



**Prostat ve Meme Kanseri Teşhis ve Tedavisi İçin Hedefli
Plazmonik Nanokabuk ve Nanoçubukların Geliştirilmesi
Program Kodu: 1003**

Proje No: 213M673

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Esmâ Volga BULMUŞ ZAREİE

Alt Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM

AĞUSTOS 2018
ANKARA



ÖNSÖZ

Bu projenin amacı, sağlıklı dokulara zarar vermeden seçici olarak meme ve prostat kanseri tümörlerini hedef alıp bu hücreleri yok eden, aynı zamanda tümörün görüntülenmesine de olanak tanıyan nanoteknoloji ürünü teranostik bir sistem geliştirmek ve bu sistemin teşhis ve tedavi etkinliğini *in vitro* ve *in vivo* deneyler ile ispatlamaktır.

Bu amaca yönelik olarak, poli(etilen glikol) (PEG) ile kaplı altın nanoçubuklar ve birden fazla nanoçubuk içeren biyouyumlu lipid esaslı nanokabuklar sentezlenmiştir. Üretilen nanotaneciklerin yüzeylerine, meme ve prostat kanser hücrelerinin membranlarında yüksek miktarlarda bulunduğu son yıllarda belirlenen reseptörleri hedefleyen seçici antikorlar konjuge edilmiştir. Üretilen hedefli nanotaneciklerin tedavi etkinlikleri öncelikle *in vitro* daha sonra prostat ve meme kanser fare modellerinde *in vivo* deneyler ile belirlenmiştir. Nanotaneciklerin görüntüleme işlevselliği, SERS ve NIR termal görüntüleme teknikleri ile ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

Birden fazla özgün bileşen içeren bu proje, özellikle prostat ve potansiyel olarak meme tümörlerini seçici bir şekilde görüntülemeyi ve yok etmeyi sağlayacak yeni bir nanosistemin geliştirilmesi yönünde güçlü bir temel sağlamıştır.

Bu proje, TÜBİTAK'ın destekleri ile gerçekleştirilmiştir.



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	7
3.1 Kullanılan Kimyasallar	7
3.2 Kullanılan Enstrümental Karakterizasyon Metodları	7
3.2.1 UV-Vis Spektroskopisi.....	8
3.2.2 Raman Spektroskopisi	8
3.2.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	8
3.2.4 Atomik Kuvvet Mikroskobu.....	8
3.2.5 Zeta Potansiyeli Ölçümleri	9
3.2.6 İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektroskopisi (ICP-MS).....	9
3.2.7 X-Işınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS).....	9
3.3 Altın Nanoparçacıkların Sentezi ve Yüzey Modifikasyonlar ve Karakterizasyonları	9
3.3.1 Altın Nanoçubukların Sentezi	9
3.3.2 Altın Nanoçubukların PEG ile Modifikasyonu	10
3.3.3 Altın Nanoçubuklara Anti-KDN Antikorumun Bağlanması	10
3.3.4 Altın Nanoçubukların Raman Kromoforu ile Modifikasyonu.....	11
3.3.5 Altın Nanoçubuklar İçeren Lipid Nanokabukların Sentezi.....	11
3.3.5.1 POPC Esaslı Altın Nanokabukların Sentezi	12
3.3.5.2 DDAB Esaslı Altın Nanokabukların Sentezi.....	13
3.3.5.3 DDAB, DPPC ve DSPE-PEG Karışımı Esaslı Altın Nanokabukların Sentezi.	15
3.3.5.4 DPPC/DSPE-PEG Karışımı Esaslı Altın Nanokabukların Sentezi	15
3.3.6 Altın Nanoçubuklar İçeren Lipid Nanokabuklara Anti-KDN Antikorumun Bağlanması.....	16
3.4 Altın Nanoparçacıkların In Vitro Değerlendirilmesi	16
3.4.1 Hücre Kültürü.....	16
3.4.2 MTT Hücre Canlılık Testi	17
3.4.3 Muse Hücre Analiz Cihazı ile Hücre Sayısı ve Canlılığının Belirlenmesi	17
3.4.4 Anneksin-V ile Apoptoz Analizi	18
3.4.5 Muse Hücre Analiz Cihazı ile Hücre Döngüsü Analizleri	18
3.4.6 Hücre Alımının ICP-MS ile Belirlenmesi	19
3.4.7 Hücre Alımının Akış Sitometresi ile Belirlenmesi	19
3.4.8 Fototermal Etkinin Belirlenmesi.....	20
3.5 Altın Nanoparçacıkların In Vivo Değerlendirilmesi	21
3.5.1 Sağlıklı Farelerde Biyodağılım	21
3.5.2 Tümörlü Farelerde Biyodağılım	22
3.5.3 Tümörlü Farelerde Fototermal Etkinin Belirlenmesi.....	22
3.5.4 Tümörlü Fare Dokularında Histopatolojik İncelemeler	24
3.5.4.1 Doku Takibi.....	24
3.5.4.2 Hematoksilen & Eozin Boyama.....	24
3.5.5 Tümörlü Farelerde RAMAN Spektroskopisi ile Görüntüleme.....	24

3.6 İstatistiksel Analizler.....	25
4. BULGULAR.....	26
4.1 Nanoçubuklar İle Elde Edilen Bulgular	26
4.1.1 Nanoçubukların Sentezi, PEG ile Modifikasyonu ve Karakterizasyonu	26
4.1.2 PEG'lenmiş Nanoçubuklara Antikor Bağlanması ve Karakterizasyonu	35
4.1.3 PEG'lenmiş Nanoçubuklara Raman Kromoforu Bağlanması ve Karakterizasyonu.....	41
4.1.4 Nanoçubukların In Vitro Değerlendirmeleri.....	43
4.1.4.1 Hücre Canlılığı, Apoptoz ve Hücre Döngüsü Analizleri.....	43
4.1.4.2 Hücre Alımı	50
4.1.4.3 Fototermal Etki.....	55
4.1.5 Nanoçubukların In Vivo Değerlendirmeleri	59
4.1.5.1 Sağlıklı Farelerde Biyodağılım ve Doz Denemeleri	59
4.1.5.2 Tümörlü Farelerde Biyodağılım	62
4.1.5.3 Tümörlü Farelerde Fototermal Terapi.....	68
4.1.5.4 Histolojik İncelemeler	71
4.1.5.5 In Vivo Görüntüleme	80
4.2 Nanokabuklar ile Elde Edilen Bulgular	83
4.2.1 Nanokabukların Sentezi ve Karakterizasyonu	83
4.2.2 Nanokabuklara Antikor Konjugasyonu ve Karakterizasyonu	91
4.2.3 Nanokabukların In Vitro Değerlendirmeleri	93
4.2.3.1 Hücre Canlılığı	93
4.2.3.2 Hücre Alımı	95
4.2.3.3 Fototermal Etki.....	97
4.2.4 Nanokabukların In Vivo Değerlendirmeleri	100
4.2.4.1 Sağlıklı Farelerde Biyodağılım	100
4.2.4.2 Tümörlü Farelerde Biyodağılım	100
4.2.4.3 Tümörlü Farelerde Fototermal Terapi.....	103
4.2.4.4 In Vivo Görüntüleme	105
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	106
5.1 Nanoçubuklar Üzerine Tartışma ve Sonuç.....	106
5.2 Nanokabuklar Üzerine Tartışma ve Sonuç.....	116
5.3 Öneriler.....	121
KAYNAKLAR.....	123

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa Numarası</u>
Şekil 3.1. In vivo fototermal etki için lazer uygulama deney düzeneği	23
Şekil 3.2. RAMAN Spektroskopisi ile görüntüleme deney düzeneği	25
Şekil 4.1. Farklı boy:en oranlarındaki (B:O) altın nanoçubukların LSPR/UV-vis spektrumları.	26
Şekil 4.2. Farklı boy:en oranlarında hazırlanmış altın nanoçubukların merceği SEM görüntüleri. Boy:en oranı= 2.66 (A), 4.33 (B) ve 7.0 (C)	27
Şekil 4.3. Boy:en oranı= 2.82 olan nanoçubukların PEG'lenme öncesi (mavi) ve sonrası (kırmızı) alınmış LSPR spektrumları	28
Şekil 4.4. Boy:en oranı= 3.52 olan nanoçubukların PEG'lenme öncesi (mavi) ve sonrası (kırmızı) alınmış LSPR spektrumları.....	28
Şekil 4.5. Boy:en oranı= 7 olan nanoçubukların PEG'lenme öncesi (mavi) ve sonrası (kırmızı) alınmış LSPR spektrumları.....	29
Şekil 4.6. Altın nanoçubukların (R2, boy: en 4.33) değişen mPEG-SH:amin-PEG-SH oranlarında PEG karışımı ile fonksiyonelleştirme işleminden önce ve sonra alınmış LSPR spektrumları.....	31
Şekil 4.7. Altın nanoçubukların PEG karışımı ile yüzey modifikasyonu öncesi (üst) ve sonrası (alt) Raman spektrumları.....	32
Şekil 4.8. CTAB stabilize (siyah pik) ve PEG karışımı ile modifiye edilmiş (kırmızı pik) altın nanoçubukların 0-400 cm ⁻¹ dalga boyu aralığında Raman spektrumları	33
Şekil 4.9. (A-B) Altın nanoçubukların fonksiyonelleştirilmeden önce ve (C-D) PEG karışımı ile fonksiyonelleştirilmesinden sonra farklı büyütme ölçeklerindeki merceği SEM görüntüleri...34	
Şekil 4.10. (A ve B) Altın nanoçubukların ve (C ve D) PEG'lenmiş altın nanoçubukların düşük ve yüksek çözünürlüklü topografik AFM görüntüleri	35
Şekil 4.11. PR2'nin monoklonal antikor ile konjugasyon işlemi öncesi (mavi) ve sonrası (kırmızı) ölçülen LSPR spektrumları	36
Şekil 4.12. Altın nanoçubukların (PR2) monoklonal antikor ile konjugasyonu sonrası N1s XPS spektrumları.	38

