsiyon Aracı Faktör-2) koaktivatörleri bağlanarak HIF hedef genlerinin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır ve HIF aktivitesi için gereklidir. Her üç üye (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  ve HIF-3 $\alpha$ ) de iki prolin kalıntısının hidroksilasyonuna ve bir lizinin asetilasyonuna ve ardından proteozomal bozunmaya aracılık eden oksijene bağımlı bozunma (ODD) alanını içermektedir. Ek olarak HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  üyeleri 718-721. Aminoasitler arasında nükleer lokalizasyon sinyal (NLS) bölgesine sahiptir. Bu bölge ise HIF-1 $\alpha$ 'nın hücre çekirdeğinde birikmesinden sorumludur (Şekil 2.7.) (Martin et al. 2017).



Şekil 2.7. HIF izoformlarının fonksiyonel domain yapıları (Infantino et al. 2021).

HIF-2 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$  ile yapısal benzerlikler paylaşırken farklı bir ekspresyon modeline ve fonksiyonel özelliklere sahiptir. Tüm hücrelerde eksprese olan HIF-1 $\alpha$  'dan farklı olarak HIF-2 $\alpha$ , embriyonik hücrelerde ve yetişkin vasküler endotel hücrelerinde, akciğerlerde, plasentada ve kalpte bol miktarda eksprese olmaktadır. Ek olarak transkripsiyonel hedeflerinde de farklılıklar bulunmuştur. Literatürde bildirildiği gibi

HIF-1 $\alpha$  farklı metabolik yollarda yer alırken, HIF-2 $\alpha$  daha çok eritropoietin (EPO) geni ve demir (Fe) metabolizması üzerinde etkilidir. Ayrıca her iki üyeninde VEGF ve GLUT-1 gibi diğer genlerin ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir (Iyer, Leung, and Semenza 1998).

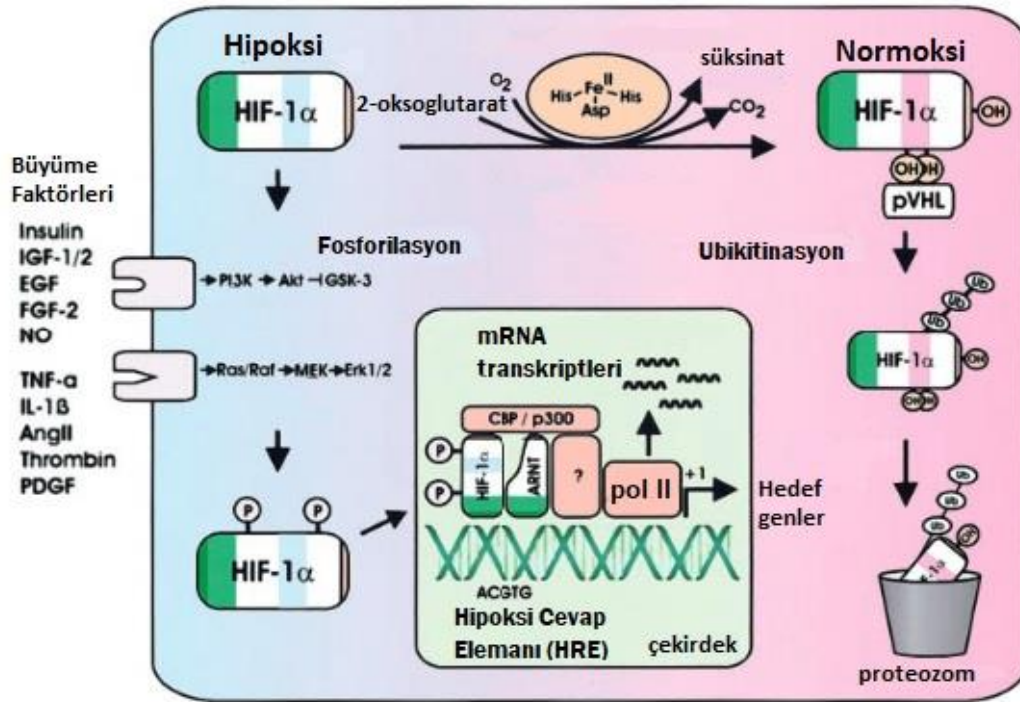
HIF-3 $\alpha$ , diğer üyelerden farklı olarak proteinler arasındaki etkileşimden sorumlu olan bir lösün fermuar (LZIP- leucine zipper) alanı bulundurur. Ek olarak, HIF-1 $\beta$  ile heterodimerize olabildiği ve deneysel kanıtlar ile hipoksi altında yetişkin farelerde timus, akciğer, beyin, kalp ve böbreklerde eksprese edildiği gösterilmiştir. Birden fazla HIF-3 $\alpha$  varyantı bulunmuştur ancak bunların spesifik fonksiyonel aktiviteleri hala tam olarak bilinmemektedir (Heidbreder et al. 2003).

### 2.7.2. HIF-1 Sinyal Yolağı

HIF-1 $\alpha$  proteininin aktivitesi ve birikimi hücre içindeki yaşam döngüsü boyunca farklı seviyelerde düzenlenmektedir. O<sub>2</sub> seviyelerinden bağımsız olarak HIF-1 $\alpha$ , çeşitli büyüme faktörleri ve diğer sinyal moleküllerini içeren bir dizi sinyal olayı yoluyla yapısal olarak sentezlenmektedir. Hipoksik koşullar altında çeşitli yolakların HIF-1 $\alpha$  stabilitesini ve transkripsiyonel aktiviteyi hidroksilasyon, asetilasyon, ubiquitinasyon ve fosforilasyon reaksiyonlarını içeren post-translasyonel modifikasyonlar aracılığıyla kontrol ettiği gösterilmiştir (Kallio et al. 1997). Buna karşılık, normoksik koşullar altında HIF-1 $\alpha$  hızlı bir şekilde bozunmaktadır ve normalde yaklaşık 5 dakika olan çok kısa bir yarılanma ömrüne sahiptir (Salceda and Caro 1997).

Normoksik koşullarda, HIF-1 $\alpha$  dioksijen (O<sub>2</sub>), Fe (II) ve 2-oksoglutarata mutlak bir gereksinim duyan enzimler tarafından spesifik prolin veya asparajin kalıntıları üzerinde hidroksilasyona uğramaktadır (Mcneill et al. 2002). Bunun için HIF-1 $\alpha$  üzerinde etkili olan dört hidroksilaz enzimi tanımlanmıştır: *Pro*<sup>402</sup> ve *Pro*<sup>564</sup> prolin kalıntılarını değiştiren üç prolin-4-hidroksilaz alanı içeren enzim (PHD1-3) ve bir asparajin kalıntısı olan *Asn*<sup>803</sup>ü değiştiren FIH (HIF'i inhibe eden faktör). *Pro*<sup>402</sup> ve *Pro*<sup>564</sup> prolin kalıntıları ODD alanında bulunurken, *Asn*<sup>803</sup> asparajin kalıntısı HIF-1 $\alpha$  'nın C-TAD alanında bulunmaktadır (Walmsley et al. 2008). Prolin kalıntılarının hidroksilasyonu, HIF-1 $\alpha$  ve von Hippel-Lindau (VHL) tümör supresör proteini arasındaki etkileşimi sağlamaktadır. VHL proteini ise, HIF $\alpha$  alt birimlerinin proteazomal degradasyonunu takiben ubiquitinasyonu başlatan çok proteinli bir E3 ubiquitin ligazın (Siah1 ve Siah3) substrat tanıma bileşenidir. Ayrıca *Asn*<sup>803</sup> üzerindeki hidroksilasyon HIF-1 $\alpha$  ile koaktivatör p300/CBP arasındaki etkileşimi önlemektedir. Dolayısıyla *Pro*<sup>402</sup> ve *Pro*<sup>564</sup>ün

hidroksilasyonu HIF-1 $\alpha$ 'nın poliubikitinasyon için işaretlenmesini sağlayarak protein stabilitesini etkilerken, *Asn*<sup>803</sup> üzerindeki hidroksilasyon transkripsiyonel aktivitesini inhibe ederek HIF-1 $\alpha$  aracılı hedef gen transkripsiyonunu ortadan kaldırmaktadır (Şekil 2.8.) (Lando et al. 2002; Wenger 2002).



Şekil 2.8. HIF-1 $\alpha$ 'nın oksijene bağlı düzenlenmesi (Wenger 2002).

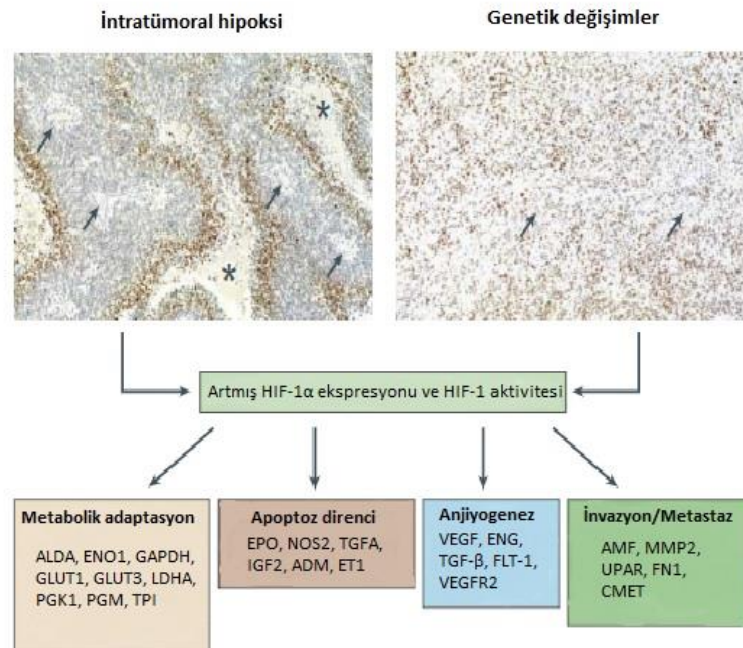
Hipoksik koşullarda, PHD enzimi HIF1 $\alpha$ 'yı hidroksile edemez ve bu nedenle HIF1 $\alpha$  pVHL tarafından tanınmaz. Böylece HIF1 $\alpha$  alt birimleri hücrede birikir ve HIF1 $\beta$  ile heterodimerize olmak için çekirdeğe translokasyon yaparak P300/CBP gibi koaktivatörleri ile birleşir ve VEGF-A, FLT-1, GLUT-1, Bcl-2 gibi hedef genlerin promotör bölgelerindeki hipoksi yanıt elementlerine (HRE) bağlanarak transkripsiyonu artırır (Şekil 2.9.) (Infantino et al. 2021).

HIF-1'in aktivasyonunun ve hipoksi ile indüklenebilir genin transkripsiyonunun sadece hipoksik koşullarla sınırlı bir süreç olmadığı bilinmektedir. HIF-1 $\alpha$  mRNA ve protein sentezinin yanı sıra HIF-1 transkripsiyonel aktivitesi de normoksida büyüme faktörleri (PDGF; EGF; HGF), onkogen ürünleri (v-Src, RasV12, Her2, Akt) ve inflamasyon araçları (IL-1b, TNF-  $\alpha$ , NO) gibi çeşitli uyaranlar tarafından indüklenir. Bu

uyaranların bazıları hücre tipine özgü bir şekilde ekspresyonunu indüklemektedir (Manolescu et al. 2009).

Yapılan son çalışmalar ise HIF-1 $\alpha$ 'nın PI3K/Akt/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, JAK/STAT, Wnt/ $\beta$ -katenin, Notch ve NF- $\kappa$ B gibi farklı sinyal yolları ile ilişkili olduğunu da ortaya koymuştur (Lopez-Bergami, Fitchman, and Ronai 2008).

Literatürde mevcut olan birçok çalışmadan insanlardaki kanserlerde HIF-1 $\alpha$ 'nın aşırı eksprese edildiği bilinmektedir. HIF-1 $\alpha$ 'nın sentezi, reseptör/reseptör olmayan tirozin kinazlar ve ayrıca G-protein-bağlı reseptörler tarafından indüklenen iki yol olan PI3K ve MAPK yollarının kontrolü altındadır (Semenza 2003). Ayrıca, NF- $\kappa$ B (nükleer faktör  $\kappa$ B) HIF-1 $\alpha$ 'nın aktivitesinde doğrudan bir modülatör olan bir etkili transkripsiyon faktörüdür. Dolayısıyla HIF-1 $\alpha$  ekspresyonu, kanserojen süreçle ilgili çok sayıda mekanizmanın kontrolü altındadır (van Uden, Kenneth, and Rocha 2008). Rapor edilen birkaç çalışma ile PI3-kinazın spesifik inhibisyonunun HIF-1'e bağlı hücrel yanıtın çoğunu engellediği ve PTEN'in tümör baskılayıcı işlevinin kaybının HIF-1 aracılı gen ekspresyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Laughner et al. 2001). Birkaç raporda ise p42/p44 (Erk2/Erk1) mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK'lar) HIF alt birimlerini fosforile ederek hipoksik olarak modifiye edilmiş proteinle benzer elektroforetik göç özelliklerine yol açabileceği gösterilmiştir (Richard et al. 1999).



**Şekil 2.9.** Kanser hücrelerinde HIF-1 ekspresyon artışından etkilenen fizyolojik yanıtlar (Semenza 2003).

### 2.7.3. HIF-1 Hedef Genleri

Bugüne kadar 1000'den fazla genin ifadesinin  $\alpha$ ,  $\beta$  heterodimerik yapıya sahip olan HIF-1 transkripsiyon faktörü tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Anjiyogenez, glukoz metabolizması, metastaz, invazyon, hücre proliferasyonu ve sağkalımı HIF-1 hedef genlerinin ekspresyonu sonucu etkilenen kritik fizyolojik yanıtlardır. Bunlar hipoksiye verilen sistemik, yerel ve hücresele yanıtlardır ve böylece pankreas kanseri hücrelerinin hipoksik koşullara adapte olması kolaylaşmaktadır (Zhou et al. 2006).

Anjiyogenez süreci, ekstraselüler matrisin bozunmasını, vasküler endotel hücrelerinin aktivasyonunu, çoğalmasını, invazyonunu ve yeni bir damar ağının kurulmasını içerdiği için karmaşıktır. VEGFA (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü), bu süreçte özellikle de vasküler endotelyal hücrelerin çoğalmasını ve göçünü desteklediği için en önemli moleküldür (Y. Guo et al. 2020). Flt-1 (fms-benzeri tirozin kinaz-1) VEGFR (Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü) ailesinin bir üyesidir ve VEGF-A, PlGF (Plasental Büyüme Faktörü) ve VEGF-B'yi bağlayan bir reseptördür. Kinaz aktivitesi VEGFR ailesinin bir diğer üyesi olan VEGFR-2 reseptöründen yaklaşık 10 kat daha zayıf olmasına rağmen VEGF-A için bağlanma afinitesinin bin kat daha fazla olduğu bilinmektedir (Shibuya 2006).

FLT-1 endotel hücrelerinde ve makrofajlarda eksprese edilmektedir ve kinaz aktivitesi aracılığıyla ateroskleroza, enflamatuar hastalıkları ve kanser metastazını desteklemektedir (Shibuya 2006). Fakat aynı zamanda pankreas kanseri hücrelerinde de eksprese edilmektedir. Normal pankreas ve kronik pankreatit ile karşılaştırıldığı zaman, ekspresyonunun pankreas kanserinde artış gösterdiği bilgisine ulaşılmaktadır. FLT-1 reseptörünün özellikle epitel hücrelerinin özelliklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazandığı süreç olan EMT (Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm) geçişinin indüklenmesi yoluyla pankreas kanserinde tümör ilerlemesinde rol oynadığı da bilinmektedir (Costache et al. 2015). Geçtiğimiz son on yılda FLT-1'in ligandı olan VEGFA'nın pankreas kanseri tümör anjiyogenezindeki rolü geniş çapta tanımlanmıştır. Liang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, VEGF ekspresyonunun pankreas kanseri dokularında %77 ve normal komşu pankreas dokularında %15 pozitif orana sahip olduğu bildirilmiştir (Liang et al. 2010).

Tümör hücreleri normal hücrelerden daha fazla glikoz tüketir ve yeterli oksijen varlığında bile glikoz türevli karbonun çoğunu laktata dönüştürürler. Bu süreç aerobik glikoliz veya Warburg etkisi olarak tanımlanmıştır (Koppenol, Bounds, and Dang 2011).

Aynı onkogenler tarafından yönlendirilmesine rağmen farklı doku kökenlerine sahip olan kanserler farklı metabolik değişiklikler sergiler. Pankreas kanseri hücrelerinde genetik mutasyonların Warburg, ters Warburg, lipid bağımlılığını içeren heterojen metabolik fenotipleri yönlendirdiği düşünülmektedir. Bu nedenle, pankreas kanseri hücreleri glikoz, amino asit ve lipid metabolizmasının karmaşık ve heterojen yeniden programlanmasını sergilemektedir (Liang et al. 2016).

Hipoksik bir ortamda pankreas kanseri hücreleri, HIF-1 $\alpha$  ekspresyonunu artırarak kanser hücrelerinin hipoksiye adaptasyonunu sağlamak için glikolizi artırmaktadır. Pankreatik duktal adenokarsinomda (PAAD) glukoz alım sürecine glukoz taşıyıcı proteinler arasından metabolik aktivasyonda ve glikolitik süreçte işlevi olan glukoz taşıyıcı 1 (GLUT1) aracılık etmektedir. PAAD hücrelerinde metabolik yeniden programlama ile birlikte enerji ve oksijen tüketimi artmaktadır. Bundan dolayı hücrelerin glukoz kullanımı da artmaktadır. İnsan hücrelerinde GLUT1 ekspresyonu normal dokularda veya iyi huylu lezyonlarda PAAD tümör dokuları ile kıyaslandığında düşük olma eğilimindedir. Bu durumda kısmen hızlı bir gelişim ve kötü prognozun bir göstergesidir (Shibuya 2006). Ayrıca hipoksik koşullarda GLUT1 ekspresyonunda artış meydana geldiği bilinmektedir. SW480 ve SW620 insan kolorektal adenokarsinoma hücre hatlarında yapılan *in vitro* çalışma sonucuna göre GLUT1 mRNA ekspresyonunun hipoksi ile stimüle olduğu bildirilmiştir (Chung et al. 2009). Acı kavun suyu (Bitter Melon Juice) ile muamele edilmiş PANC-1 ve BxPC3 pankreas kanseri hücre hatlarında ve ksenograftlarda yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucunda glukoz ekspresyonunda güçlü bir azalma olduğu gösterilmiştir (Dhar et al. 2019).

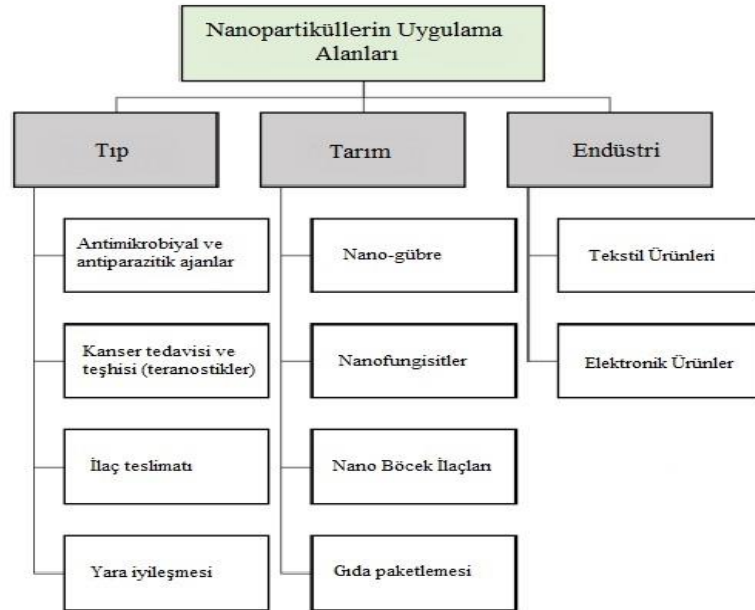
Çeşitli biyolojik olaylarda yer alan hücrelerin seçici olarak ortadan kaldırılması için gerekli olan fizyolojik süreç apoptoz olarak bilinmektedir. Bu apoptoz olarak bilinen apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde yer alan ve en iyi karakterize edilmiş protein ailesi ise Bcl-2 (B-hücreli lenfoma geni-2) olarak tanımlanmıştır. HIF-1 hedef geni ve aynı zamanda bu ailenin anti-apoptotik üyesi olan Bcl-2, sitokrom C ve AIF (apoptozu indükleyen faktör) gibi mitokondriyal apoptojenik faktörlerin sitoplazmaya salınmasını önleyip hücre apoptozunu engellemektedir. Pro-apoptotik aktiviteye sahip Bcl-2 protein ailesi üyesi olan Bax (Bcl-2 ile ilişkili X apoptoz düzenleyici) gibi proteinler dış mitokondriyal zardaki geçirgenliğin artmasını sağlayarak apoptotik faktörler olan sitokrom C ve AIF'in sitoplazmaya salınmasına sebep olarak kaspaz aktivasyonuna yol açmaktadır. Bunun sonucunda hücreler ölüme sürüklenmektedir (Tsujimoto 1998).

Apoptoz ve hücre sağkalımında hipoksi kaynaklı olarak değişiklikler meydana gelmektedir ve HIF1, apoptozun güçlü bir baskılayıcısı olarak işlev görmektedir. Bu bilgiyi destekler nitelikte yapılan bir çalışmada tümör hipoksik-iskemik mikroçevresini taklit etmek için kullanılan hipoksi ve serumsuz ortamın apoptozu azalttığı ve pankreas kanseri hücre hattı olan MiaPaCa2 hücrelerinin proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir (Wu, Guo, and Li 2015). Bir fare pankreas endokrin tümör modelinde ise, çevredeki ekzokrin dokuya invazyonun artmasının kaspaz-3 ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olduğu ve yüksek HIF-1 $\alpha$  seviyelerinin kaydedildiği alanlarda meydana geldiği bildirilmiştir (Takeda et al. 2012).

## 2.8. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller

Nanoteknoloji terimi ilk defa 1974 yılında Tokyo Bilim Üniversitesi'nde Norio Taniguchi tarafından "ileri düzey duyarlılıkla mevcut teknolojilerin küçültülmesine dayalı bir teknoloji" olarak tanımlanırken nanoteknolojinin kavramsal temeli 29 Aralık 1959 yılında Amerikan Teknoloji Enstitüsü'nde Richard Feynman'ın "There is a plenty of rooms at the bottom (Küçük şeylerle yapılacak daha çok şey var)" konulu ünlü dersinden sonra oluşturulmuştur (Mehmath et al. 2021).

Nano terimi, 'dwarf (cüce)' anlamına gelen Yunanca kelimedenden gelmektedir. Bir nanometre (nm) bir metrenin milyarda biri ( $10^{-9}$ m) veya kabaca yan yana üç atomun uzunluğu olarak tanımlanmaktadır. Nanoteknoloji, 1 ila 100 nanometre (nm) boyut aralığında partiküller geliştirmek veya manipüle etmek için kullanılan bir teknolojidir ve 21. yüzyılın en umut verici teknolojilerinden biri haline gelmiştir (Bayda et al. 2020; Maynard 2006). Ayrıca fizik, malzeme bilimi, kimya, biyoloji, bilgisayar bilimi ve mühendisliği de dahil olmak üzere neredeyse her bilim alanına katkıda bulunmaktadır (Hulla, Sahu, and Hayes 2015). Nano ölçekli parçacıklar veya nanopartiküller, ilaç tesliminde, hastalık teşhisi, medikal görüntüleme, kanser tedavisi, gen terapisi, kozmetik ve diğer bazı biyolojik ve biyolojik olmayan alanlarda geniş uygulamalarda umut verici araçlar olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.10.) (Gwinn and Vallyathan 2006; Najahi-Missaoui, Arnold, and Cummings 2021).



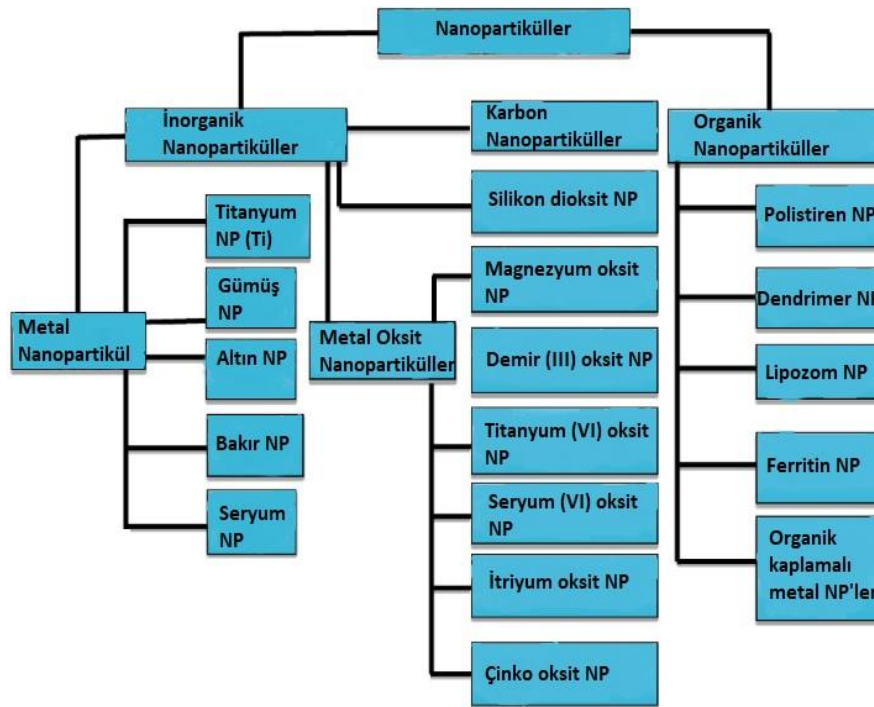
Şekil 2.10. Nanopartiküllerin kullanıldığı alanlar (Jadoun et al. 2021).

Nanopartiküller geniş yüzey alanı ve küçük boyutları nedeniyle makro ölçekli malzemelere kıyasla benzersiz ve önemli ölçüde değişmiş optik, mekanik, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler sergilerler (Lloyd, Byrne, and Coker 2011). Dolayısıyla nanoteknolojiyi diğer bilim dallarından ayıran en önemli özellik nano boyutlardaki malzemelerin yüzey/hacim oranlarının artması ve böylece malzemenin özelliklerinde büyük değişiklikler sağlanabilmesidir (Beykaya and Çağlar 2016).

Nanopartiküller, kompozisyonlarına, morfolojisine, kökenine ve boyutlarına göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir (Şekil 2.11). Nanomalzemeler metalik olmayan ve inorganik ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{ZnO}_2$ ,  $\text{Al(OH)}_3$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CeO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{CaO}$ ), metalik ve metal alaşımları (Au, Ag, Pt, Pd, Cu, Fe, Ni, Co, Al, Mn, Mg), karbon bazlı nanomalzemeler (fullerenler, karbon nanotüpler, karbon nanofiberler, grafen), dendrimerler ve nanopolimerler (polimerik nanotüpler ve nanopartiküller, nanoteller, nanorodlar, nanoselüloz, polimer filmler) ve kuantum noktaları (kadmiyum tellürid, kadmiyum selenid, kadmiyumsuz kuantum noktalar) olarak da sınıflandırılabilir (Pulit-Prociak and Banach 2016). Nanomalzemeler kökenine göre doğal ve sentetik nanomalzemeler olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Doğal nanomalzemeler doğada kendiliğinden bulunurken sentetik nanomalzemeler fiziksel, kimyasal ve biyolojik (yeşil sentez) yöntemler kullanılarak sentezlenebilmektedir (Jeevanandam et al. 2018). Manyetik nanopartiküller, metal nanopartiküller (demir, altın, gümüş, çinko, platin, bakır vb.), metal oksit nanopartiküller, kuantum noktalar, yarı iletken nanopartiküller,

nanotüpler, fullerenler ve diğer nanomalzemeler bu sentez yolları kullanılarak sentezlenebilen nanopartiküller olarak bilinmektedir (Şekil 2.11.) (Jeevanandam et al. 2018).

Nanopartiküller, küre, silindir, levha veya tüp gibi farklı morfolojilerde üretilebilir (Pal, Rai, and Pandey 2019). Çeşitli morfolojik yapılarında bulunabilmeleri ortamda bulunan biyoaktif bileşiklerin sayısının yanı sıra oluşturuldukları ortamın türüne bağlıdır (Aswathy Aromal and Philip 2012). Ayrıca nanopartiküllerin morfolojik özellikleri reaksiyon süresi, pH ve sıcaklık gibi çeşitli parametreler aracılığıyla kontrol edilebilmektedir (Zhang et al. 2020).



Şekil 2.11. Nanopartiküllerin sınıflandırılması (Khanna, Kaur, and Goyal 2019).

### 2.8.1. Gümüş Nanopartiküller

Gümüş, farklı formlarda ve farklı amaçlarla uzun yıllardır kullanımı yaygın olan bir metaldir. Gümüş iyonları ( $Ag^+$ ) çeşitli mikroorganizmalar için toksik olduğu için içme suyunu arındırmak için ve ayrıca kronik ülser ve yanık tedavisinde kullanılmıştır (Amato et al. 2011; Rai, Yadav, and Gade 2009). Nanogümüşün Antik Mısır ve Roma'da kullanıldığına dair kanıtlar da bulunmaktadır (Reidy et al. 2013). Farklı metalik ve metalik olmayan nanopartiküller arasında, gümüş nanopartiküller uygulanabilirlik ve çok yönlülükleri için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Kaliyamurthi et al. 2016; Satyavani,

Ramanathan, and Gurudeeban 2011a, 2011b). AgNP'ler medikal görüntüleme, kanser tedavisi, gen terapisi, atık su arıtma, biyotıp, ilaç taşıma ve tarım alanlarında geniş ilgi görmüştür (Benelli 2016; LewisOscar et al. 2016).

AgNP, ışığı absorblama ve saçmada birçok boya ve pigmentin aksine çok verimlidir. Parçacığın boyutuna ve şekline bağlı olarak belirli bir renk sergilemektedir. Gümüş nanopartiküllerin ışıkla güçlü etkileşimi, metal yüzeydeki iletim elektronlarının yüzey plazmon rezonansı (SPR) olarak bilinen belirli dalga boylarında ışık tarafından uyarıldığında kolektif bir salınım maruz kalmasıyla ortaya çıkmaktadır, bu salınım alışılmadık derecede güçlü saçılma ve emilim özellikleriyle sonuçlanmaktadır (Abou El-Nour et al. 2010).

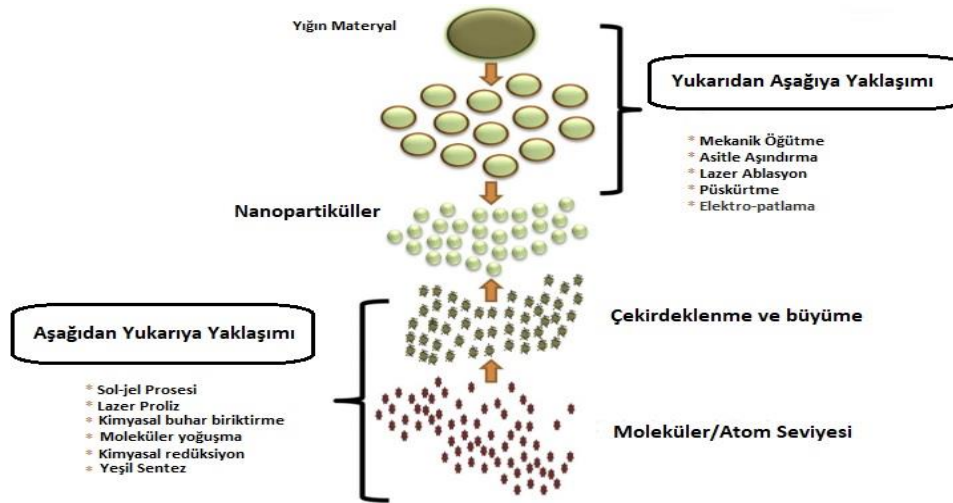
AgNP'leri özellikle tıp ve sağlık alanında belirgin bir şekilde kullanılmaktadır. Antimikrobiyal, anti-viral, antikanser, trombolitik ve antikoagüle aktivite gibi çeşitli özellikler sergileyen AgNP'leri bu tıbbi uygulamalarının yanı sıra yara onarımı, kemik iyileşmesi, diş uygulamaları, aşı adjuvan ve biyosensör dahil olmak üzere diğer tıbbi uygulamalarda da kullanılmaktadır (Gomes, Martins, and Prior 2021; Xu et al. 2020b). Gümüş nanopartikülleri gibi metal nanopartiküllerin, anti-diyabetik aktivite gösterme potansiyeline sahip olduğu da gösterilmiştir. Diyabette dünyadaki 11 yetiştikten 1'inde metal nanopartiküllerin kullanılmasının, daha kesin bir tedavi bulmak için yeni araştırma alanlarını oluşturabileceği veya en azından bu hastalığı kontrol etmek için daha iyi bir araç oluşturabileceği düşünülmektedir (Oladipo et al. 2020).

Geleneksel ilaçlarla kıyaslandığı zaman nanopartiküllerin biyoyumluluğunun daha yüksek olduğu görülmüştür. Biyoyumluluğun daha yüksek olması dolayısıyla hücrede istenmeyen toksik yan etkiler azalmakta ve uygulanan terapötiklerin etkinliği artmaktadır. Ayrıca AgNP'leri çeşitli biyolojik aktivite ve benzersiz özelliklerinden dolayı kemoterapi başarısızlığında yer alan engellerin üstesinden gelme potansiyeli olan terapötik ajan olarak bilinmektedir. Bu doğrultuda Zielinska ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 2.6 ve 18 nm boyutlarındaki gümüş nanopartiküllerin boyut ve konsantrasyona bağlı bir şekilde canlılığı ve proliferasyonu azaltarak PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Zielinska et al. 2017).