Şekil 4.13. Altın nanoçubukların, PEG'lenme sonrası (PR2) ve antikor konjugasyonu sonrası (Ab-PR2) tıklamalı modda alınmış AFM görüntüleri.....	39
Şekil 4.14. Antikor bağlı altın nanoçubukların, değişen konsantrasyonlarda KDN çözeltisi ile etkileştirilmesi sonrası ölçülen LSPR spektrumları.....	40
Şekil 4.15. CTAB kaplı altın nanoçubukların (R2) (mor), Raman kromoforu bağlanmış altın nanoçubukların (yeşil), kromofor ve PEG bağlanmış altın nanoçubukların (kırmızı) LSPR spektrumları..	41
Şekil 4.16. Altın nanoçubukların (R2; siyah) DTTC (R2-kromofor; kırmızı) ve PEG (PR2-kromofor; mavi) konjugasyonları sonrası Raman spektrumları .	43
Şekil 4.17. MCF 10A meme epitel hücrelerinin farklı dozlarda nanoçubuklar (R1, R2, PR1 ve PR2) ile 24 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılığı sonuçları (n=3).....	44
Şekil 4.18. RWPE-1 hücrelerin farklı dozlarda PR1, PR2 ve PR3 nanoçubuklar ile 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra canlılık sonuçları (n=3)	45
Şekil 4.19. Meme ve prostat kanseri hücre hatlarında 100 µM konsantrasyonda PR2, PR3, Ab-PR2 ve Ab-PR3 uygulandıktan 24 saat sonra canlılık değerleri. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05)	47
Şekil 4.20. Annexin V ile apoptoz sonuçları (n=2).....	48
Şekil 4.21. Hücre döngüsü deneyleri sonuçları Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).....	49
Şekil 4.22. DU145 prostat ve MCF7 meme kanser hücreleri tarafından farklı boy:en oranına sahip PEG'lenmiş nanoçubukların zamana bağlı alımları. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05)...	50
Şekil 4.23. A) DU 145 prostat kanser hücreleri tarafından mAb konjuge edilmiş (Ab-PR2) ve edilmemiş (PR2) nanoçubukların 1 ve 6 saatte alımı. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05)..	51
Şekil 4.24. Kanser ve epitel hücreler tarafından antikor konjuge edilmiş ve edilmemiş nanoçubukların alımı. Deneylerde PR2 ve Ab-PR2 (20 µM) kullanılmıştır. İnkübasyon süresi= 6 saat. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).....	53

Şekil 4.25. Kanser ve epitel hücrelerin Alexa Fluor işaretli antikor konjuge edilmiş nanoçubuklar (Ab-PR2) ile inkübasyonu sonrası alınmış akış sitometre ölçümleri (n=3).....	54
Şekil 4.26. 1 DU 145 prostat kanser hücrelerinin farklı boy:en oranlarında nanoçubuklar ile inkübasyonu sonrası 30 dk 780 nm lazer (100 mW) uygulanan kuyucuklardan elde edilen hücre canlılık oranları (n=2).....	55
Şekil 4.27. PR2 ve PR3 ile inkübe edilmiş MCF7 meme ve DU 145 prostat kanser hücrelerinin lazer uygulaması sonrası hücre canlılığı. PR2 için lazer 1= 780 nm (100 mW); PR3 için lazer 2=940 nm (100 mW) kullanılmıştır. Işıma süresi 30 dakika. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).....	56
Şekil 4.28. Lazere (780 nm, 100 mW) maruz bırakılan (A) PR2 ve (B) PR3 çözeltilerinin zamana bağlı sıcaklık değişimleri (n=3).....	57
Şekil 4.29. Lazere (808 nm, 200 mW) maruz bırakılan (A) PR2 ve (B) PR3 çözeltilerinin zamana bağlı sıcaklık değişimleri. (C) Lazere (808 nm, 500mW) maruz bırakılan PR2 çözeltisinin zamana bağlı sıcaklık değişimi (n=3)	58
Şekil 4.30. 300 μ M PR2 ile inkübe edilmiş MCF7 meme kanser hücrelerinin 15 dk lazer (808 nm, 200 mW) uygulaması sonrası hücre canlılık yüzdeleri. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).....	59
Şekil 4.31. PR2'nin (1.2 mM) sağlıklı dişi farede farklı zamanlarda biyodağılımı (μ g altın/g organ) (n=2)	60
Şekil 4.32. PR3'nin (1.2 Mm) sağlıklı dişi farelerde farklı zamanlarda biyodağılımı (μ g altın/g organ) (n=2).	60
Şekil 4.33. PR2'nin (2.8 Mm) sağlıklı dişi farede farklı zamanlarda biyodağılımı (μ g altın/g organ) (n=2).....	61
Şekil 4.34. PR3'nin (2.8 Mm) sağlıklı dişi farede farklı zamanlarda biyodağılımı (μ g altın/g organ) (n=2).....	62
Şekil 4.35. Prostat tümörlü farelerin, serbest antikor (Ab) i.v. enjeksiyonu 3, 6, ve 24 saat sonrası IVIS mikroskop ile alınmış floresans görüntüleri. Antikor, Alexa Flor-647 ile işaretlenmiştir.....	63
Şekil 4.36. Prostat tümörlü farelerin, sadece PBS i.v. enjeksiyonu 3, 6, ve 24 saat sonrası IVIS mikroskop ile alınmış floresans görüntüleri.....	64

- Şekil 4.37. Prostat tümörlü farelerin, PR2 ve Ab-PR2 i.v. enjeksiyonu 3., 6. ve 24. saat sonrası IVIS mikroskop ile alınmış floresans görüntüleri. PR2 ve Ab-PR2, Alexa Flor-647 ile işaretlenmiştir..... 65
- Şekil 4.38. PR2 ve Ab-PR2'nin (3.8 Mm) prostat tümörlü fare modellerinde, ICP-MS ile belirlenmiş 24 saat sonundaki biyodağılımı (μg altın/g organ) (n=2). 66
- Şekil 4.39. Meme tümörlü farelerin, serbest antikorun (Ab) i.v. enjeksiyonu 0, 8 ve 24 saat sonrası IVIS mikroskobu ile alınmış floresans görüntüleri. Antikor, Alexa Flor-647 ile işaretlenmiştir..... 67
- Şekil 4.40. Meme tümörlü farelerin, PBS kontroller (-Lazer, n=2; +Lazer, n=2), ve nanoçubuk örnekleri PR2 (n=3) ve Ab-PR2 (n=3) i.v. enjeksiyonu 24 saat sonrası IVIS mikroskop ile alınmış biyolimünenans ve floresans görüntüleri. PR2 ve Ab-PR2 Alexa Flor-647 ile işaretlenmiştir..... 67
- Şekil 4.41. Meme tümörlü farelerin, PBS kontroller (-Lazer, n=2; +Lazer, n=2), ve nanoçubuk örnekleri PR2 (n=3) ve Ab-PR2 (n=3) i.v. enjeksiyonu 24 saat sonrası ICP-MS ile belirlenmiş biyodağılım sonuçları. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).....68
- Şekil 4.42. Prostat tümörlü farelerde tümör oluşumundan fototermal deney sonucuna kadar ağırlıklarındaki değişim. Oklar Ab-PR2 ve PBS (kontrol) enjeksiyonlarının yapıldığı günleri göstermektedir..... 69
- Şekil 4.43. Prostat tümörlü farelerde fototermal terapi ile tümör hacminin değişimi. (Ab-PR2 n=2; PBS Kontrol+Lazer n=2; PBS Kontrol-Lazer, n=1) 69
- Şekil 4.44. Meme tümörlü farelerde tümör oluşumundan fototermal deney sonucuna kadar ağırlıklarındaki değişimi göstermektedir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (PR2, Ab-PR2 ve Ab için n = 3; PBS-Lazer ve PBS+Lazer için n=2; * p <0.05)..... 70
- Şekil 4.45. Meme tümörlü farelerde tümör oluşumundan fototermal deney sonucuna kadar tümör hacmindeki değişim. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (PR2, Ab-PR2 ve Ab için n = 3; PBS-Lazer ve PBS+Lazer için n=2; * p <0.05) 71
- Şekil 4.46. Meme tümör dokularına ait histolojik görünümü. Oklar mitotik figürler ve (N) nekrotik alanlara ait imajları göstermektedir (H&E boyama, Scale bar: 50 μm ; iç kısım kare 20 μm).....72

Şekil 4.47. Karaciğer dokularına ait histolojik görünümü. (V) Vena centralis (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).....	73
Şekil 4.48. Akciğer dokularına ait histolojik görünümü (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).....	74
Şekil 4.49. Dalak dokularına ait histolojik görünümü (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).....	75
Şekil 4.50. Böbrek dokularına ait histolojik görünümü (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).....	76
Şekil 4.51. Cerebrum dokularına ait histolojik görünümü (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).....	77
Şekil 4.52. Cerebellum dokularına ait histolojik görünümü (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).....	78
Şekil 4.53. Tümör dokularına ait anti-KDN immunreaktivitesi (IHC boyama, Scale bar 50 µm; 20 µm).....	80
Şekil 4.54. Prostat tümörlü farelerde 10 dk süresince 808 nm, 500 mW lazer uygulamasından sonra tümör bölgesinin termal kamera görüntüleri.....	80
Şekil 4.55. İ.V. enjeksiyon ile Ab-PR2 (n=2) ve PBS (n=2) uygulanmış meme tümörlü farelerden toplanmış karaciğer ve böbrek dokularının Raman spektrometresi ile görüntülenmesi.....	82
Şekil 4.56. Doğrudan tümöre enjeksiyon ile Ab-PR2 (n=1) ve PBS (n=1) uygulanmış meme tümörlü farelerden toplanmış tümör dokularının Raman spektrometresi ile görüntülenmesi.	83
Şekil 4.57. CTAB ile stabilize edilmiş altın nanoçubuklar (mavi pik) ve POPC esaslı altın nanokabukların (kırmızı pik) UV-Vis spektrumları.....	84
Şekil 4.58. POPC esaslı nanokabukların Raman spektrumu.....	84
Şekil 4.59. POPC esaslı altın nanokabukların düşük (A) ve yüksek çözünürlüklü (B) AFM görüntüleri.....	85
Şekil 4.60. POPC esaslı nanokabukların farklı büyütmelerdeki mercek içi SEM görüntüleri..	85
Şekil 4.61. DDAB kaplı altın nanopartiküllerin LSPR/UV-vis spektrumları ve farklı büyütmelerdeki mercek içi SEM görüntüleri. A ve C, Deney No 4.4 ile hazırlanmış nanopartiküller; B ve D Deney No 3.4 ile hazırlanmış nanoçubuklar.....	86

Şekil 4.62. DDAB kaplı altın nanoçubukların (üst) ve sadece DDAB'in (alt) Raman spektrumları.....	87
Şekil 4.63. (A) DDAB kaplı nanokabukların UV-Vis spektrumu (B) CTAB kaplı nanokabukların UV-Vis spektrumu.....	88
Şekil 4.64. DDAB kaplı nanokabukların SEM görüntüleri.....	88
Şekil 4.65. DDAB/DSPE-PEG/DSPC karışımı esaslı nanokabukların (A) büyük alan ve (B) yüksek büyütme SEM görüntüleri.....	89
Şekil 4.66. İçinde PEG'lenmiş nanoçubuk içeren DPPC/DSPE-PEG kaplı nanokabukların LSPR spektrumu. Nanoçubukların PEG'lenme öncesi (mavi), sonrası (yeşil), lipid kabuklama sonrası (kırmızı) alınmış LSPR/UV-Vis spektrumları.....	90
Şekil 4.67. DPPC/DSPE-PEG kaplı nanokabukların farklı büyütmelerdeki mercek içi SEM görüntüleri.....	90
Şekil 4.68. DPPC/DSPE-PEG kaplı nanokabukların AFM görüntüleri.....	91
Şekil 4.69. Altın nanokabukların antikor konjugasyonu (A) öncesi ve (B) sonrası N1s XPS analizi.....	92
Şekil 4.70. Altın nanoçubukların, antikor konjugasyonu öncesi (LR) ve sonrası (Ab-LR) tıklamalı modda alınmış AFM görüntüleri.....	93
Şekil 4.71. DDAB/DSPE-PEG/DSPC esaslı nanokabukların hücre canlılığına etkileri (n=3)...	94
Şekil 4.72. DPPC/DSPE-PEG nanokabukların (LR) hücre canlılığına etkileri (24 saat). Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).....	94
Şekil 4.73. Antikor konjuge edilmiş DPPC/DSPE-PEG nanokabukların (Ab-LR) hücre canlılığına etkileri (24 saat): A) MCF 10A; B) MCF 7; C) RWPE-1; D) DU-145. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).....	95
Şekil 4.74. Kanser ve normal epitel hücrelerin Alexa Fluor işaretli antikor konjuge edilmiş nanokabuklar (Ab-LR) ile inkübasyonu sonrası alınmış akış sitometre ölçümleri (n=3).....	96
Şekil 4.75. Lazere (808 nm, 200 mW (üst), 500 mW (alt)) maruz bırakılan farklı konsantrasyonlardaki DPPC/DSPE-PEG nanokabuk çözeltilerinin zamana bağlı sıcaklık değişimleri (=3).....	97

- Şekil 4.76. DPPC/DSPE-PEG nanokabuk (600 μ M) ile inkübe edilmiş MCF7 meme kanser hücrelerinin 15 dk lazer (808 nm, 500 mW) uygulaması sonrası hücre canlılık yüzdeleri. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).....98
- Şekil 4.77. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin, iki farklı dozda nanokabuklar ile inkübasyonu sonrası yıkama işlemi yapmadan uygulanan lazer (808 nm) sonrası hücre canlılıkları. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).....99
- Şekil 4.78. DU-145 meme kanseri hücrelerinin, iki farklı dozda nanokabuklar ile inkübasyonu sonrası yıkama işlemi yapmadan uygulanan lazer (808 nm) sonrası hücre canlılıkları. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).....99
- Şekil 4.79. Nanokabukların (LR) (2,8 mM) sağlıklı dişi farede farklı zamanlarda biyodağılımı (μ g altın/g organ) (n=2)..... 100
- Şekil 4.80. Sadece PBS'in prostat tümörlü erkek farelere i.v. enjeksiyonu 0. saat (yaklaşık ilk 15 dk içinde), 3., 6. ve 24. saat sonrası alınmış IVIS mikroskop sonuçları (n=2).....101
- Şekil 4.81. Antikor konjuge nanokabuk (Ab-LR)'ların prostat tümörlü erkek farelere i.v. enjeksiyonu sonrası 0. saat (yaklaşık ilk 15 dk içinde), 3., 6. ve 24. saat sonrası alınmış IVIS mikroskop sonuçları (n=2). LR, Alexa Flor-647 ile işaretli antikorlar konjuge edilerek deney öncesinde işaretlenmiştir 102
- Şekil 4.82. Antikor bağlı nanokabuk (Ab-LR) ve antikor taşımayan nanokabuk (LR) örneklerinin prostat tümörlü erkek farelere i.v. enjeksiyonu 24. saat sonrası belirli dokular için alınan ICP-MS sonuçları (n=2).....103
- Şekil 4.83. Prostat tümörlü farelerin tümör oluşumundan fototermal deney sonucuna kadar ağırlıklarındaki değişim (n=2). Oklar Ab-LR ve PBS (kontrol) enjeksiyonlarının yapıldığı günleri göstermektedir..... 104
- Şekil 4.84. Prostat tümörlü farelerde Ab-LR kullanılarak gerçekleştirilen fototermal terapi ile tümör hacminin değişimi (n=2).....104
- Şekil 4.85. Ab-LR, LR ve PBS uygulanmış prostat tümörlü farelerde 10 dk süresince 808 nm, 500 mW lazer uygulamasından sonra tümör bölgesinin termal kamera görüntüleri (n=2).....105



TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa Numarası</u>
Tablo 3.1. Projede nanokabuk hazırlamada kullanılan lipid karışımları	12
Tablo 3.2. DDAB esaslı nanokabukların hazırlanmasında test edilen çekirdek ve büyütme çözeltilerinde kullanılan lipid konsantrasyonları	14
Tablo 4.1. CTAB kaplı altın nanoçubukların PEG'lenme öncesi XPS analizi sonuçları	29
Tablo 4.2. CTAB kaplı altın nanoçubukların PEG'lenme sonrası XPS analizi sonuçları	30
Tablo 4.3. Altın nanoçubukların (R2, boy:en 4.33) değişen mPEG-SH:amin-PEG-SH oranlarında PEG karışımı ile fonksiyonelleştirme işleminden önce ve sonra zeta potansiyel ve hidrodinamik boyut değerleri (n=3).....	31
Tablo 4.4. Altın nanoçubukların (boy:en= 4.3), PEG'lenme ve antikor bağlanması sonrası zeta potansiyeli (mV) değerleri (n=3)	37
Tablo 4.5. Altın nanoçubukların (boy:en= 4.3), PEG'lenme ve antikor bağlanması sonrası dinamik ışık saçılımı ile ölçülen hidrodinamik çapları (n=3).....	37
Tablo 4.6. Antikor bağlanması sonrası altın nanoçubukların (PR2) XPS analizi sonuçları.....	38
Tablo 4.7. Monoklonal antikor konjuge nanoçubukların değişen konsantrasyonlarda KDN ile etkileşimi sonrası zeta potansiyel değerleri (n=3)	40
Tablo 4.8. In vitro çalışmalarda kullanılan örnek kodları	44
Tablo 4.9. Meme ve prostat kanseri hücre hatlarında PR2 ve PR3 (100 µM) uygulandıktan 24 saat sonra %canlılık değerleri	46
Tablo 4.10. DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabukların Ab konjugasyonu öncesi (LR) ve sonrası (Ab-LR) XPS analiz sonuçları	91
Tablo 4.11. DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabukların Ab konjugasyonu öncesi (LR) ve sonrası (Ab-LR) XPS analiz sonuçlarından hesaplanmış element oranları	92
Tablo 4.12. DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabukların Ab konjugasyonu öncesi (LR) ve sonrası (Ab-LR) DLS/Zeta potansiyel ölçüm sonuçları (n=3).....	93

ÖZET

Gerçekleştirilen projenin amacı, seçici olarak meme ve prostat kanseri tümörlerini hedef alıp bu hücreleri yok eden, aynı zamanda tümörün görüntülenmesine de olanak tanıyan nanoteknoloji ürünü teranostik bir sistem geliştirmek ve bu sistemin teşhis ve tedavi etkinliğini in vitro ve in vivo deneyler ile ispatlamaktır. Bu amaca yönelik olarak, biyouyumlu ve seçici antikolar ile modifiye edilmiş altın nanoçubuk ve nanokabukların üretilmesi, bu nanotanecikler kullanılarak farelerdeki tümörlerin görüntülenmesi ve fototermal lazer terapi ile etkin bir şekilde yok edilmesi hedeflenmiştir.

Altın nanotanecikler, eşsiz biyouyumluluk, optik ve elektronik özellikleri sayesinde teranostik sistemler olarak kullanılmaktadır. Yüzeyleri uygun ligandlar ile modifiye edilmiş altın nanotanecikler kanserli hücreleri seçici olarak hedefleyebilmekte ve plazmonik özellikleri sayesinde zararlı olmayan yakın kızılötesi (near-infrared) (NIR) lazer ışınması altında fototermal etki ile kanser hücrelerini yok edebilmektedirler. Altın nanotanecikler, aynı zamanda “yüzey arttırılmış Raman spektroskopisi” (SERS) ve “NIR termal görüntüleme” teknikleri için mükemmel ajanlardır. Altın nanoçubuklar ve nanokabuklar, nanoküre geometrisine kıyasla, daha üstün plazmonik özellik gösterir.

Gerçekleştirilen projede, poli(etilen glikol) (PEG) ile kaplı altın nanoçubuklar ve birden fazla nanoçubuk içeren lipid esaslı nanokabuklar sentezlenmiştir. Üretilen nanotaneciklerin yüzeylerine, meme ve prostat kanser hücrelerinin membranlarında yüksek miktarlarda bulunduğu son yıllarda belirlenen ve sialik asit ailesinin farklı bir türü olan KDN (2-keto-3-deoxy- D-glycero-D-galacto-nononic acid) reseptörünü hedefleyen seçici antikolar (anti-KDN antikoları) konjuge edilmiştir. Üretilen hedefli nanotaneciklerin fototermal tedavi etkinlikleri öncelikle in vitro, daha sonra prostat ve meme kanser fare modellerinde in vivo deneyler ile belirlenmiştir. Nanotaneciklerin in vivo görüntüleme potansiyeli, SERS ve NIR termal görüntüleme teknikleri ile ortaya çıkarılmıştır.