## 2.9. Nanopartikül Sentezi İçin Yaklaşımlar

Nanopartiküllerin sentezi için şekil 2.12.' de belirtildiği gibi bottom-up (aşağıdan yukarıya) ve top-down (yukarıdan aşağıya) olmak üzere iki ana yaklaşım bulunmaktadır (Marchiol 2012). Top-down yaklaşımı uygun bir başlangıç malzemesinin kademeli olarak

mekanik, kimyasal veya diğer enerji formlarını kullanarak boyut küçültme yöntemleriyle nano boyutlu yapılara parçalanmasına dayanmaktadır. Bottom-up yaklaşımı ise atomların veya moleküllerin nano ölçek aralığında moleküler yapıya montajına dayanmaktadır (Narayanan and Sakthivel 2010a).



Şekil 2.12. Nanopartikül sentez yaklaşımları (Khanna et al. 2019).

Top-down yaklaşım, genellikle malzemeleri istenen boyutta şekillendirmek için harici olarak kontrol edilen aletlerin kullanıldığı mikrofabrikasyon tekniklerini kullanmaktadır ve nano ölçekte karmaşık konformasyonlar oluşturmak için atomların veya moleküllerin kendi kendine birleştirilme özelliklerinden yararlanılmaktadır. Bugüne kadar çeşitli metalik nanopartiküller mekanik öğütme, asitle aşındırma, lazer ablasyon, püskürtme ve elektro-patlama gibi top-down yaklaşımlarla üretilmiştir (Khan, Saeed, and Khan 2019). Fakat bu yaklaşım ekonomik olarak maliyetli ve yüksek enerji gerektiren uzun bir süreçtir. En büyük avantajları nanopartiküllerin boyut dağılımının ve morfolojilerinin kontrolünü sağlayabilmek iken en büyük dezavantajı nanopartikül yüzey yapısının kusurlu olabilmesidir. Yüzey yapısındaki bu tür kusurlar, yüksek en boy oranından dolayı metalik nanopartiküllerin fiziksel özellikleri ve yüzey kimyası üzerinde önemli bir etkiye sahip olmaktadır (Thakkar, Mhatre, and Parikh 2010; Wang and Xia 2004).

Bottom-up yaklaşımı organik çözücüler içeren kimyasal yöntemleri ve farklı bitkiler ve mikroorganizmalar kullanılan biyolojik yöntemleri içermektedir. Bu yaklaşımda nano ölçekli yapılar sol-jel prosesi, lazer piroliz, kimyasal buhar biriktirme, moleküler yoğunlaşma, kimyasal redüksiyon ve en önemlisi yeşil sentez yöntemleri ile

sentezlenebilmektedir (Iravani 2011; Marchiol 2012). Nanopartiküllerin sentezi için bottom-up yaklaşımı en etkili yaklaşımdır. Bunun sebebi nanopartiküllerin daha basit moleküllerden geliştirilebilmesi ve nanopartiküllerin boyutunun veya şeklinin kimyasalların konsantrasyonu ve reaksiyon şartlarının (sıcaklık, pH vb.) değiştirilerek kontrol edilebildiği veya modüle edilebildiği bir yaklaşım olmasıdır (J. Singh, Singh, and Rawat 2017).

## 2.10. Nanopartikül Sentez Yöntemleri

Nanopartiküller, fiziksel, kimyasal, biyolojik teknikler de dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılarak sentezlenebilmektedir (Mohanpuria, Rana, and Yadav 2008) (Tablo 2.2.).

**Tablo 2.2.** Nanopartikül sentez yöntemleri (Rafique, Sadaf, et al. 2017).

Nanopartiküllerin Sentezi		
Aşağıdan Yukarıya Yaklaşımı		Yukarıdan Aşağıya Yaklaşımı
Yeşil Metodlar	Kimyasal Metodlar	Fiziksel Metodlar
* Bakteri kullanarak	* Kimyasal indirgeme	* Lazer ablasyonu
* Mantar kullanarak	* Mikroemülsiyon	* Buharlaştırma-yoğuşma
* Bitki kullanarak	* Fitokimyasal	* Püskürtmeli piroliz
* Maya kullanarak	* Elektrokimyasal	* Bilyalı öğütme
* Mikroorganizma kullanarak	* Piroliz	* Taş baskı
	* Mikrodalga	
Toksik olmayan		Toksik

### 2.10.1. Fiziksel Sentez

Fiziksel yöntemler, nanopartiküllerin büyük ölçekli üretimi için tercih edilen çok basit süreçler içermektedir. Yığın metalin mekanik etki ile daha küçük parçalar haline getirildiği yöntemler olduğu için top-down tekniklerin çatısı altında yer almaktadır. (Sánchez-López et al. 2020). Fiziksel yöntemler genellikle hızlıdır, toksik kimyasalları içermemektedir fakat yüksek enerji tüketimi gerektirdiği için dezavantajlıdır. Bundan dolayı fiziksel sentez nanopartiküllerin üretilmesi çok tercih edilen bir yöntem değildir (Jorge de Souza, Rosa Souza, and Franchi 2019).

### 2.10.2. Kimyasal Sentez

Kimyasal sentez prosedürlerinde nanopartiküllerin hazırlanması için metal bir öncü, indirgeyici ajanlar ve bir stabilize edici madde gereklidir. Çeşitli kimyasal yöntemlerden en basit olanı, gümüş nitratların sulu bir çözeltide, bir indirgeyici ve stabilize edici bir ajan varlığında indirgenmesini içermektedir. Sitrat, askorbat, borohidrit ve hidrojen gazı dahil olmak üzere çeşitli indirgeyici ajanlar kullanılabilir. Kullanılan stabilize edici ajanlar ise yüzey aktif maddeler, polivinilpirolidon ve polietilen glikol gibi spesifik fonksiyonel gruplara sahip ligandlar veya polimerlerdir (Gudikandula and Charya Maringanti 2016).

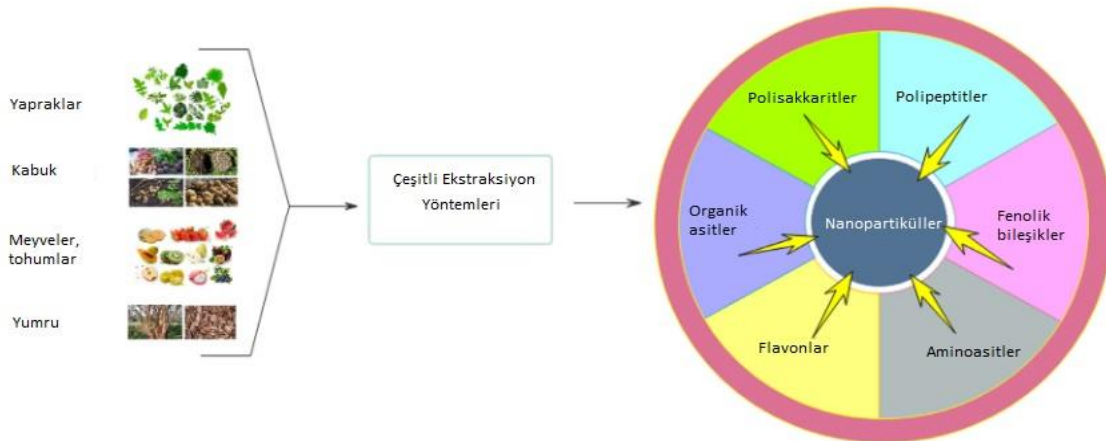
Poliol yöntemi, gümüş nanopartikülleri sentezlemek için yaygın olarak kullanılan bir kimyasal yöntem türüdür. Bu yöntemde, bir çözücü ve stabilize edici bir ajanın ikili rolünü yerine getiren etilen glikol varlığında gümüş nitrat indirgenmektedir. Ayrıca nanopartiküllerin son boyutu ve şekli göz önünde bulundurularak belirli reaktifler ve indirgeyici ajanlar kullanılmaktadır. Genellikle sodyum sitrat güçlü bir indirgeyici madde olan sodyum borohidrid tarafından elde edilen nanopartiküllere kıyasla daha büyük boyutlu nanopartikül oluşumuna yol açmaktadır. Alternatif olarak, küresel nanopartiküller hazırlamak için kullanılan standart bir kimyasal reaktif ise oleil amin-sıvı parafin karışımıdır (Raghavan et al. 2016). Sentez sürecinde kullanılan çözücüler ve indirgeyici ajanlar hem insan sağlığı hem de çevre için zararlıdır ayrıca kullanılan çözücülerin toksisitesi uzun ömürlü bir etkiye sahiptir. Örneğin polivinil alkol, kimyasal sentez yönteminde sıklıkla kullanılan bir reaktiftir fakat sentezlenen nanopartiküllerin ilaç tesliminde kullanıldığında vücuttaki sağlıklı hücrelere de zarar verdiği bilinmektedir (Ovais et al. 2018).

### 2.10.3. Biyolojik Sentez

Nanopartikül sentez süreçlerinin çoğunluğunun çevre dostu olmadığı bilinmektedir ve bildirilen sentez yöntemlerinin sadece %24'ü yeşil veya çevre dostu tekniklere dayanmaktadır (Tolaymat et al. 2010). Nanopartikül sentezinde kimyasal ve fiziksel yöntemlerin hem kompleks bir yapıya sahip olması hem de yüksek maliyetli olması ve çevre dostu olmaması bilim insanlarını biyolojik yöntemlere yönlendirmektedir. Nematollahi tarafından yapılan çalışma sonucu olarak nanopartikül üretimi için bitki veya bitki kısımlarının kullanımının ucuz, yenilenebilir kaynaklar olduğu ve çoğunlukla sağlık alanında kullanıldığı bildirilmiştir (Nematollahi 2015).

Biyolojik sentez, literatürde yeşil (green) sentez ve yeşil kimya olarak da bilinmektedir. Sitotoksiste, çevresel toksiste ve kanserojenite nedeni olabilen ve sıklıkla çevresel olarak aşındırıcı ajanları kullanan fiziksel ve kimyasal sentez süreçlerini içeren geleneksel sentez yöntemlerinden tamamen farklıdır (Kumar et al. 2020). Özellikle metalik nanopartiküllerin sentezi için yeşil sentez yaklaşımları son yıllarda yeni ve umut verici bir araştırma alanı haline gelmiştir (Ovais et al. 2018).

Nanopartiküllerin üretimi için biyolojik sentez yönteminde bakteriler, mantarlar, algler ve kabuk, yaprak, çiçek, meyve, kök, tohum ve rizom dahil olmak üzere bitkilerin farklı kısımları kullanılmaktadır (Ayano et al. 2014; Aziz et al. 2021; Chung et al. 2016; Kuppusamy et al. 2014; Yadav et al. 2015). Farklı bitki kısımlarından elde edilen ekstraktların içeriğinde enzimler, alkaloidler, alkoller, yağlar, flavanoidler, terpenoidler, aminoasitler, karbonhidratlar ve fenolik bileşikler gibi fitokimyasallar bulunmaktadır. Bu fitokimyasallar sentez sırasında metal iyonlarının ( $Ag^{+}$ 'ın  $Ag^{0}$ 'a) indirgenmesine katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.13.) (Abdelghany et al. 2018; Jadoun et al. 2021).



Şekil 2.13. Bitki ekstrakt içeriği (Ettadili et al. 2022).

Bugüne kadar bakteri, mantar, alg ve bitki kullanılarak metal nanopartiküllerin biyolojik sentezi hakkında çok sayıda araştırma makalesi yayınlanmıştır. Biyolojik sentez, ucuz, tek adımda gerçekleşen ve çevre dostu bir yöntem olduğundan dolayı bitki aracılı sentez yaklaşımlarının metal nanopartikülleri sentezlemek için daha güvenilir ve ekonomik bir yol olduğu bildirilmiştir. Bu yaklaşımla sentezlenen nanopartiküller sıtma, HIV, kanser, hepatit ve diğer çeşitli hastalıklar için potansiyel farmasötik ajan olarak kullanılmaktadır (Ovais et al. 2018).

Konvansiyonel yöntemler olarak bilinen kimyasal ve fiziksel yöntemlerden farklı olarak bitki temelli sentez yüksek sıcaklık, basınç ve toksik kimyasallar kullanılmadan ve nanopartiküllerin daha çevre dostu daha ucuz bir şekilde büyük ölçekli sentezini sağlayan yaklaşımdır (Şekil 2.14.) (Shankar et al. 2004).



Şekil 2.14 Biyolojik sentezin avantajları (Ettadili et al. 2022).

## 2.11. Nanopartikül Sentezini Etkileyen Faktörler

Reaksiyon parametreleri biyolojik olarak sentezlenen nanopartiküllerin verimini, şeklini, boyutunu ve stabilitesini optimize etmede kritik rol oynamaktadır. pH, reaksiyon sıcaklığı, bitki ekstraktının ve gümüş tuzunun konsantrasyonu, reaksiyon süresi, basınç ve kullanılan teknik veya sentez yöntemi gibi çeşitli faktörler nanopartiküllerin sentezini ve stabilizasyonunu kontrol etmektedir (Mittal, Chisti, and Banerjee 2013; Pal et al. 2019).

**pH:** Nanopartikül sentezi sırasında pH, metal nanopartiküllerin hem şeklini hem de boyutunu etkileyen önemli bir faktördür (Patil and Chandrasekaran 2020). *V. Luteoabulum* kullanılarak pH 3'te küresel boyutlarda nanopartikül (<10.0 nm) sentezinin gerçekleştiği fakat pH 5'e yükseltildiğinde altıgen, üçgen ve çubuk gibi farklı şekillerde nanopartikül oluştuğu gözlenmiştir. pH 7-9'a yükseltildiğinde ise düzensiz ve tanımsız şekillerde nanopartikül elde edildiği tespit edilmiştir (Gericke and Pinches 2006). Benzer bir çalışmada ise *Coriolus versicolor* (Hindi kuyruğu mantarı) kullanılarak sentezlenen nanopartiküllerin üretiminde metal iyonlarının indirgenmesinin pH'a karşı oldukça

duyarlı olduğu bulunmuştur (Sanghi and Verma 2009). Manosalva ve arkadaşları *Galega officinalis* (Keçisedefi) özü kullanarak AgNP üzerine bitki özü konsantrasyonu ve tuz ( $\text{AgNO}_3$ ) konsantrasyonu gibi diğer parametrelerle birlikte pH'ın etkisini kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve yüksek pH ve düşük tuz çözeltisi konsantrasyonu içeren AgNP'lerin daha küçük boyutlara sahip olduklarını bildirmişlerdir (Manosalva et al. 2019).

**Sıcaklık:** Sıcaklık, elde edilen nanoparçacıkların şekillerini ve boyutlarını etkileyerek metal nanopartiküllerin sentezinde önemli rol oynayan diğer bir faktördür. Reaksiyon sıcaklığı arttıkça, indirgenme oranı artmaktadır ve dolayısıyla artan verimde küçük ve yüksek oranda dispers NP'ler oluşmaktadır. *Curcuma longa* (Zerdeçal) yumru tozu özü kullanılarak sentezlenen gümüş NP'lerin, sıcaklıktaki artışla birlikte yüzey plazmon rezonansında artış belirlenmiştir (Sathishkumar, Sneha, and Yun 2010). Benzer bir çalışmada *Tanacetum vulgare* (Solucan otu) meyve özü kullanılarak hem gümüş hem de altın NP'lerin bitki aracılı sentezinde sıcaklığın 25'ten 150°C'ye çıkarılmasıyla absorpsiyon piklerinin keskinliğinde artış gözlenmiştir. Gözlenen keskin pikler NP'lerin verimi ile sıcaklık arasındaki pozitif korelasyon olduğunu doğrulamaktadır (Dubey, Lahtinen, and Sillanpää 2010).

**Ekstrakt Konsantrasyonu:** Bitki ekstraktında bulunan biyomoleküller, metalik nanopartiküllerin sentezini ve şeklini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu durumun bitki biyokütlesinde mevcut olan polifenollerin ve flavonoidlerin yüzdesinin daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Irfan et al. 2018). Yapılan bir çalışmada reaksiyon ortamındaki *Plectranthus amboinicus* (Küba kekiği) yaprak ekstraktı konsantrasyonundaki değişiklikler, altın nanopartikül (AuNP) boyutunu 50 ila 350 nm arasında ve ayrıca küresel, üçgen ve altıgen gibi farklı şekillerde etkilemiştir (Narayanan ve Sakthivel 2010).

**Tuz Konsantrasyonu:** Nanopartiküllerin boyutları, gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) konsantrasyonundaki değişikliklerden güçlü bir şekilde etkilenmektedir. Phanjom ve Ahmed tarafından yapılan çalışmada 1 ila 8 mM  $\text{AgNO}_3$  konsantrasyon aralığında 17.06 ile 7.22 nm arasındaki boyutlarda AgNP'leri sentezlenirken 9 ila 10 mM  $\text{AgNO}_3$  konsantrasyon aralığında 45.93 ile 62.12 nm arasındaki büyüklükte AgNP'ler sentezlendiği bildirilmiştir. Dolayısıyla tuz konsantrasyonunun artmasıyla sentezlenen nanopartikülün boyutunda da artış meydana gelmektedir (Phanjom and Ahmed 2017).

**Reaksiyon süresi:** Literatüre göre, çözeltinin rengi kararlı olduğu anda optimum reaksiyon süresi tamamlanmış olmaktadır. Reaksiyon süresinin artması, boyut artışına neden olarak nanopartikülleri önemli ölçüde etkilemektedir (Abdullah, Ahmad, and Shameli 2015). Nanopartikül inkübasyon süresinin uzun olması, nanopartiküllerin potansiyelinde bir azalmaya neden olabilecek agregasyona neden olmaktadır (Baer 2014). Dwivedi ve Gopal, *Chenopodium album* (Sirken otu) yaprağı ekstresi ile çalışırken inkübasyon süresindeki artışla birlikte UV absorpsiyon spektrumlarının keskinliğinde bir artış olduğunu ve ayrıca nanopartiküllerin reaksiyonun 15. dakikası içinde ortaya çıktığını ve 2 saate kadar arttığını fakat bundan sonraki zaman zarfında sadece hafif bir değişiklik meydana geldiğini bildirdiler (Carrillo-López et al. 2014).

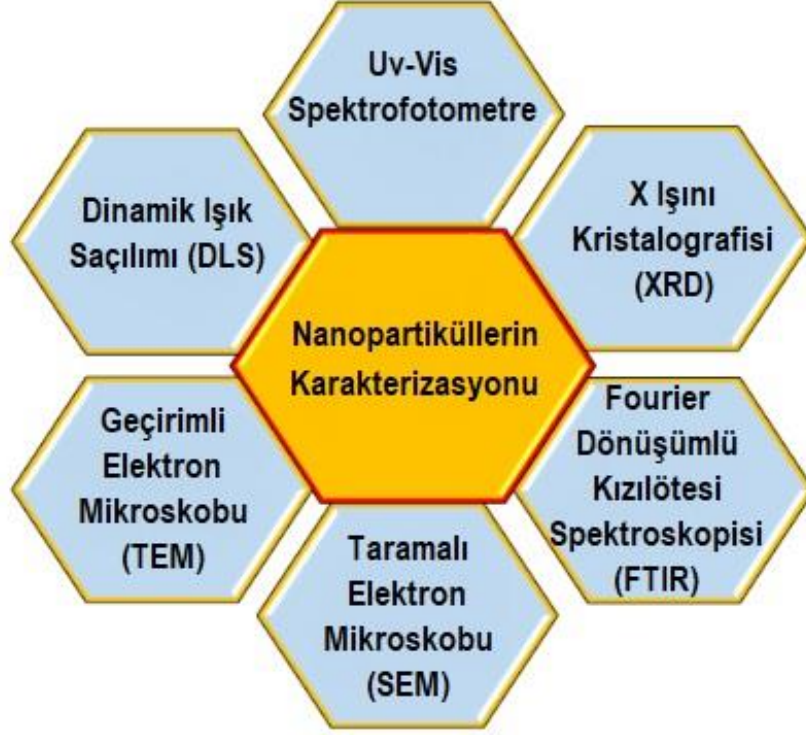
**Basınç:** Basınç, sentezlenen nanopartiküllerin şeklini ve boyutunu etkilediği için metalik nanopartiküllerin sentezinde de önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar, ortam basıncı koşulları sağlandığında, metal iyonlarının fitokimyasal ajanlar yoluyla redüksiyonunun normalden daha hızlı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir (Tran, Nguyen, and Le 2018).

## 2.12. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin sentezinden sonra farklı karakterizasyon teknikleri ile nanopartiküllerin boyutları, şekilleri, kimyasal bileşimleri, yüzey alanları ve kristallik dahil olmak üzere çeşitli parametrelerin ölçülmesi önemli bir aşamadır (Barkat et al. 2017; Patil and Kim 2017). Bunun için birçok karakterizasyon tekniği bulunmaktadır. Sentezlenen nanopartiküllerin boyutunun ve şeklinin belirlenmesi için XRD (X-ray diffraction, X-ışınları difraktometresi), SEM (Scanning Electron Microscope, Taramalı Elektron Mikroskobu), TEM (Transmission Electron Microscope, Geçirimli Elektron Mikroskobu), DLS (Dynamic Light Scattering, Dinamik ışık saçılımı) ve AFM (Atomic Force Microscope, Atomik Kuvvet Mikroskobu) teknikleri, nanopartiküllerin tespit edilmesi ve fonksiyonel gruplarının tanımlanması için UV-Görünür spektroskopik tekniği, EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy, Enerji Dağıtıcı X-Işını Spektroskopisi) ve FTIR (Fourier Transform Infrared, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi) analiz teknikleri kullanılmaktadır (Şekil 2.15.) (Khandel and Research Scholar 2016).

UV Görünür Spektrofotometre, gümüş nanopartiküllerin optik özelliklerini gözlemlemek amacıyla kullanılan bir karakterizasyon yöntemidir (Tejamaya et al. 2012).

Genellikle nanopartikül boyutu 1-100 nm boyutlarında olan nanomalzemelerin tanımlanması için 200-800 nm ışık dalga boyu kullanılmaktadır. Metalik nanopartiküller, karakteristik spektrumda belirli absorbans bantları sergilemektedir ve her metalik nanopartikülün boyutuna bağlı olarak spesifik bir absorbans eğrisinin olduğu bilinmektedir.



Şekil 2.15. Nanopartiküllerin karakterizasyon yöntemleri (Almatroudi 2020).

Genellikle gümüş nanopartiküller 400-450 nm aralığında değişen pik aracılığıyla tespit edilmektedir (Rafique, Shaikh, et al. 2017). UV görünür spektroskopisi analizin hızlı olması, güvenilir, kullanımı kolay, yüksek hassasiyet ve doğruluk sağladığı için avantajlı bir karakterizasyon yöntemidir. Chen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Cymbopogon citratus* (Limon otu) yaprak ekstraktı kullanılarak biyolojik sentezlenen 17-25.8 nm boyut aralığındaki gümüş nanopartiküllerin UV görünür spektrumlarının 435 nm'de güçlü emilim piki verdiği gözlenmiştir (Chen et al. 2019).

FTIR, nanopartiküllerin yüzeyine bağlı olarak bulunan organik fonksiyonel grupların (karboniller, hidroksiller gibi) tespiti amacıyla kullanılmaktadır (Chithrani, Ghazani, and Chan 2006). Ayrıca araştırmacılar bu yöntemi, nanopartikül sentezinde bitki özünde bulunan kimyasal bileşiği anlamak için kullanmışlardır. Bu tekniğin prensibi, kızılötesi radyasyon numuneden geçtiğinde bazı radyasyonu absorbe etmesi ve

absorbe edilmeyen radyasyonların numuneden geçirilmesidir. Spektrum, numunenin kimliğini absorpsiyon ve geçirgenlik değerine göre belirlemektedir (Hembram et al. 2018). Örneğin Pandian ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Allium sativum* (Sarımsak) bitki ekstraktı aracılığıyla biyolojik olarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin FTIR analizi sonucunda 3100-3400  $\text{cm}^{-1}$  bölgesindeki geniş bandın, fenolün hidroksil grubu ve alkoller nedeniyle oluşabilecek O-H germe titreşim frekansından, 1640  $\text{cm}^{-1}$ 'deki yoğun bandın ise terpenoidlerde mevcut olan aromatik halkanın C-C gerilmesinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Pandian et al. 2015).

Nanopartiküllerin yüzey topolojisi, morfolojisi ve kimyasal bileşimi SEM kullanılarak incelenebilir. Yaklaşık 1nm çözünürlükle hemen hemen her yüzeyi görüntüleme yeteneğine sahiptir. SEM yöntemine alternatif olarak alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) kullanılarak nanopartiküller daha yüksek çözünürlükle görüntülenmektedir. EDX, SEM ile birlikte kullanılarak yüzeye yakın elementlerin ve bunların miktarlarının analizi sağlanmaktadır (Raval et al. 2018).

TEM, nanopartiküllerin yapısal özelliklerinin çalışılması için en yaygın kullanılan tekniktir. Bu teknik nanopartiküllerin boyutu, morfolojisi ve dağılımı hakkında bilgi sağlamaktadır (Asoro, Kovar, and Ferreira 2013). TEM tekniğinin, CTEM (Konvensiyonel TEM), HRTEM (Yüksek Çözünürlüklü TEM) ve STEM (Taramalı TEM) dahil çeşitli formları da bulunmaktadır (Adhikari, Larm, and Baker 2019). TEM, yüksek enerjili bir elektron ışını ile ince bir numune arasındaki etkileşime dayanmaktadır. İletilen ışının genlik ve faz varyasyonları nanopartikül görüntülerini sağlamaktadır (Parupudi, Mulagapati, and Subramony 2022). TEM, SEM'e göre gelişmiş çözünürlük ve daha kritik boyutlar sağlayabildiği için daha avantajlı bir karakterizasyon tekniğidir (Lin et al. 2014).

Foton korelasyon spektroskopisi veya yarı-elastik ışık saçılımı olarak da bilinen DLS, biyolojik olarak sentezlenmiş AgNP' lerin partikül boyut ve boyutunun dağılım profilini ve süspansiyondaki nanopartiküllerin polidispers doğasını belirlemek amacıyla kullanılan analitik bir tekniktir (Hembram et al. 2018). Bu yöntemde, parçacıkları içeren örnek bir çözelti tek renkli bir ışık demetinin yoluna yerleştirilerek parçacıkların Brownian hareketi nedeniyle dağınık ışığın zamansal dalgalanmaları belirlenmektedir (Gugliotta, Vega, and Meira 2000). Brownian hareketinin etkisiyle DLS tarafından belirlenen nanopartikül boyutunun, genellikle TEM'den daha büyük olduğu görülmektedir. Bu teknik, sıvılardaki nanopartiküllerin ortalama boyutunu belirlemek amacıyla kullanılmaktadır.

Zeta potansiyeli, nanopartiküllerin yüzey yükünün bir ölçüsüdür (Parupudi et al. 2022). Bir lazer çeşitli bir elektrik alanının etkisi altında nanopartikül çözeltisi üzerinden geçirilerek zeta potansiyel değeri elde edilebilmektedir (Almatroudi 2020).

X-ışını kırınımı, Bragg yasasına göre incelenen bir numunenin kristal düzlemlerinde eşleştirilmiş bir X-ışını olayının yansıması olarak tanımlanabilir (Cantor and Schimmel 1980). XRD tekniği, AgNP'lerin yapıları, tane boyutları, kristallikleri, gibi parametreler hakkında bilgi edinmek amacıyla kullanılmaktadır (Strasser et al. 2010).

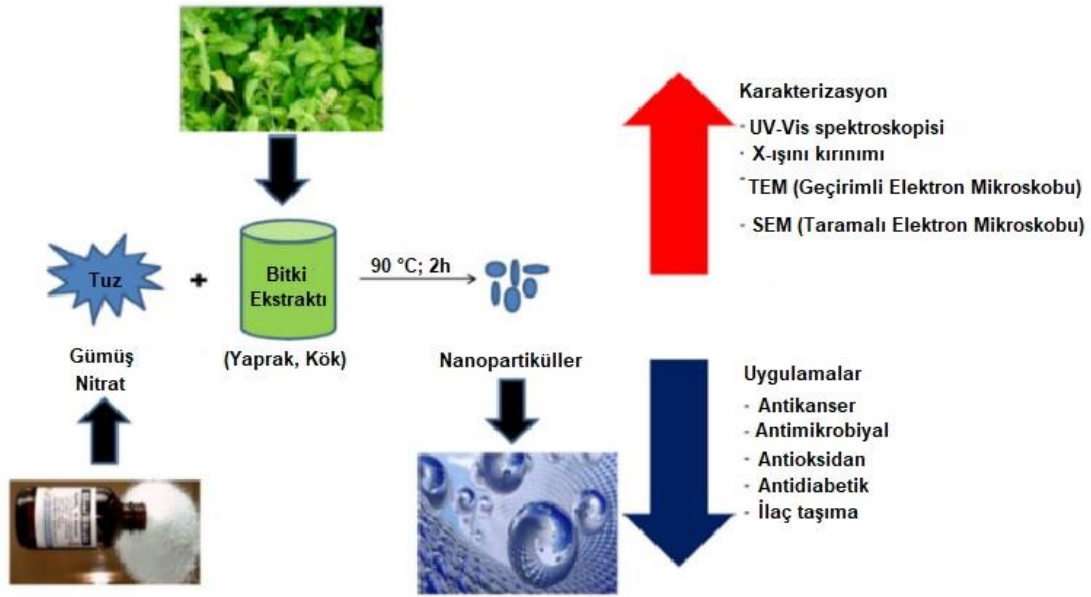
### 2.13. Gümüş Nanopartiküllerin Biyolojik Sentezi

Metal nanopartiküllerin sentezi için hem çevre dostu hem de güvenilir tekniklerin geliştirilmesi nanoteknoloji alanında önemli bir adım olmuştur (J. Singh et al. 2017). Metal iyonlarının redüksiyonu için, 1900'lerin başından bu yana bitki özlerinin kullanılması bilinmektedir ancak bu yöntemde yer alan redüksiyon ajanlarının doğası hala tam olarak anlaşılammıştır. Fakat son 30 yıl içinde metal iyonlarının redüksiyonu için bitki veya tüm bitki özü ve bitki dokusunun kullanımına önemli ölçüde ilgi artmıştır (Park et al. 2011).

Raveendranet ve arkadaşları, yeşil kimyanın gelişimi için nanopartikül hazırlanmasında, solvent (çözücü) seçimi, çevreye duyarlı bir indirgeyici maddenin kullanımı ve nanopartikül stabilizasyonu için toksik olmayan bir malzemenin kullanılması olan üç ana faktörün göz önünde bulundurulması gerektiğini öne sürmüştür (Raveendran, Fu, and Wallen 2003).

Gümüş nanopartiküllerin yeşil sentezi için temel gereksinimler, gümüş metal iyon çözeltisi ve indirgeyici biyolojik ajandır (Şekil 2.16.). Yeşil sentez sürecinde bitki ekstraktında bulunan biyomoleküller, tek adımda metal iyonlarını nanopartiküllere indirgemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu indirgenme oda sıcaklığında veya ışık, ısı, elektrik, ses ve mikrodalga gibi dış enerji kaynakları kullanılarak gerçekleşmektedir (Kumar and Yadav 2009; Mittal et al. 2013).

Nanopartikül sentezinde bitki ekstraktı hem stabilize edici ajan hem de indirgeyici ajan olarak rol oynamaktadır. Bitki ekstraktının kaynağı ve aynı bitkinin farklı kısımları bile sentezlenen nanopartikülün özelliğini etkilemektedir (Abdi et al. 2018; Kumar and Yadav 2009). Bu etkinin nedeni, ekstraktların farklı organik indirgeme ajan kombinasyonları ve konsantrasyonları içermesidir (Mukunthan and Balaji 2012).



Şekil 2.16. AgNP'lerin bitki ekstrektı kullanılarak sentezlenme süreci (Jadoun et al. 2021).

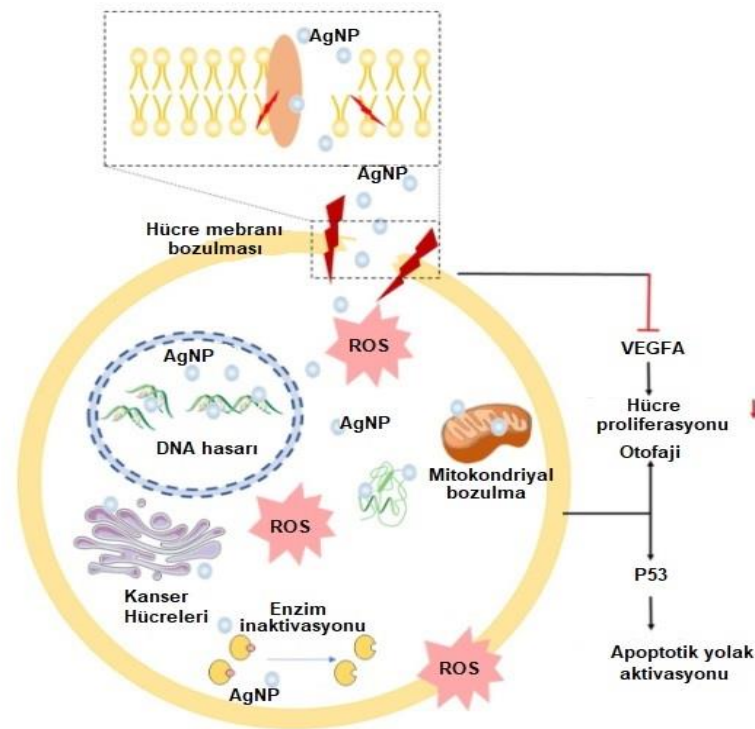
#### 2.14. Gümüş Nanopartiküllerin Antikanser Etkisi

Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi kanserin yaygın tedavileri arasındadır. Fakat bu konvansiyonel tedavilerin yan etkileri kanser tedavilerini sınırlandırmaktadır. Bundan dolayı, terapötik etkileri iyileştirmek için yeni ilaçlar geliştirmek esastır. Son yıllarda nanopartiküller, özgün fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı kanser terapötiklerinde daha fazla dikkat çekmiştir (Shi et al. 2017; da Silva et al. 2019). Geleneksel antikanser ajanlarla karşılaştırıldığında metalik nanopartiküller ilaç adayları ile birlikte yeni terapötik ajan veya ilaç taşıyıcısı olarak kullanılabilir ve tümör hedefli bir yaklaşım sağlanarak istenmeyen yan etkiler önlenmektedir. Bu metalik nanopartiküller arasında AgNP'ler antikanser veya antitümör terapötik ajan arayışında ideal olan nanopartiküldür (da Silva et al. 2019).