Anti-KDN antikoları ile hedeflenmiş nanotaneciklerin üretimi ve etkinliklerinin belirlenmesi, bildiğimiz kadarıyla literatürde henüz rapor edilmemiş olup gerçekleştirilen proje tamamen özgün değere sahiptir. Ayrıca, proje kapsamında literatür için yeni, birden fazla nanoçubuk taşıyan lipid nanokabuk yapılar üretilmiş ve ik defa bu yapıların fototermal etkisine yönelik bulgular elde edilmiştir. Proje çalışmaları, özellikle prostat tümörlerini ve potansiyel olarak meme tümörlerini seçici bir şekilde görüntülemeyi ve yoketmeyi sağlayacak yeni bir nanosistemin geliştirilmesi yönünde güçlü bir temel sağlamıştır.



ABSTRACT

The aim of the project is to develop a theranostic system which selectively targets, destroys, and simultaneously images breast and prostate tumors, and to prove the theranostic efficacy via *in vitro* and *in vivo* experiments. For this aim, it was intended to produce biocompatible and specific antibody-modified gold nanorods and nanoshells, and image and destroy tumors in mice via photothermal effect using these nanoparticles.

Gold nanoparticles have been used as theranostics because of their unique biocompatibility, optic and electronic properties. The gold nanoparticles having surfaces modified with proper ligands can selectively target cancer cells and destroy them under near-infrared (NIR) irradiation via photothermal effect. Gold nanoparticles are also excellent agents for surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) and NIR thermal imaging techniques. Gold nanorods and nanoshells, when compared to nanosphere geometry, have superior plasmonic properties.

In this project, poly(ethylene glycol) modified gold nanorods and lipid-based nanoshells containing nanorods were synthesized. The surface of these nanoparticles was conjugated with antibodies targeting KDN (2-keto-3-deoxy- D-glycero-D-galacto-nononic acid) receptors, members of sialic acid family and present at high amounts on the membranes of breast and prostate cancer cells. The therapeutic effect of these nanoparticles in the project was tested first in *in vitro* and then in *in vivo* experiments using nude mice bearing prostate and breast tumors. The *in vivo* imaging potential of the nanoparticles was also determined via SERS and NIR thermal imaging techniques.

Development of nanoparticles modified with anti-KDN antibodies and determination of their theranostic functionality have not been reported yet in the literature. Also there is no report on the use of novel nanoshell structures containing nanorods as theranostics. The research performed in this project has yielded a strong basis for development of a nanosystem which can selectively image and destroy breast and prostate tumors.

1. GİRİŞ

Meme kanseri ülkemizde ve dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (Curado, 2011). Dünyada erkeklerde en sık görülen kanser türü ise prostat kanseridir ve ülkemizde akciğer kanserlerinin ardında 2. sırada yer almaktadır (Jemal vd., 2008). Bu iki kanser türünün, diğer kanser türleri gibi sağlık ve sosyoekonomik etkilerini azaltmak için etkin teşhis ve tedavi yöntemlerine acil ihtiyaç vardır.

Altın kolloidler, eşsiz biyoyumluluk, optik ve elektronik özellikleri sayesinde son yıllarda kanserin teşhis ve tedavisinde teranostik sistemler olarak kullanılmaktadır. Yüzeylerine, hücre reseptörlerini tanıyan ligandlar bağlanarak bu yapıların kanser hücrelerini seçici hedeflemesi sağlanabilir (Paciotti vd., 2001, 2004). Plazmonik özellikleri sayesinde derin doku penetrasyonuna sahip ve dokulara zararlı olmayan yakın kızılötesi (near-infrared) (NIR) lazer ışınması altında fototermal etki ile kanser hücrelerini son derece lokal bir şekilde yok edebilmektedirler. Bu şekilde lokal ısıtma mekanizması, sağlıklı hücreleri ve tümör çevresindeki hücreleri minimum etkiler ve böylece yan etkileri ortadan kaldırması açısından klasik kemoterapiye kıyasla son derece avantajlıdır (Oyelere vd., 2010).

Nanoçubuklar, dokulara zarar vermeyen 700-900 nm (1. NIR penceresi) arasındaki ışınma ile çevrelerine ısı verirler (Pissuwan vd., 2008). Literatürde görece yeni olan kabuk içinde nanoçubuk yapıların (rod-in-shell veya rattle-like) ise çok daha derin doku penetrasyonu sağlayan 2. NIR penceresinde (1000-1350 nm) daha etkili fototermal etki gösterdikleri rapor edilmiştir (Tsai vd., 2013).

Altın nanotanecikler aynı zamanda “yüzey arttırılmış Raman spektroskopisi” (SERS) ve “NIR termal görüntüleme” gibi invaziv olmayan görüntüleme ve teşhis teknikleri için mükemmel ajanlardır (Qian vd., 2007; Charan vd., 2012). Altın nanotanecikler, yüzeylerine adsorbe olmuş kromoforların Raman saçılması etkinliğini 10^{15} kat kadar arttırabilmekte, bu sayede atmosferik şartlar altında tek bir molekülün bile spektroskopik tayini mümkün olmaktadır (Kneipp vd., 1999; Campion ve Kambhampati, 1998). Yüzeyleri Raman kromoforları, PEG ve hücre-spesifik ligandlar ile modifiye edilmiş altın nanokürelerin farelerde tümörlerin SERS tekniği ile çok hassas bir şekilde teşhisini mümkün kıldığı literatürde rapor edilmiştir (Qian vd., 2007).

Kanserde “hedefli tedaviler”in henüz tam anlamıyla geliştirilememiş olmasının en önemli nedenlerinden biri kanser hücrelerinin seçici olarak sağlıklı hücrelerden ayrılmasında yaşanan güçlüklerdir. Kanser hücresinin normal hücreden kesin olarak ayrılmasında kullanılan moleküllerin sayısı oldukça sınırlıdır. 2-Keto-3-deoksi-D-gliserol-5-fosfat (KDN)



sialik asit ailesinin bir üyesidir. Bu molekül bakterilerden, insanları da içeren yüksek vertebralılara kadar pek çok canlıda bulunabilmektedir. Ancak memeli hücrelerinde KDN genellikle çok düşük seviyelerde bulunmaktadır. KDN'nin insan örneklerinde saptanmasında en dikkat çekici özellik insan tümörlerinde bir "oncodevelopmental" antijen olarak yüksek oranda bulunmasıdır. Normal over dokusu ile kıyaslandığında over kanserlerinde serbest KDN düzeyi, en sık karşılaşılan sialik asit olan Neu5Ac'ye göre daha yüksektir. Önemli olarak, Go vd. (2007) yaptıkları çalışmada insan karsinoma hücrelerinde hipoksik şartlarda serbest KDN ve Neu5Ac oranlarının arttığını göstermişlerdir. Bu bağlamda, KDN molekülü, sağlıklı dokuda kanserli dokuya göre çok az miktarda olması nedeniyle gerçek anlamda hedefli tedaviler için çok uygun yeni bir molekül olarak ortaya çıkmaktadır.

Gerçekleştirilen projede, poli(etilen glikol) (PEG) ile kaplı altın nanoçubuklar ve birden fazla nanoçubuk içeren lipid esaslı nanokabuklar sentezlenmiştir. Üretilen nanotaneciklerin yüzeylerine, proje çerçevesinde üretilmiş olan KDN (2-keto-3-deoxy- D-glycero-D-galactononic acid) reseptörünü hedefleyen seçici antikolar (anti-KDN antikoları) kovalent olarak bağlanmıştır. Üretilen hedefli nanotaneciklerin fototermal tedavi etkinlikleri öncelikle in vitro, daha sonra prostat ve meme kanser fare modellerinde in vivo deneyler ile belirlenmiştir. Nanotaneciklerin in vivo görüntüleme potansiyeli, SERS ve NIR termal görüntüleme teknikleri ile ortaya çıkarılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Meme kanseri ülkemizde ve dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Bu kanser tipinin dünyada ortalama insidansı yüz binde 38-40, ülkemizde ise ortalama yüz binde 40 civarındadır (Curado, 2011). Dünyada erkeklerde en sık görülen kanser türü ise prostat kanseridir. Ülkemizde akciğer kanserlerinin ardında 2. sırada yer alan prostat kanseri için, dünya ortalaması yüz binde 28'lerdedir. Ülkemizde ise bu oran yüz binde 37'dir (Jemal vd., 2008). Bu iki kanser türünün, diğer kanser türleri gibi sağlık ve sosyoekonomik etkilerini azaltmak için etkin teşhis ve tedavi yöntemlerine acil ihtiyaç vardır.

Neredeyse yarım asırdır romatizmal eklem hastalıklarının tedavisinde güvenli bir şekilde kullanılan (Merchant, 1998; Root vd., 1954) ve uzun dönem in vivo toksisite veya diğer istenmeyen etkilerinin olmadığı bilinen (Connor vd., 2005; Shukla vd., 2005) altın kolloidler, eşsiz biyouyumluluk, optik ve elektronik özellikleri sayesinde son yıllarda kanserin teşhis ve tedavisinde teranostik sistemler olarak kullanılmaktadır. Yüzeylelerine, hücre reseptörlerini tanıyan ligandlar bağlanarak bu yapıların kanser hücrelerini seçici hedeflemesi sağlanabilir (Paciotti vd., 2001, 2004). Plazmonik özellikleri sayesinde 10 cm derinliğe kadar doku penetrasyonuna sahip ve dokulara zararlı olmayan yakın kızılötesi (near-infrared) (NIR) lazer ışınması altında fototermal etki ile kanser hücrelerini son derece lokal bir şekilde yok edebilmektedirler. Bu şekilde lokal ısıtma mekanizması, sağlıklı hücreleri ve tümör çevresindeki hücreleri minimum etkiler ve böylece yan etkileri ortadan kaldırması açısından klasik kemoterapiye kıyasla son derece avantajlıdır (Oyelere vd., 2010). Aynı derecede öneme sahip bir başka avantaj ise lokal ısıtma mekanizmasının ilaç dirençliliği mekanizmalarını devre dışı bırakarak kemoterapiye dirençli kanserlerde de etkili olabilmesidir (Carpin vd., 2011). Biyouyumlu ve kan akışında sirkülasyon süresini uzatma özelliğine sahip bir polimer olan poli(etilen glikol) (PEG) ile kaplanmış altın nanotaneciklerin Faz I klinik denemelerinden olumlu sonuçlar alınmıştır (Libutti vd., 2010).

Altın nanoçubuklar ve nanokabuklar, nanoküre geometrisine kıyasla, daha üstün plazmonik özellik gösterir. Nanoçubuklar, dokulara zarar vermeyen 700-900 nm (1. NIR penceresi) arasındaki ışınma ile çevrelerine ısı verirler (Pissuwan vd., 2008). Farelerde sistemik uygulanan altın nanoçubukların sadece 10 dakika lazer ışınması altında çevredeki dokuya minimal bir zararla tümör merkezindeki sıcaklığı 20°C arttırdığı belirlenmiştir (Dickerson vd., 2008). "Nature" dergisinde yayınlanan bir çalışmada altın nanoçubukların yüzeyi trastuzumab ve porfirin ile modifiye edilerek altın nanoçubukların meme kanserine hedefli tanı ve tedavi ajanı olarak potansiyelleri incelenmiştir (Kang vd., 2017). ACS Nano dergisinde yayınlanan başka bir benzer çalışmada, kitosan ve Pluronic F-68 ile modifiye edilmiş altın nanoçubuklar skuamöz tümörüne sahip fareye enjekte edilerek fototermal terapi uygulanmıştır. Çalışmada

altın nanoçubukların in vivo kanser tedavisinde etkili bir terapötik etkiye sahip olduğu görülmüştür (Choi vd., 2011). Tümörlerin altın nanokabuklar ile fototermal terapisine yönelik pilot çalışmalar klinik aşamasındadır (Nanospectra Biosciences). Literatürde yeni ortaya çıkan kabuk içinde nanoçubuk yapıların (rod-in-shell veya rattle-like) ise çok daha derin doku penetrasyonu sağlayan 2. NIR penceresinde (1000-1350 nm) daha etkili fototermal etki gösterdikleri rapor edilmiştir (Tsai vd., 2013). 1. NIR penceresinde etki gösteren malzemelere göre 2. NIR aralığında etkili olan malzemeler literatürde oldukça kısıtlıdır. PbS, PbSe, Ag₂S kuantum nanotanecikleri gibi toksisite problemi olan NIR floroforları mevcuttur. Boyutları 100 nm'nin altında olupta 2. NIR bölgesinde ışık absorblayan malzemeler çok daha kısıtlı sayıdadır (Huang vd., 2010, 2011). Bunlar arasında Pd nanoyapraklar (nanosheets) sayılabilir. Çok yakın zamanda, Ag/Au kabuk içinde birtek Au nanoçubuğu içeren nanokabuk yapısı sentezlenmiş ve bu yapının 1. ve 2. NIR bölgelerinin her ikisinde de tümörlerin fototermal olarak yok edilmesinde son derece etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu nanokabuk yapısının, nanoçubuklara göre fototermal etkisinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Tsai vd., 2013). Lipid konjuge altın nanoçubukların hücre membranını deformasyonu, CTAB kaplı altın nanoçubuklara göre daha az olduğu için hücre içerisine alımı daha verimli olup bundan dolayı SERS esaslı moleküler seviyede tayinde nanoprob olarak kullanılmaktadır (Yoo vd., 2013).

İçerisinde birden fazla altın nanoçubuk bulunan altın nanokabuk yapıları literatürde yer almayan yeni bir yöntemle ilk defa grubumuz tarafından üretilmiştir (Tomak, 2013). Bu özgün nanokabuk yapılarının ve ayrıca nanoçubukların lokalize yüzey plazmon rezonans (localized surface plasmon resonance) (LSPR) ölçümleri sonucu nanoçubukların beklendiği üzere 700-900 nm arasında, nanokabukların ise 900-1400 nm arası ışığı absorpladığı belirlenmiştir. Bu yeni yapıların kanserin teşhis ve tedavisinde kullanımı, literatürde henüz bildirilmemiştir.

Altın nanotanecikler aynı zamanda “yüzey artırılmış Raman spektroskopisi” (SERS) ve “NIR termal görüntüleme” gibi invaziv olmayan görüntüleme ve teşhis teknikleri için mükemmel ajanlardır (Qian vd., 2007; Charan vd., 2012). Altın nanotanecikler, yüzeylerine adsorbe olmuş kromoforların Raman saçılması etkinliğini 10^{15} kat kadar arttırabilmekte, bu sayede atmosferik şartlar altında tek bir molekülün bile spektroskopik tayini mümkün olmaktadır (Kneipp vd., 1999; Campion ve Kambhampati, 1998). Yüzeyleri Raman kromoforları, PEG ve hücre-spesifik ligandlar ile modifiye edilmiş altın nanokürelerin farelerde tümörlerin SERS tekniği ile çok hassas bir şekilde teşhisini mümkün kıldığı literatürde rapor edilmiştir (Qian vd., 2007). SERS ile teşhis etkinliği, daha geniş yüzey alanı ve daha güçlü saçılma özelliğine sahip altın nanoçubuklar ile arttırılabilir (Vendrell vd., 2013). Benzer şekilde nanoçubuk içeren nanokabuk yapıların, daha derin ışık penetrasyonu ve daha güçlü saçılma özellikleri sayesinde SERS tekniği ile teşhis etkinliğini arttırması, daha da önemlisi derin dokularda oluşmuş tümörlerin teşhisini mümkün kılması beklenir. Daha basit bir yaklaşımla,

hedefli altın nanoçubuklar ve nanokabuklar kullanarak tümörlerin termal görüntülenmesi de mümkündür. Bu yapıların fototermal etki ile NIR bölgesinde absorbladıkları ışığı ısıya dönüştürmeleri sonucu lokalize oldukları tümör bölgesinde sıcaklığı belirgin bir şekilde arttırmaları termal bir kamera ile rahatlıkla görüntülenebilmektedir (Von Maltzahn vd., 2009).

Kanserde “hedefli tedaviler”in henüz tam anlamıyla geliştirilememiş olmasının en önemli nedenlerinden biri kanser hücrelerinin seçici olarak sağlıklı hücrelerden ayrılmasında yaşanan güçlüklerdir. Rutin patolojik incelemenin yanında, kanser tanısının konulmasında ve kanserli hücrelerin hedeflenmesinde yeni moleküllerin bulunması bütün dünyada kanser araştırmalarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Kanser hücresinin normal hücreden kesin olarak ayrılmasında kullanılan moleküllerin sayısı oldukça sınırlıdır. Bu amaçla yapılan umut veren klinik öncesi çalışmalar bulunmakla beraber bu konuda beklentileri tam anlamıyla karşılayan bir molekül bulunmamaktadır. Literatürde sıklıkla EGFR (Huang vd., 2009) veya folik asit (Jin vd., 2012) reseptörleri gibi aslında sağlıklı dokularda da belirgin şekilde ekspres edilen reseptörler hedeflenmektedir. Bu tür sistemler ile yapılan tedaviler yan etkileri gerçek anlamda ortadan kaldıramamaktadır.

2-Keto-3-deoksi-D-gliserol-D-galakto-nononik asit (KDN) sialik asit ailesinin bir üyesidir. Ortak bir Sia (N-asetilnöraminik asit- Neu5Ac) içinde yer alan C5 pozisyonunda aseto-amid grubu yerine hidroksil grubu eklenmesi ile oluşan, biyosentezi ve fonksiyonu açısından sialik asit ailesinin önemli bir üyesidir. KDN çeşitli sialidazlara duyarsızlık ve polisialik asidinin uzaması için bir “stop sinyali” içermesi gibi farklı özelliklere sahiptir (Varki vd., 2009). Bu molekül bakterilerden, insanları da içeren yüksek vertebralılara kadar pek çok canlıda bulunabilmektedir. Ancak memeli hücrelerinde KDN genellikle çok düşük seviyelerde bulunmaktadır. Bu molekül ilk olarak Inoue ve ark. tarafından polisialo-glikoprotein olarak izole edilmiştir (Nadano vd., 1986). İnsanda KDN klasik sialik asit analiz yöntemleri ile belirlenemeyecek kadar az miktarda bulunmaktadır. Bu sebeple, KDN, Neu5Ac'nin bulunmasından ancak 50 yıl sonra keşfedilebilmiştir (Inoue ve Kitajima, 2006; Inoue vd., 1996).

Minör bir sialik asit olan KDN'nin insan örneklerinde saptanmasında en dikkat çekici özellik insan tümörlerinde bir “oncodevelopmental” antijen olarak yüksek oranda bulunmasıdır. Normal over dokusu ile kıyaslandığında over kanserlerinde serbest KDN düzeyi, en sık karşılaşılan sialik asit olan Neu5Ac'ye göre daha yüksektir. Bununla beraber oranın kanserin progresyonu ile birlikte arttığı düşünülmektedir (Inoue vd., 1998). B16 mouse melanoma hücrelerinde de glikokonjugatlara bağlı KDN ve serbest KDN oranlarının da arttığı belirlenmiştir (Angata vd., 1999). Lokal ilerlemiş tümörlerde hipoksinin kanser hücrelerinin malign transformasyonu üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Hipoksi- rezistan kanser hücreleri radyoterapi ve kemoterapiye de daha az duyarlıdır (Yin vd., 2006; Koike vd., 2004). Önemli olarak, Go vd. (2007) yaptıkları çalışmada insan karsinoma hücrelerinde hipoksik şartlarda

serbest KDN ve Neu5Ac oranlarının arttığını göstermişlerdir. Prof. Dr. Öktem'in KDN'ye karşı geliştirilmiş poliklonal antikoları kullanarak gerçekleştirdiği çalışmalar, bu antikoların, intraepitelial tümör teşhisinde prostat spesifik antijen (PSA)'e karşı geliştirilmiş antikolardan daha duyarlı sonuçlar verdiği ve bu antikoların prostat kanseri dışında, meme kanserinde de belirleyici olabileceğini göstermiştir. Bu bağlamda, KDN molekülü, sağlıklı dokuda kanserli dokuya göre çok az miktarda olması nedeniyle gerçek anlamda hedefli tedaviler için çok uygun yeni bir molekül olarak ortaya çıkmaktadır.