AgNP'lerin meme kanseri, servikal kanser, yumurtalık kanseri, hepatoseller karsinoma, glioblastoma, kolon kanseri, melanoma, pankreatik duktal adenokarsinoma ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlere karşı hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda boyut-, doz/konsantrasyon- ve zamana- bağlı şekillerde geniş spektrumlu antikanser özellik sergilediği gösterilmiştir (Ahmadian et al. 2018; Al-Sheddi et al. 2018; Gurunathan et al. 2015, 2018; Tavakoli et al. 2018; Yuan, Peng, and Ggurunathan 2017). Çok sayıda çalışmada, kontrol edilebilir boyut ve şekilde AgNP sentezine odaklanılmıştır

ve bu amaçla fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler de dahil olmak üzere çeşitli spesifik sentetik yöntemler geliştirilmiştir (Shanmuganathan et al. 2019).

AgNP'ler, Şekil 2.17'da gösterildiği gibi çoklu mekanizmalar aracılığıyla geniş-spektrumlu antikanser aktiviteye sahiptir (Barabadi et al. 2020; Chen et al. 2018). Sayısız *in vitro* ve *in vivo* deney sonucunda, AgNP'lerin kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve canlılığını azaltabileceği kanıtlanmıştır. AgNP'lerden salınan serbest  $Ag^+$ , hücre zarlarının yıkımında rol oynamaktadır. Ek olarak  $Ag^+$ , glutasyonun oksidasyonunu indükler ve hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu artırarak sitoplazmik bileşenlerin hasarlı hücrelerden sızmasına neden olmaktadır (Mukherjee et al. 2014). Ayrıca, AgNP'ler tarafından indüklenen ROS, DNA hasarına yol açabilir. Mitokondriye yönlendirilen süperoksit radikalleri mitokondriyal dış zar permeabilizasyonunu (outer membrane permeabilization-MOMP) ve sitokrom c'nin salınımını artırabilir, elektron taşıma zincirini tahrip edebilir ve mitokondriyal işlevi bozabilir (Garrido et al. 2006).



Şekil 2.17. AgNP'lerin antikanser mekanizmalarının şematik diyagramı (Xu ve diğerleri, 2020).

AgNP'lerin hücre alımlarının partikül-hücre veya partikül-protein etkileşimlerinin yanı sıra kısmen nanoparçacıkların şekline bağlı olduğu bilinmektedir (sen Gupta 2016; Yeasmin et al. 2017). Küçük boyutlu AgNP'ler, endositozu artırarak daha önemli sitotoksosite ve genotoksositeye neden olabilir. Yapılan birçok çalışma

sonucunda genel olarak küresel AgNP'lerin diğer şekillerle kıyaslandığında yüksek yüzey hacim oranı nedeniyle daha iyi sitotoksikite sergilediği ve genelde yüksek doz AgNP'lerin düşük doz AgNP'lere göre daha fazla apoptoza neden olduğu saptanmıştır (Yeasmin et al. 2017; Zhang, Shen, and Gurunathan 2016).

Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada yüksek biyolojik aktiviteye sahip ideal bir antikanser ajanı elde etmek için Ångstrom (bir nanometrenin onda biri,  $10^{-10}$  m) ölçeğine ulaşan çok küçük AgNP'ler başarı ile sentezlenmiştir ve bu gümüş Ångstrom nanopartiküllerin AgNP ile karşılaştırıldığında daha güçlü antikanser aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir (Wang et al. 2019).

Pei ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Coptis chinensis* (Çin düğün çiçeği) yaprak özütünden biyolojik olarak sentezlenen AgNP (CC-AgNP)'lerin A549 hücreleri için seçicilik göstererek doza-bağlı bir şekilde büyüme inhibisyonu sağladığı ve dolayısıyla antikanser ve antiproliferatif etkilerinin olduğu saptanmıştır. Ayrıca CC-AgNP'leri migrasyon ve proliferasyonu önemli ölçüde sınırlandırmıştır ve apoptotik yolun düzenlenmesiyle akciğer adenokarsinom hücrelerinde apoptozu teşvik etmiştir (Pei et al. 2019). Benzer bir çalışmada *B. thunbergii* (Bodur kadıntuzluğu) yaprak sulu ekstraktının yeşil sentez aracılı gümüş nanopartiküllerinin normal hücre hattında (HUVEC) herhangi bir sitotoksikite olmaksızın doza bağlı olarak etkili anti pankreatik kanser aktivitesine sahip olduğu ve yakında insanlarda pankreas kanserini tedavi etmek için yeni kemoterapötik takviyeler veya ilaçlar olarak kullanılabilmesi tespit edilmiştir (J. Guo et al. 2020).

Siddiqui ve arkadaşları tarafından Hep-2 insan hepatoselüler kanser hücrelerinin *Cuminum cyminum* (Kimyon tohum) özütü kullanılarak sentezlenen AgNP'ler ile muamele edilmesiyle oksidatif stres aracılı hücre ölümünün gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bundan dolayı sentezlenmiş biyojenik gümüş nanopartiküllerin umut verici terapötik ajan ve antikanser ilaç olabileceği ileri sürülmüştür (Siddiqui et al. 2020).

Priya ve diğerleri tarafından, ilk defa karidesden ekstrakte edilen kitosan indirgeme ajanı olarak kullanılarak sentezlenen biyojenik AgNP'lerin, insan karsinomu HEPG2 hücrelerine karşı antikanser aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Priya, Vijayakumar, and Janani 2020).

*Ferula persica* bitkisinin anten kısımlarının özütü kullanılarak biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve AGS insan gastrik karsinomu hücre hattı üzerine önceden yayınlanan raporlardan daha iyi antikanser etki sergilediği rapor edilmiştir (Hashemi et al. 2021).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. *Crocus sativus* (Safran) Bitkisinin Stigma Ekstraktının Hazırlanması

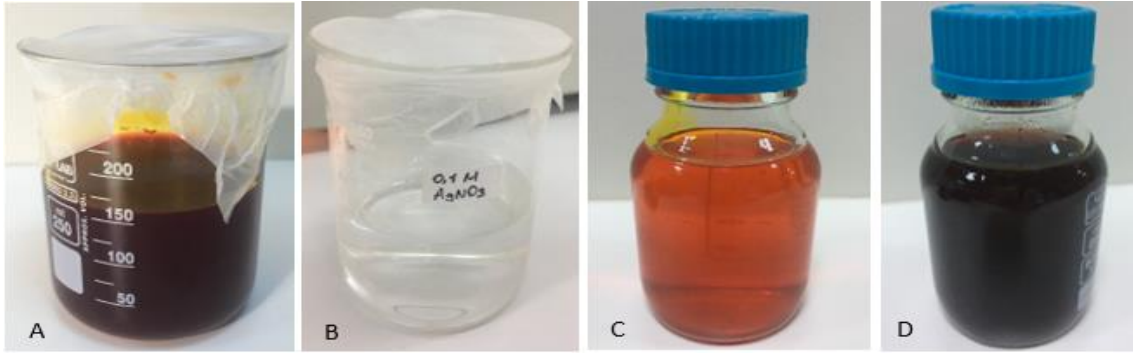
Bu çalışmada gümüş nanopartikül (AgNP) sentezi için Konya ilinin Meram ilçesinde Uzm. Dr. Berna Erayman tarafından yetiştirilen *Crocus sativus* (Safran) bitkisinin stigmaları kullanıldı. Ekstraktı hazırlamak için safran bitkisinin stigmaları musluk suyunda yıkanarak serin ve rutubetsiz ortamda kurutuldu. Bitki ekstraktını hazırlamak amacıyla çözücü olarak distile su (dH<sub>2</sub>O) kullanıldı. Kurutulan 10 gram stigma havanda tokmak yardımıyla toz haline getirildi ve 200 ml distile su içeren borosilikat cam şişeye alınarak su banyosunda bekletildi. Elde edilen ekstrakt filtre kâğıdı ile süzüldü ve daha sonra kullanılmak üzere karanlık ortamda 4°C' de muhafaza edildi.

#### 3.2. Gümüş Nitrat (AgNO<sub>3</sub>) Sulu Çözeltisinin Hazırlanması

AgNP sentezi için gerekli olan AgNO<sub>3</sub> Merck'den (Cas No: 7761-88-8) temin edildi. Hassas terazide 16,988 g AgNO<sub>3</sub> tartılarak bir miktar dH<sub>2</sub>O bulunan balon jojeye eklenip çözdürüldü ve hacim dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'e tamamlanarak 0.1 M AgNO<sub>3</sub> sulu çözeltisi hazırlandı.

#### 3.3. Gümüş Nanopartiküllerin Biyolojik Sentezi ve Saflaştırılması

AgNP'lerin sentezi için önceden hazırlanan AgNO<sub>3</sub> sulu çözeltisi ile *Crocus sativus* (Safran) bitkisinin stigma ekstraktı borosilikat cam şişede karıştırıldı. Sentez sürecinde, sıcaklığı etkili biçimde arttırmak ve sentez süresini kısaltmak amacıyla ev tipi mikrodalga fırın kullanıldı. Reaksiyon öncesinde sarı-kırmızı renkte olan karışım ev tipi mikrodalga fırında belli bir süre bekletildi ve kısa bir süre sonunda literatürde de bildirildiği gibi gümüş iyonlarının indirgenmesi ile karışım renginin koyu kahverengi olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1.) (Roy and Das 2015). Bu koyu renkli reaksiyon ve aynı koşullarda hazırlanan diğer tüm reaksiyonlar 9.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ardından üç defa dH<sub>2</sub>O ile yıkama işlemine tabi tutuldu. Santrifüj sonunda gümüş nanopartikülün bir kısmı etanol ile kurutma işlemi uygulanarak karakterizasyon analizlerinde kullanılmak üzere muhafaza edildi.



**Şekil 3.1.** (A) *Crocus sativus* (safran) stigma ekstraktı, (B) gümüş nitrat sulu çözeltisi, (C) reaksiyon öncesi karışım ve (D) reaksiyondan sonraki gümüş nanopartikül karışımı görüntüsü.

### 3.4. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Çevre dostu olan yeşil sentez yöntemiyle sentezlenen gümüş nanopartiküllerin karakterize edilmesi amacıyla UV-Visible Spektroskopisi, TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu), FE-SEM/EDX (Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu/ Enerji Dağıtıcı X-Işını Spektroskopisi), XRD (X-Işını Kırınımı), FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi), DLS (Dinamik Işık Saçılım Spektrometresi) ve Zeta potansiyel analizleri gerçekleştirildi.

Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonans (SPR) özelliklerini belirlemek amacıyla UV-Vis spektrometresi kullanılmıştır. AgNP çözeltilerinin absorbansı 300-800 nm dalga boyu aralığında UV-Vis spektrometre cihazı (Thermo Scientific™, Multiskan™ GO) ile ölçüldü. TEM analizi Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DAYTAM) hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

FE-SEM/EDX (ZEISS GeminiSEM 500) ve XRD (PANalytical Empyrean) analizleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİTAM) bünyesindeki cihazlarda hizmet alımı yapılarak çalışıldı. FTIR, DLS ve Zeta potansiyel analizleri Yıldız Teknik Üniversitesinde gerçekleştirildi.

### 3.5. Hücre Kültürü

Çalışmada gerekli olan insan pankreas kanseri hücre hattı PANC-1 ve HEK293 hücre hattı ATCC (American Type Culture Collection)' den temin edildi. Her iki hücre hattı da % 10 fetal sıgır serum (FBS) ve %1 antibiyotik (penisilin (100 U/ml), streptomisin (100 µg/µl)) eklenerek hazırlanan DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) besiyeri ile 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kültüre edildi.

### 3.5.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Pasajlanması

Dondurulmuş hücreleri içeren kriyotüp -80°C dondurucudan çıkarılarak 37°C'lik su banyosunda çözdürüldü. Steril falkon tüpe besiyeri ilave edilerek üzerine kriyotüpe bulunan sıvı eklendi ve hücreler 800 rpm de (devir/dakika) 5 dk soğutmalı santrifüj cihazında (NF 800/800R) çöktürüldü. Santrifüj sonrasında süpernatant (üst faz) atılarak pellet üzerine besiyeri eklendi ve pipetaj yapılarak hücreler homojenize edildi. Homojenize edilen hücreler %10 fetal bovine serum (FBS; Gibco, Brazil) ve %1 antibiyotik (Penicillin-Streptomycin 1:1; Gibco®-Invitrogen, ABD) içeren 3 ml DMEM (Sigma-Aldrich) besiyeri bulunan T25 kültür flaskında 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub>' li etüvde doluluk oranına ulaşmıca kadar inkübasyona bırakılarak kültüre edildi ve yeni flasklara pasajlandı. Flaskın yüzeyini kaplayan hücreler cell scraper ile kaldırıldı ve 800 rmp'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı. Tüpün dibinde kalan pellet 1 ml besiyeri eklenerek çözüldü.

### 3.5.2. Hücrelerin Sayılması

Çözdürülen hücre süspansiyonu ve tripan blue boyası 1:1 oranında karıştırıldı. Pipetaj sonrasında hücre sayım lamına boyanmış hücre süspansiyonu sızdırıldı. İverted mikroskopta (EP50 OLYMPUS) ölü hücrelerin boyayı içine alarak maviye boyandığı canlı hücrelerinde beyaz ve parlak olduğu görüldü. Canlı hücrelerin sayıları aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$\text{Hücre sayısı (1 ml)} = \text{Sayılan karelerdeki ortalama hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

### 3.6. Nanopartikül Dozlarının Uygulanması

96 kuyucuklu platalere her kuyucukta  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat 37°C %5 CO<sub>2</sub> etüvde inkübe edildi. Süre sonunda eski besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak biyolojik olarak sentezlenen gümüş nanopartikül (AgNP<sub>(b)</sub>), kimyasal olarak sentezlenen ticari gümüş nanopartikül (AgNP<sub>(k)</sub>)(US Research Nanomaterials, Inc, US1036), ekstrakt ve AgNO<sub>3</sub> için farklı konsantrasyonlarda (0-200 µg/ml) hazırlanan dozlar hücrelere verildi. % hücre canlılığın hesaplanabilmesi için üç tekrarlı iki kontrol grubuna besiyeri eklendi.

### 3.7. Hücre Canlılık Analizi

AgNO<sub>3</sub>, ekstrakt, AgNP<sub>(b)</sub> ve AgNP<sub>(k)</sub>'lerin sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi uygulandı. Etüvde 24 saat boyunca inkübe edilen plateler içindeki kuyucuklardan farklı konsantrasyonlardaki dozları içeren eski besiyeri uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100 µl 5 mg/ml MTT (AppliChem, Almanya, #5P011404) solüsyonu eklendi. 4 saat 37°C %5 CO<sub>2</sub> etüvde inkübe edildi ve süre sonunda MTT solüsyonu uzaklaştırıldı. Hücreler üzerine 100 µl DMSO eklenerek yarım saat karanlık bir ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında Thermo Scientific™ Multiskan SkyHigh Mikroplate Spektrofotometre (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO, ABD) ile 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. AgNP<sub>(b)</sub>, AgNP<sub>(k)</sub>, AgNO<sub>3</sub> ve ekstrakt uygulaması sonucundaki % canlılıklar kontrol grubu ile kıyaslanarak istatistiksel olarak hesaplandı ve IC<sub>50</sub> dozları belirlendi.

### 3.8. RNA İzolasyonu ve Miktar Ölçümü

Her flaskta 9x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde PANC-1 insan pankreas kanseri hücreleri ve sağlıklı hücre hattı olan HEK293 hücrelerinin ekimi yapıldı. Flasklar 37°C %5 CO<sub>2</sub> etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra belirlenen IC<sub>50</sub> dozları hazırlanarak flasklara uygulandı. Tekrar 37°C %5 CO<sub>2</sub> etüvde 24 saat inkübasyondan sonra hücreler cell scraper ile kazınarak steril falkona toplandı ve 1400 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet üzerine 500 µl Trizol (Sigma-Aldrich®, Almanya, #BCBX6548) eklendi ve pipetaj yapılarak pellet çözdürüldü. Ardından 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 200 µl kloroform eklendikten sonra steril ependorfa alındı ve +4 °C'de 12.000 g'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Fay ayrımı gerçekleştikten sonra üst faz dikkatli bir şekilde yeni ependorfa aktarıldı. Üzerine 200 µl izopropanol eklenip 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve tekrar +4 °C'de 12.000 g'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 1000 µl %75'lik etilalkol eklendi ve +4 °C'de 7500 g'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve pellet kabinde kurumaya bırakıldı. 25 µl nükleaz free su ile çözdürüldü.

RNA izolasyonu aşaması tamamlandıktan sonra Thermo Scientific™ Multiskan SkyHigh Mikroplate Spektrofotometre (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO, ABD) cihazı yardımıyla RNA'ların saflığı ve miktarı ölçüldü. Blank olarak Nanodrop Plate'ine (Thermo Scientific™ µDrop™ and µDrop Duo Plate, N12391M2) nükleaz free su konuldu. Her tüpteki RNA örneğinden 3 µl µDrop Plate'ine konuldu. Cihazdaki ScanIt

Software 4.0 programı kullanılarak RNA örneklerinin konsantrasyonları (ng/  $\mu$ l) ve saflığı (OD260/280) ölçüldü.

### 3.9. Agaroz Jel Hazırlanması, Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Konsantrasyon ve saflığı ölçülen RNA'lar kalitelerini değerlendirmek amacıyla agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jel hazırlanması ve jelin yürütüleceği tanka eklemek için 50X TAE Buffer (BioShop, # TAE222.1) (Tris Asetat EDTA)'dan 1x TAE Buffer hazırlandı. 100 ml 1X TAE Buffer bulunan şişeye 1 g agaroz (Sigma-Aldrich, #A9539) eklendi. Agaroz tamamen eriyene kadar mikrodalga fırında yüksek ayarda ısıtıldı ve el yakmayana kadar soğutuldu. Sonra 5  $\mu$ l RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (20,000x) (İntron Biotechnology, #21141) eklendi ve boyanın homojen dağılması için karıştırıldı. Hazırlanan jel önceden hazırlanmış jel kasetine dökülerek donması beklendi. Jel donduktan sonra tarak çıkartıldı ve jel kasetle beraber elektroforez tankına yerleştirildi. Önce ilk kuyucuğa 4  $\mu$ l RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo Scientific™, #SM1823) yüklendi. Diğer kuyucuklara 2X RNA Loading Dye ile karıştırılan RNA örnekleri yüklendi. Elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak RNA örnekleri 110 V'da 1 saat yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel tanktan alındı ve jel görüntüleme cihazında (ChemiDoc™ Touch Imaging System) görüntülendi.

### 3.10. cDNA Sentezi

RNA örneklerinden cDNA elde etmek için RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit'i (Thermo, #K1622) ile çalışıldı. cDNA sentez protokolüne başlamadan önce ölçülen RNA konsantrasyonları nükleaz free su ile 1  $\mu$ g'a eşitlendi ve total hacim her RNA örneği için 10  $\mu$ l oldu. RNA örneklerini içeren tüpe sırasıyla 1  $\mu$ l Oligo(dT) 18 primer ve 1  $\mu$ l Random Hekzamer primer eklendi. Son durumda total hacim her örnek için 12  $\mu$ l oldu. Tüpler 65°C'de 5 dk 1 döngü olacak şekilde inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra tüpler buz üzerine alındı ve her örnek için ayrı bir tüpte 8  $\mu$ l mix hazırlandı. Mix içerisinde 4  $\mu$ l 5X Reaction Buffer, 1  $\mu$ l RiboLock RNase Inhibitor, 2  $\mu$ l 10 mM dNTP Mix ve 1  $\mu$ l RevertAid M-MuLVRT (200 U/  $\mu$ l) bulunmaktadır. Her 12  $\mu$ l'lik örnek RNA-primer karışımına hazırlanan mixten 8  $\mu$ l dağıtılır. Bu işlemden sonra her bir tüpte total hacim 20  $\mu$ l oldu. Tüpler Thermal Cycler cihazında 42°C'de 60 dk, 25'de 5 dk, 42°C'de 60 dk ve 70°C'de 5 dk döngü programı hazırlanarak inkübe edildi. Süre sonunda tüpler cihazdan alındı ve kullanılabileceği kadar -80°C'de muhafaza edildi.

### 3.11. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR çalışması için FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Version 07, #06402712001) kiti ve QuantStudio3 cihazı (Thermo, ABD) kullanıldı.

Ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla HIF1 $\alpha$ , GLUT1, FLT-1, VEGFA, Bcl-2 ve Bax genlerine spesifik tasarlanan primer dizileri Tablo 3.1'de verilmiştir. Tasarlanan primerlerin sentezi Oligomer Biyoteknoloji tarafından gerçekleştirilip uygun koşullarda tarafımıza teslim edildi.

**Tablo 3.1.** Ekspresyon analizinde kullanılan genlere spesifik primer dizileri.

Gen	Primer Dizisi
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	F: 5'-CCTTATCAAGATGCGAACTCACA-3' R: 5'-GAACGTCGAAAAGAAAAGTC-3'
<b>GLUT1</b>	F: 5'-CCGCAACGAGGAGAACCG-3' R: 5'-GTGACCTTCTTCTCCCGCATC-3'
<b>FLT-1</b>	F: 5'-GCAGATTTCTCAGTCGCAGG-3' R: 5'-GTCGTGTAAGGAGTGGACCA-3'
<b>VEGFA</b>	F: 5'-GGCCAGCACATAGGAGAGAT-3' R: 5'-ACGCTCCAGGACTTATACCG-3'
<b>Bcl-2</b>	F: 5'-TTGTAATTCATCTGCCGCCG-3' R: 5'-CAATGAATCAGGAGTCGCGG-3'
<b>Bax</b>	F: 5'-TTTGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3' R: 5'-TGAAGTTGCCGTCAGAAAACAT-3'
<b><math>\beta</math>-actin</b>	F: 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' R: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'

Çalışılacak hedef genler için kit protokolüne göre 5  $\mu$ l SYBR Green qPCR Master Mix (2x), 1  $\mu$ l Forward-Reverse primer ve 2  $\mu$ l PCR Grade dH<sub>2</sub>O bulunan mix hazırlandı. Hazırlanan mixten tüm kuyucuklara 2 tekrarlı olacak şekilde 8  $\mu$ l ve üzerine 2  $\mu$ l cDNA örnekleri pipetaj yapıldı. Cihazda çalışılacak genler için program özellikleri ayarlandı ve reaksiyon 40 döngü olarak başlatıldı (Tablo 3.2.).

**Tablo 3.2.** RT-PCR program özellikleri.

Reaksiyon	Zaman	Sıcaklık
Denatürasyon	15 saniye	95°C
Annealing (primer bağlanması)	30 saniye	58 °C
Uzama	60 saniye	72°C

### 3.12. İstatistiksel Analiz

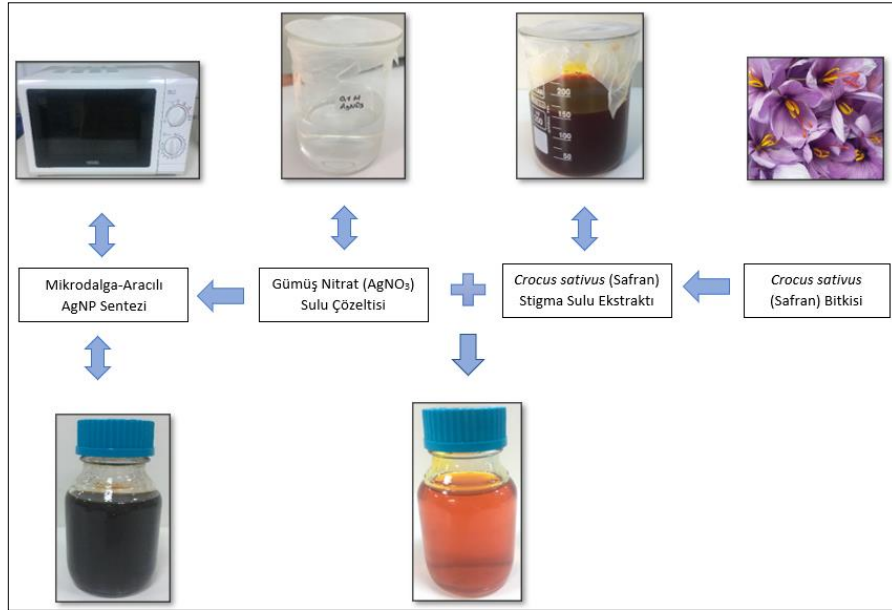
İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8.0.1 programı (GraphPad Software Inc., San Diego, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. MTT sonucunda elde edilen veriler nonlineer regresyon analizi ile değerlendirildi. Gruplar arası farklılıkları değerlendirmek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Veriler, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama  $\pm$  SD olarak sunulmuştur ve 0.05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Araştırma Sonuçları

#### 4.1.1. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi

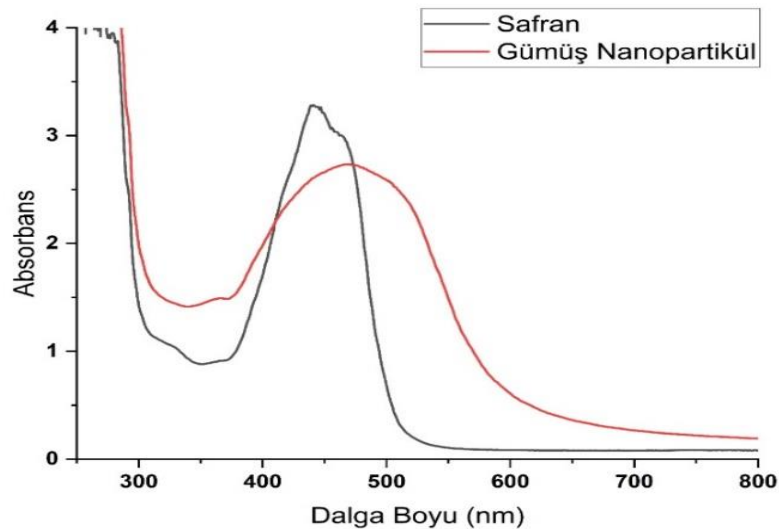
Gümüş nanopartiküller *Crocus sativus* (Safran) bitkisinin stigmalarının sulu ekstraktı kullanılarak mikrodalga-aracılı olarak sentezlendi. Sentez aşamasında kullanılan gümüş nitrat ( $AgNO_3$ ) sulu çözeltisi reksiz, safran sulu ekstraktı ise sarı-kırmızı renkliydi.  $AgNO_3$  sulu çözeltisine safran sulu ekstraktının eklenmesi ve mikrodalgada fırında ısıtma işlemini takiben koyu kahverengiye doğru renk değişimi gözlemlendi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. *Crocus sativus* (safran) bitki stigma kısımlarından biyolojik AgNP sentezi.

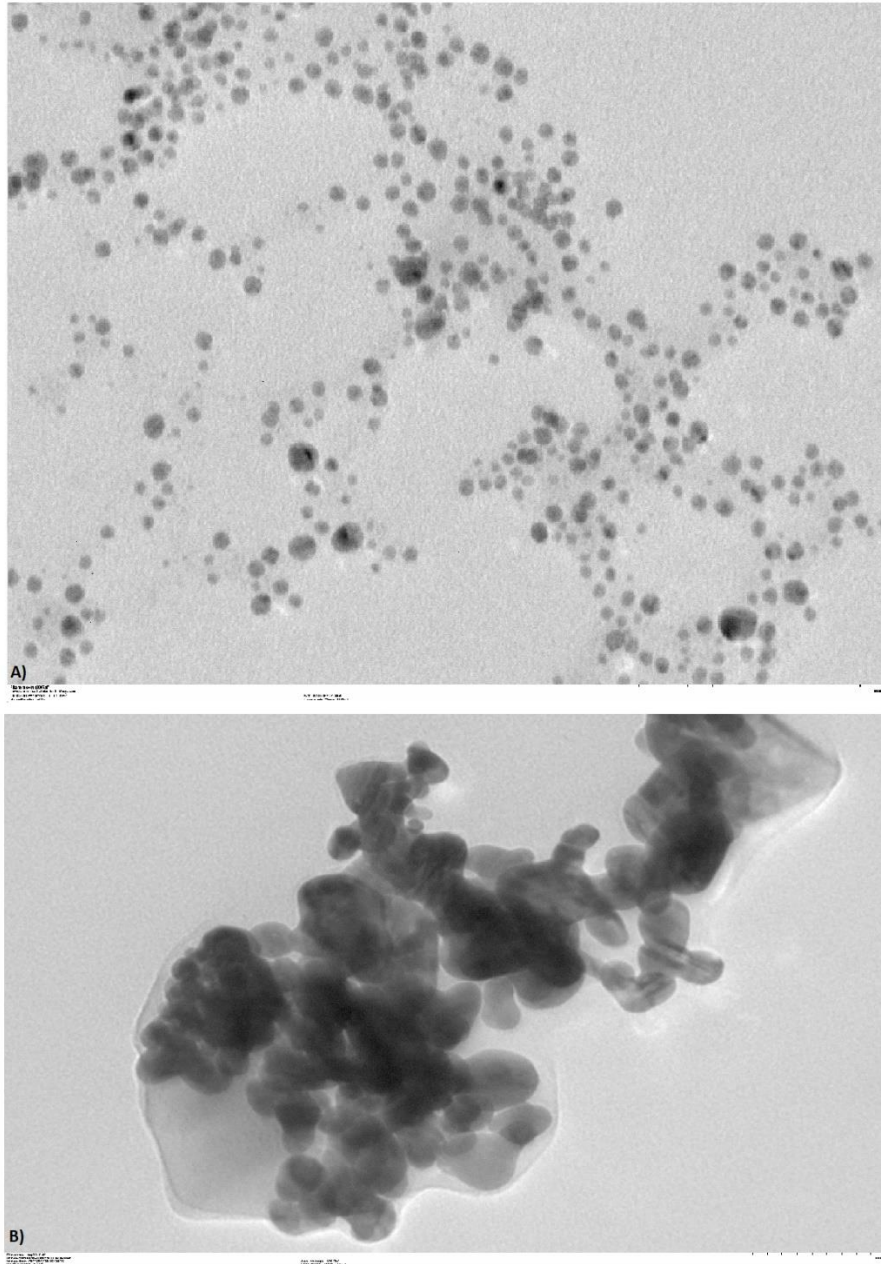
#### 4.1.2. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonans (SPR) özelliklerini belirlemek amacıyla UV-Vis spektrometresi kullanıldı. Çalışmadaki UV-Vis spektrum analizi Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü laboratuvarında gerçekleştirildi. AgNP çözeltilerinin absorbansı 300-800 nm dalga boyu aralığında UV-Vis spektrometre (Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Multiskan<sup>TM</sup> GO) ile ölçüldü. *Crocus sativus* (Safran) bitkisinin stigma ekstraktından sentezlenen AgNP'lerin 471 nm de maksimum pik verdiği gözlemlendi (Şekil 4.2).