Altın nanotanecik yapıları ile hedefli fototermal terapi, dünya çapında sınırlı sayıda çalışmada çeşitli tümörlerde denenmiş olup başarılı sonuçlar alınmıştır (Hirsch vd., 2003; Yuan vd., 2012; Eghtedari vd., 2008). Anti-KDN antikoları ile hedeflenmiş altın nanotaneciklerin üretimi ve etkinliklerinin belirlenmesi, bildiğimiz kadarıyla, literatürde henüz bildirilmemiştir. Benzer şekilde, bildiğimiz kadarıyla, birden fazla nanoçubuk taşıyan nanokabuk yapıların görüntüleme veya terapiye yönelik potansiyelini ortaya koyan bir çalışma da literatürde henüz bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Hekzadesiltrimetil amonyum bromür (CTAB, Sigma Aldrich, Bioextra >%99), sodyum borohidrat (NaBH₄, Sigma Aldrich, granüler, eser metal esaslı, %99.99), askorbik asit (L-AA, Fluka, metal esaslı, %99.9998), gümüş nitrat (AgNO₃, Alfa Aesar, %99.995), hidrojen tetrakloroaurat (III) hidrat (HAuCl₄, Alfa Aesar, %99.999), sodyum oleat (NaOL, abcr, %97), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimide hidroklorür (EDC, Merck), N-Hidroksisüksinimid (Sulfo-NHS, Thermo Fisher Scientific), 2-keto-3-deoksi-D-glisero-D-galakto-nononik asid (KDN, Sigma Aldrich), etanol (C₂H₅OH, Sigma, %99), nitrik asit (HNO₃, Merck, %65), amonyum hidroksit (NH₄OH, Merck, %32), sülfürik asit (H₂SO₄, Merck, %95-97), hidrojen peroksit (H₂O₂, Merck, %30), hidroklorik asit (HCl, Merck, %37), kloroform (CHCl₃, Merck, >%99), potasyum karbonat (K₂CO₃, Sigma Aldrich, >%99), sodyum bikarbonat (NaHCO₃, Sigma Aldrich), RPMI 1640 (+L-Glutamin, Gibco), fetal sığır serumu (FBS, Gibco), penisilin-streptomisin (Pen-Strep, Gibco), Keratinosit (+L-Glutamin, Gibco), tripsin-EDTA (Gibco), lizis tamponu (eBioscience), fosfat tampon tuzu (PBS, 10X, Gibco), tripan mavisi (Biological Industries), tiazol mavi tetrazolyum bromid (MTT, Sigma), hücre proliferasyon kiti (WST-1, Sigma), anneksin V-FITC apoptozis seti (Biovision), epidermal büyüme faktörü insan rekombinantı (EGF, Biovision), sığır hipofiz özütü (BPE, Thermo Scientific), hidrokortizon (Calbiochem), insulin (Sığır pankreasından, Sigma), dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma, %99), sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma, %99), hücre proliferasyon kiti (WST-1, Sigma), Alexa Flour 647 NHS ester (Thermo Fisher Scientific), malakit yeşil izotiyosiyanat (Thermo Fisher Scientific), 3,3' -Dietiltiyatrikarbosiyanin iyodid (DTTC iyodid, Sigma, %99), lusiferaz deney kiti (Perkin Elmer), matrijel matriks (Corning). Tiyol fonksiyonlu polietilen glikol (mPEG-SH (5000), NH₂-PEG-SH (5000), mPEG-SH (1000) ve NH₂-PEG-SH (1000) Laysan Bio' dan tedarik edilmiştir. 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (POPC) ve 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC) Avanti Polar Lipids firmasından, 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N-[(polietilen glikol)-2000] (DSPE-PEG(2000)) ve 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N-[amino(polietilen glikol)-2000] (DSPE-PEG(2000)-Amin) Biochempeg firmasından sağlanmıştır. Tüm kimyasallar alındığı gibi kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Enstrümental Karakterizasyon Metodları

Nanoçubukları ve nanokabukların, modifikasyonlar öncesi ve sonrası karakterizasyonları aşağıdaki cihaz ve metodlar kullanılarak yapılmıştır.

3.2.1 UV-Vis Spektroskopisi

UV-Vis ışık absorpsiyon ölçümleri optik mikroskoba fiber optikle bağlantılı Ocean Optics HR2000 spektrofotometresi ile, tungsten-halojen lambadan sağlanan polarize olmamış beyaz ışık altında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada tüm spektrumlar standart geçirim geometrisi modunda yapılan makroskobik ölçümlerle elde edilmiştir. Tüm ölçümler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 Raman Spektroskopisi

Bu çalışmadaki Raman ölçümleri, HORIBA Jobin Yvon tarafından geliştirilmiş XploRA PLUS sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde uyarma kaynakları olarak sistem içerisinde bulunan 532 nm'de ışımaya yapan katı hal lazer kaynağı ve 785 nm'de bulunan diyot lazeri kullanılmıştır. Sisteme entegre olan optik görüntüleme sistemi Olympus BX41 olup üzerine aynı firmaya ait 10X, 20X, 40X ve 100X büyütmelelere sahip objektifler ile numunelere bakıldı. Her ölçümde veri toplama süresi olarak 10 sn olarak ayarlanmış ve her ölçüm 10 kez tekrarlanmıştır. Toplanan spektrumlar HORIBA veri toplama programı LabSpec 6 ile normalize edilmiştir. Ölçümlerin tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği için Raman deneyleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.2.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Elektron mikroskobu görüntüleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan FEI Quanta 250 FEG taramalı elektron mikroskobu ile alınmıştır. Görüntüler, örneğe göre değişen 2-10 keV çalışma aralığında, cihazın geri saçılmış elektron (BSE) ve ikinci elektron (SE) dedektörleri ile elde edilmiştir.

3.2.4 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

Topografik veri almak için Nanosurf FlexAFM oda sıcaklığında tıklamalı modda ölçüm yapılarak kullanılmıştır. Bütün görüntüleme farklı tarama hızlarında 512x512 veri toplama ile yürütüldü. 42 N/m yay sabitine sahip oksit-sivriltilmiş silikon nitrür tipler ile entegre edilmiş manivelalar kullanılmıştır. Bu tiplerin rezonans frekansları 204 ve 497 kHz arasında ve tipin efektif eğrilik yarıçapı 7 nm'den küçüktür. AFM görüntüleri Scanning Probe Image Processor SPIP yazılımı kullanılarak hazırlandı. AFM analizleri için örnekler çözeltiden cam/silikon yüzeye damlatılıp açık havada kurutulmaya bırakılarak hazırlandı.

3.2.5 Zeta Potansiyeli Ölçümleri

Zeta-potansiyeli ölçümleri MALVERN Zetasizer Nano ZS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. (ölçüm aralığı: zeta -500 ila +500 mV için 0.3 nm ila 10 µm; lazer kaynağı: diyot lazer; lazer dalga boyu: 632.8 nm; lazer gücü: 10 mW). Ölçümler 120 sn'lik bir dengeleme süresinden sonra gerçekleştirilmiştir. 3 kere 70'lik okuma 25 °C'de gerçekleştirilmiştir. Sayımlar 165° 'lik bir açıda tespit edilmiştir. Örnekler üç tekrarlı şekilde ölçülmüştür.

3.2.6 İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektroskopisi (ICP-MS)

Örneklerdeki altın konsantrasyonunu belirlemek için hizmet alımı yolu ile Agilent 7500ce Octopole Reaksiyon Sistemi ORS kullanılarak indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektroskopisi kullanılmıştır. Cihaza ait kullanım koşulları sırasıyla 1500 W güç, 13 litre/dakikada plazma gaz akışı, 0,2 litre/dakika yardımcı gaz akışı, 0,92 litre/dakika nebulizör gaz akışı ve peristaltik pompanın akış hızı 0,1 rpm'dir.

3.2.7 X-Işınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

Örneklerin elementel analizleri ve kimyasal yapıları, Thermo Scientific K-Alpha Yüzey Analizi modeli x-ışını fotoelektron spektroskopi cihazı ile gerçekleştirildi. Ölçümler alfa ışın kaynağı tarafından üretilen x ışınları ile 400 um çaplı bir alandan alındı.

3.3 Altın Nanoparçacıkların Sentezi ve Yüzey Modifikasyonları

3.3.1 Altın Nanoçubukların Sentezi

Proje kapsamında değişen boy:en oranına sahip altın nanoçubuklar üretilmiştir. Altın nanoçubuklar (R), çekirdek çözeltisinin ve takiben büyütme çözeltisinin sentezlenmesini içeren iki aşamalı kolloidal tohum ortamında büyütme yöntemi ile sentezlendi. Yüksek konsantrasyonda ve belirli boy:en oranlarında (30-100 nm boyunda ve 10-25 nm çapında) altın nanoçubukların üretilmesinde Green vd. (2011) metodu kullanıldı. Kısaca; çekirdek çözeltisinin hazırlanması için 1 mM H₂AuCl₄, 200 mM CTAB ve 10 mM NaBH₄ çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden sırasıyla 5 ml CTAB, 2.5 ml H₂AuCl₄ ve 0.6 ml NaBH₄ eklendi. Karıştırılan çözeltilerden çekirdek çözeltisi elde etmek için karışım oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırıldı. Çekirdek çözeltisi hazırlandıktan sonra büyütme çözeltisi hazırlanmasına geçildi. Büyütme çözeltisi 17-20 ml H₂AuCl₄, 17-20 ml CTAB, 60-100 µl AgNO₃ (32 mM), 280-260 µl askorbik asit (78.8 mM) alınarak hazırlandı ve hazırlanan büyütme çözeltisinin üzerine son olarak 60-100 µl çekirdek çözeltisi eklendi. Çözelti oda sıcaklığında bir gece inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra, UV-Vis spektroskopi ölçümleri alındı.