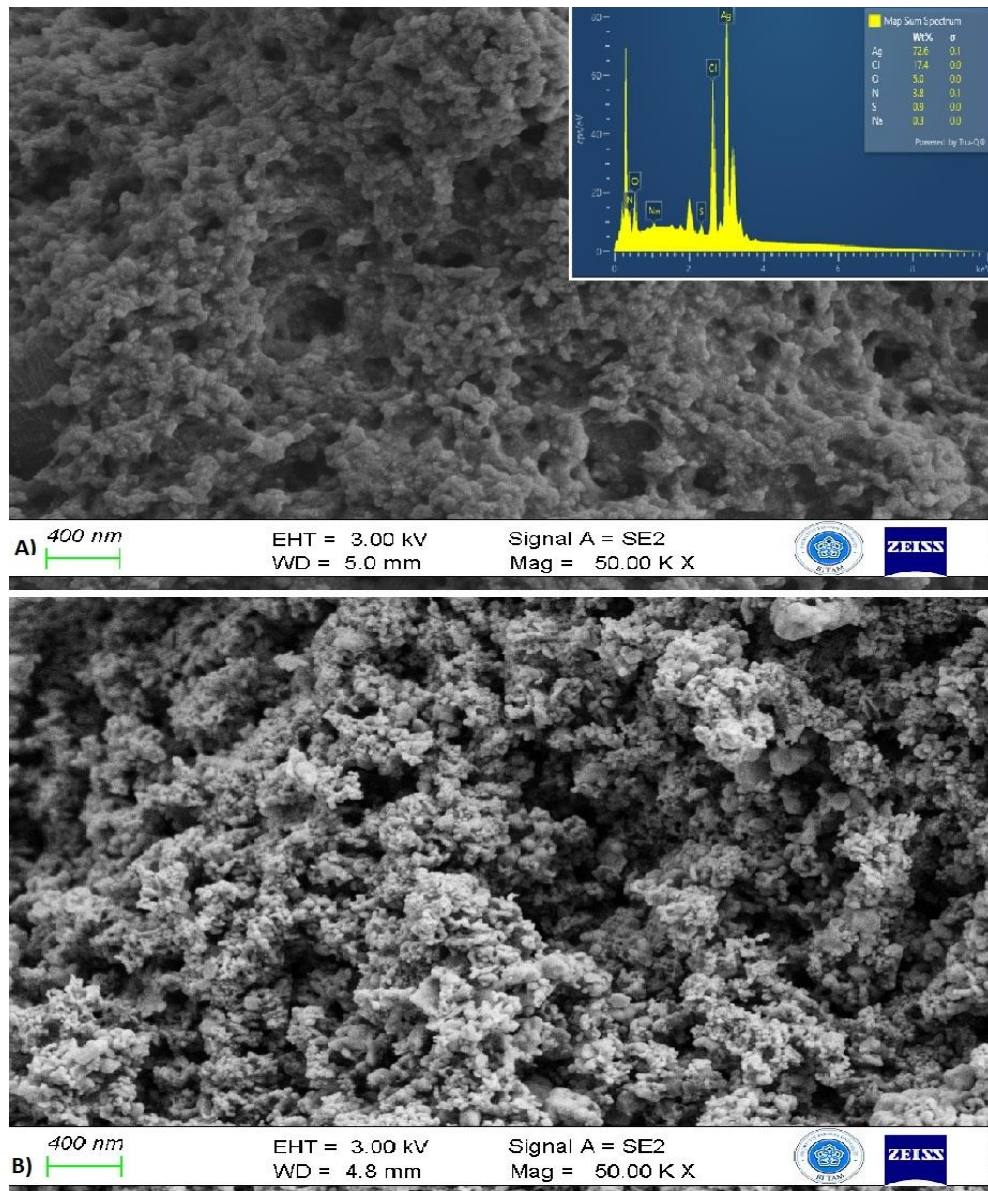
Şekil 4.2. UV-Vis spektrum analizi sonucu.

Bu çalışmadaki TEM analizi, biyolojik olarak sentezlenen ve ticari olarak satın alınan gümüş nanopartiküllerin boyutu hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'e hizmet alımı şeklinde yaptırıldı. Biyolojik olarak sentezlenen gümüş nanopartikül ( $AgNP_{(b)}$ ) boyutlarının 2-20 nm arasında dağılan oranda olduğu gözlemlendi. Ticari olarak satın alınan kimyasal gümüş nanopartikül ( $AgNP_{(k)}$ ) boyutlarının 30-50 nm arasında dağılan oranda olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3.)



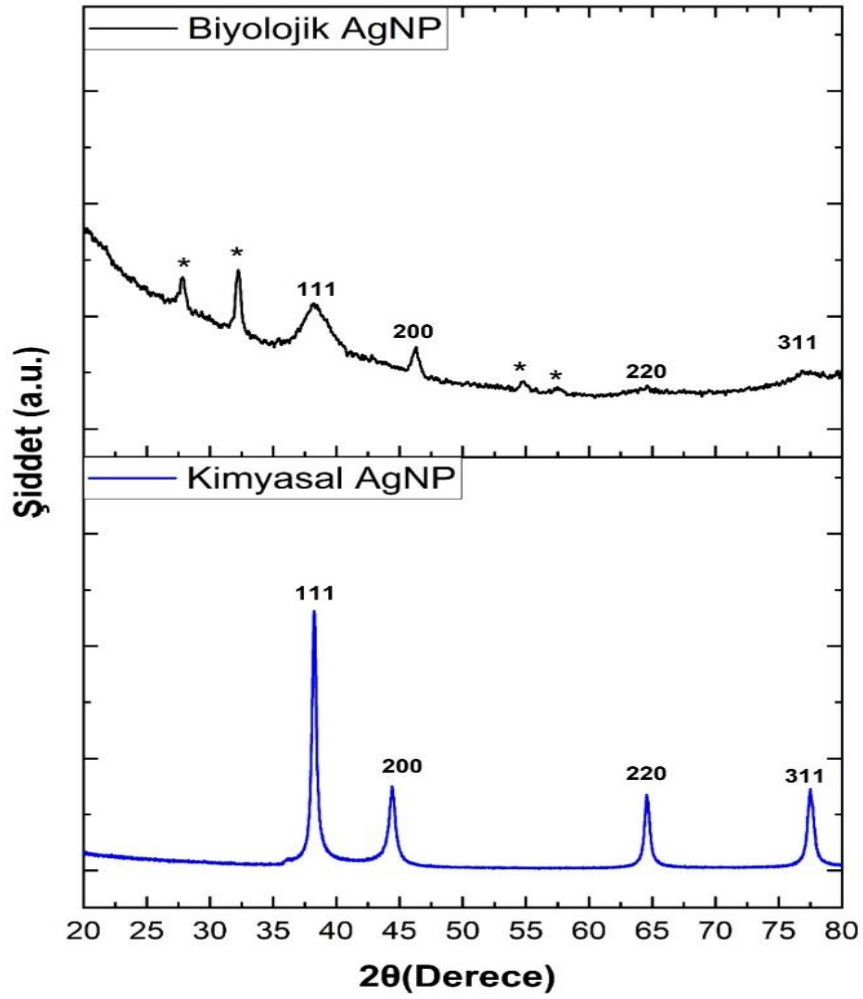
Şekil 4.3.  $AgNP_{(b)}$  (A) ve  $AgNP_{(k)}$  (B) TEM analizi sonucu.

Bu çalışmadaki FE-SEM/EDX analizi, AgNP<sub>(b)</sub> ve AgNP<sub>(k)</sub>'lerin morfolojisi hakkında bilgi edinmek amacıyla Necmettin Erbakan Üniversitesi'nde Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezine (BİTAM) hizmet alımı şeklinde yaptırıldı. Biyolojik olarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin yapıya sahip olduğu gözlemlendi. AgNP<sub>(b)</sub>'lerin yapıya sahip olduğu ve AgNP<sub>(k)</sub> yapıya sahip olduğu (Şekil 4.6) belirlendi. Ayrıca yapılan EDS analizi sonucunda %72,6 Ag, %17,4 Cl, %5 O, %3,8 N, %0,9 S ve %0,3 Na elementlerinin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4). Gümüş dışındaki elementlerin safran sulu ekstraktından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



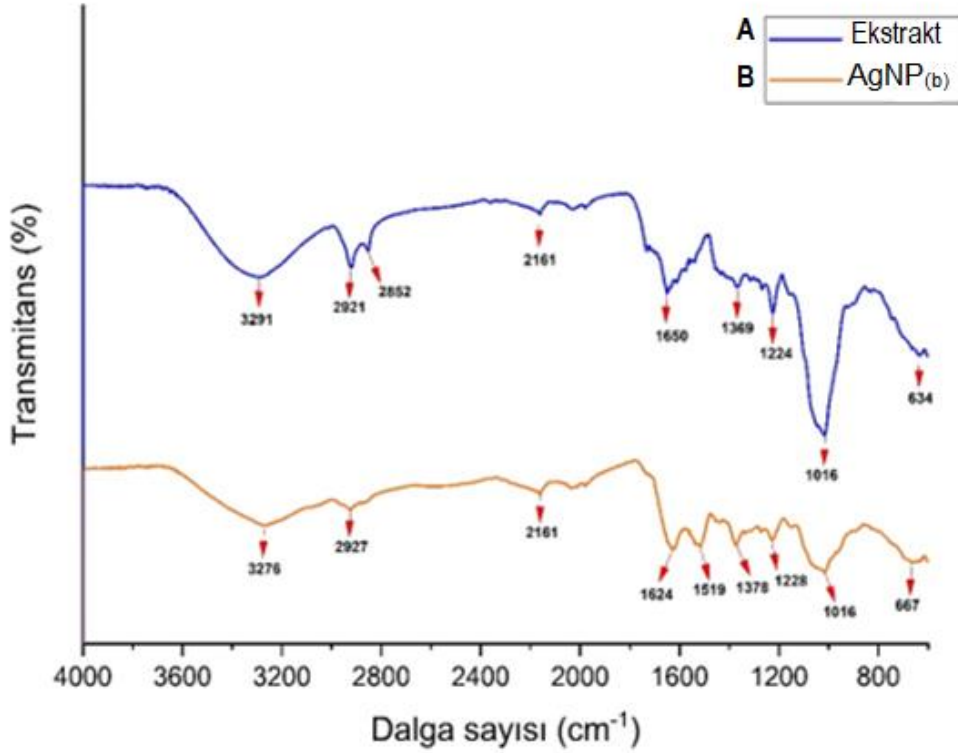
Şekil 4.4. AgNP<sub>(b)</sub> (A) ve AgNP<sub>(k)</sub> (B) FE-SEM-EDX analizi sonucu.

Bu çalışmadaki XRD analizi,  $AgNP_{(b)}$  ve  $AgNP_{(k)}$ 'lerin Necmettin Erbakan Üniversitesi'nde Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezine (BİTAM) hizmet alımı şeklinde yaptırıldı. XRD paterni  $10^{\circ}$ - $80^{\circ}$  arasında  $2\theta$  aralığında  $0,02$  adım büyüklüğü ile çalışıldı.  $AgNP$ 'lerin XRD sonuçlarında literatürde bildirilen  $AgNP$ 'lere benzer şekilde (111), (200), (220) ve (311) ile ilişkili olan  $2\theta$  derece aralıklarında dört kırınım piki gözlemlendi (Şekil 4.5.). Ek olarak biyolojik olarak sentezlenen  $AgNP$ 'lerde karakteristik pikler dışında farklı piklerde gözlemlendi.



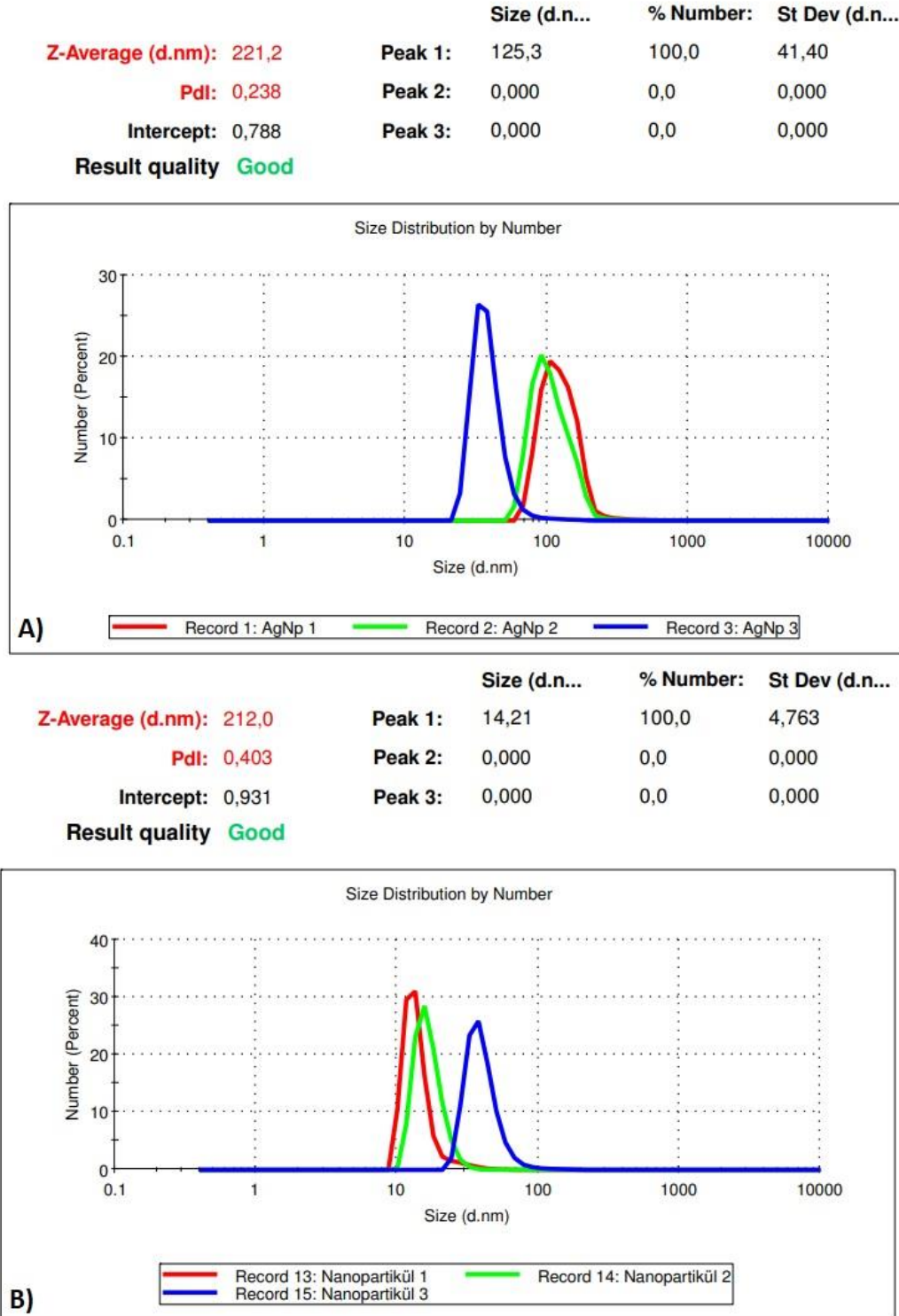
Şekil 4.5.  $AgNP_{(b)}$  ve  $AgNP_{(k)}$  XRD analizi sonucu.

Bu çalışmadaki FTIR analizi AgNP<sub>(b)</sub> ve safran yüzeyinde bağlı olarak bulunan organik fonksiyonel grupları tespit etmek amacıyla Yıldız Teknik Üniversitesinde yaptırıldı (Şekil 4.6.). Sırasıyla analiz sonucunda 3276 cm<sup>-1</sup>, 2927 cm<sup>-1</sup>, 2161 cm<sup>-1</sup>, 1624 cm<sup>-1</sup>, 1519 cm<sup>-1</sup>, 1378 cm<sup>-1</sup>, 1228 cm<sup>-1</sup>, 1016 cm<sup>-1</sup>, 667 cm<sup>-1</sup> bantları ve 3291 cm<sup>-1</sup>, 2921 cm<sup>-1</sup>, 2852 cm<sup>-1</sup>, 2161 cm<sup>-1</sup>, 1650 cm<sup>-1</sup>, 1369 cm<sup>-1</sup>, 1224 cm<sup>-1</sup>, 1016 cm<sup>-1</sup>, 634 cm<sup>-1</sup> bantları gözlemlendi. Bu piklerden safran için 2921 ve 2852 cm<sup>-1</sup>'de tespit edilen iki farklı pik, -CH<sub>2</sub>-gerilmesi ve -CH<sub>3</sub> gerilmesine karşılık gelmektedir. 600-680 cm<sup>-1</sup> aralığında bant alkil halojenürleri göstermektedir (Anastasaki et al. 2010). Ayrıca, 1624 cm<sup>-1</sup> aralığı karbonil grubunun C=O bağı ve bu bölgede ortaya çıkması muhtemel amidlerin gerilme titreşimleri ile ilgilidir. Ayrıca, güçlü hidrojen bağlarına sahip alkol ve fenolik bileşiklerdeki tek bağı OH gerilmesi 3.200-3.500 cm<sup>-1</sup> aralığında bulunur. 1016 cm<sup>-1</sup>'deki FTIR bandı C-O fenolik bileşiklerini göstermektedir. Bu piklerin varlığı nanopartiküllerin terpenoidler, flavonoidler, glikozitler, fenoller, tanenler gibi keton, aldehit, karboksilik asit ve diğerleri gibi fonksiyonel gruplara sahip bitki ikincil metabolitleri tarafından kaplandığını doğrulamaktadır (Bagherzade, Tavakoli, and Namaei 2017).



Şekil 4.6. Ekstrakt (A) ve AgNP<sub>(b)</sub> (B) FTIR analiz görüntüsü.

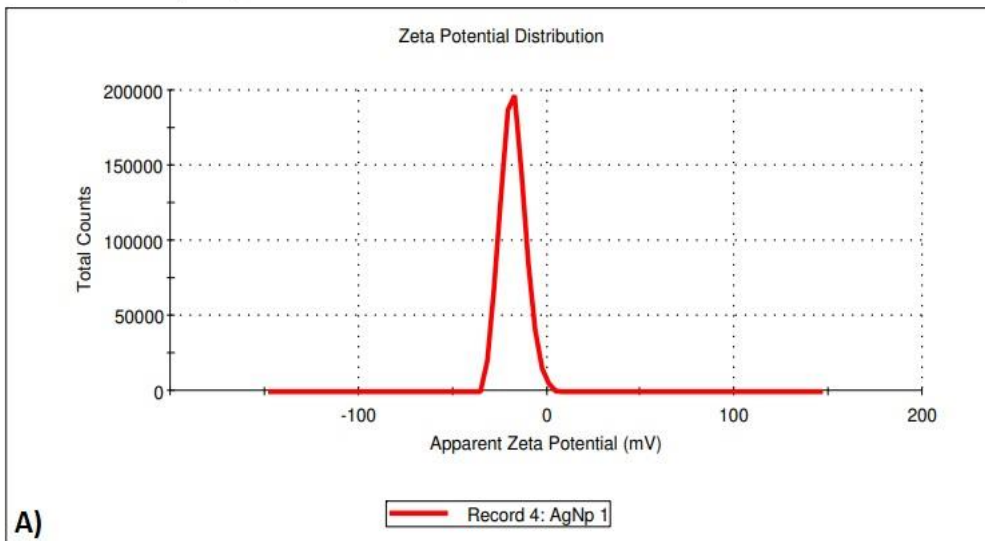
Bu çalışmadaki DLS analizi AgNP<sub>(b)</sub> ve AgNP<sub>(k)</sub>'lerin boyut dağılımı hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla Yıldız Teknik Üniversitesinde yaptırıldı (4.7.). Sırasıyla polidispers indeksleri (Pdl) 0,238 ve 0,403 olarak kaydedildi.



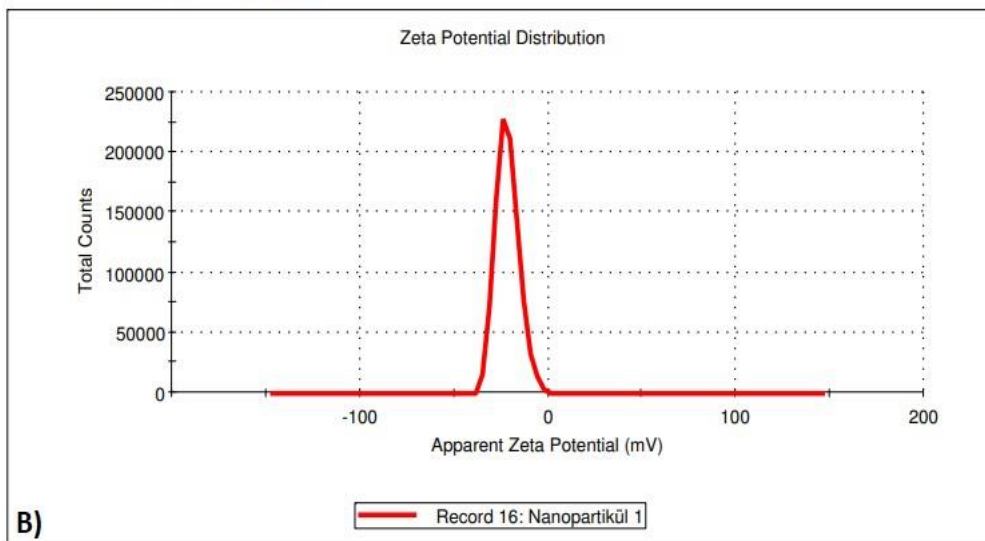
Şekil 4.7. AgNP<sub>(b)</sub> (A) ve AgNP<sub>(k)</sub> (B) DLS analiz sonuçları.

Bu çalışmadaki zeta potansiyel analizi, AgNP<sub>(b)</sub> ve AgNP<sub>(k)</sub> yüzey yükü hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla Yıldız Teknik Üniversitesinde yaptırıldı. AgNP<sub>(b)</sub> ve AgNP<sub>(k)</sub> zeta potansiyelleri sırasıyla -17,8 mV ve -21,5 mV olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.8.).

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV): -17,8</b>	<b>Peak 1: -17,8</b>	100,0	6,49
<b>Zeta Deviation (mV): 6,49</b>	<b>Peak 2: 0,00</b>	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm): 0,0444</b>	<b>Peak 3: 0,00</b>	0,0	0,00
<b>Result quality Good</b>			



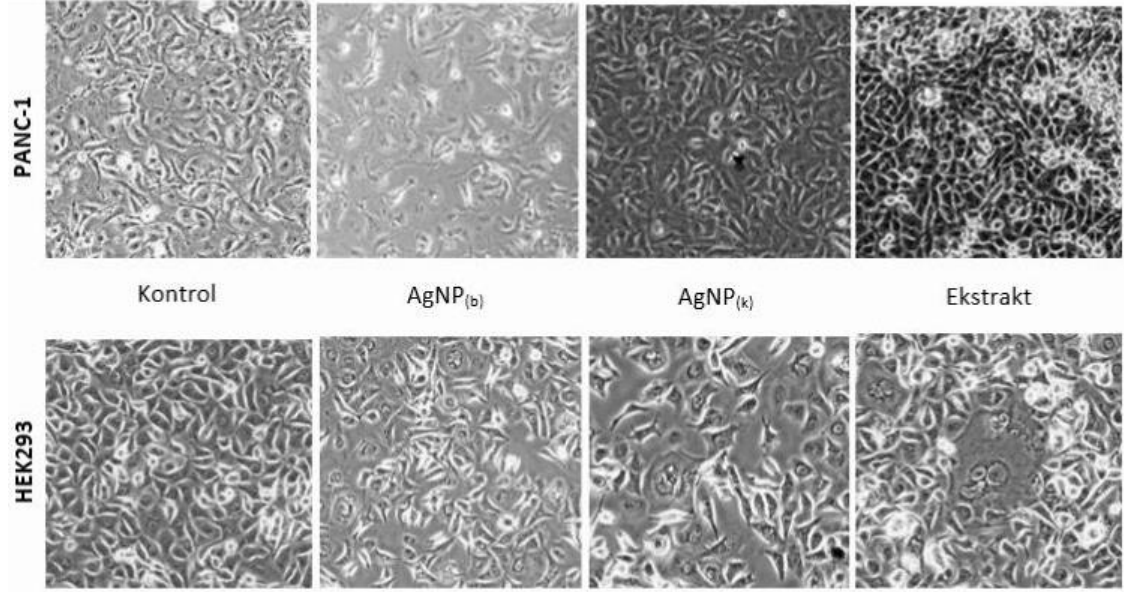
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV): -21,5</b>	<b>Peak 1: -21,5</b>	100,0	6,09
<b>Zeta Deviation (mV): 6,09</b>	<b>Peak 2: 0,00</b>	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm): 0,0437</b>	<b>Peak 3: 0,00</b>	0,0	0,00
<b>Result quality Good</b>			



Şekil 4.8. AgNP<sub>(b)</sub> (A) ve AgNP<sub>(k)</sub> (B) Zeta potansiyel analiz sonuçları.

#### 4.1.3. Doz Uygulaması Sonrası Hücrelerin Morfolojisi

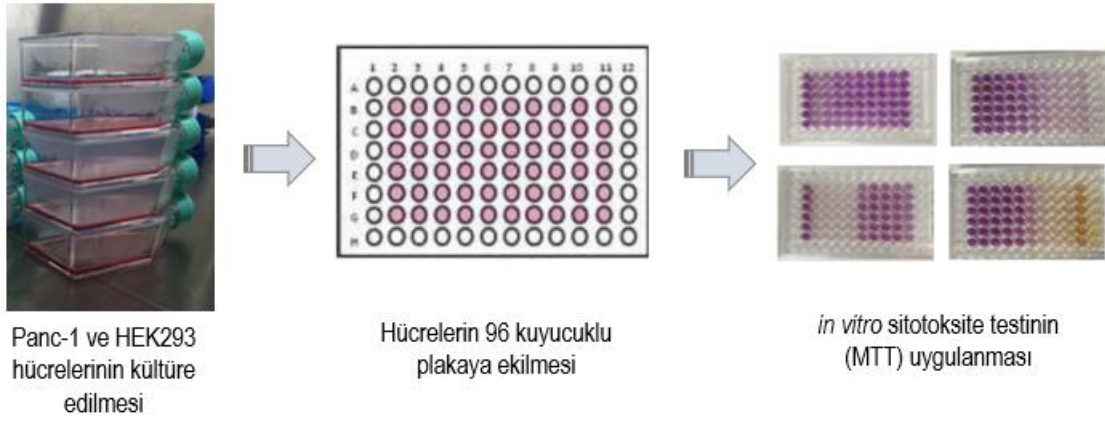
PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarına farklı konsantrasyonlarda ekstrakt, AgNP<sub>(b)</sub> ve AgNP<sub>(k)</sub> uygulaması yapıldıktan 24 saat sonra inverted mikroskopta 10x optik büyütmede görüntü elde edildi (Şekil 4.9.). Yapılan incelemeler sonucunda kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman her iki nanopartikülün ve ekstraktın uygulanması sonucunda konsantrasyondaki artışa bağlı olarak hücre canlılığında azalma gözlemlendi.



Şekil 4.9. Doz uyguladıktan 24 saat sonra hücre morfoloji görüntüleri.

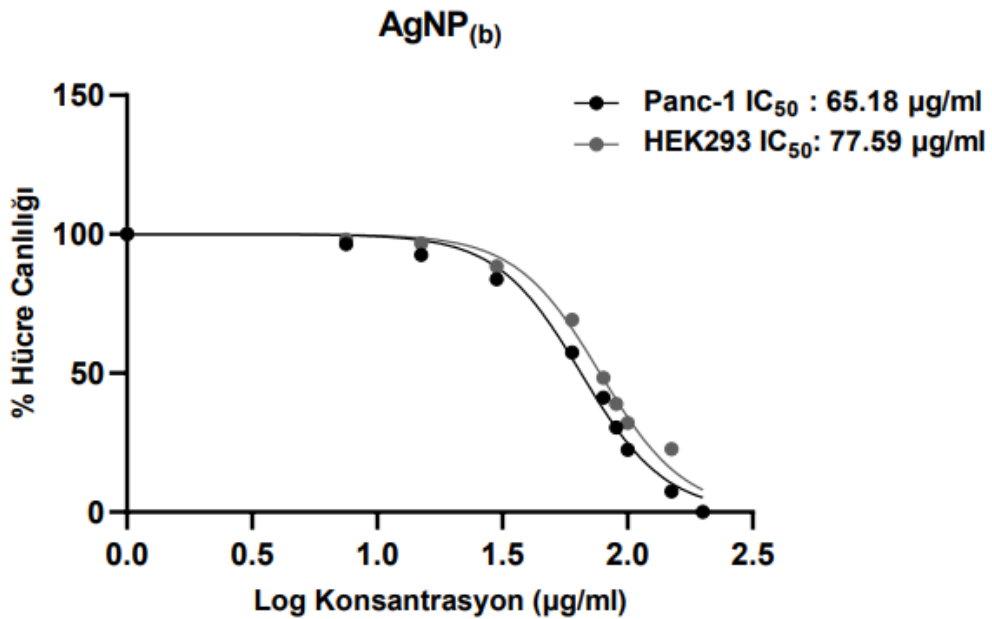
#### 4.1.4. Hücrelerin Canlılık Analizi

PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarına IC<sub>50</sub> dozu belirlemek amacıyla AgNP<sub>(b)</sub>, AgNP<sub>(k)</sub>, ekstrakt (0-200 µg/ml) ve AgNO<sub>3</sub> (0-4 µg/ml) sulu çözeltisi için artan farklı konsantrasyonlardaki dozlarda uygulama yapıldı. 24 saat inkübasyondan sonra uygulamaların in vitro sitotoksitesini belirlemek için MTT analizi uygulandı ve spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı (Şekil 4.10.). Kontrol grupları ve uygulanan doz gruplarının absorbans sonuçları değerlendirilerek % hücre canlılıkları hesaplandı. % hücre canlılık grafikleri logaritmik olarak verildi. Doz uygulanması sonucunda artan farklı konsantrasyonlarda Panc-1 ve HEK293 hücre hatlarındaki canlılıkların anlamlı ölçüde azaldığı belirlendi (p<0.05).



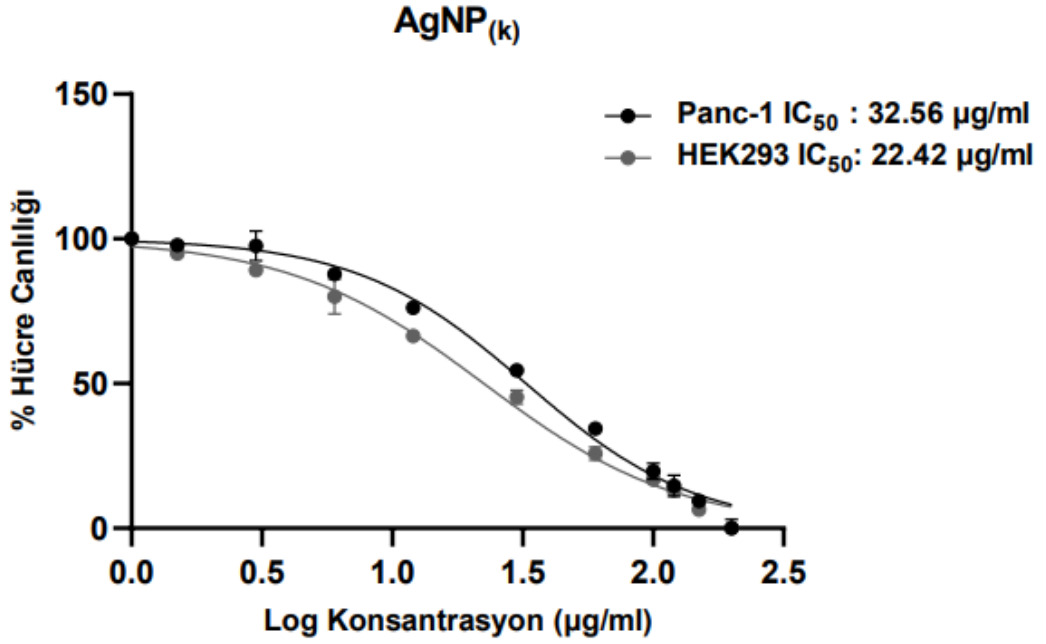
Şekil 4.10. Hücre canlılık analizi aşamaları.

24 saatlik artan farklı AgNP<sub>(b)</sub> doz uygulamasından sonra PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarının hücre canlılık yüzdeleri doza bağımlı bir şekilde azaldı. Panc-1 ve HEK293 hücrelerinde IC<sub>50</sub> dozu sırasıyla 65.18 µg/ml ve 77.59 µg/ml olarak hesaplandı (Şekil 4.11.). Uygulanan en yüksek doz olan 200 µg/ml konsantrasyonu için canlılık ~%13 olarak kaydedildi. *Crocus sativus* (Safran) stigma kısımlarının sulu ekstraktı ile biyolojik olarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin normal hücre hattında (HEK293) sitotoksik etkisi düşük konsantrasyonlarda önemli bir toksisite göstermezken, uygulanan 77.59 µg/ml AgNP konsantrasyonunun artmasıyla birlikte sitotoksitenin arttığı gözlemlendi.



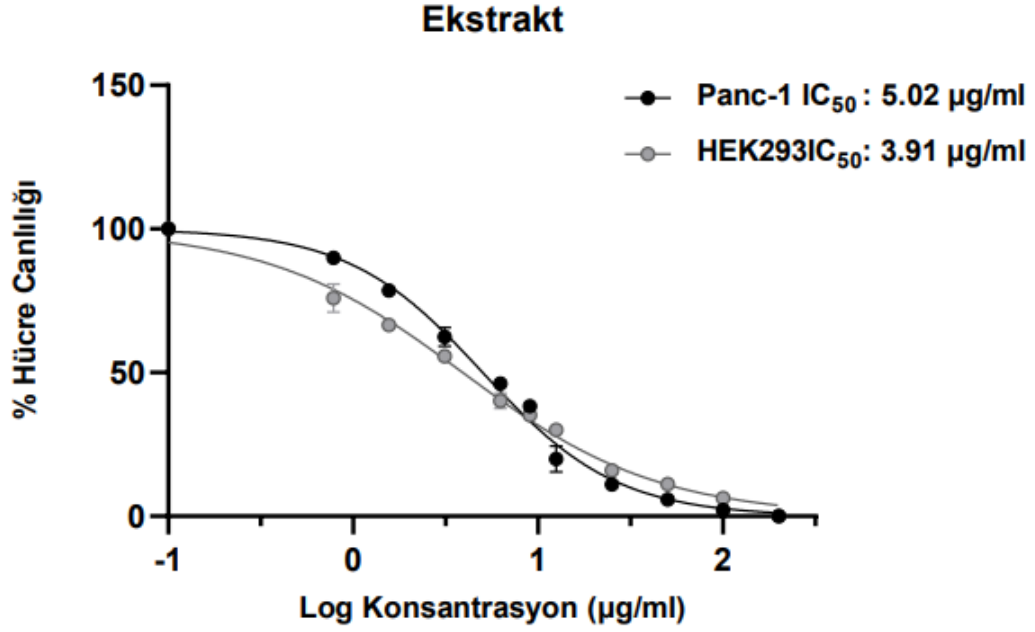
Şekil 4.11. PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarına uygulanan AgNP<sub>(b)</sub> dozlarının hücre canlılığına etkisi.

24 saatlik artan farklı  $AgNP_{(k)}$  doz uygulamasından sonra PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarının hücre canlılık yüzdeleri doza bağımlı bir şekilde azaldı. PANC-1 ve HEK293 hücrelerinde  $IC_{50}$  dozu sırasıyla  $32.56 \mu\text{g/ml}$  ve  $22.42 \mu\text{g/ml}$  olarak hesaplandı (Şekil 4.12.). PANC-1 pankreas kanseri hücre hattında yüksek sitotoksite sergilediği fakat HEK293 normal hücre hattına toksik etkiye sahip olduğu tespit edildi.



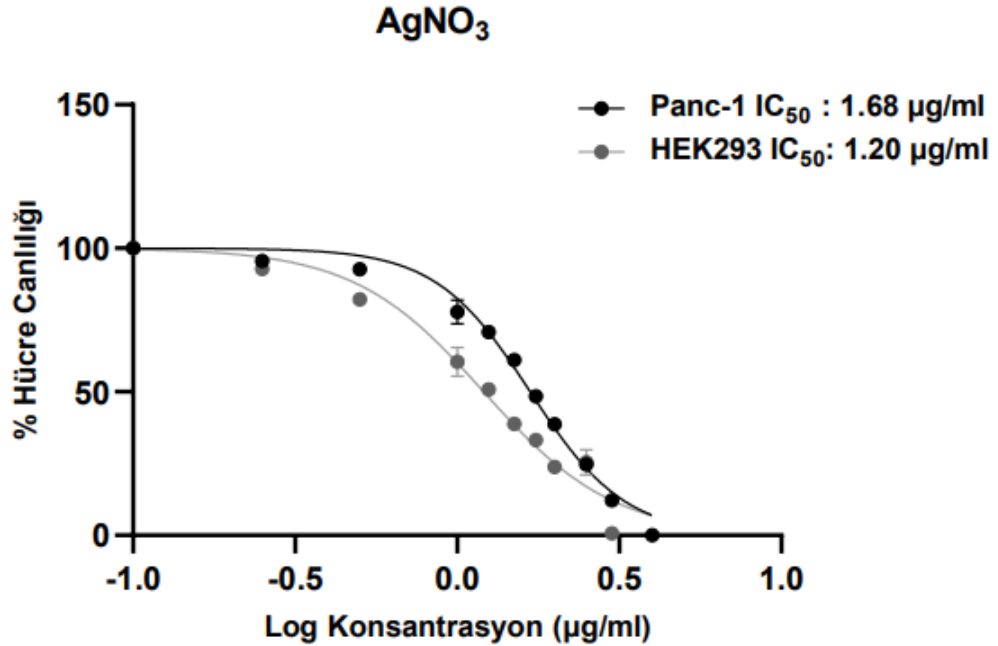
Şekil 4.12. PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarına uygulanan  $AgNP_{(k)}$  dozlarının hücre canlılığına etkisi.

24 saatlik artan farklı ekstrekt doz uygulamasından sonra PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarının hücre canlılık yüzdeleri doza bağımlı bir şekilde azaldı. PANC-1 ve HEK293 hücrelerinde  $IC_{50}$  dozu sırasıyla  $5.02 \mu\text{g/ml}$  ve  $3.91 \mu\text{g/ml}$  olarak hesaplandı (Şekil 4.13.). Ekstrekt uygulamasının PANC-1 pankreas kanseri hücre hattına sitotoksitesinin yüksek olduğu ve normal hücre hattı olan HEK293 için oldukça toksik etkiye sahip olduğu görüldü.



Şekil 4.13. PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarına uygulanan ekstrakt dozlarının hücre canlılığına etkisi.

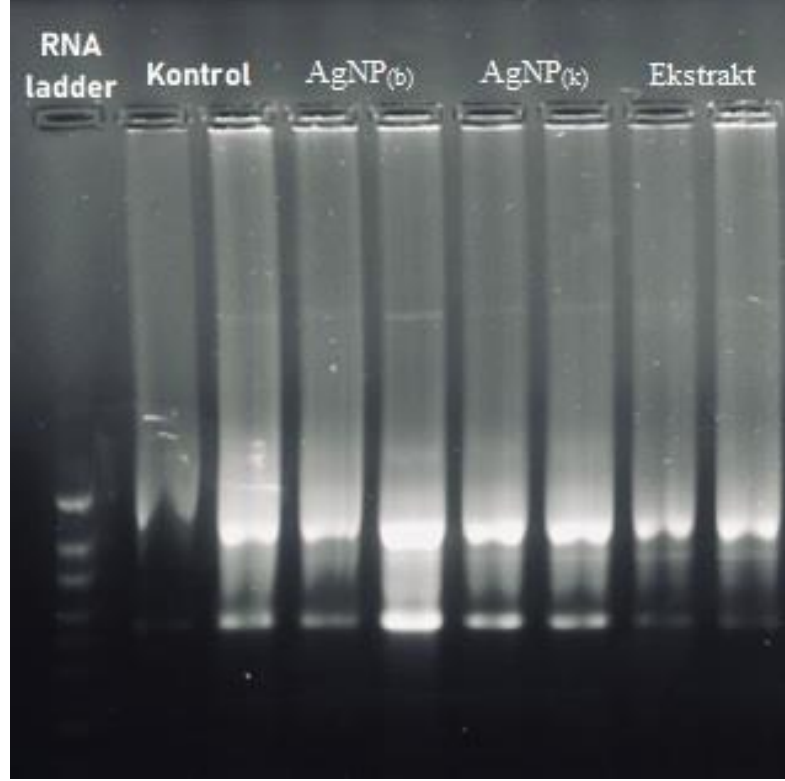
24 saatlik artan farklı  $AgNO_3$  doz uygulamasından sonra PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarının hücre canlılık yüzdeleri doza bağımlı bir şekilde azaldı. PANC-1 ve HEK293 hücrelerinde  $IC_{50}$  dozu sırasıyla 1.68 µg/ml ve 1.20 µg/ml olarak hesaplandı (Şekil 4.14.). Kanser hücrelerine sitotoksik etkisinin yüksek olmasına rağmen aynı etkiyi HEK293 normal hücre hattında da gösterdiği tespit edildi.



Şekil 4.14. PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarına uygulanan  $AgNO_3$  dozlarının hücre canlılığına etkisi.

#### 4.1.5. Jel Elektroforezinde RNA Örneklerinin Tayini

PANC-1 insan pankreas kanseri hücre hattından izole edilen RNA örneklerinin saflıkları ve miktarlarının ölçümü her biri için iki tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. Daha sonra sırasıyla soldan sağa doğru RNA ladder, kontrol, biyolojik AgNP, kimyasal AgNP ve ekstrakt RNA örnekleri iki tekrarlı olarak yüklendi ve %1' lik agaroz jelde yürütülerek bant profili incelendi (Şekil 4.15.).



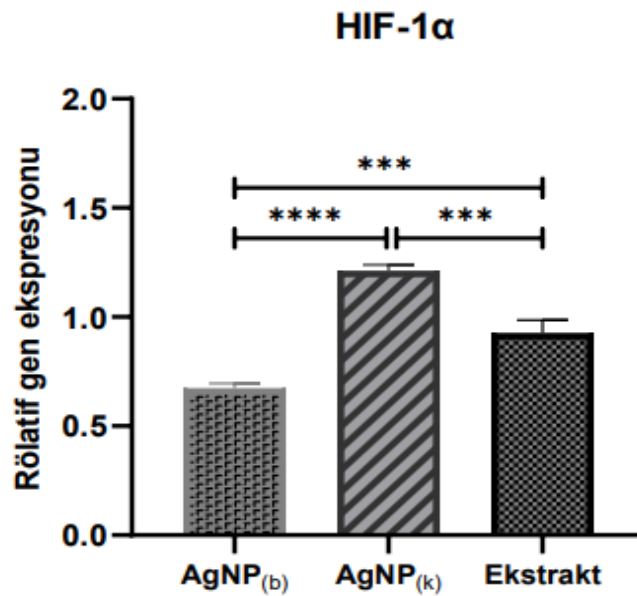
Şekil 4.15. RNA örneklerinin bant profili.

#### 4.1.6. PANC-1 Hücre Hattına Uygulanan Dozların HIF1 $\alpha$ , GLUT1, FLT-1, VEGFA, Bcl-2 ve Bax Gen Ekspresyonlarına Etkisi

PANC-1 hücre hattına AgNP<sub>(b)</sub>, AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarında uygulandı. 24 saat inkübasyon işleminin sonunda PANC-1 hücrelerinden RNA izole edilerek cDNA sentezi basamakları uygulandı. cDNA örnekleri kullanılarak RT-PCR yapıldı ve PANC-1 hücrelerinde ilgili genlerin ekspresyonlarına bakıldı. RT-PCR verilerinin analizinde  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  normalizasyon yöntemi kullanıldı (Livak and Schmittgen 2001). Bu yöntemle göre çalışılan her gen için kontrol ve doz gruplarının gen ekspresyon düzeyleri housekeeping gene ( $\beta$ -actin) göre hesaplandı. Kontrol ve doz grupları arasında çalışılan genlerin ekspresyonlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde One-way

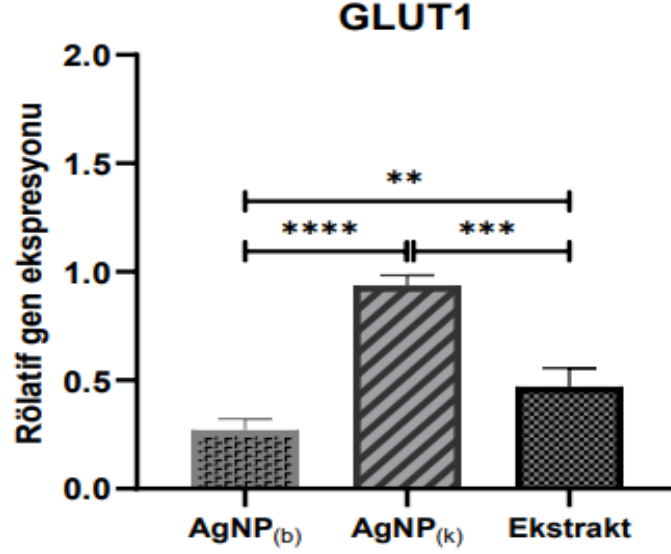
ANOVA varyans analizi kullanılmış olup p değeri  $<0.05$  ise farklılık anlamlı olarak kabul edildi ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$ ).

Kontrole göre HIF1 $\alpha$  gen ekspresyonunda AgNP<sub>(b)</sub> ( $p < 0.0001$ ) ve AgNP<sub>(k)</sub> ( $p = 0.0003$ ) uygulaması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilirken ekstrakt ( $p = 0.1092$ ) uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı. Ayrıca AgNP<sub>(b)</sub>, ekstrakt uygulamaları ile kıyaslandığında AgNP<sub>(b)</sub> uygulamasının HIF1 $\alpha$  gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla downregüle ettiği bulgusuna ulaşıldı. Ek olarak AgNP<sub>(k)</sub> uygulamasının HIF1 $\alpha$  gen ekspresyonunu upregüle ettiği tespit edildi (Şekil 4.16.).



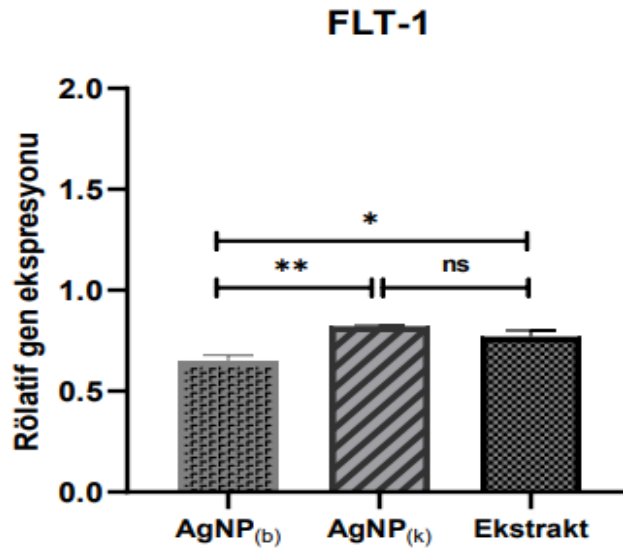
Şekil 4.16. PANC-1 hücre hattına AgNP<sub>(b)</sub>, AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt IC<sub>50</sub> doz uygulanmasından 24 saat sonra HIF1 $\alpha$  gen ekspresyon değişimi.

Kontrole göre GLUT1 gen ekspresyonunda AgNP<sub>(b)</sub> ( $p < 0.0001$ ) ve ekstrakt ( $p < 0.0001$ ) uygulaması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilirken AgNP<sub>(k)</sub> ( $p = 0.5376$ ) uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı. Ayrıca AgNP<sub>(b)</sub>, AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt uygulamaları ile kıyaslandığında AgNP<sub>(b)</sub> uygulamasının GLUT1 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde downregüle ettiği tespit edildi (Şekil 4.17.).



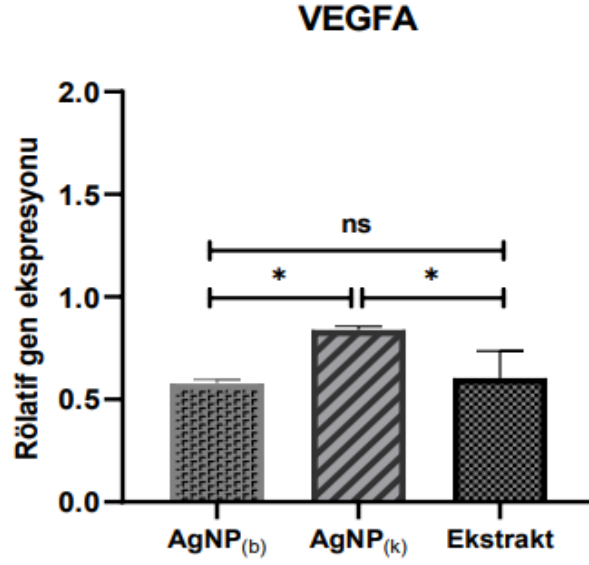
**Şekil 4.17.** PANC-1 hücre hattına AgNP<sub>(b)</sub>, AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt IC<sub>50</sub> doz uygulanmasından 24 saat sonra GLUT1 gen ekspresyon değişimi.

Kontrole göre FLT-1 gen ekspresyonunda AgNP<sub>(b)</sub> ( $p < 0.0001$ ), AgNP<sub>(k)</sub> ( $p = 0.0016$ ) ve ekstrakt ( $p = 0.0003$ ) uygulaması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edildi. Ayrıca AgNP<sub>(b)</sub> uygulaması AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt uygulamaları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde FLT-1 gen ekspresyonunu downregüle ettiği saptandı. Ek olarak AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt uygulamalarının etkileri karşılaştırıldığında FLT-1 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.18.).



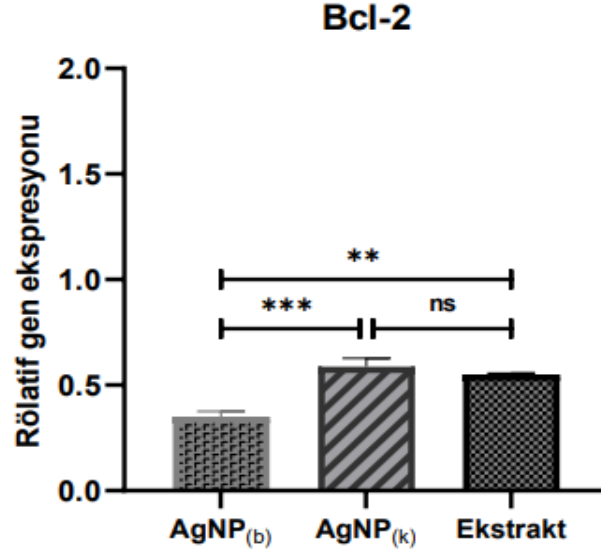
**Şekil 4.18.** PANC-1 hücre hattına AgNP<sub>(b)</sub>, AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt IC<sub>50</sub> doz uygulanmasından 24 saat sonra FLT-1 gen ekspresyon değişimi.

Kontrole göre VEGFA gen ekspresyonunda AgNP<sub>(b)</sub> (p=0.0003) ve ekstrakt (p=0.0004) uygulaması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilirken AgNP<sub>(k)</sub> (p=0.0784) uygulamasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı. Ayrıca AgNP<sub>(b)</sub> ve ekstrakt uygulamalarının VEGFA gen ekspresyonunu benzer şekilde downregüle ettiği görüldü. Ek olarak ekstrakt ve AgNP<sub>(k)</sub> uygulamaları karşılaştırıldığında VEGFA gen ekspresyonunu ekstrakt uygulamasının daha fazla downregüle ettiği görüldü (Şekil 4.19.).



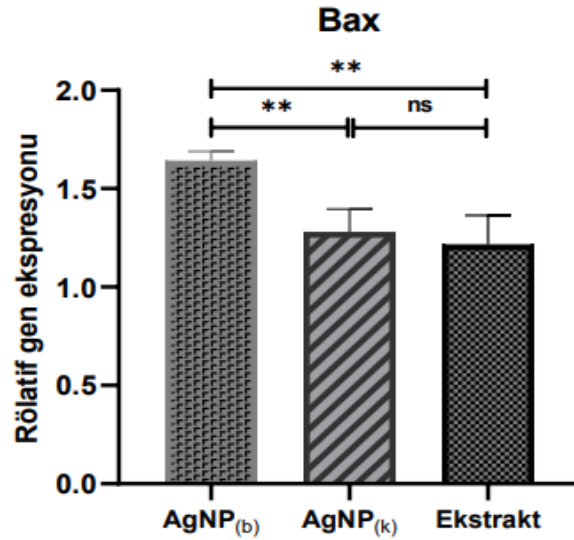
Şekil 4.19. PANC-1 hücre hattına AgNP<sub>(b)</sub>, AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt IC<sub>50</sub> doz uygulanmasından 24 saat sonra VEGFA gen ekspresyon değişimi.

Kontrole göre Bcl-2 gen ekspresyonunda AgNP<sub>(b)</sub> (p<0.0001), AgNP<sub>(k)</sub> (p<0.0001) ve ekstrakt (p<0.0001) uygulaması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edildi. AgNP<sub>(b)</sub> uygulamasının AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt uygulamaları ile kıyaslandığında Bcl-2 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak daha anlamlı bir şekilde downregüle ettiği saptandı. Ayrıca AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt uygulamalarının etkileri karşılaştırıldığında Bcl-2 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.20.).



**Şekil 4.20.** PANC-1 hücre hattına AgNP<sub>(b)</sub>, AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt IC<sub>50</sub> doz uygulanmasından 24 saat sonra Bcl-2 gen ekspresyon değişimi.

Kontrole göre Bax gen ekspresyonunda AgNP<sub>(b)</sub> ( $p=0.0002$ ) ve AgNP<sub>(k)</sub> ( $p=0.0302$ ) uygulaması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilirken ekstrakt ( $p=0.0938$ ) uygulaması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Ayrıca AgNP<sub>(b)</sub> uygulaması AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt uygulamaları ile kıyaslandığında Bax gen ekspresyonunu istatistiksel olarak daha anlamlı bir şekilde upregüle ettiği sonucuna ulaşıldı. Ek olarak AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt uygulamalarının etkileri karşılaştırıldığında Bax gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şkil 4.21.).



**Şekil 4.21.** PANC-1 hücre hattına AgNP<sub>(b)</sub>, AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt IC<sub>50</sub> doz uygulanmasından 24 saat sonra Bax gen ekspresyon değişimi.

## 4.2. Tartışma

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC), en agresif ve ölümcül katı tümörlerden biri olarak bilinir ve kansere bağlı ölümlerin üçüncü önde gelen nedenidir. Erkeklerde (100.000 kişide) 2000 yılından 2020 yılına kadar ölüm oranı 12,1'den 12,7'ye artmıştır fakat bu oranın kadınlarda (100.000 kişide) 9,3–9,6'da nispeten sabit kaldığı bildirilmiştir. Pandemiye rağmen lösemi, melanom ve böbrek kanseri ölüm oranları 2016'dan 2020'ye kadar yılda yaklaşık %1,5 düşüş sergilemiştir ve 1991'den bu yana toplam ölüm oranı %33' lük azalma göstermiştir. Dolayısıyla tahmini olarak 3,8 milyon ölümün engellendiği düşünülmektedir. Bu ilerleme, çeşitli kanserlerin tedavisindeki ilerlemeleri giderek daha fazla yansıtmaktadır (Siegel et al. 2023). Fakat pankreas kanserinde erken belirti olmadığı ve her iki cinsiyette de ileri yaşlarda teşhis edilebildiği için yıllar geçtikçe sağkalım oranı düşmektedir. Bundan dolayı ilerlemiş pankreas kanseri katı tümörlerini tedavi edebilmek için yeni terapötik ajanların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatürde yeşil kimya olarak da bilinen biyolojik sentez yaklaşımıyla nanopartiküller, konvansiyonel yöntemler olan fiziksel ve kimyasal yöntemlerle kıyaslandığı zaman daha kararlı, daha az toksisiteye sahip olarak üretilmektedir. Dolayısıyla doğaya daha az zararlı hale gelmesine neden olmaktadır. Nanopartiküller, biyouyumlu oldukları ve geniş bir yüzey alanına sahip oldukları için çeşitli hastalıkların tedavisi için etkili tekniklerin geliştirilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Özellikle bitki bazlı nanopartiküller, antibakteriyel aktivite, antikanser ve antiviral aktivite sergilediği için terapötik ilaçlar dahil olmak üzere tıpta yaygın olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Bitki özlerinin ve fizyolojik olarak aktif biyomoleküllerin her yerde bulunabilmesi nedeniyle nanoparçacık biosentezi, kimyasal ilaçların kullanımına göre çok daha güvenilir bir yaklaşım olarak düşünülmektedir (Nair, Sajini, and Mathew 2022).

Safran, güneybatı Asya'ya özgü olan ve şu anda Avrupa, Türkiye, Orta Asya, Hindistan ve Çin gibi dünyanın başka yerlerinde büyük ölçüde yetiştirilen bir bitkidir (Hoshyar and Mollaei 2017). Ana içeriği krosin ve safranal olan ayrıca antioksidan, antimutajenik, antijenotoksik, tümörisidal ve antioksidan aktiviteye sahip bir bitkidir. 2010 yılında yapılan bir çalışma, BxPC-3 insan pankreas kanseri hücre hattında safran bitkisinin ana bileşeni olan krosinin apoptotik etkisini araştırmak üzere tasarlanmıştır. Bu çalışmada apoptozun kromatin yoğunlaşma özelliğini saptamak için Hoechst33258 boyaması kullanılmış ve DNA fragmentasyonu jel elektroforezi ve hücre döngüsü analizi ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, BxPC-3 insan pankreas kanseri hücre hattının krosin aracılı büyüme inhibisyonuna ve apoptotik hücre ölümüne karşı oldukça

duyarlı olduğu tespit edilmiştir (D'Alessandro et al. 2013). Benzer başka bir çalışmada ise, krosetin maddesinin apoptozu indükleyen yolları aktive ederek hem *in vitro* pankreas kanseri hücreleri hem de *in vivo* atimik çıplak fare (athymic nude mouse) tümörü üzerinde önemli bir antitümörjenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. *in vitro* çalışma sonucunda hücre döngüsü proteinleri (Cdc-2, Cdc-25C, Cyclin-B1) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) önemli ölçüde değişmiştir. *in vivo* çalışma sonucunda, kontrole kıyasla krosetin ile muamele edilen hayvanlarda epidermal büyüme faktörü reseptörü ekspresyonu ile belirlendiği üzere tümör büyümesinde önemli ölçüde gerileme olduğu görülmüştür (Dhar et al. 2009).

Yapmış olduğumuz çalışma ile ilk defa *Crocus sativus* (Safran) stigma kısmının ekstraktı kullanılarak konvansiyonel yöntemlerden farklı olacak şekilde biyolojik olarak mikrodalga aracılı gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez aşamasında kullanılan gümüş nitrat ( $AgNO_3$ ) sulu çözeltisi reksiz, safran sulu ekstraktı ise sarı-kırmızı renkliydi.  $AgNO_3$  sulu çözeltisine safran sulu ekstraktının eklenmesi ve mikrodalgada fırında ısıtma işlemini takiben literatürde de belirtildiği gibi koyu kahverengiye doğru renk değişimi gözlemlendi (Eshghi et al. 2018; Kaplan et al. 2021). Bu durum, *Crocus sativus* (Safran) stigma kısmının ekstraktının gümüş iyonlarını başarılı bir şekilde indirgediğini ve AgNP'leri oluşturduğunu gösterdi. Biyolojik olarak sentezlenen AgNP ve ticari olarak satın alınan kimyasal AgNP'ler Uv-Vis, TEM, FESEM-EDX, FTIR, EDX, DLS ve Zeta potansiyel yöntemleri ile karakterize edildi.

Sonuçlarımız 471 nm dalga boyu bölgesinde en yüksek SPR absorpsiyon piki göstermektedir ve bu da literatürdeki mevcut bilgiler doğrultusunda AgNP oluşumunu doğrulamaktadır. Jahan ve arkadaşları tarafından yaptığımız çalışmaya benzer şekilde mikrodalga aracılı olarak elma posası ve kimyon tohumu ekstraktından biyolojik olarak AgNP sentezi gerçekleştirilmiştir ve sırasıyla 440 nm ve 439 nm dalgaboylarında maksimum pik sergiledikleri tespit edilmiştir. Teucrium polium (Acıyavşan) yaprak ekstraktından sentezlenen AgNP'lerin 434-440 nm dalga boyları aralığında maksimum pik verdiği rapor edilmiştir (Hashemi, Tasharofi, and Saber 2020). Ayrıca çeşitli bitki kısımlarının ekstraktı aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin maksimum 400-500 nm dalga boyu aralığında pikler verdiği tespit edilmiştir (Sulaiman et al. 2013; Thirunavoukkarasu et al. 2013; Vilchis-Nestor et al. 2008).

Hejebi ve arkadaşlarının sentezlediği AgNP'lerin TEM analizi ile partikül boyutlarının ortalama 23 nm olduğu ve 1-50 nm arasında değiştiği gösterilmiştir (Hajebi et al. 2019). Nar kabuğu ekstraktından sentezlenen AgNP'lerin TEM analiz sonucunda

küresel şekilli ve 15-30 nm karakteristik çap aralığında nanopartiküllerin olduğu tespit edilmiştir (A. A. Khan et al. 2021). Benzer bir çalışmada *P.anisum* (Anason) tohum ekstraktından yine küresel şekilde fakat 3,2-16 nm arasında değişen daha küçük boyutlarda AgNP'lerin sentezlendiği bildirilmiştir (Alsalihi et al. 2016).

Khan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, nar kabuğu ekstraktından sentezlenen AgNP'lerin partikül boyutu, PDI (polidispers indeks) ve yüzey zeta-potansiyeli DLS analizi ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin ortalama boyutunun yaklaşık 40 nm olduğu, PDI değerinin 0,321 ve zeta-potansiyel değerinin  $31,2 \pm 0,3$  mV olduğu belirlenmiştir (A. A. Khan et al. 2021).

Hashemi ve arkadaşlarının yaptığı FE-SEM analizi sonucunda, biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin çoğunun 70-100 nm arasında değişen boyutlarda ve küresel veya küresel şekle yakın olduğu görülmüştür (Hashemi et al. 2020). Loganathan ve arkadaşlarının *Knoxia sumatrensis* yaprak sulu ekstraktından sentezledikleri AgNP'lerin FE-SEM analizi, nanopartiküllerin 7.73-32.84 nm boyutunda ve altıgen şeklinde olduğunu göstermektedir. Aynı AgNP'lerin EDX analizi ile araştırma sonuçlarımızda elde ettiğimiz gümüş varlığının uyumlu olduğu görüldü. Bu çalışmada EDX sonuçlarımıza benzer şekilde gümüş, karbon, oksijen, kalsiyum ve klorun mevcut olduğu da açıklanmıştır. Gümüş dışındaki elementlerden gelen zayıf piklerin ise ekstrakt içeriğindeki fitokimyasallardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Loganathan et al. 2022). Umaz ve arkadaşları, *Hypericum Triquetrifolium turra* (Kantaron) çiçeği ekstraktı yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupları FTIR analizi ile açığa çıkarmıştır. Analiz sonucuna göre  $3338-3339$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $2359-2360$   $\text{cm}^{-1}$  ve  $1635-1636$   $\text{cm}^{-1}$  pikleri gözlenmiştir. Bu piklerin sırasıyla -OH (hidroksil), C=C (alkin) ve C≡N(nitril), C=O (amid) ve C=C (alken) fonksiyonel gruplarına ait olduğu bildirilmiştir (Umaz et al. 2019).

Daha önce yapılan bir çalışmada *K. sumatrensis* yaprak ekstraktından sentezlenen AgNP'lerin XRD sonuçlarında, 210, 101, 111, 200, 231, 142, 241 değerlerine karşılık gelen  $2\theta$  derece aralıklarında dokuz pik gözlenmiştir. Dolayısıyla saf gümüşün kafes düzlemlerinin kübik yapıda ve kristalin olduğu görülmektedir (Loganathan et al. 2022). Buğday samanından elde edilen lignin sulu ekstraktından sentezlenen AgNP'lerin XRD spektrumu, standart AgNP'lere benzer şekilde (111), (200), (220) ve (311) ile ilişkili olan  $2\theta = 38.2^\circ$ ,  $44.4^\circ$ ,  $64.4^\circ$  ve  $77.5^\circ$  dört kırınım piki sergilemiştir (Saratale et al. 2019).

Çalışmamızda pankreas kanseri hücre hattı PANC-1 ve normal hücre hattı olan HEK293 hücrelerine *Crocus sativus* (Safran) stigma kısmının sulu ekstraktından sentezlenen AgNP, ticari olarak satın alınan kimyasal AgNP, ekstrakt ve  $\text{AgNO}_3$  artan

farklı konsantrasyonlarda muamelesi üzerine yüzde canlılık değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. PANC-1 hücreleri için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 65.18 µg/ml, 32.56 µg/ml, 5.02 µg/ml, 1.68 µg/ml olarak tespit edildi. HEK293 hücreleri için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 77.59 µg/ml, 22.42 µg/ml, 3.91 µg/ml ve 1.20 µg/ml olarak tespit edildi. Sonuçta biyolojik olarak sentezlediğimiz AgNP'ler kanser hücrelerine seçici sitotoksik etki gösterirken diğer uygulamalar normal hücre hattı olan HEK293 hücrelerine karşı yüksek toksisite sergiledi. Khorrami ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, L-929 (fare fibroblast hücre hattı) hücreleri 48 saat boyunca ceviz kabuğu sulu ekstraktından sentezlenen AgNP'ler ile muamele edilmiştir ve hücre ölümü en yüksek %15 olarak tespit edilirken ticari olarak satın alınan AgNP ile maruziyet sonucunda %60 sitotoksik etki sergilediği saptanmıştır (Khorrami et al. 2018).

2016 yılında yapılan bir çalışmada, küresel şekilli 94 nm biyolojik AgNP ve 104 nm kimyasal AgNP sentezi gerçekleştirilerek biyolojik AgNP'lerin NCI-H460 hücrelerine yüksek sitotoksik etki gösterdiği ancak HDFa (insan deri fibroblast hücreleri) hücrelerinde hücre canlılığında önemli değişikliklere yol açmadığı ve kimyasal AgNP'lerin ise HDFa hücrelerinde yüksek toksisiteye sebep olduğu tespit edilmiştir (Kummara, Patil, ve Uriah 2016). 2020 yılında yapılan bir çalışmada ise *Berberis thunbergii* yaprak sulu ekstraktından mikrodalga aracılı biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin PANC-1, AsPC-1 ve MIA-Paca2 hücrelerinin canlılığını doza bağlı olarak azalttığı ve HUVEC hücrelerine toksik olmadığı belirlenmiştir.

Annu ve arkadaşları tarafından, *Punica granatum* (Nar) kabuğu ekstraktı kullanılarak 6-45 nm boyut aralığında ve küresel şekilde sentezlenen AgNP'lerin vücudun normal hücrelerini etkilemeden A549 hücre hattına 48 ve 72 saat muameleden sonra IC<sub>50</sub> değerinin 5 µg/ml olarak tespit edildiği ve antikanser özellik sergilediği gösterilmiştir (Annu et al. 2018). Khan ve arkadaşları aynı meyve ekstraktını kullanarak sentezledikleri AgNP'lerin MDA-MB-231 hücrelerine uygulandığında reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine yol açtığını tespit etmiştir. Ayrıca PG-AgNP'lerin hücre canlılığını doza bağımlı bir şekilde önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (A. A. Khan et al. 2021). Hina ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *Borago officinalis* (Hodan) yaprak ekstraktı kullanılarak küresel, altıgen ve düzensiz şekilde ve 30 ila 80 nm arasında değişen boyutlarda biyolojik olarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin hem A549 karaciğer kanseri hücre hattı (IC<sub>50</sub>: 5 µg/ml) hem de HeLa servikal kanser hücre hattında (IC<sub>50</sub>: 2 µg/ml) antikanser ve antibakteriyel ajanlar olarak potansiyel gösterdiği bulunmuştur (H. Singh, Du, and Yi 2017).

Oves ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *Phoenix dactylifera* (Hurma) saçak kökü ekstraktından düzgün küresel şekilde olan 21.65 ila 41.05 nm arasında değişen boyutlarda biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin, MCF-7 hücre hattına karşı önemli sitotoksitenin olduğu (IC<sub>50</sub>: 29.6 µg/ml) ve MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Oves et al. 2018). Kummara ve arkadaşları tarafından, *Azadirachta indica* (*neem*) yaprak özütü kullanarak küresel şekilde ve 5 ila 35 nm boyutlarında sentezledikleri yeşil AgNP'lerin hücre canlılığında doza bağlı azalmaya ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, yeşil AgNP'lerin NCI-H460 hücrelerinde kimyasal olarak sentezlenen AgNP'lerden daha gelişmiş anti kanser aktivite gösterdiği ve insan akciğer kanseri tedavisi için potansiyel bir alternatif ajan olabileceği ileri sürülmüştür (Kummara, Patil, and Uriah 2016b).