Yüksek boy: en oranında (örneğin boy: en= 7; 105 nm boyunda ve 15 nm çapında) altın nanoçubuklar ikili yüzey aktif madde karışımı kullanılarak üretildi (Ye vd., 2013). Kısaca, çekirdek çözeltisinin hazırlanması için 0.5 mM HAuCl₄, 200 mM CTAB ve 10 mM NaBH₄ çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden sırasıyla 5 ml CTAB, 5 ml HAuCl₄ ve 0.6 ml NaBH₄ eklendi. Karıştırılan çözeltilerden çekirdek çözeltisi elde etmek için karışım oda sıcaklığında 2 dakika boyunca yüksek hızda karıştırıldı ve 30 dakika beklemeye bırakıldı. Çekirdek çözeltisi hazırlandıktan sonra büyütme çözeltisi hazırlandı. Büyütme çözeltisinin hazırlanması için 3.5 g CTAB ve 0.617 g NaOL 50°C' de 125 ml su içerisinde çözüldükten sonra sıcaklık 30°C' ye düşürüldü. Daha sonra 9-12 ml AgNO₃ ve 125 ml HAuCl₄ eklenerek 15 dakika beklendi. Süspansiyon renksiz oluncaya kadar yüksek hızda 1.5 saat karıştırıldı. Karıştırma hızı düşürülerek sırasıyla 1-1.5 ml HCl eklenip 15 dakika beklenildikten sonra 625 µl askorbik asit ilave edildi. Hazırlanan büyütme çözeltisinin üzerine son olarak 200-400 µl çekirdek çözeltisi de eklendi. Çözelti 30°C'de su banyosunda bir gece inkübasyona bırakıldı.

3.3.2 Altın Nanoçubukların PEG ile Modifikasyonu

Proje süresince farklı boy:en oranlarında üretilmiş nanoçubuklar yüzeyleri mPEG-SH ile kaplanarak kullanılmıştır. Ayrıca antikör bağlı nanoçubuk örneklerinin hazırlanabilmesi için mPEG-SH / NH₂-PEG-SH karışımı ile modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler kısaca şu şekilde yapılmıştır: Altın nanoçubuk sulu çözeltisine (1 ml), K₂CO₃ (2 mM, 0.1 ml) ve PEG (5000 g/mol, 1 mM, 1 ml) sulu çözeltileri eklenmiştir. PEG çözeltisi içerisinde mPEG-SH:NH₂-PEG-SH mPEG-SH oranı molce 4:1 veya 1:1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Sonuç çözelti bir gece oda şartlarında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, karışım diyaliz tübüne (MWCO: 50 kDa) aktarılarak 3 gün boyunca diyaliz edilmiştir. Diyaliz suyu 3 saat aralıklarla değiştirilmiştir. Diyaliz sonrası örnekler liyofilizatörde kurutulmuştur.

3.3.3 Altın Nanoçubuklara Anti-KDN Antikörünün Bağlanması

mPEG-SH:NH₂-PEG-SH (molce 4:1) karışımı ile modifiye edilmiş nanoçubukların yüzeylerine monoklonal antikörler kovalent olarak bağlanmıştır. Antikör bağlanması işlemi kısaca şu şekilde yapılmıştır: PEG ile kaplı altın nanoçubuklar üzerindeki NH₂ gruplarının molce % 0.1'i veya % 0.05'i hedef alınmıştır. Antikör (21.3 g/L) ultra saf su içinde çözülmüştür. Bu stok çözeltiden 100 veya 50 µl alınarak içine 100 µl'lik fosfat tampon (PB) içinde çözülmüş N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid (EDC) (7.4x10⁻⁴ veya 3.7x10⁻⁴ M) çözeltisi ve N-hidroksisüksinimid (NHS) (5 mM) eklenmiştir. Bu antikör çözeltisi PEG kaplı altın nanoçubuk çözeltisine (130 mg altın atomu/L) eklenmiştir. Reaksiyon gece boyunca +4 °C'de bırakılmıştır. Bir gece inkübasyon süresinden sonra reaksiyona girmemiş ürünleri ve yan ürünleri

uzaklaştırmak için çözelti 13500 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek 3 kez ultrasaf su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası antikor-konjuge nanoçubuklar liyofilizatör ile kurutulmuştur.

3.3.4 Altın Nanoçubukların Raman Kromoforu ile Modifikasyonu

In vivo deneyler için malakit yeşil izotiyosiyanat Raman kromoforu olarak kullanılmıştır. Raman kromoforu'nun, altın nanoçubukların yüzeyine bağlanması için uygulanan konjugasyon yöntemi kısaca şöyledir: Altın nanoçubuk çözeltisi 1200 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve çöken nanoçubuklar iki kez su ile yıkanmıştır. Etanol içerisinde Raman kromofor (5 µm) çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan raman kromofor solüsyonu, 1: 6 (kromofor çözeltisi / altın nanoçubuk) hacim oranında altın nanoçubukların üzerine eklenmiştir.

Reaksiyonun 1 saatlik inkübasyon süresinden sonra, altın nanoçubuk-raman kromofor konjugatı santrifüj edilerek bağlanmayan raman kromoforu uzaklaştırılmıştır. Santrifüj işleminden sonra nanoçubuklar su içerisinde dağıtılmıştır. Bu aşamadan sonra Raman kromoforu bağlı altın nanoçubukların üzerine PEG çözeltisi (mPEG-SH:NH₂-PEG-SH mPEG-SH oranı molce 4:1; 1 mM) eklenmiş ve reaksiyon 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından, PEG ile modifiye edilmiş altın çubuk çözeltisi, 15 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüj edilerek reaksiyona girmemiş PEG molekülleri uzaklaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra altın nanoçubuklara, yukarıda prosedür ile antikor konjugasyonu yapılmıştır.

3.3.5 Altın Nanoçubuklar İçeren Lipid Nanokabukların Sentezi

Altın nanoçubuklar içeren lipid nanokabukların sentezinde birçok deneme yapılmıştır. Öncelikle proje öncesinde CTAB ile stabilize edilmiş nanokabuklar sentezlenmiştir. Proje kapsamında öncelikle CTAB ile sentezlenmiş nanokabukların yüzeyinin toksik olarak bilinen CTAB molekülleri yerine 1-palmitoil-2-oleil-sn-glisero-3-fosfokolin (POPC) lipid molekülleri ile kaplanması yönünde deneyler yapılmıştır. POPC ile oluşturulmuş nanokabukların boy dağılımları çok geniş olduğu için daha sonra optimizasyon deneylerinde 2. rapor döneminde homojen boy dağılımına sahip nanokabukların üretilmesi yönünde optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sırasında dimetil distearil ammonyum bromür (DDAB) test edilerek bu lipid ile hem nanoçubuk hem de nanokabuk yapıları daha yüksek verimde, kararlı ve dar boy aralığı dağılımına sahip bir şekilde elde edilmiştir. Ancak katyonik bir lipid olan DDAB'in olası toksik etkisini azaltmak ve altın nanokabukların in vivo ve in vitro ortamlar içerisindeki stabilizasyonun artırılması için daha sonra DDAB, DPPC ve DSPE-PEG lipid karışımı nanokabuk üretiminde kullanılmıştır. Böylece içerisinde altın nanoçubuklar içeren PEG kaplı lipid nanokabuklar doğrudan üretilmiştir. Ancak in vitro toksisite çalışmalarının

sonunda DDAB, DPPC ve DSPE-PEG lipid karışımından oluşan nanokabukların 50 μ M ve altında konsantrasyonlarda toksik etki göstermiş olmaları nedeni ile DDAB tamamen formülasyondan uzaklaştırılmış ve sadece DPPC ve DPPC ve DSPE-PEG lipidleri içeren karışım kullanılarak altın nanoçubuklar içeren PEG'lenmiş lipid nanokabuklar doğrudan sentezlenmiştir. Tüm bu sentez deneyleri aşağıda ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Projede nanokabuk hazırlamada kullanılan lipid karışımları

Deneme	Lipid Bileşimi	Konsantrasyon
1	DDAB	40mM, 20mM, 15mM, 10mM, 5mM
2	POPC	15mM, 10mM
3	DSPE-PEG	100uM, 1uM, 2uM, 5uM, 10uM, 0,5uM, 0,1uM, 20uM, 50uM, 1mM, 2mM, 5mM, 10mM
4	POPC: DDAB	%25(10mM): %75(15mM)
5	DPPC	5mM, 10mM, 15mM, 1mM
6	POPC: DDAB	%50(10mM): %50(15mM)
7	POPC: DDAB	%75(10mM): %25(15mM)
8	DDAB: DPPC: DSPE-PEG	%65(15-20mM): %20(1mM): %15(1mM)
9	DDAB: DPPC: DSPE-PEG	%55(15mM): %30(1mM): %15(1mM)
10	DDAB: DPPC: DSPE-PEG	%65(10mM): %20(1mM): %15(1mM)
11	DDAB: DPPC	%65(20mM): %35(1mM)
12	DDAB: DSPE	%65(20mM): %35(1mM)
13	DDAB: DSPE: DSPE-PEG	%65(20mM): %20(1mM): %15(1mM)
14	DDAB: DPPC	%65(15mM): %35(1mM)
15	DDAB: DPPC: DSPE-PEG	%60(15mM): %20(1mM): %20(1mM)
16	DPPC: DSPE	%60(1mM): %40(1mM)
17	DDAB: DSPE-PEG	%60(1mM): %40(1mM)
18	DDPC: DSPE-PEG	%60(1mM): %40(1mM)
19	DSPE: DSPE-PEG	%60(1mM): %40(1mM)
20	DSPC	1mM, 10mM
21	DPPC: DSPE-PEG	%75(1mM): %25(1mM)
22	DPPC: DSPE-PEG	%50(1mM): %50(1mM)
23	DPPC: DSPE-PEG	%25(1mM): %75(1mM)
24	DDPC: DSPE-PEG	%50: %50 1mM: 1mM

3.3.5.1 POPC Esaslı Altın Nanokabukların Sentezi

Bu yöntemde öncelikle CTAB stabilize altın nanoçubuklar sentezlenmiştir. Altın nanoçubukların hazırlanması ilk olarak 0.10 M, 7.5 ml CTAB çözeltisine 0.01 M, 0.250 ml HAuCl_4 sulu çözeltisi eklendi. Çözelti manyetik karıştırıcı kullanılarak çözeltilerin homojen olarak dağılması sağlandı ve çözeltinin rengi açık kahverengi-sarı görünümüne ulaştığı zaman 0.01 M, 0.600 ml NaBH_4 eklendi ve 2 dakika boyunca karıştırılmaya devam edildi. Oluşturulan çekirdek çözeltisi daha sonraki aşamada kullanılacağı için oda sıcaklığında 25°C'de muhafaza edilerek CTAB'in çökmesi engellendi. Başka bir vialde 0.1 M 9.5 ml CTAB konuldu ve CTAB çözeltisi üzerine sırasıyla 0.01 M, 0.400 ml HAuCl_4 , 0.01 M 0.060 ml AgNO_3 çözeltileri eklendi. Çözeltinin rengi açık kahverengi-sarı bir renk aldıktan sonra 0.01 M 0.064 ml askorbik asit

eklendi ve askorbik asidin eklenmesi ile çözeltinin renginin renksiz bir hal aldığı gözlemlendi. Altın nanoçubukların sentezlenmesindeki son aşama olarak 0.02 ml çekirdek çözeltisi eklendi ve 10 sn boyunca karıştırılmaya devam edildi (Sau ve Murphy, 2004). Son aşamada ilk olarak 15 ml altın nanoçubuk çözeltisi içerisindeki CTAB'i uzaklaştırmak için altın nanoçubuklar 10000 rpm'de 15 dakika süresince 2 kez santrifüj edildi ve saf su (0.75 ml) ile yeniden çözüldü.