Mollick ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, *Abelmoschus esculentus* (*L.*) pulp özü kullanılarak ortalama 6.7 nm boyutunda yeşil sentezlenen AgNP'lerin Jurkat hücre hattı (İnsan T hücreli lenfoma) üzerinde antikanser aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir ve bu antikanser aktivitenin mitokondriyal membran bütünlüğünün kaybı ile artan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gözlenmiştir (Mollick et al. 2019). AgNP'ler, ROS üretimi ve DNA hasarını indükleyen kanser hücrelerinin ultrayapısını tahrip ederek apoptoz ve nekroza neden olabilmektedir (Farah vd. 2016; Wang vd. 2019). Bu ultrayapısal değişiklikler nanopartikülün dozuna ve uygulama zamanına bağlıdır. Genel olarak, AgNP konsantrasyonu ne kadar yüksekse ve maruz kalma süresi ne kadar uzun olursa, hücre ultrayapısının hasarı o kadar fazla olmaktadır (Sooklert vd. 2019; Swanner vd. 2019).

Korkmaz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Mimusops elengi* (İspanyol kirazı) ekstraktı aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin hem meme kanseri hücre hattı MCF-7 hem de kolon kanseri hücre hattı HT-29 hücreleri üzerinde doz ve zamana bağlı bir şekilde sitotoksite gösterdiği bildirilmiştir (Korkmaz et al. 2020). 2022 yılında Liu ve arkadaşları, AgNP 'lere karşı iyi huylu pankreas duktal ve karaciğer stellat hücrelerinin yüksek direnç gösterirken yüksek kemoterapiye dirençli PDAC hücre hatlarının 10 ppm'lik düşük konsantrasyonlarda bile zamana ve doza bağlı bir şekilde hücre canlılığını neredeyse tamamen inhibe ettiğini tespit etmiştir (Liu vd. 2022).

Adebayo ve arkadaşları, *Detarium microcarpum* (Tatlı detar) yaprak fitokimyasallarından ortalama 81 nm boyutunda gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştirmiştir. 72 saat dAgNP muamelesi sonucunda hücre canlılığının sırasıyla 84 µg/ml ve 31.5 µg/ml IC<sub>50</sub> değerleri ile PANC-1 ve HeLa hücre proliferasyonlarını inhibe

ettiğini ortaya koymuşlardır (Adebayo et al. 2020). Balkrishna ve arkadaşları tarafından, yaklaşık  $8 \pm 2$  nm boyutlarında *Putranjiva roxburghii* tohum ekstraktından sentezlenen AgNP'lerin 24 saat PANC-1, MDA-MB-231 ve HCT-116 hücre hatlarına muamelesi sonucunda sırasıyla 0.36 mg/ml, 0.26 mg/ml ve 0.54 mg/ml IC<sub>50</sub> değerleri ile hücre canlılığının doza bağlı olarak inhibe olduğu bulgusuna ulaşılmıştır (Balkrishna et al. 2020).

Ayromlou ve arkadaşları, *Scorzonera calyculata* özütü kullanılarak ortalama 25.28 nm büyüklüğünde ve küre şeklinde sentezlenen AgNP'lerin çeşitli konsantrasyonlarda, A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattına karşı doza-bağlı olarak sitotoksite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bundan dolayı sentezlenen AgNP'lerin antikanser terapötik ajan olma potansiyeli taşıdığı bildirilmiştir (Ayromlou, Masoudi, ve Mirzaie 2019). Chen ve arkadaşları ise *Cymbopogon citratus* yaprak özütünden sentezlenen AgNP'lerin yine aynı hücre hattında, hücre proliferasyonunu azalttığı, hücre invazyonunu ve apoptozun indüksiyonunu artırarak kanser hücre ölümünü başlattığını bildirmiştir (Chen vd. 2019).

2018 yılında yapılan bir çalışmada biyolojik ve kimyasal gümüş nanopartikül sentezlemek için indirgeyici ve stabilize edici ajanlar olarak sırasıyla *Datura stramonium* yaprağı ekstresi ve sodyum sitrat kullanılmıştır. Sonuç olarak yeşil sentezlenmiş gümüş nanoparçacıkların dar boyut aralığı, küresel şekil, yüksek antioksidan kapasite, antibakteriyel ve DNA kırılma aktiviteleri gösterdiği kimyasal olarak sentezlenmiş nanoparçacıkların daha az ortalama boyuta, daha geniş nanoparçacık boyutuna sahip olduğu, antioksidan aktivite sergilemediği ve daha az antibakteriyel ve DNA kırılma aktiviteleri gösterdiği bilgisine ulaşılmıştır (Mousavi-Khattat, Keyhanfar, and Razmjou 2018). Shaik ve arkadaşları biyolojik ve kimyasal gümüş nanopartikül sentezlemek için indirgeyici ve stabilize edici ajanlar olarak sırasıyla *Salvadora persica L.* kök ekstraktı ve trisodyum sitrat kullanmıştır. Sonuç olarak biyolojik sentezlenmiş AgNP'ler, kimyasal olarak sentezlenmiş AgNP'lerin antimikrobiyal aktivitelerine kıyasla biraz daha yüksek veya eşdeğer antimikrobiyal aktiviteler sergilediği tespit edilmiştir (Shaik et al. 2016). Vasanth ve Kurian tarafından kimyasal ve biyolojik yolla sentezlenen gümüş nanopartiküllerin sıçan hücre hattında (LLC PK1) ve hücre organellerinde toksik etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda sıçanlarda ihmal edilebilir düzeyde toksisite gözlenmiştir fakat nanopartikül uygulanan hayvandan alınan normal epitel hücre hattında (LLC PK1) ve mitokondride işlev bozuklukları görülmüştür. Bu nedenle, AgNP'lerin uzun süreli maruziyetine karşı önlem alınması gerektiği ve gümüş nanopartiküllerin

mitokondriye kronik olarak maruz kalma ve etki yolunun bulunması için ileri çalışmalar yapılması gerektiği vurgulanmıştır (Vasanth and Kurian 2017).

Mirkatuli ve arkadaşları biyolojik sentez yöntemiyle üretilen gümüş nanopartiküllerin toksik ve toksik olmayan dozlarının enjeksiyonu ile neonatal Wistar sıçanlarının serebellumunda meydana gelen histopatolojik değişiklikleri incelenmiş ve etkisini kimyasal gümüş nanopartiküller ile karşılaştırmıştır. Uygulanan nanopartiküller arasında biyolojik nanopartiküllerin kimyasal nanopartiküllerin aksine, beyincik hücreleri üzerinde daha az önemli etkisi olduğu bulgularına ulaşmıştır (Mirkatuli, Baghbani, and Yahyaei 2021).

Hipoksi katı tümörlerin ortak bir özelliğidir ve kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi gibi geleneksel kanser tedavilerinin etkinliğini büyük ölçüde engellemektedir. İlerlemiş tümörlerde oksijenin tükenmesiyle birlikte metastazı ve klinik olarak malign bir fenotipi destekleyen bir dizi genetik, transkripsiyonel ve metabolik adaptasyon meydana gelmektedir (Shi, Liao, and Zhang 2021). Bu durumda invazyon, metastaz, anjiyogenez ve glikoliz sürecinde yer alan ilgili genlerin ekspresyonu HIF1 transkripsiyon faktörü tarafından uyarılmakta ve böylece pankreas kanseri hücreleri hipoksik koşullara uyum sağlamaktadır. Bundan dolayı hipoksik tümör mikroçevresini hedef alan veya hipoksiye bağlı yollarla etkileşime giren gümüş nanopartikülleri gibi yeni terapötiklerin geliştirilmesi üzerinde etkin çalışmalar sürdürülmektedir (Albadari et al. 2019; Tan et al. 2020).

Tümörlerin gelişmesi ve ilerlemesinde birçok sinyal yolu, hücre büyümesi, proliferasyonu, apoptoz ve canlılığı kontrol etmede rol oynamaktadır ve tümör ilerlemesine, tümör mikroçevre (TME), anjiyogenez ve iltihaplanma gibi daha karmaşık sinyal ağlarına katılmaktadır. AgNP'lerin, ilişkili sinyal yollarını düzenleyerek veya proteinleri etkisiz hale getirerek tümör proliferasyonu, invazyonu ve anjiyogenezini inhibe ettiği onaylanmıştır (Wang et al. 2017). 2016 yılında Yang ve arkadaşları tarafından AgNP'lerin HIF-1 protein birikimini, VEGFA ve GLUT-1 aşağı akış hedef genlerinin ekspresyonunu zayıflatarak HIF sinyal yolunu bozabileceği bulunmuştur. Ayrıca HIF sinyal yolunda AgNP'ler, p53 gibi anahtar genlerin yukarı veya aşağı regülasyonu düzenleyerek apoptozu teşvik edebilmektedir (Yang et al. 2016).

AgNP'ler ile muamele edilen MCF-7 ve kolon kanseri (HCT-116) hücrelerinde pro-apoptotik genlerin (p53, Bax ve kaspaz-3) ekspresyon düzeylerinin önemli ölçüde arttığı, anti-apoptotik Bcl-2 geninin ekspresyonunun ise azaldığı bildirilmiştir. Dolayısıyla AgNP'lerin, p53, bax/bcl-2 ve kaspaz kaskadı aracılığıyla ROS'un da aracılık

ettiği kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği öne sürülmektedir (M. S. Khan et al. 2021). Benzer başka bir çalışma ise *Zygodhylum albüm* (balduz) kök ekstraktı ile biyosentezlenen AgNP'lerin, p53, Bax, kaspaz 3,8 ve 9 proapoptotik genlerini upregüle ettiğini ve Bcl-2 anti-apoptotik genin downregüle ettiğini, dolayısıyla hem ekstrinsik hem de intrinsik yollar aracılığıyla Prostat kanser hücre hattı PC-3 ve Akciğer kanser hücre hattı A549 hücrelerinde apoptotik etkilerini ortaya koymuştur (Abdelhameed et al. 2022). Ghorbani ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucunda da sumak sulu ekstraktından biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lere maruz kalan MCF-7 hücrelerinde, Bax gen ekspresyonunun artması ve Bcl-2 gen ekspresyonunun azalması yoluyla apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (Ghorbani et al. 2018).

Gurunathan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada spesifik mekanizma tam olarak açıklanamamış olsa da AgNP'lerin tümör invazyonunu inhibe edebileceği gözlemlenmiştir. Ayrıca AgNP'lerin, sitokinlerin protein ekspresyonunu ve kanser hücrelerindeki büyüme faktörlerinin protein ekspresyonunu azaltabileceği veya MMP'lerin enzimatik aktivitesini azaltabileceği varsayılmaktadır. AgNP'lerin PI3K/AKT yolunu etkisiz hale getirerek VEGF kaynaklı anjiyogenezi inhibe edebileceği gösterilmiştir (Gurunathan et al. 2009). Güvenli ve etkili bir antikanser ajan geliştirmek amacıyla AgNP'lerin kanser karşıtı etkileri için daha fazla mekanizma araştırılmaya devam etmektedir (Xu ve diğerleri, 2020).

Castro-Aceituno ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Panax Ginseng* Meyer (Ginseng) taze yapraklarından sentezlenen AgNP'lerin A549, MCF7 ve hepatoselüler HEPG2 hücre hatlarında hücre canlılığını ve indüklenmiş reaktif oksijen türü üretimini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, *P.g* AgNP'lerin A549 hücrelerinde EGFR'nin fosforilasyonunu ve mRNA üretimini ve hücre migrasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Ek olarak A549 hücrelerinde p38 MAPK/p53-mitokondri kaspaz-3 yolunu up regüle ettiği ve hücre apoptozunu teşvik ettiği tespit edilmiştir (Castro-Aceituno et al. 2016).

Çalışmamızda HIF-1 ve onun hedef genleri olan VEGFA, FLT-1, GLUT1, Bcl-2 ve pro-apoptotik Bax genlerinde mRNA seviyesindeki değişiklikleri incelemek için PANC-1 hücre hattına AgNP<sub>(b)</sub>, AgNP<sub>(k)</sub> ve ekstrakt belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarında uygulandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda PANC-1 hücrelerinden RNA izole edildi ve cDNA sentezi basamakları uygulanarak cDNA örnekleri ile RT-PCR yapıldı. RT-PCR verilerinin analizinde 2<sup>-ΔΔCt</sup> normalizasyon yöntemi kullanıldı (Livak and Schmittgen 2001). Bu yöntemle göre çalışılan her gen için kontrol ve doz gruplarının gen ekspresyon düzeyleri housekeeping gene göre hesaplandı. Graphpad Prism programında her

uygulama için üç bağımsız deneyden elde edilen veriler değerlendirilerek, biyolojik olarak sentezlenen AgNP uygulamasının ticari olarak satın alınan kimyasal AgNP ve *Crocus sativus* (Safran) stigma ekstraktından daha fazla HIF-1 ve onun hedef genleri olan VEGFA, FLT-1, GLUT1, Bcl-2 genlerinin ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde downregüle ettiği ve pro-apoptotik Bax gen ekspresyonunu upregüle ettiği sonucuna ulaşıldı.

Elde ettiğimiz veriler ile AgNP ile indüklenen hücre ölümünün, HIF-1 $\alpha$  gen ekspresyonunu upregüle ve ardından hedef genlerin ekspresyonunu downregüle ederek AgNP sitotoksikite mekanizması sağladığı tespit edildi. Ek olarak VEGF-A ve GLUT1 gen ekspresyonunda gözlenen azalma ile anjiyogenez sırasında tüp oluşumunun engellenebileceği ve böylece tümör hücrelerine enerji beslemesinin kesileceği sonucuna varıldı. Bu bulgular, pankreas kanserinde *Crocus sativus* (Safran) stigma kısmının ekstraktı kullanılarak biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin kullanımının yeni bir tedavi stratejisi olacağını düşündürmektedir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak *Crocus sativus L.* (safran) bitkisinin stigma kısımlarının ekstraktında bulunan fonksiyonel gruplar aracılığıyla Ag<sup>+</sup> iyonlarının indirgenerek AgNP sentezinin gerçekleştiği gösterildi ve sentez koşulları optimize edilerek mikrodalga-aracılı olarak yüksek verimde AgNP üretimi sağlandı. Pankreas kanseri hücre hattı PANC-1 ve normal hücre hattı HEK293 hücrelerinde uygulanan *in vitro* sitotoksikite, RNA izolasyonu, cDNA sentezi, RT-PCR deneysel çalışma sonuçları doğrultusunda, *Crocus sativus L.* (Safran) bitkisinin stigma kısımlarının sulu ekstraktı ile biyolojik olarak sentezlediğimiz AgNP'lerin, PANC-1 hücre hattında antikanser etki sergilediği bulgularına ulaşıldı. Panc-1 hücre hattına ticari olarak satın alınan kimyasal AgNP'lerin biyolojik olarak sentezlediğimiz AgNP'den daha sitotoksik olduğunu fakat HEK293 normal hücre hattına çok daha fazla toksik olduğu tespit edildi. Ayrıca HIF1 transkripsiyon faktörü ve invazyon, metastaz, anjiyogenez, glikoz metabolizması ile ilgili hedef genleri olan VEGFA, FLT-1, GLUT1, Bcl-2 genlerinin ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde downregüle ettiği ve pro-apoptotik Bax gen ekspresyonunu upregüle ettiği sonucuna ulaşıldı.

Tüm veriler değerlendirildiğinde biyolojik AgNP'lerin normal HEK293 hücrelerine kimyasal AgNP'lerden daha az toksik etki göstermeleri nedeniyle daha

güvenli olduklarından ve HIF1 sinyal yolağı üzerinde etkili sonuçlar sergilediğinden kanser alanında terapötik ajan olarak uygulanabilecekleri sonucuna varılmıştır.

Sıcaklık, zaman, ekstrakt ve tuz konsantrasyonu gibi sentez parametreleri optimize edilerek daha küçük boyutlu ve daha stabil AgNP'ler sentezlenerek antikanser etkinliklerinin artması sağlanabilir. Antikanser etkinliklerinin yanı sıra antioksidan ve antibakteriyel etkinlikleri değerlendirilebilir. Ayrıca AgNP'lere kemoterapötik ilaç yüklemesi yapılarak ilacın kontrollü salımı ve tümör hedefi artırılabilir. Böylece istenmeyen yan etkiler azaltılabilir.

Biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin moleküler düzeydeki etkilerinin açığa çıkarılabilmesi için HIF-1 transkripsiyon faktörü ve onun hedef genlerinin gen ekspresyonuna etkisine ek olarak HIF-1 sinyal yolağı ile bağlantılı olan diğer yollar üzerindeki etkileri gen ekspresyonu ve protein düzeyinde çalışmalar ile araştırılmalıdır. Ayrıca geleneksel antikanser ilaçlara alternatif olacak çevre dostu ve aynı zamanda biyoyumlu olan AgNP'lerin formülasyonu için in vitro çalışmaların in vivo çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdelghany, T. M., Aisha M. H. Al-Rajhi, Mohamed A. al Abboud, M. M. Alawlaqi, A. Ganash Magdah, Eman A. M. Helmy, and Ahmed S. Mabrouk. 2018. "Recent Advances in Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications: About Future Directions. A Review." *BioNanoScience* 8(1):5–16.
- Abdelhameed, Reda F. A., Mohamed S. Nafie, Dina M. Hal, Ali M. Nasr, Shady A. Swidan, Maged S. Abdel-Kader, Amany K. Ibrahim, Safwat A. Ahmed, Jihan M. Badr, and Enas E. Eltamany. 2022. "Comparative Cytotoxic Evaluation of Zygophyllum Album Root and Aerial Parts of Different Extracts and Their Biosynthesized Silver Nanoparticles on Lung A549 and Prostate PC-3 Cancer Cell Lines." *Pharmaceuticals* 15(11):1–16. doi: 10.3390/ph15111334.
- Abdi, Vahideh, Iman Sourinejad, Morteza Yousefzadi, and Zahra Ghasemi. 2018. "Mangrove-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles Using Native Avicennia Marina Plant Extract from Southern Iran." *Chemical Engineering Communications* 205(8):1069–76. doi: 10.1080/00986445.2018.1431624.
- Abdullah, Nur Iffah Shafiqah Binti, Mansor B. Ahmad, and Kamyar Shameli. 2015. "Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Artocarpus Elasticus Stem Bark Extract." *Chemistry Central Journal* 9(1). doi: 10.1186/s13065-015-0133-0.
- Abou El-Nour, Kholoud M. M., Ala'a Eftaiha, Abdulrhman Al-Warthan, and Reda A. A. Ammar. 2010. "Synthesis and Applications of Silver Nanoparticles." *Arabian Journal of Chemistry* 3(3):135–40.
- Adebayo, Ismail Abiola, Hasni Arsad, Haladu Ali Gagman, Noor Zafirah Ismail, and Mohammed Razip Samian. 2020. "Inhibitory Effect of Eco-Friendly Naturally Synthesized Silver Nanoparticles from the Leaf Extract of Medicinal Detarium Microcarpum Plant on Pancreatic and Cervical Cancer Cells." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 21(5):1247–52. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.5.1247.
- Adhikari, Laxmi, Nathaniel E. Larm, and Gary A. Baker. 2019. "Argentous Deep Eutectic Solvent Approach for Scaling up the Production of Colloidal Silver Nanocrystals." *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 7(13):11036–43. doi: 10.1021/acssuschemeng.9b01777.
- Ahmadian, Elham, Solmaz Maleki Dizaj, Elaheh Rahimpour, Amir Hasanzadeh, Aziz Eftekhari, Hasan Hosain zadegan, Jamal Halajzadeh, and Hale Ahmadian. 2018. "Effect of Silver Nanoparticles in the Induction of Apoptosis on Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cell Line." *Materials Science and Engineering C* 93:465–71. doi: 10.1016/j.msec.2018.08.027.
- Aier, Imlimaong, Rahul Semwal, Anju Sharma, and Pritish Kumar Varadwaj. 2019. "A Systematic Assessment of Statistics, Risk Factors, and Underlying Features Involved in Pancreatic Cancer." *Cancer Epidemiology* 58:104–10. doi: 10.1016/j.canep.2018.12.001.

- Albadari, Najah, Shanshan Deng, and Wei Li. 2019. "The Transcriptional Factors HIF-1 and HIF-2 and Their Novel Inhibitors in Cancer Therapy." *Expert Opinion on Drug Discovery* 14(7):667–82.
- Allen, Peter J., Deborah Kuk, Carlos Fernandez del Castillo, Olca Basturk, Christopher L. Wolfgang, John L. Cameron, Keith D. Lillemoe, Cristina R. Ferrone, Vicente Morales-Oyarvide, Jin He, Matthew J. Weiss, Ralph H. Hruban, Mithat Gönen, David S. Klimstra, and Mari Mino-Kenudson. 2017. "Multi-Institutional Validation Study of the American Joint Commission on Cancer (8th Edition) Changes for T and N Staging in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma." *Annals of Surgery* 265(1):185–91. doi: 10.1097/SLA.0000000000001763.
- Almatroudi, Ahmad. 2020. "Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterisation and Biomedical Applications." *Open Life Sciences* 15(1):819–39. doi: 10.1515/biol-2020-0094.
- Alsalmi, Mohamad S., Sandhanasamy Devanesan, Akram A. Alfuraydi, Radhakrishnan Vishnubalaji, Murugan A. Munusamy, Kadarkarai Murugan, Marcello Nicoletti, and Giovanni Benelli. 2016. "Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Pimpinella Anisum Seeds: Antimicrobial Activity and Cytotoxicity on Human Neonatal Skin Stromal Cells and Colon Cancer Cells." *International Journal of Nanomedicine* 11:4439–49. doi: 10.2147/IJN.S113193.
- Al-Sheddi, Ebtesam S., Nida N. Farshori, Mai M. Al-Oqail, Shaza M. Al-Massarani, Quaiser Saquib, Rizwan Wahab, Javed Musarrat, Abdulaziz A. Al-Khedhairy, and Maqsood A. Siddiqui. 2018. "Anticancer Potential of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using Extract of Nepeta Deflersiana against Human Cervical Cancer Cells (HeLA)." *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2018. doi: 10.1155/2018/9390784.
- Amato, Elvio, Yuri A. Diaz-Fernandez, Angelo Taglietti, Piersandro Pallavicini, Luca Pasotti, Lucia Cucca, Chiara Milanese, Pietro Grisoli, Cesare Dacarro, Jose M. Fernandez-Hechavarría, and Vittorio Necchi. 2011. "Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity against Gram Positive and Gram Negative Bacteria of Biomimetically Coated Silver Nanoparticles." *Langmuir* 27(15):9165–73. doi: 10.1021/la201200r.
- Amundadottir, Laufey T. 2016. "Pancreatic Cancer Genetics." *International Journal of Biological Sciences* 12(3):314–25.
- Anastasaki, E., C. Kanakis, C. Pappas, L. Maggi, C. P. del Campo, M. Carmona, G. L. Alonso, and M. G. Polissiou. 2010. "Differentiation of Saffron from Four Countries by Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis." *European Food Research and Technology* 230(4):571–77. doi: 10.1007/s00217-009-1197-7.
- Annu, Shakeel Ahmed, Gurpreet Kaur, Praveen Sharma, Sandeep Singh, and Saiqa Ikram. 2018. "Evaluation of the Antioxidant, Antibacterial and Anticancer (Lung Cancer Cell Line A549) Activity of: Punica Granatum Mediated Silver Nanoparticles." *Toxicology Research* 7(5):923–30. doi: 10.1039/c8tx00103k.

- Asoro, Michael A., Desiderio Kovar, and Paulo J. Ferreira. 2013. "In Situ Transmission Electron Microscopy Observations of Sublimation in Silver Nanoparticles." *ACS Nano* 7(9):7844–52. doi: 10.1021/nn402771j.
- Aswathy Aromal, S., and Daizy Philip. 2012. "Green Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Trigonella Foenum-Graecum* and Its Size-Dependent Catalytic Activity." *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 97:1–5. doi: 10.1016/j.saa.2012.05.083.
- Ayano, Hiroyuki, Masashi Kuroda, Satoshi Soda, and Michihiko Ike. 2014. "Draft Genome Sequence of *Pseudomonas Aeruginosa* Strain RB, a Bacterium Capable of Synthesizing Cadmium Selenide Nanoparticles." *Genome Announcements* 2(3). doi: 10.1128/genomeA.00368-14.
- Aziz, Md. Nafe, Almaz Zaki, Irshad Ahamad, and Tasneem Fatma. 2021. "Silver Nanoparticle Synthesis from Cyanobacteria: Environmental and Biomedical Applications." Pp. 461–72 in *Emerging Technologies for Nanoparticle Manufacturing*. Springer International Publishing.
- Baer, D. R. 2014. "Surface Characterization of Nanoparticles: Critical Needs and Significant Challenges." *J of Surface Anal* 17(3):163–69.
- Bagherzade, Ghodsieh, Maryam Manzari Tavakoli, and Mohmmad Hasan Namaei. 2017. "Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of Saffron (*Crocus Sativus* L.) Wastages and Its Antibacterial Activity against Six Bacteria." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7(3):227–33. doi: 10.1016/j.apjtb.2016.12.014.
- le Baleur, Yann, Anne Couvelard, Marie Pierre Vullierme, Alain Sauvanet, Pascal Hammel, Vinciane Rebours, Frédérique Maire, Olivia Hentic, Alain Aubert, Philippe Ruzsniowski, and Philippe Lévy. 2011. "Mucinous Cystic Neoplasms of the Pancreas: Definition of Preoperative Imaging Criteria for High-Risk Lesions." *Pancreatology* 11(5):495–99. doi: 10.1159/000332041.
- Balkrishna, Acharya, Vinay Kumar Sharma, Subrata K. Das, Nayan Mishra, Laxmi Bisht, Alpana Joshi, and Niti Sharma. 2020. "Characterization and Anti-Cancerous Effect of Putranjiva Roxburghii Seed Extract Mediated Silver Nanoparticles on Human Colon (HCT-116), Pancreatic (PANC-1) and Breast (MDA-MB 231) Cancer Cell Lines: A Comparative Study." *International Journal of Nanomedicine* 15:573–85. doi: 10.2147/IJN.S230244.
- Barabadi, Hamed, Omid Hosseini, Kaveh Damavandi Kamali, Fereshteh Jazayeri Shoushtari, Masoumeh Rashedi, Hamed Haghi-Aminjan, and Muthupandian Saravanan. 2020. "Emerging Theranostic Silver Nanomaterials to Combat Lung Cancer: A Systematic Review." *Journal of Cluster Science* 31(1).

- Barkat, Md. Abul, Harshita, Sarwar Beg, Mohd. Javed Naim, Faheem H. Pottoo, Satya P. Singh, and Farhan J. Ahmad. 2017. "Current Progress in Synthesis, Characterization and Applications of Silver Nanoparticles: Precepts and Prospects." *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 13(1):53–69. doi: 10.2174/1574891x12666171006102833.
- Basturk, Olca, Seung Mo Hong, Laura D. Wood, N. Volkan Adsay, Jorge Albores-Saavedra, Andrew v. Biankin, Lodewijk A. A. Brosens, Noriyoshi Fukushima, Michael Goggins, Ralph H. Hruban, Yo Kato, David S. Klimstra, Günter Klöppel, Alyssa Krasinskas, Daniel S. Longnecker, Hanno Matthaei, G. Johan A. Offerhaus, Michio Shimizu, Kyoichi Takaori, Benoit Terris, Shinichi Yachida, Irene Esposito, and Toru Furukawa. 2015. "A Revised Classification System and Recommendations from the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas." Pp. 1730–41 in *American Journal of Surgical Pathology*. Vol. 39. Lippincott Williams and Wilkins.
- Bayda, Samer, Muhammad Adeel, Tiziano Tuccinardi, Marco Cordani, and Flavio Rizzolio. 2020. "The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine." *Molecules* 25(1).
- Baykara, Onur. 2016. "Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar." *Balıkesir Health Sciences Journal* 5(3):154–65. doi: 10.5505/bsbd.2016.93823.
- Ben, Qiwen, Zhaoshen Li, Chunxing Liu, Quancai Cai, Yaozong Yuan, Kaixuan Wang, Lining Xiao, Jun Gao, and Huagao Zhang. 2012. "Hepatitis B Virus Status and Risk of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma A Case-Control Study From China." *Pancreas* 41(3):435–40.
- Ben, Qiwen, Kaixuan Wang, Yaozong Yuan, and Zhaoshen Li. 2011. "Pancreatic Cancer Incidence and Outcome in Relation to ABO Blood Groups among Han Chinese Patients: A Case-Control Study." *International Journal of Cancer* 128(5):1179–86. doi: 10.1002/ijc.25426.
- Benelli, Giovanni. 2016. "Plant-Mediated Biosynthesis of Nanoparticles as an Emerging Tool against Mosquitoes of Medical and Veterinary Importance: A Review." *Parasitology Research* 115(1):23–34.
- Bertout, Jessica A., Shetal A. Patel, and M. Celeste Simon. 2008. "The Impact of O<sub>2</sub> Availability on Human Cancer." *Nature Reviews Cancer* 8(12):967–75.
- Beykaya, Mehmet, and Abdullah Çağlar. 2016. "An Investigation on Synthesis of Silver-Nanoparticles (AgNP) and Their Antimicrobial Effectiveness by Using Herbal Extracts." *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering* 16(3):631–41. doi: 10.5578/fmbd.34220.
- Cantor, Charles R., and Paul R. Schimmel. 1980. *Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. edited by W.H. Freeman. San Francisco.

- Carmellet P., and Jain R. K. 2000. "Angiogenesis in Cancer and Other Diseases." *Nature* 407(6801):249–57.
- Carreau, Aude, Bouchra el Hafny-Rahbi, Agata Matejuk, Catherine Grillon, and Claudine Kieda. 2011. "Why Is the Partial Oxygen Pressure of Human Tissues a Crucial Parameter? Small Molecules and Hypoxia." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15(6):1239–53. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x.
- Carrillo-López, Luis M., Hilda A. Zavaleta-Mancera, Alfredo Vilchis-Nestor, R. Marcos Soto-Hernández, Jesús Arenas-Alatorre, Libia I. Trejo-Téllez, and Fernando Gómez-Merino. 2014. "Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Chenopodium Ambrosioides*." *Journal of Nanomaterials*. doi: 10.1155/2014/951746.
- Castellano-Megías, Víctor M. 2014. "Pathological Features and Diagnosis of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas." *World J Gastrointest Oncol* 6(9):311–24. doi: 10.4251/wjgo.v6.i9.311.
- Castro-Aceituno, Verónica, Sungeun Ahn, Shakina Yesmin Simu, Priyanka Singh, Ramya Mathiyalagan, Hyun A. Lee, and Deok Chun Yang. 2016. "Anticancer Activity of Silver Nanoparticles from *Panax Ginseng* Fresh Leaves in Human Cancer Cells." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 84:158–65. doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.016.
- Cervantes, Aya, Ellen K. Waymouth, and Maxim S. Petrov. 2019. "African-Americans and Indigenous Peoples Have Increased Burden of Diseases of the Exocrine Pancreas: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Digestive Diseases and Sciences* 64(1):249–61. doi: 10.1007/s10620-018-5291-1.
- Chen, Biao, Yajun Zhang, Yaning Yang, Shaopeng Chen, An Xu, Lijun Wu, and Shengmin Xu. 2018. "Involvement of Telomerase Activity Inhibition and Telomere Dysfunction in Silver Nanoparticles Anticancer Effects." *Nanomedicine* 13(16):2067–82. doi: 10.2217/nmm-2018-0036.
- Chen, Zhu, Xu Ye, Guo Qingkui, Qian Wenliang, Zhao Wen, Wang Ning, and Zheng Min. 2019. "Anticancer Activity of Green Synthesised AgNPs from *Cymbopogon Citratus* (LG) against Lung Carcinoma Cell Line A549." *IET Nanobiotechnology* 13(2):178–82. doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5145.
- Chithrani, B. Devika, Arezou A. Ghazani, and Warren C. W. Chan. 2006. "Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells." *Nano Letters* 6(4):662–68. doi: 10.1021/nl052396o.
- Chung, Ill Min, Inmyoung Park, Kim Seung-Hyun, Muthu Thiruvengadam, and Govindasamy Rajakumar. 2016. "Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Their Characteristic Properties and Therapeutic Applications." *Nanoscale Research Letters* 11(1):1–14. doi: 10.1186/s11671-016-1257-4.
- Conroy, Thierry, Marc Ychou, Olivier Bouché, Rosine Guimbaud, Yves Bécouarn, Antoine Adenis, Jean-Luc Raoul, Sophie Gourgou-Bourgade, Christelle de La Fouchardière, Jaafar Bennouna, Jean-Baptiste Bachet, Faiza Khemissa-Akouz,

- Denis Péré-Vergé, Catherine Delbaldo, Eric Assenat, Bruno Chauffert, Pierre Michel, Christine Montoto-Grillot, M. Chem, and Michel Ducreux. 2011. "FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer." *The New England Journal of Medicine* 364(19):1817–25.
- Costache, M. I., Mihai Ioana, Sevastița Iordache, D. Ene, Cornelia A. Ilexandra Costache, and A. Săftoiu. 2015. "VEGF Expression in Pancreatic Cancer and Other Malignancies: A Review of the Literature." *Rom J Intern Med* 53(3):199–208. doi: 10.1515/rjim-2015-0027.
- Crippa, Stefano, Roberto Salvia, Andrew L. Warshaw, Ismael Domínguez, Claudio Bassi, Massimo Falconi, Sarah P. Thayer, Giuseppe Zamboni, Gregory Y. Lauwers, Mari Mino-Kenudson, Paola Capelli, Paolo Pederzoli, and Carlos Fernández del Castillo. 2008. "Mucinous Cystic Neoplasm of the Pancreas Is Not an Aggressive Entity: Lessons from 163 Resected Patients." *Annals of Surgery* 247(4):571–79. doi: 10.1097/SLA.0b013e31811f4449.
- D'Alessandro, Anna M., Andrea Mancini, Anna Rita Lizzi, Angela de Simone, Carmine Esposito Marroccella, Giovanni Luca Gravina, Carla Tatone, and Claudio Festuccia. 2013. "Crocus Sativus Stigma Extract and Its Major Constituent Crocin Possess Significant Antiproliferative Properties against Human Prostate Cancer." *Nutrition and Cancer* 65(6):930–42. doi: 10.1080/01635581.2013.767368.
- Dhar, Animesh, Smita Mehta, Gopal Dhar, Kakali Dhar, Snigdha Banerjee, Peter van Veldhuizen, Donald R. Campbell, and Sushanta K. Banerjee. 2009. "Crocetin Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Tumor Progression in a Xenograft Mouse Model." *Molecular Cancer Therapeutics* 8(2):315–23. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0762.
- Dhar, Deepanshi, Komal Raina, Rama Kant, Michael F. Wempe, Natalie J. Serkova, Chapla Agarwal, and Rajesh Agarwal. 2019. "Bitter Melon Juice-Intake Modulates Glucose Metabolism and Lactate Efflux in Tumors in Its Efficacy against Pancreatic Cancer." *Carcinogenesis* 40(9):1164–76. doi: 10.1093/carcin/bgz114.
- Dubey, Shashi Prabha, Manu Lahtinen, and Mika Sillanpää. 2010. "Tansy Fruit Mediated Greener Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles." *Process Biochemistry* 45(7):1065–71. doi: 10.1016/j.procbio.2010.03.024.
- Dumlu, Ersin Gürkan, Derya Karakoç, and Arif Özdemir. 2015. "Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas: Current Perspectives." *International Surgery* 100(6):1060–68.
- Edge, SB. ,., DR. ,. Byrd, and CC. ,. Compton. 2010. "AJCC Cancer Staging Manual." New York: Springer.
- Edge, Stephen B., and Carolyn C. Compton. 2010. "The American Joint Committee on Cancer: The 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM." *Annals of Surgical Oncology* 17(6):1471–74.

- Ercan, Gulinnaz, Ayfer Karlitepe, and Bulent Ozpolat. 2017. "Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Approaches." *Anticancer Research* 37(6):2761–75.
- Eshghi, Mahsa, Hamideh Vaghari, Yahya Najian, Mohammad Javad Najian, Hoda Jafarizadeh-Malmiri, and Aydin Berenjjan. 2018. "Microwave-Assisted Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Juglans Regia Leaf Extract and Evaluation of Their Physico-Chemical and Antibacterial Properties." *Antibiotics* 7(3):1–10. doi: 10.3390/antibiotics7030068.
- Estaras, M. ., and A. Gonzalez. 2021. "Modulation of Cell Physiology under Hypoxia in Pancreatic Cancer." *World Journal of Gastroenterology* 27(28):4582–4602.
- Ettadili, F. E., S. Aghris, F. Laghrib, A. Farahi, S. Saqrane, M. Bakasse, S. Lahrich, and M. A. el Mhammedi. 2022. "Recent Advances in the Nanoparticles Synthesis Using Plant Extract: Applications and Future Recommendations." *Journal of Molecular Structure* 1248. doi: 10.1016/j.molstruc.2021.131538.
- Ettlich, Thomas J., and Thomas Seufferlein. 2021. "Systemic Therapy for Metastatic Pancreatic Cancer." *Current Treatment Options in Oncology* 22(11).
- Fath, Mohsen Karami, Setareh Garousi, Mehran Mottahedi, Nasim Ghasemzadeh, Kiana Salmani, Fatemeh Olfati, Miad Beit Saeed, Sina Sotoudeh, and Ghasem Barati. 2023. "The Role of Hypoxia-Inducible Factors in Breast Cancer Stem Cell Specification." *Pathology - Research and Practice* 154349. doi: 10.1016/j.prp.2023.154349.
- Ferlay, Jacques, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman, and Freddie Bray. 2015. "Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012." *International Journal of Cancer* 136(5):E359–86. doi: 10.1002/ijc.29210.
- Fujikura, Kohei, Masayuki Akita, Shiho Abe-Suzuki, Tomoo Itoh, and Yoh Zen. 2017. "Mucinous Cystic Neoplasms of the Liver and Pancreas: Relationship between KRAS Driver Mutations and Disease Progression." *Histopathology* 71(4):591–600. doi: 10.1111/his.13271.
- Garrido, C., L. Galluzzi, M. Brunet, P. E. Puig, C. Didelot, and G. Kroemer. 2006. "Mechanisms of Cytochrome c Release from Mitochondria." *Cell Death and Differentiation* 13(9):1423–33.
- Gaujoux, Sébastien, Sylvie Salenave, Maxime Ronot, Anne Sophie Rangheard, Jérôme Cros, Jacques Belghiti, Alain Sauvanet, Philippe Ruszniewski, and Philippe Chanson. 2014. "Hepatobiliary and Pancreatic Neoplasms in Patients with McCune-Albright Syndrome." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99(1):E97–101. doi: 10.1210/jc.2013-1823.

- Genkinger, Jeanine M., Donna Spiegelman, Kristin E. Anderson, Leif Bergkvist, Leslie Bernstein, Piet A. van den Brandt, Dallas R. English, Jo L. Freudenheim, Charles S. Fuchs, Graham G. Giles, Edward Giovannucci, Susan E. Hankinson, Pamela L. Horn-Ross, Michael Leitzmann, Satu Männistö, James R. Marshall, Marjorie L. McCullough, Anthony B. Miller, Douglas J. Reding, Kim Robien, Thomas E. Rohan, Arthur Schatzkin, Victoria L. Stevens, Rachael Z. Stolzenberg-Solomon, Bas A. J. Verhage, Alicja Wolk, Regina G. Ziegler, and Stephanie A. Smith-Warner. 2009. "Alcohol Intake and Pancreatic Cancer Risk: A Pooled Analysis of Fourteen Cohort Studies." *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 18(3):765–76. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0880.
- Geramizadeh, Bitra, Mahsa Marzban, Alireza Shojazadeh, Ana Kadivar, and Zahra Maleki. 2021. "Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas: Cytomorphology, Imaging, Molecular Profile, and Prognosis." *Cytopathology* 32(4):397–406. doi: 10.1111/cyt.12973.
- Gericke, M., and A. Pinches. 2006. "Biological Synthesis of Metal Nanoparticles." *Hydrometallurgy* 83(1–4):132–40. doi: 10.1016/j.hydromet.2006.03.019.
- Ghorbani, Parisa, Farideh Namvar, Masoud Homayouni-Tabrizi, Mozghan Soltani, Ehsan Karimi, and Parichehreh Yaghmaei. 2018. "Apoptotic Efficacy and Antiproliferative Potential of Silver Nanoparticles Synthesised from Aqueous Extract of Sumac (*Rhus Coriaria* L.)." *IET Nanobiotechnology* 12(5):600–603. doi: 10.1049/IET-NBT.2017.0080.
- Gomes, Helena I. O., Catarina S. M. Martins, and João A. V. Prior. 2021. "Silver Nanoparticles as Carriers of Anticancer Drugs for Efficient Target Treatment of Cancer Cells." *Nanomaterials* 11(4).
- Gudikandula, Krishna, and Singara Charya Maringanti. 2016. "Synthesis of Silver Nanoparticles by Chemical and Biological Methods and Their Antimicrobial Properties." *Journal of Experimental Nanoscience* 11(9):714–21. doi: 10.1080/17458080.2016.1139196.
- Gugliotta, Luis M., Jorge R. Vega, and Gregorio R. Meira. 2000. "Latex Particle Size Distribution by Dynamic Light Scattering: Computer Evaluation of Two Alternative Calculation Paths." *Journal of Colloid and Interface Science* 228(1):14–17. doi: 10.1006/jcis.2000.6923.
- Guo, Juan, Yihui Li, Zhi Yu, Lei Chen, Arunachalam Chinnathambi, Hesham S. Almoallim, Sulaiman Ali Alharbi, and Linxun Liu. 2020. "Novel Green Synthesis and Characterization of a Chemotherapeutic Supplement by Silver Nanoparticles Containing *Berberis Thunbergii* Leaf for the Treatment of Human Pancreatic Cancer." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 69(3):887–97. doi: 10.1002/bab.2160.
- Guo, Yang, Zunqiang Xiao, Liu Yang, Yuling Gao, Qiaojuan Zhu, Linjun Hu, Dongsheng Huang, and Qiuran Xu. 2020. "Hypoxia-Inducible Factors in Hepatocellular Carcinoma (Review)." *Oncology Reports* 43(1):3–15. doi: 10.3892/or.2019.7397.

- sen Gupta, Anirban. 2016. "Role of Particle Size, Shape, and Stiffness in Design of Intravascular Drug Delivery Systems: Insights from Computations, Experiments, and Nature." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 8(2):255–70.
- Gupta, Rohan, Idoroenyi Amanam, and Vincent Chung. 2017. "Current and Future Therapies for Advanced Pancreatic Cancer." *Journal of Surgical Oncology* 116(1):25–34.
- Gurunathan, Sangiliyandi, Kyung Jin Lee, Kalimuthu Kalishwaralal, Sardarpasha Sheikpranbabu, Ramanathan Vaidyanathan, and Soo Hyun Eom. 2009. "Antiangiogenic Properties of Silver Nanoparticles." *Biomaterials* 30(31):6341–50. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.008.
- Gurunathan, Sangiliyandi, Jung Hyun Park, Jae Woong Han, and Jin Hoi Kim. 2015. "Comparative Assessment of the Apoptotic Potential of Silver Nanoparticles Synthesized by *Bacillus Tequilensis* and *Calocybe Indica* in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells: Targeting P53 for Anticancer Therapy." *International Journal of Nanomedicine* 10:4203–23. doi: 10.2147/IJN.S83953.
- Gurunathan, Sangiliyandi, Muhammad Qasim, Chanhyeok Park, Hyunjin Yoo, Jin Hoi Kim, and Kwonho Hong. 2018. "Cytotoxic Potential and Molecular Pathway Analysis of Silver Nanoparticles in Human Colon Cancer Cells HCT116." *International Journal of Molecular Sciences* 19(8). doi: 10.3390/ijms19082269.
- Gwinn, Maureen R., and Val Vallyathan. 2006. "Nanoparticles: Health Effects - Pros and Cons." *Environmental Health Perspectives* 114(12):1818–25.
- Hajebi, Sahar, Masoud Homayouni Tabrizi, Mahboobeh Nakhaei Moghaddam, Farzaneh Shahraki, and Soheyla Yadamani. 2019. "Rapeseed Flower Pollen Bio-Green Synthesized Silver Nanoparticles: A Promising Antioxidant, Anticancer and Antiangiogenic Compound." *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 24(3):395–404. doi: 10.1007/s00775-019-01655-4.
- Hanahan, Douglas. 2022. "Hallmarks of Cancer: New Dimensions." *Cancer Discovery* 12(1):31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100(1):57–70.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144(5):646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hashemi, Seyedeh Fatemeh, Nooshin Tasharrofi, and Mohaddeseh Mahmoudi Saber. 2020. "Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Teucrium Polium* Leaf Extract and Assessment of Their Antitumor Effects against MNK45 Human Gastric Cancer Cell Line." *Journal of Molecular Structure* 1208. doi: 10.1016/j.molstruc.2020.127889.

- Hashemi, Zahra, Mahsa Mohammadyan, Shamisa Naderi, Mahdi Fakhar, Pourya Biparva, Javad Akhtari, and Mohammad Ali Ebrahimzadeh. 2021. "Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Ferula Persica Extract (Fp-NPs): Characterization, Antibacterial, Antileishmanial, and in Vitro Anticancer Activities." *Materials Today Communications* 27. doi: 10.1016/j.mtcomm.2021.102264.
- Heidbreder, Marc, Frederike Fröhlich, Olaf Jöhren, Andreas Dendorfer, Fatimunnisa Qadri, and Peter Dominiak. 2003. "Hypoxia Rapidly Activates HIF-3 $\alpha$  mRNA Expression." *The FASEB Journal* 17(11):1–19. doi: 10.1096/fj.02-0936fje.
- Hembram, Krushna C., Rahul Kumar, Laxman Kandha, Pankaj K. Parhi, Chanakya N. Kundu, and Birendra K. Bindhani. 2018. "Therapeutic Prospective of Plant-Induced Silver Nanoparticles: Application as Antimicrobial and Anticancer Agent." *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 46(sup3):S38–51. doi: 10.1080/21691401.2018.1489262.
- Hezel, Aram F., Alec C. Kimmelman, Ben Z. Stanger, Nabeel Bardeesy, and Ronald A. DePinho. 2006. "Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Genes and Development* 20(10):1218–49. doi: 10.1101/gad.1415606.
- Hoe, Khoo Kian, Chandra S. Verma, and David P. Lane. 2014. "Drugging the P53 Pathway: Understanding the Route to Clinical Efficacy." *Nature Reviews Drug Discovery* 13(3):217–36.
- Hoshyar, Reyhane, and Homa Mollaei. 2017. "A Comprehensive Review on Anticancer Mechanisms of the Main Carotenoid of Saffron, Crocin." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 69(11):1419–27. doi: 10.1111/jphp.12776.
- Hsieh, Chia Hung, Cheng Hung Lee, Ji An Liang, Chun Yen Yu, and Woei Cherng Shyu. 2010. "Cycling Hypoxia Increases U87 Glioma Cell Radioresistance via ROS Induced Higher and Long-Term HIF-1 Signal Transduction Activity." *Oncology Reports* 24(6):1629–36. doi: 10.3892/or\_00001027.
- Hu, J. X. ., Zhao C. F., W. B. ., Chen, Q. C. ., Liu, Q. W. ., Li, Y. Y. ., Lin, and F. Gao. 2021. "Pancreatic Cancer: A Review of Epidemiology, Trend, and Risk Factors." *World Journal of Gastroenterology* 21(27):4252–4483.
- Huang, Brian Z., Daniel O. Stram, Loic le Marchand, Christopher A. Haiman, Lynne R. Wilkens, Stephen J. Pandol, Zuo Feng Zhang, Kristine R. Monroe, and Veronica Wendy Setiawan. 2019. "Interethnic Differences in Pancreatic Cancer Incidence and Risk Factors: The Multiethnic Cohort." *Cancer Medicine* 8(7):3592–3603. doi: 10.1002/cam4.2209.
- Hulla, J. E., S. C. Sahu, and A. W. Hayes. 2015. "Nanotechnology: History and Future." *Human and Experimental Toxicology* 34(12):1318–21.
- Hung, Shun Pei, Jennifer H. Ho, Yu Ru v. Shih, Ting Lo, and Oscar K. Lee. 2012. "Hypoxia Promotes Proliferation and Osteogenic Differentiation Potentials of Human Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Orthopaedic Research* 30(2):260–66. doi: 10.1002/jor.21517.

- Infantino, Vittoria, Anna Santarsiero, Paolo Convertini, Simona Todisco, and Vito Iacobazzi. 2021. "Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target." *International Journal of Molecular Sciences* 22(11). doi: 10.3390/ijms22115703.
- Iravani, Siavash. 2011. "Green Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants." *Green Chemistry* 13(10):2638–50. doi: 10.1039/c1gc15386b.
- Irfan, Muhammad, Muhammad Moniruzzaman, Tausif Ahmad, Ola Yahia Osman, Pradip Chandra Mandal, Sekhar Bhattacharjee, and Murid Hussain. 2018. "Stability, Interparticle Interactions and Catalytic Performance of Gold Nanoparticles Synthesized through Ionic Liquid Mediated Oil Palm Leaves Extract." *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6(4):5024–31. doi: 10.1016/j.jece.2018.07.031.
- Iyer, Narayan v, Sandra W. Leung, and Gregg L. Semenza. 1998. "The Human Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ Gene:HIF1AStructure and Evolutionary Conservation." *Genomics* 52(2):159–65.
- Jadoun, Sapana, Rizwan Arif, Nirmala Kumari Jangid, and Rajesh Kumar Meena. 2021. "Green Synthesis of Nanoparticles Using Plant Extracts: A Review." *Environmental Chemistry Letters* 19(1):355–74. doi: 10.1007/s10311-020-01074-x.
- Jang, Kee Taek, Sang Mo Park, Olca Basturk, Pelin Bagci, Sudeshna Bandyopadhyay, Edward B. Stelow, Dustin M. Walters, Dong Wook Choi, Seoung Ho Choi, Jin Seok Heo, Juan M. Sarmiento, Michelle D. Reid, and Volkan Adsay. 2015. "Clinicopathologic Characteristics of 29 Invasive Carcinomas Arising in 178 Pancreatic Mucinous Cystic Neoplasms with Ovarian-Type Stroma: Implications for Management and Prognosis." *American Journal of Surgical Pathology* 39(2):179–87. doi: 10.1097/PAS.0000000000000357.
- Jeevanandam, Jaison, Ahmed Barhoum, Yen S. Chan, Alain Dufresne, and Michael K. Danquah. 2018. "Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: History, Sources, Toxicity and Regulations." *Beilstein Journal of Nanotechnology* 9(1):1050–74. doi: 10.3762/bjnano.9.98.
- Jorge de Souza, Tiago Alves, Lilian Rodrigues Rosa Souza, and Leonardo Pereira Franchi. 2019. "Silver Nanoparticles: An Integrated View of Green Synthesis Methods, Transformation in the Environment, and Toxicity." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 171:691–700.
- Kaliamurthi, Satyavani, Gurudeeban Selvaraj, Zeynep Elibol Çakmak, and Turgay Çakmak. 2016. "Production and Characterization of Spherical Thermostable Silver Nanoparticles from *Spirulina Platensis* (Cyanophyceae)." *Phycologia* 55(5):568–76. doi: 10.2216/15-98.1.
- Kallio, Pekka J., Ingemar Pongratz, Katarina Gradin, Jacqueline Mcguire, and Lorenz Poellinger. 1997. "Activation of Hypoxia-Inducible Factor 1: Posttranscriptional Regulation and Conformational Change by Recruitment of the Arnt Transcription Factor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(11):5667–72.

- Kaplan, Özlem, Nazan Gökşen Tosun, Aykut Özgür, Seçil Erden Tayhan, Sema Bilgin, İbrahim Türkekul, and İsa Gökce. 2021. "Microwave-Assisted Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Crude Extracts of *Boletus Edulis* and *Coriolus Versicolor*: Characterization, Anticancer, Antimicrobial and Wound Healing Activities." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 64. doi: 10.1016/j.jddst.2021.102641.
- Khan, Azmat Ali, Amer M. Alanazi, Nawaf Alsaif, Tanveer A. Wani, and Mashooq A. Bhat. 2021. "Pomegranate Peel Induced Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Multifaceted Potential against Intracellular Pathogen and Cancer." *Saudi Journal of Biological Sciences* 28(8):4191–4200. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.06.022.
- Khan, Ibrahim, Khalid Saeed, and Idrees Khan. 2019. "Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities." *Arabian Journal of Chemistry* 12(7):908–31.
- Khan, Mohd Shahnawaz, Alya Alomari, Shams Tabrez, Iftekhhar Hassan, Rizwan Wahab, Sheraz Ahmad Bhat, Nouf Omar Alafaleq, Nojood Altwaijry, Gouse M. Shaik, Syed Kashif Zaidi, Wessam Nouh, Majed S. Alokail, and Mohamed A. Ismael. 2021. "Anticancer Potential of Biogenic Silver Nanoparticles: A Mechanistic Study." *Pharmaceutics* 13(5):1–12. doi: 10.3390/pharmaceutics13050707.
- Khandel, Pramila, and Ph D. Research Scholar. 2016. "Microbes Mediated Synthesis of Metal Nanoparticles: Current Status and Future Prospects." *International Journal of Nanomaterials and Biostructures* 6(1):1–24.
- Khanna, Purna, Amrit Kaur, and Dinesh Goyal. 2019. "Algae-Based Metallic Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications." *Journal of Microbiological Methods* 163(105656):1–24. doi: 10.1016/j.mimet.2019.105656.
- Khorrami, Sadegh, Ali Zarrabi, Moj Khaleghi, Marziyeh Danaei, and M. R. Mozafari. 2018. "Selective Cytotoxicity of Green Synthesized Silver Nanoparticles against the MCF-7 Tumor Cell Line and Their Enhanced Antioxidant and Antimicrobial Properties." *International Journal of Nanomedicine* 13:8013–24. doi: 10.2147/IJN.S189295.
- Koong, Albert C., Vivek K. Mehta, Quynh T. Le, George A. Fisher, David J. Terris, J. Martin Brown, Augusto J. Bastidas, and Mark Vierra. 2000. "Pancreatic Tumors Show High Levels of Hypoxia." 48(4):919–22.
- Koppenol, Willem H., Patricia L. Bounds, and Chi V. Dang. 2011. "Otto Warburg's Contributions to Current Concepts of Cancer Metabolism." *Nature Reviews Cancer* 11(5):325–37. doi: 10.1038/nrc3038.
- Korbecki, Jan, Klaudyna Kojder, Katarzyna Barczak, Donata Simińska, Izabela Gutowska, Dariusz Chlubek, and Irena Baranowska-Bosiacka. 2020. "Hypoxia Alters the Expression of CC Chemokines and Cc Chemokine Receptors in a Tumor—a Literature Review." *International Journal of Molecular Sciences* 21(16):1–32. doi: 10.3390/ijms21165647.

- Korc, Murray, Christie Y. Jeon, Mouad Edderkaoui, Stephen J. Pandol, and Maxim S. Petrov. 2017. "Tobacco and Alcohol as Risk Factors for Pancreatic Cancer." *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* 31(5):529–36. doi: 10.1016/j.bpg.2017.09.001.
- Korkmaz, Nesrin, Yusuf Ceylan, Attia Hamid, Ahmet Karadağ, Ali Savaş Bülbül, Muhammad Nauman Aftab, Özge Çevik, and Fatih Şen. 2020. "Biogenic Silver Nanoparticles Synthesized via Mimusops Elengi Fruit Extract, a Study on Antibiofilm, Antibacterial, and Anticancer Activities." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 59. doi: 10.1016/j.jddst.2020.101864.
- Kumar, Harsh, Kanchan Bhardwaj, Kamil Kuča, Anu Kalia, Eugenie Nepovimova, Rachna Verma, and Dinesh Kumar. 2020. "Flower-Based Green Synthesis of Metallic Nanoparticles: Applications beyond Fragrance." *Nanomaterials* 10(4).
- Kumar, Vinay, Neha Sharma, and S. S. Maitra. 2017. "In Vitro and in Vivo Toxicity Assessment of Nanoparticles." *International Nano Letters* 7(4):243–56. doi: 10.1007/s40089-017-0221-3.
- Kumar, Vineet, and Sudesh Kumar Yadav. 2009. "Plant-Mediated Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles and Their Applications." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84(2):151–57.
- Kummara, Sivaiah, Mrityunjaya B. Patil, and Tiewlasubon Uriah. 2016a. "Synthesis, Characterization, Biocompatible and Anticancer Activity of Green and Chemically Synthesized Silver Nanoparticles – A Comparative Study." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 84:10–21. doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.003.
- Kummara, Sivaiah, Mrityunjaya B. Patil, and Tiewlasubon Uriah. 2016b. "Synthesis, Characterization, Biocompatible and Anticancer Activity of Green and Chemically Synthesized Silver Nanoparticles – A Comparative Study." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 84:10–21. doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.003.
- Kuppusamy, Palaniselvam, Mashitah M. Yusoff, Gaanty Pragas Maniam, and Natanamurugaraj Govindan. 2014. "Biosynthesis of Metallic Nanoparticles Using Plant Derivatives and Their New Avenues in Pharmacological Applications." *Saudi Pharmaceutical Journal* 24(4):473–84. doi: 10.1016/j.jsps.2014.11.013.
- Lando, David, Daniel J. Peet, Dean A. Whelan, Jeffrey J. Gorman, and Murray L. Whitelaw. 2002. *Asparagine Hydroxylation of the HIF Transactivation Domain: A Hypoxic Switch*.
- Lanzen, Jennifer, Rod D. Braun, Bruce Klitzman, David Brizel, Timothy W. Secomb, and Mark W. Dewhirst. 2006. "Direct Demonstration of Instabilities in Oxygen Concentrations within the Extravascular Compartment of an Experimental Tumor." *Cancer Research* 66(4):2219–23. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2958.

- Laughner, Erik, Panthea Taghavi, Kelly Chiles, Patrick C. Mahon, and Gregg L. Semenza. 2001. "HER2 (Neu) Signaling Increases the Rate of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) Synthesis: Novel Mechanism for HIF-1-Mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression." *Molecular and Cellular Biology* 21(12):3995–4004. doi: 10.1128/mcb.21.12.3995-4004.2001.
- LewisOscar, Felix, Sasikumar Vismaya, Manivel Arunkumar, Nooruddin Thajuddin, Dharumadurai Dhanasekaran, and Chari Nithya. 2016. "Algal Nanoparticles: Synthesis and Biotechnological Potentials." in *Algae - Organisms for Imminent Biotechnology*. InTech.
- Liang, Chen, Yi Qin, Bo Zhang, Shunrong Ji, Si Shi, Wenyan Xu, Jiang Liu, Jinfeng Xiang, Dingkong Liang, Qiangsheng Hu, Liang Liu, Chen Liu, Guopei Luo, Quanxing Ni, Jin Xu, and Xianjun Yu. 2016. "Energy Sources Identify Metabolic Phenotypes in Pancreatic Cancer." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 48(11):969–79.
- Liang, Qi Lian, Bi Rong Wang, Guo Qiang Chen, Guo Hong Li, and Yan Yun Xu. 2010. "Clinical Significance of Vascular Endothelial Growth Factor and Connexin43 for Predicting Pancreatic Cancer Clinicopathologic Parameters." *Medical Oncology* 27(4):1164–70. doi: 10.1007/s12032-009-9354-1.
- Lin, Ping Chang, Stephen Lin, Paul C. Wang, and Rajagopalan Sridhar. 2014. "Techniques for Physicochemical Characterization of Nanomaterials." *Biotechnology Advances* 32(4):711–26.
- Liu, Li, Xue Feng An, Michael Schaefer, Bin Yan, Carolina de la Torre, Stefan Hillmer, Jury Gladkikh, and Ingrid Herr. 2022. "Nanosilver Inhibits the Progression of Pancreatic Cancer by Inducing a Paraptosis-like Mixed Type of Cell Death." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 153:113511. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2022.113511.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." *Methods* 25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lloyd, Jonathan R., James M. Byrne, and Victoria S. Coker. 2011. "Biotechnological Synthesis of Functional Nanomaterials." *Current Opinion in Biotechnology* 22(4):509–15.
- Lodish, Harvey, Arnold Berk, Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Lawrence Zipursky, and James Darnell. 2003. *Molecular Cell Biology*. 5th ed.
- Loganathan, Settu, Kuppusamy Selvam, Muthugounder Subaramanian Shivakumar, Sengottayan Senthil-Nathan, Prabhakaran Vasantha-Srinivasan, Dhakshinamoorthy Gnana Prakash, Sengodan Karthi, Fahad Al-Misned, Shahid Mahboob, Ahmed Abdel-Megeed, Aml Ghaith, and Patcharin Krutmuang. 2022. "Phytosynthesis of Silver Nanoparticle (AgNPs) Using Aqueous Leaf Extract of *Knoxia Sumatrensis*

- (Retz.) DC. and Their Multi-Potent Biological Activity: An Eco-Friendly Approach.” *Molecules* 27(22). doi: 10.3390/molecules27227854.
- Lopez-Bergami, Pablo, Boris Fitchman, and Ze’ev Ronai. 2008. “Understanding Signaling Cascades in Melanoma.” *Photochemistry and Photobiology* 84(2):289–306.
- Mahon, P. C., K. Hirota, and G. L. Semenza. 2001. “FIH-1: A Novel Protein That Interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to Mediate Repression of HIF-1 Transcriptional Activity.” *Genes and Development* 15(20):2675–86. doi: 10.1101/gad.924501.
- Manolescu, Bogdan, Eliza Oprea, Carmina Busu, and Cornelia Cercasov. 2009. “Natural Compounds and the Hypoxia-Inducible Factor (HIF) Signalling Pathway.” *Biochimie* 91(11–12):1347–58. doi: 10.1016/j.biochi.2009.08.005.
- Manosalva, Nixson, Gonzalo Tortella, María Cristina Diez, Heidi Schalchli, Amedea B. Seabra, Nelson Durán, and Olga Rubilar. 2019. “Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Effect of Synthesis Reaction Parameters on Antimicrobial Activity.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35(6). doi: 10.1007/s11274-019-2664-3.
- Marchiol, Luca. 2012. “Synthesis of Metal Nanoparticles in Living Plants.” *Italian Journal of Agronomy* 7(3):274–82. doi: 10.4081/ija.2012.e37.
- Martin, Abril saint, M. Cristina Castaneda Patlan, and Martha Robles Flores. 2017. “The Role of Hypoxia-Inducible Factors in Cancer Resistance.” *Journal of Cell Signaling* 2(1):1–12. doi: 10.4172/2576-1471.1000154.
- Maynard, Andrew D. 2006. *Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk*.
- Mceill, Luke A., Kirsty S. Hewitson, Jonathan M. Gleadle, Louise E. Horsfall, Neil J. Oldham, Patrick H. Maxwell, Christopher W. Pugh, Peter J. Ratcliffe, and Christopher J. Schofield. 2002. “The Use of Dioxygen by HIF Prolyl Hydroxylase (PHD1).” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:1547–50.
- Mehnath, Sivaraj, Ashok Kumar Das, Sandeep Kumar Verma, and Murugaraj Jeyaraj. 2021. “Biosynthesized/Green-Synthesized Nanomaterials as Potential Vehicles for Delivery of Antibiotics/Drugs.” Pp. 363–432 in *Comprehensive Analytical Chemistry*. Vol. 94. Elsevier B.V.
- Mirkatuli, Hanieh Alsadat, Mohammadhasan Baghbani, and Behrooz Yahyaei. 2021. “Comparison of the Possible Histopathological Changes of the Rat Neonatal Cerebellum Induced by Toxic and Nontoxic Doses of Biological Silver Nanoparticles with Chemical Silver Nanoparticles.” *Brain and Behavior* 11(8):1–10. doi: 10.1002/brb3.2319.
- Mittal, Amit Kumar, Yusuf Chisti, and Uttam Chand Banerjee. 2013. “Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Plant Extracts.” *Biotechnology Advances* 31(2):346–56.

- Mohammed, Somala, George van Buren, and William E. Fisher. 2014. "Pancreatic Cancer: Advances in Treatment." *World Journal of Gastroenterology* 20(28):9354–60. doi: 10.3748/wjg.v20.i28.9354.
- Mohanpuria, Prashant, Nisha K. Rana, and Sudesh Kumar Yadav. 2008. "Biosynthesis of Nanoparticles: Technological Concepts and Future Applications." *Journal of Nanoparticle Research* 10(3):507–17.
- Mollick, Md Masud Rahaman, Dipak Rana, Sandeep Kumar Dash, Sourav Chattopadhyay, Biplab Bhowmick, Dipanwita Maity, Dibyendu Mondal, Sutanuka Pattanayak, Somenath Roy, Mukut Chakraborty, and Dipankar Chattopadhyay. 2019. "Studies on Green Synthesized Silver Nanoparticles Using *Abelmoschus Esculentus* (L.) Pulp Extract Having Anticancer (in Vitro) and Antimicrobial Applications." *Arabian Journal of Chemistry* 12(8):2572–84. doi: 10.1016/j.arabjc.2015.04.033.
- Mousavi-Khattat, Mohammad, Mehrnaz Keyhanfar, and Amir Razmjou. 2018. "A Comparative Study of Stability, Antioxidant, DNA Cleavage and Antibacterial Activities of Green and Chemically Synthesized Silver Nanoparticles." *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 46(S3):S1022–31. doi: 10.1080/21691401.2018.1527346.
- Mukherjee, Sudip, Debabrata Chowdhury, Rajesh Kotcherlakota, Sujata Patra, B. Vinothkumar, Manika Pal Bhadra, Bojja Sreedhar, and Chitta Ranjan Patra. 2014. "Potential Theranostics Application of Bio-Synthesized Silver Nanoparticles (4-in-1 System)." *Theranostics* 4(3):316–35. doi: 10.7150/thno.7819.
- Mukunthan, K. S., and S. Balaji. 2012. "Cashew Apple Juice (*Anacardium Occidentale* L.) Speeds up the Synthesis of Silver Nanoparticles." *International Journal of Green Nanotechnology: Biomedicine* 4(2):71–79. doi: 10.1080/19430892.2012.676900.
- Murphy, Stephen J., Steven N. Hart, Joema Felipe Lima, Benjamin R. Kipp, Mitchell Klebig, Jennifer L. Winters, Csilla Szabo, Lizhi Zhang, Bruce W. Eckloff, Gloria M. Petersen, Steven E. Scherer, Richard A. Gibbs, Robert R. McWilliams, George Vasmatazis, and Fergus J. Couch. 2013. "Genetic Alterations Associated with Progression from Pancreatic Intraepithelial Neoplasia to Invasive Pancreatic Tumor." *Gastroenterology* 145(5). doi: 10.1053/j.gastro.2013.07.049.
- Nair, Gopika M., T. Sajini, and Beena Mathew. 2022. "Advanced Green Approaches for Metal and Metal Oxide Nanoparticles Synthesis and Their Environmental Applications." *Talanta Open* 5:100080. doi: 10.1016/j.talo.2021.100080.
- Najahi-Missaoui, Wided, Robert D. Arnold, and Brian S. Cummings. 2021. "Safe Nanoparticles: Are We There Yet?" *International Journal of Molecular Sciences* 22(1):1–22. doi: 10.3390/ijms22010385.
- Narayanan, Kannan Badri, and Natarajan Sakthivel. 2010a. "Phytosynthesis of Gold Nanoparticles Using Leaf Extract of *Coleus Amboinicus* Lour." *Materials Characterization* 61(11):1232–38. doi: 10.1016/j.matchar.2010.08.003.

- Narayanan, Kannan Badri, and Natarajan Sakthivel. 2010b. "Phytosynthesis of Gold Nanoparticles Using Leaf Extract of *Coleus Amboinicus* Lour." *Materials Characterization* 61(11):1232–38. doi: 10.1016/J.MATCHAR.2010.08.003.
- Nematollahi, F. 2015. "Silver Nanoparticles Green Synthesis Using Aqueous Extract of *Salvia Limbata* C.A. Mey." *International Journal of Biosciences (IJB)* 6(2):30–35. doi: 10.12692/ijb/6.2.30-35.
- Oladipo, I. C., A. Lateef, M. A. Azeez, T. B. Asafa, T. A. Yekeen, S. B. Ogunsona, H. M. Irshad, and S. H. Abbas. 2020. "Antidiabetic Properties of Phytosynthesized Gold Nanoparticles (AuNPs) from *Datura Stramonium* Seed." in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. Vol. 805. Institute of Physics Publishing.
- Olbryt, Magdalena, Anna Habryka, Sebastian Student, Michał Jarzab, Tomasz Tyszkiewicz, and Katarzyna Marta Lisowska. 2014. "Global Gene Expression Profiling in Three Tumor Cell Lines Subjected to Experimental Cycling and Chronic Hypoxia." *PLoS ONE* 9(8):e105104. doi: 10.1371/journal.pone.0105104.
- Ovais, Muhammad, Ali Talha Khalil, Muhammad Ayaz, Irshad Ahmad, Susheel Kumar Nethi, and Sudip Mukherjee. 2018. "Biosynthesis of Metal Nanoparticles via Microbial Enzymes: A Mechanistic Approach." *International Journal of Molecular Sciences* 19(12). doi: 10.3390/ijms19124100.
- Oves, Mohammad, Mohammad Aslam, Mohd Ahmar Rauf, Shariq Qayyum, Huda A. Qari, Mohd Shahnawaz Khan, Mohammad Zubair Alam, Shams Tabrez, Arivalagan Pugazhendhi, and Iqbal M. I. Ismail. 2018. "Antimicrobial and Anticancer Activities of Silver Nanoparticles Synthesized from the Root Hair Extract of *Phoenix Dactylifera*." *Materials Science and Engineering C* 89:429–43. doi: 10.1016/j.msec.2018.03.035.
- Pal, Gaurav, Priya Rai, and Anjana Pandey. 2019. "Green Synthesis of Nanoparticles: A Greener Approach for a Cleaner Future." Pp. 1–26 in *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*. Elsevier.
- Pandian, A. Muthu Kumara, C. Karthikeyan, M. Rajasimman, and M. G. Dinesh. 2015. "Synthesis of Silver Nanoparticle and Its Application." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 121:211–17. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.03.039.
- Park, Y., Y. N. Hong, A. Weyers, Y. S. Kim, and R. J. Linhardt. 2011. "Polysaccharides and Phytochemicals: A Natural Reservoir for the Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles." *IET Nanobiotechnology* 5(3):69–78. doi: 10.1049/iet-nbt.2010.0033.
- Parupudi, Arun, Sri Hari Raju Mulagapati, and J. Anand Subramony. 2022. "Nanoparticle Technologies: Recent State of the Art and Emerging Opportunities." Pp. 3–46 in *Nanoparticle Therapeutics*. Elsevier.

- Patil, Maheshkumar Prakash, and Gun do Kim. 2017. "Eco-Friendly Approach for Nanoparticles Synthesis and Mechanism behind Antibacterial Activity of Silver and Anticancer Activity of Gold Nanoparticles." *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(1):79–92.
- Patil, Sunita, and Rajkuberan Chandrasekaran. 2020. "Biogenic Nanoparticles: A Comprehensive Perspective in Synthesis, Characterization, Application and Its Challenges." *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 18(1). doi: 10.1186/s43141-020-00081-3.
- Pei, Junwen, Binfan Fu, Lifeng Jiang, and Taizhen Sun. 2019. "Biosynthesis, Characterization, and Anticancer Effect of Plant-Mediated Silver Nanoparticles Using *Coptis Chinensis*." *International Journal of Nanomedicine* 14:1969–78. doi: 10.2147/IJN.S188235.
- Perusina Lanfranca, M., J. K. Thompson, F. Bednar, C. Halbrook, C. Lyssiotis, B. Levi, and T. L. Frankel. 2019. "Metabolism and Epigenetics of Pancreatic Cancer Stem Cells." *Seminars in Cancer Biology* 57:19–26.
- Phanjom, Probin, and Giasuddin Ahmed. 2017. "Effect of Different Physicochemical Conditions on the Synthesis of Silver Nanoparticles Using Fungal Cell Filtrate of *Aspergillus Oryzae* (MTCC No. 1846) and Their Antibacterial Effect." *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 8(4). doi: 10.1088/2043-6254/aa92bc.
- Pittman, Meredith E., Rema Rao, and Ralph H. Hruban. 2017. "Classification, Morphology, Molecular Pathogenesis, and Outcome of Premalignant Lesions of the Pancreas." *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 141(12):1606–14. doi: 10.5858/arpa.2016-0426-RA.
- Porta M., Fabregat X., Malats N., Guarner L., Carrato A., de Miguel A., Ruiz L., Jariod M., Costafreda S., Coll S., and X. Real F. 2005. "Exocrine Pancreatic Cancer: Symptoms at Presentation and Their Relation to Tumour Site and Stage." *Clinical and Translational Oncology* 7(5):189–97.
- Priya, Kannappan, Mayakrishnan Vijayakumar, and Balakarthikeyan Janani. 2020. "Chitosan-Mediated Synthesis of Biogenic Silver Nanoparticles (AgNPs), Nanoparticle Characterisation and in Vitro Assessment of Anticancer Activity in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells." *International Journal of Biological Macromolecules* 149:844–52. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.007.
- Pulit-Prociak, Jolanta, and Marcin Banach. 2016. "Silver Nanoparticles - A Material of the Future...?" *Open Chemistry* 14(1):76–91. doi: 10.1515/chem-2016-0005.
- Rafique, Muhammad, Iqra Sadaf, M. Shahid Rafique, and M. Bilal Tahir. 2017. "A Review on Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications." *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 45(7):1272–91.

- Rafique, Muhammad, Ahson J. Shaikh, Reena Rasheed, Muhammad Bilal Tahir, Hafiz Faiq Bakhat, Muhammad Shahid Rafique, and Faiz Rabbani. 2017. "A Review on Synthesis, Characterization and Applications of Copper Nanoparticles Using Green Method." *Nano* 12(4):1–23. doi: 10.1142/S1793292017500436.
- Raghavan, DharmaraJ, B. Zewde, A. Ambaye, J. Stubbs III, and D Raghavan. 2016. "A Review of Stabilized Silver Nanoparticles – Synthesis, Biological Properties, Characterization, and Potential Areas of Applications." *JSM Nanotechnol Nanomed* 4(2):1043.
- Rahib, Lola, Benjamin D. Smith, Rhonda Aizenberg, Allison B. Rosenzweig, Julie M. Fleshman, and Lynn M. Matrisian. 2014. "Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States." *Cancer Research* 74(11):2913–21.
- Rai, Mahendra, Alka Yadav, and Aniket Gade. 2009. "Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials." *Biotechnology Advances* 27(1):76–83.
- Raval, Nidhi, Rahul Maheshwari, Dnyaneshwar Kalyane, Susanne R. Youngren-Ortiz, Mahavir B. Chougule, and Rakesh K. Tekade. 2018. "Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development." Pp. 369–400 in *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Elsevier.
- Raveendran, Poovathinthodiyil, Jie Fu, and Scott L. Wallen. 2003. "Completely 'Green' Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles." *Journal of the American Chemical Society* 125(46):13940–41. doi: 10.1021/ja029267j.
- Ravenna, Linda, Lorenzo Principessa, Alessandra Verdina, Luisa Salvatori, Matteo Antonio Russo, and Elisa Petrangeli. 2014. "Distinct Phenotypes of Human Prostate Cancer Cells Associate with Different Adaptation to Hypoxia and Pro-Inflammatory Gene Expression." *PLoS ONE* 9(5):96250. doi: 10.1371/journal.pone.0096250.
- Reidy, Bogumila, Andrea Haase, Andreas Luch, Kenneth A. Dawson, and Iseult Lynch. 2013. "Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications." *Materials* 6(6):2295–2350. doi: 10.3390/ma6062295.
- Richard, Darren E., Edurne Berra, Emmanuel Gothié, Danièle Roux, and Jacques Pouyssegur. 1999. "P42/P44 Mitogen-Activated Protein Kinases Phosphorylate Hypoxia- Reducible Factor (HIF-1 $\alpha$ ) and Enhance the Transcriptional Activity of HIF-1." *Journal of Biological Chemistry* 274(46):32631–37. doi: 10.1074/jbc.274.46.32631.
- Roy, P. S., and B. J. Saikia. 2016. "Cancer and Cure: A Critical Analysis." *Indian Journal of Cancer* 53(3):441–42. doi: 10.4103/0019-509X.200658.
- Roy, S., and T. K. Das. 2015. "Plant Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles- A Review." *International Journal of Plant Biology* 3(3):1044.

- Şahin Calapoğlu, Nilüfer. 2016. "Hipoksiye Karşı Hücreyel Cevabın Düzenleyicisi: HIF-1 Regulator of Cellular Response to Hypoxia." *Smyrna Tıp Dergisi* 48–53.
- Sakamoto, Shoko, Yasuhiko Deguchi, Sawako Uchida, Yoshiaki Itoh, and Koki Inoue. 2022. "Prolonged Extrapyrimal Symptoms Induced by Long-Term, Intermittent Administration of Low-Dose Olanzapine along with Metoclopramide for Emesis: A Case Report." *Neuropsychopharmacology Reports* 42(3):380–83. doi: 10.1002/npr2.12277.
- Salceda, Susana, and Jaime Caro. 1997. "Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. Its Stabilization by Hypoxia Depends on Redox-Induced Changes." *Journal of Biological Chemistry* 272(36):22642–47. doi: 10.1074/jbc.272.36.22642.
- Sánchez-López, Elena, Daniela Gomes, Gerard Esteruelas, Lorena Bonilla, Ana Laura Lopez-Machado, Ruth Galindo, Amanda Cano, Marta Espina, Miren Ettcheto, Antoni Camins, Amélia M. Silva, Alessandra Durazzo, Antonello Santini, Maria L. Garcia, and Eliana B. Souto. 2020. "Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview." *Nanomaterials* 10(2).
- Sanghi, Rashmi, and Preeti Verma. 2009. "Biomimetic Synthesis and Characterisation of Protein Capped Silver Nanoparticles." *Bioresource Technology* 100(1):501–4. doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.048.
- Saratale, Rijuta Ganesh, Ganesh Dattatraya Saratale, Gajanan Ghodake, Si Kyung Cho, Avinash Kadam, Gopalakrishnan Kumar, Byong Hun Jeon, Deepak Pant, Amit Bhatnagar, and Han Seung Shin. 2019. "Wheat Straw Extracted Lignin in Silver Nanoparticles Synthesis: Expanding Its Prophecy towards Antineoplastic Potency and Hydrogen Peroxide Sensing Ability." *International Journal of Biological Macromolecules* 128:391–400. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.120.
- Sathishkumar, Muthuswamy, Krishnamurthy Sneha, and Yeoung Sang Yun. 2010. "Immobilization of Silver Nanoparticles Synthesized Using Curcuma Longa Tuber Powder and Extract on Cotton Cloth for Bactericidal Activity." *Bioresource Technology* 101(20):7958–65. doi: 10.1016/j.biortech.2010.05.051.
- Satyavani, K., T. Ramanathan, and S. Gurudeeban. 2011a. "Green Synthesis Of Silver Nanoparticles By Using Stem Derived Callus Extract Of Bitter Apple (Citrullus Colocynthis)." *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 6(3):1019–24.
- Satyavani, K., T. Ramanathan, and S. Gurudeeban. 2011b. "Plant Mediated Synthesis of Biomedical Silver Nanoparticles by Using Leaf Extract of Citrullus Colocynthis." *Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 1(2):95–101.
- Semenza, Gregg L. 2003. "Targeting HIF-1 for Cancer Therapy." *Nature Reviews Cancer* 3(10):721–32. doi: 10.1038/nrc1187.

- Shaik, Mohammed Rafi, Ghadeer H. Albalawi, Shams Tabrez Khan, Merajuddin Khan, Syed Farooq Adil, Mufsir Kuniyil, Abdulrahman Al-Warthan, Mohammed Rafiq H. Siddiqui, Hamad Z. Alkhatlan, and Mujeeb Khan. 2016. “‘Miswak’ Based Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Evaluation and Comparison of Their Microbicidal Activities with the Chemical Synthesis.” *Molecules* 21(11). doi: 10.3390/molecules21111478.
- Shankar, S. Shiv, Akhilesh Rai, Absar Ahmad, and Murali Sastry. 2004. “Rapid Synthesis of Au, Ag, and Bimetallic Au Core-Ag Shell Nanoparticles Using Neem (*Azadirachta Indica*) Leaf Broth.” *Journal of Colloid and Interface Science* 275(2):496–502. doi: 10.1016/j.jcis.2004.03.003.
- Shanmuganathan, Rajasree, Indira Karuppusamy, Muthupandian Saravanan, Harshiny Muthukumar, Kumar Ponnuchamy, Vijayan Sri Ramkumar, and Arivalagan Pugazhendhi. 2019. “Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Biomedical Applications - A Comprehensive Review.” *Current Pharmaceutical Design* 25(24):2650–60. doi: 10.2174/1381612825666190708185506.
- Shi, C., and E. Liu. 2014. “Anatomy, Histology, and Function of the Pancreas.” Pp. 2229–42 in *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*. Elsevier Inc.
- Shi, Chanjuan, Alison P. Klein, Michael Goggins, Anirban Maitra, Marcia Canto, Syed Ali, Richard Schulick, Emily Palmisano, and Ralph H. Hruban. 2009. “Increased Prevalence of Precursor Lesions in Familial Pancreatic Cancer Patients.” *Clinical Cancer Research* 15(24):7737–43. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0004.
- Shi, Jinjun, Philip W. Kantoff, Richard Wooster, and Omid C. Farokhzad. 2017. “Cancer Nanomedicine: Progress, Challenges and Opportunities.” *Nature Reviews Cancer* 17(1):20–37.
- Shi, Rachel, Chengheng Liao, and Qing Zhang. 2021. “Hypoxia-Driven Effects in Cancer: Characterization, Mechanisms, and Therapeutic Implications.” *Cells* 10(3):1–26. doi: 10.3390/cells10030678.
- Shibuya, Masubmi. 2006. “Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): A Dual Regulator for Angiogenesis.” *Angiogenesis* 9(4):225–30. doi: 10.1007/s10456-006-9055-8.
- Siddiqui, Nurunnesa, Kunal Pal, Parimal Karmakar, Md Maidul Islam, and Subrata Mukhopadhyay. 2020. “A Dual Role of Cumin-Seed Extract towards the Silver Nanoparticle Synthesis and Stabilisation and Its Potential for Antibacterial and Anticancer Activities through Oxidative Damage.” *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 11(2). doi: 10.1088/2043-6254/ab92fd.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, Hannah E. Fuchs, and Ahmedin Jemal. 2022. “Cancer Statistics, 2022.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 72(1):7–33. doi: 10.3322/caac.21708.

- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, Nikita Sandeep Wagle, and Ahmedin Jemal. 2023. "Cancer Statistics, 2023." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 73(1):17–48. doi: 10.3322/caac.21763.
- da Silva, Patricia Bento, Rachel Temperani Amaral Machado, Andressa Maria Pironi, Renata Carolina Alves, Patricia Rocha de Araújo, Amanda Cutrim Dragalzew, Ingrid Dalberto, and Marlus Chorilli. 2019. "Recent Advances in the Use of Metallic Nanoparticles with Antitumoral Action - Review." *Current Medicinal Chemistry* 26(12):2108–46. doi: 10.2174/0929867325666180214102918.
- Singh, Hina, Juan Du, and Tae Hoo Yi. 2017. "Green and Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles Using Borago Officinalis Leaf Extract: Anticancer and Antibacterial Activities." *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 45(7):1310–16. doi: 10.1080/21691401.2016.1228663.
- Singh, Jagpreet, Tejinder Singh, and Mohit Rawat. 2017. "Green Synthesis of Silver Nanoparticles via Various Plant Extracts for Anti-Cancer Applications." *Global Journal of Nanomedicine* 2(3):0057–0060. doi: 10.19080/GJN.2017.02.555590.
- Singh, Mansher, and Anirban Maitra. 2007. "Precursor Lesions of Pancreatic Cancer: Molecular Pathology and Clinical Implications." *Pancreatology* 7(1):9–19. doi: 10.1159/000101873.
- Smith, Jessica A., Aatur D. Singhi, and Anirban Maitra. 2012. "Precursors to Invasive Pancreatic Cancer." *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy* 2:19–27. doi: 10.2147/gicct.s21839.
- Springer, Simeon, Yuxuan Wang, Marco Dal Molin, David L. Masica, Yuchen Jiao, Isaac Kinde, Amanda Blackford, Siva P. Raman, Christopher L. Wolfgang, Tyler Tomita, Noushin Niknafs, Christopher Douville, Janine Ptak, Lisa Dobbyn, Peter J. Allen, David S. Klimstra, Mark A. Schattner, C. Max Schmidt, Michele Yip-Schneider, Oscar W. Cummings, Randall E. Brand, Herbert J. Zeh, Aatur D. Singhi, Aldo Scarpa, Roberto Salvia, Giuseppe Malleo, Giuseppe Zamboni, Massimo Falconi, Jin Young Jang, Sun Whe Kim, Wooil Kwon, Seung Mo Hong, Ki Byung Song, Song Cheol Kim, Niall Swan, Jean Murphy, Justin Geoghegan, William Brugge, Carlos Fernandez-Del Castillo, Mari Mino-Kenudson, Richard Schulick, Barish H. Edil, Volkan Adsay, Jorge Paulino, Jeanin van Hooft, Shinichi Yachida, Satoshi Nara, Nobuyoshi Hiraoka, Kenji Yamao, Susuma Hijioka, Schalk van der Merwe, Michael Goggins, Marcia Irene Canto, Nita Ahuja, Kenzo Hirose, Martin Makary, Matthew J. Weiss, John Cameron, Meredith Pittman, James R. Eshleman, Luis A. Diaz, Nickolas Papadopoulos, Kenneth W. Kinzler, Rachel Karchin, Ralph H. Hruban, Bert Vogelstein, and Anne Marie Lennon. 2015. "A Combination of Molecular Markers and Clinical Features Improve the Classification of Pancreatic Cysts." *Gastroenterology* 149(6):1501–10. doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.041.
- Strasser, Peter, Shirlaine Koh, Toyli Anniyev, Jeff Greeley, Karren More, Chengfei Yu, Zengcai Liu, Sarp Kaya, Dennis Nordlund, Hirohito Ogasawara, Michael F. Toney, and Anders Nilsson. 2010. "Lattice-Strain Control of the Activity in Dealloyed Core-Shell Fuel Cell Catalysts." *Nature Chemistry* 2(6):454–60. doi: 10.1038/nchem.623.

- Sulaiman, Ghassan Mohammad, Wasnaa Hatif Mohammed, Thorria Radam Marzoog, Ahmed Abdul Amir Al-Amiery, Abdul Amir H. Kadhum, and Abu Bakar Mohamad. 2013. "Green Synthesis, Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Silver Nanoparticles Using Eucalyptus Chapmaniana Leaves Extract." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3(1):58–63. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60024-6.
- Takeda, Takaaki, Hiroaki Okuyama, Yasuko Nishizawa, Shuhei Tomita, and Masahiro Inoue. 2012. "Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Is Necessary for Invasive Phenotype in Vegf-Deleted Islet Cell Tumors." *Scientific Reports* 2(494):1–7. doi: 10.1038/srep00494.
- Tan, Marcus C., Olca Basturk, A. Rose Brannon, Umesh Bhanot, Sasinya N. Scott, Nancy Bouvier, Jennifer Lafemina, William R. Jarnagin, Michael F. Berger, David Klimstra, and Peter J. Allen. 2015. "GNAS and KRAS Mutations Define Separate Progression Pathways in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm-Associated Carcinoma." *Journal of the American College of Surgeons* 220(5):845–54. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2014.11.029.
- Tan, Zhen, Jin Xu, Bo Zhang, Si Shi, Xianjun Yu, and Chen Liang. 2020. "Hypoxia: A Barricade to Conquer the Pancreatic Cancer." *Cellular and Molecular Life Sciences* 77(16):3077–83. doi: 10.1007/s00018-019-03444-3.
- Tavakoli, Fatemeh, Rana Jahanban-Esfahlan, Khaled Seidi, Masoumeh Jabbari, Ramezan Behzadi, Younes Pilehvar-Soltanahmadi, and Nosratollah Zarghami. 2018. "Effects of Nano-Encapsulated Curcumin-Chrysin on Telomerase, MMPs and TIMPs Gene Expression in Mouse B16F10 Melanoma Tumour Model." *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 46(sup2):75–86. doi: 10.1080/21691401.2018.1452021.
- Tejamaya, Mila, Isabella Römer, Ruth C. Merrifield, and Jamie R. Lead. 2012. "Stability of Citrate, PVP, and PEG Coated Silver Nanoparticles in Ecotoxicology Media." *Environmental Science and Technology* 46(13):7011–17. doi: 10.1021/es2038596.
- Tellier, Céline, Déborah Desmet, Laurene Petit, Laure Finet, Carlos Graux, Martine Raes, Olivier Feron, and Carine Michiels. 2015. "Cycling Hypoxia Induces a Specific Amplified Inflammatory Phenotype in Endothelial Cells and Enhances Tumor-Promoting Inflammation In Vivo." *Neoplasia (United States)* 17(1):66–78. doi: 10.1016/j.neo.2014.11.003.
- Thakkar, Kaushik N., Snehit S. Mhatre, and Rasesh Y. Parikh. 2010. "Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6(2):257–62. doi: 10.1016/j.nano.2009.07.002.
- Thirunavoukkarasu, M., U. Balaji, S. Behera, P. K. Panda, and B. K. Mishra. 2013. "Biosynthesis of Silver Nanoparticle from Leaf Extract of *Desmodium Gangeticum* (L.) DC. and Its Biomedical Potential." *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 116:424–27. doi: 10.1016/j.saa.2013.07.033.

- Thomlinson, R. H., and L. H. Gray. 1955. "The Histological Structure of Some Human Lung Cancers and the Possible Implications for Radiotherapy." *British Journal of Cancer* 9(4):539–49.
- Tolaymat, Thabet M., Amro M. el Badawy, Ash Genaidy, Kirk G. Scheckel, Todd P. Luxton, and Makram Suidan. 2010. "An Evidence-Based Environmental Perspective of Manufactured Silver Nanoparticle in Syntheses and Applications: A Systematic Review and Critical Appraisal of Peer-Reviewed Scientific Papers." *Science of the Total Environment* 408(5):999–1006.
- Torphy, Robert J., Yuki Fujiwara, and Richard D. Schulick. 2020. "Pancreatic Cancer Treatment: Better, but a Long Way to Go." *Surgery Today* 50(10):1117–25. doi: 10.1007/s00595-020-02028-0.
- Tran, Quang Huy, Van Quy Nguyen, and Anh Tuan Le. 2018. "Silver Nanoparticles: Synthesis, Properties, Toxicology, Applications and Perspectives." *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 9(4):1–23. doi: 10.1088/2043-6254/aad12b.
- Tsujimoto, Yoshihide. 1998. "Role of Bcl-2 Family Proteins in Apoptosis: Apoptosomes or Mitochondria?" *Genes to Cells* 3(11):697–707. doi: 10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x.
- van Uden, Patrick, Niall S. Kenneth, and Sonia Rocha. 2008. "Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  by NF-KB." *Biochemical Journal* 412(3):477–84. doi: 10.1042/BJ20080476.
- Umaz, Adil, Adil KOÇ, Mehmet Fırat BARAN, Cumali KESKİN, and Mehmet Nuri ATALAR. 2019. "Hypericum Triquetrifolium Turra Bitkisinden Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Etkinliğinin İncelenmesi." *Journal of the Institute of Science and Technology* 9(3):1467–75. doi: 10.21597/jist.533115.
- Valsangkar, Nakul P., Vicente Morales-Oyarvide, Sarah P. Thayer, Cristina R. Ferrone, Jennifer A. Wargo, Andrew L. Warshaw, and Carlos Fernández-Del Castillo. 2012. "851 Resected Cystic Tumors of the Pancreas: A 33-Year Experience at the Massachusetts General Hospital." *Surgery* 152(3):4–12. doi: 10.1016/j.surg.2012.05.033.
- Vasanth, Shakila Banu, and Gino A. Kurian. 2017. "Toxicity Evaluation of Silver Nanoparticles Synthesized by Chemical and Green Route in Different Experimental Models." *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 45(8):1721–27. doi: 10.1080/21691401.2017.1282500.
- Vaupel, Peter, and Arnulf Mayer. 2007. "Hypoxia in Cancer: Significance and Impact on Clinical Outcome." *Cancer and Metastasis Reviews* 26(2):225–39. doi: 10.1007/s10555-007-9055-1.

- Vilchis-Nestor, Alfredo R., Victor Sánchez-Mendieta, Marco A. Camacho-López, Rosa M. Gómez-Espinosa, Miguel A. Camacho-López, and Jesús A. Arenas-Alatorre. 2008. "Solventless Synthesis and Optical Properties of Au and Ag Nanoparticles Using *Camellia Sinensis* Extract." *Materials Letters* 62(17–18):3103–5. doi: 10.1016/j.matlet.2008.01.138.
- Walmsley, Sarah R., Naomi N. McGovern, Moira K. B. Whyte, and Edwin R. Chilvers. 2008. "The HIF/VHL Pathway: From Oxygen Sensing to Innate Immunity." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 38(3):251–55. doi: 10.1165/rcmb.2007-0331TR.
- Wang, Maonan, Jingzhou Zhao, Lishen Zhang, Fang Wei, Yu Lian, Yingfeng Wu, Zhaojian Gong, Shanshan Zhang, Jianda Zhou, Ke Cao, Xiayu Li, Wei Xiong, Guiyuan Li, Zhaoyang Zeng, and Can Guo. 2017. "Role of Tumor Microenvironment in Tumorigenesis." *Journal of Cancer* 8(5):761–73.
- Wang, Yuliang, and Younan Xia. 2004. "Bottom-up and Top-down Approaches to the Synthesis of Monodispersed Spherical Colloids of Low Melting-Point Metals." *Nano Letters* 4(10):2047–50. doi: 10.1021/nl048689j.
- Wang, Zhen Xing, Chun Yuan Chen, Yang Wang, Fu Xing Zi Li, Jie Huang, Zhong Wei Luo, Shan Shan Rao, Yi Juan Tan, Yi Wei Liu, Hao Yin, Yi Yi Wang, Ze Hui He, Kun Xia, Ben Wu, Xiong Ke Hu, Ming Jie Luo, Hao Ming Liu, Tuan Hui Chen, Chun Gu Hong, Jia Cao, Zheng Zhao Liu, Ze Long, Ping Ping Gan, Wei Yi Situ, Rong Fan, Ling Qing Yuan, and Hui Xie. 2019. "Ångstrom-Scale Silver Particles as a Promising Agent for Low-Toxicity Broad-Spectrum Potent Anticancer Therapy." *Advanced Functional Materials* 29(23). doi: 10.1002/adfm.201808556.
- Wenger, Roland H. 2002. "Cellular Adaptation to Hypoxia: O<sub>2</sub>-Sensing Protein Hydroxylases, Hypoxia-Inducible Transcription Factors, and O<sub>2</sub>-Regulated Gene Expression." *The FASEB Journal* 16(10):1151–62.
- Wiebe, Lauren A. 2012. "A Myriad of Symptoms: New Approaches To Optimizing Palliative Care of Patients With Advanced Pancreatic Cancer." *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 32(1):243–48.
- Wu, C. Y., X. Z. Guo, and H. Y. Li. 2015. "Hypoxia and Serum Deprivation Protected MiaPaCa-2 Cells from KAI1-Induced Proliferation Inhibition through Autophagy Pathway Activation in Solid Tumors." *Clinical and Translational Oncology* 17(3):201–8. doi: 10.1007/s12094-014-1211-9.
- Xu, Li, Yi Yi Wang, Jie Huang, Chun Yuan Chen, Zhen Xing Wang, and Hui Xie. 2020a. "Silver Nanoparticles: Synthesis, Medical Applications and Biosafety." *Theranostics* 10(20):8996–9031. doi: 10.7150/thno.45413.
- Xu, Li, Yi Yi Wang, Jie Huang, Chun Yuan Chen, Zhen Xing Wang, and Hui Xie. 2020b. "Silver Nanoparticles: Synthesis, Medical Applications and Biosafety." *Theranostics* 10(20):8996–9031.

- Xu, Wei, Xiaochong Zhou, Minyue Yin, Jingwen Gao, Zhen Weng, and Chunfang Xu. 2022. "The Relationship between Helicobacter Pylori and Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis." *Translational Cancer Research* 11(8):2810–22. doi: 10.21037/tcr-21-2803.
- Yadav, Alka, Kateryna Kon, Gabriela Kratosova, Nelson Duran, Avinash P. Ingle, and Mahendra Rai. 2015. "Fungi as an Efficient Mycosystem for the Synthesis of Metal Nanoparticles: Progress and Key Aspects of Research." *Biotechnology Letters* 37(11):2099–2120.
- Yadav, Dhiraj, and Albert B. Lowenfels. 2013. "The Epidemiology of Pancreatitis and Pancreatic Cancer." *Gastroenterology* 144(6):1252–61. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.068.
- Yamaue H (Ed). 2017. *Innovation of Diagnosis and Treatment for Pancreatic Cancer*. Springer Singapore.
- Yang, Tieshan, Qian Yao, Fei Cao, Qianqian Liu, Binlei Liu, and Xiu Hong Wang. 2016. "Silver Nanoparticles Inhibit the Function of Hypoxia-Inducible Factor-1 and Target Genes: Insight into the Cytotoxicity and Antiangiogenesis." *International Journal of Nanomedicine* 11:6679–92. doi: 10.2147/IJN.S109695.
- Yeasmin, Sabina, Hemanta Kumar Datta, Sujata Chaudhuri, Debasish Malik, and Abhijit Bandyopadhyay. 2017. "In-Vitro Anti-Cancer Activity of Shape Controlled Silver Nanoparticles (AgNPs) in Various Organ Specific Cell Lines." *Journal of Molecular Liquids* 242:757–66. doi: 10.1016/j.molliq.2017.06.047.
- Yokode, Masataka, Masayuki Akita, Kohei Fujikura, Mi Ju Kim, Yukiko Morinaga, Seiichi Yoshikawa, Takuro Terada, Hiroshi Matsukiyo, Takuma Tajiri, Shiho Abe-Suzuki, Tomoo Itoh, Seung Mo Hong, and Yoh Zen. 2018. "High-Grade PanIN Presenting with Localised Stricture of the Main Pancreatic Duct: A Clinicopathological and Molecular Study of 10 Cases Suggests a Clue for the Early Detection of Pancreatic Cancer." *Histopathology* 73(2):247–58. doi: 10.1111/his.13629.
- Yu, Tianchi, Bo Tang, and Xueying Sun. 2017. "Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy." *Yonsei Medical Journal* 58(3):489–96. doi: 10.3349/ymj.2017.58.3.489.
- Yuan, Yu Guo, Qiu Ling Peng, and Sangiliyandi Ggurunathan. 2017. "Silver Nanoparticles Enhance the Apoptotic Potential of Gemcitabine in Human Ovarian Cancer Cells: Combination Therapy for Effective Cancer Treatment." *International Journal of Nanomedicine* 12:6487–6502. doi: 10.2147/IJN.S135482.
- Zhang, Dan, Xin Lei Ma, Yan Gu, He Huang, and Guang Wei Zhang. 2020. "Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Potential Applications to Treat Cancer." *Frontiers in Chemistry* 8.

- Zhang, Xi Feng, Wei Shen, and Sangiliyandi Gurunathan. 2016. "Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines: An in Vitro Model." *International Journal of Molecular Sciences* 17(10):2–26. doi: 10.3390/ijms17101603.
- Zhao, Zhi Yu, and Wei Liu. 2020. "Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment." *Technology in Cancer Research and Treatment* 19:1–13. doi: 10.1177/1533033820962117.
- Zhou, Jie, Tobias Schmid, Steffen Schnitzer, and Bernhard Brüne. 2006. "Tumor Hypoxia and Cancer Progression." *Cancer Letters* 237(1):10–21. doi: 10.1016/j.canlet.2005.05.028.
- Zhou, Qiao, and Douglas A. Melton. 2018. "Pancreas Regeneration." *Nature* 557(7705):351–58. doi: 10.1038/s41586-018-0088-0.
- Zhu, Huiyun, Tuo Li, Yiqi Du, and Min Li. 2018. "Pancreatic Cancer: Challenges and Opportunities." *BMC Medicine* 16(1).
- Zielinska, Ewelina, Agata Zauszkiewicz-Pawlak, Michal Wojcik, and Iwona Inkielewicz-Stepniak. 2017. "Silver Nanoparticles of Different Sizes Induce a Mixed Type of Programmed Cell Death in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Oncotarget* 9(4):4675–97.