Bu aşamadan sonra 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glisero-3-fosfokolin (POPC) esaslı lipozomlar hazırlanmıştır. Bu amaçla, 20 mM kurutulmuş 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glisero-3-fosfokolin (POPC) lipid filmleri, 5 ml kloroform çözeltisi içerisindeki lipid çözeltisinin döner buharlaştırıcıda buharlaştırılmasıyla hazırlandı. Kurutulmuş filmler içerisinde mevcut olan tüm organik çözücülerini uzaklaştırmak için yüksek vakum altında bir gece bekletildi. Daha sonra lipid filmler 5 ml saf su eklenerek çözüldü ve 40 °C'de 1 saat boyunca bekletildi. Karıştırıldıktan sonra N₂ gazı gönderildi ve ardından 4 dakika sonikasyon, 4 dakika soğutma şeklinde sonikasyon işlemi 4 kez tekrar edildi. Bir sonraki adımda lipid çözeltisi 16000 g'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant kısım 0.22 µm'lik filtreden geçirildikten sonra su eklenerek 10 mM'a seyreltilti (Orendorff vd., 2009).

Son aşamada altın nanoçubuk pelleti çözeltisi (0.75 ml), 10 mM, 2 ml POPC vezikülleri ile karıştırıldı ve 12 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra POPC altın nanoçubuklar 4000 rpm'de 8 dakika boyunca santrifüj edilip saf su içerisinde yeniden çözüldü. Böylece ortamda bulunan fazla ya da bağlanmamış lipidler çözeltiden uzaklaştırıldı (Orendorff vd., 2009).

3.3.5.2 DDAB Esaslı Altın Nanokabukların Sentezi

DDAB kaplı altın nanoçubuk içeren DDAB esaslı nanokabukların sentezi aşağıda detaylandırıldığı şekilde iki aşamada yapılmıştır. İlk olarak DDAB kaplı altın nanoçubuk elde edilmiştir. Nanoçubuk sentezinde öncelikle çekirdek çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla Orendorff vd. (2009)'nin yayınlamış olduğu prosedür benimsenerek lipid değişen konsantrasyonlarda kloroform çözeltisi içerisinde çözülmüş ve çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılarak lipid film elde edilmiştir. Daha sonra lipid film üzerine saf su eklenmiş ve 40 °C'de 1 saat boyunca beklenmiştir. Çekirdek çözeltisinin hazırlanması için DDAB çözeltisine (değişen konsantrasyonlarda, 3.25 ml) H₂AuCl₄ (1.5 mM) sulu çözeltisi eklendi. Bu çözeltiliye NaBH₄ (1.5 mM, 200 µl) eklendi ve 2 dakika boyunca karıştırıldı. Oluşturulan çekirdek çözeltisi daha sonraki aşamada kullanılmaya kadar oda sıcaklığında bekletildi. Aynı bir yerde büyüme çözeltisi hazırlandı. Bu amaçla yukarıda anlatıldığı gibi öncelikle DDAB lipid filmi elde edildi. Daha sonra lipid film üzerine saf su eklendi ve 40 °C'de 1 saat boyunca bekletildi. Daha sonra çözelti N₂ gazı ile süpürülmüş ve ardından 4 dakika sonikasyon, 4 dakika soğutma şeklinde sonikasyon işlemi 4 kez tekrar edilmiştir. Bir sonraki adımda lipid çözeltisi 1000 rpm'de 20

dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı 0.22 µm'lik filtreden geçirilmiştir (Orendorff vd., 2009). Elde edilen lipid süspansiyonu (değişen konsantrasyonlarda, 3.15 µl) üzerine sırasıyla H₂AuCl₄ (2 mM, 166 µl), AgNO₃ (2 mM, 25 µl) çözeltileri eklendi. Çözeltinin rengi açık kahverengi-sarı bir renk aldıktan sonra askorbik asit (20 mM 18,33 µl) eklendi. Son aşamada büyütme çözeltisi üzerine 4 µl çekirdek çözeltisi eklendi ve 20 dakika boyunca karıştırılmaya devam edildi. 24 saat süre ile büyütme için solüsyon inkübe edildi. 24 saat sonunda santrifüj edilerek 2 kez saf su ile yıkama gerçekleştirildi. DDAB esaslı altın nanokabukların hazırlanması tamamen nanoçubukların hazırlanması için uygulanan prosedür takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Yapılan tek değişiklik çekirdek çözeltisi hazırlanması sırasında lipid solüsyonu içine sabit akış hızında azot gazı verilmiştir. Son aşamada çekirdek çözeltisi aynı şekilde hazırlanmış büyütme çözeltisi içine eklenmiştir. Test edilen çekirdek ve büyütme çözeltilerindeki denenen lipid konsantrasyonları Tablo 3.2'de verilmektedir.

Tablo 3.2. DDAB esaslı nanokabukların hazırlanmasında test edilen çekirdek ve büyütme çözeltilerinde kullanılan lipid konsantrasyonları

Deney No	Çekirdek Çözeltisinde Lipid Konsantrasyonu (mM)	Büyüme Çözeltisinde Lipid Konsantrasyonu (mM)
1.1	5	5
1.2	5	10
1.3	5	15
1.4	5	20
2.1	10	5
2.2	10	10
2.3	10	15
2.4	10	20
3.1	15	5
3.2	15	10
3.3	15	15
3.4	15	12
4.1	20	5
4.2	20	10
4.3	20	15
4.4	20	20

3.3.5.3 DDAB, DPPC ve DSPE-PEG Karışımı Esaslı Altın Nanokabukların Sentezi

DDAB, DPPC ve DSPE-PEG lipidleri içeren karışım kullanılarak altın nanokabukların üretilmesinde DDAB esaslı altın nanokabukların üretim metodu izlenmiştir. Prosedür azot gazı akışı ile gerçekleştirilerek altın nanokabuklar elde edilmiştir. Yöntem kısaca aşağıda anlatılmıştır: Lipid filmlerin oluşması için lipidler (20 mM DDAB (%65) + 1 mM DPPC (%20) + 1 mM DSPE-PEG (%15)) kloroform çözeltisi içerisinde çözüldü. Lipid çözelti içerisindeki organik çözücünün kalıntıları döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Daha sonra oluşan lipid filmler saf su eklenerek asılı hale getirildi ve 40°C'de 1 saat boyunca bekletildi. Su fazındaki lipid karışımı içerisindeki oksijen, N₂ gazı ile süpürüldü ve ardından 30 dakika sonikasyon işlemi yapıldı. Bir sonraki adımda lipid çözeltisi 13500 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatant kısım 0.22 µm'lik filtreden geçirildi. (Orendorff vd., 2009)

Çekirdek çözeltisinin hazırlanması için lipozom çözeltisi içerisine azot gazı verildi ve bu esnada uygun konsantrasyonda ve hacimde sırasıyla H_{AuCl}₄ ve NaBH₄ eklendi. Çekirdek çözeltisi hazırlanırken gaz verme işlemi reaksiyon süresince devam edildi. Azot gazı gönderilerek oluşturulan çekirdek çözeltisi hazırlandıktan sonra büyütme çözeltisi hazırlandı. Büyütme çözeltisinin hazırlanması için lipozom çözeltisi içine sırasıyla istenilen konsantrasyonda sırasıyla AgNO₃, H_{AuCl}₄, askorbik asit eklenmiştir. Son aşama olarak çekirdek çözeltisinden uygun hacimde alınarak büyütme çözeltisine eklenmiştir.

3.3.5.4 DPPC/DSPE-PEG Karışımı Esaslı Altın Nanokabukların Sentezi

Yeni bir metot geliştirilerek DPPC veya DPPC/DSPE-PEG lipidleri içeren karışım kullanılarak altın nanoçubuklar içeren PEG'lenmiş nanokabuklar sentezlenmiştir. Yöntem kısaca şöyledir: Üretilen altın nanoçubukların yüzeyi NH₂-PEG-SH (1000 g/mol) ile modifiye işlemi altın nanoçubukların PEG'leme metotunda belirtildiği şekilde yapılmıştır. Lipid filmlerin oluşması için lipidler (1 mM DPPC veya 1 mM DPPC ve 1 mM DSPE-PEG(2000)NH₂ %50 oranında karışım) kloroform çözeltisi içerisinde çözüldü. Organik çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Daha sonra oluşan lipid filmler PEG ile modifiye edilmiş altın nanoçubuklar eklenerek asılı hale getirildi ve 40°C' de yarım saat boyunca bekletildi. Ardından azot gazı altında 30 dakika 3 tur sonikasyon işlemi yapıldı. Bir sonraki adımda lipid çözeltisi 12500 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi ve çöken kısım diyaliz tübüne (MWCO 1000 kDa) aktararak 2 gün boyunca diyaliz edildi. Diyaliz suyu 3 saatlik aralıklarla değiştirildi.

3.3.6 Altın Nanoçubuklar İçeren Lipid Nanokabuklara Anti-KDN Antikorunun Bağlanması

In vitro sitotoksosite testleri sonrası proje kapsamında en son üretilen DPPC/DSPE-PEG karışımı esaslı nanokabukların in vitro ve in vivo deneylerde kullanılmasına karar verilmiştir. Bu nanokabuklar yüzeylerinde doğrudan amin-PEG bulundurdukları için nanokabuklara ayrıca bir PEG'leme işlemi yapılmamıştır. DPPC:DSPE-PEG(2000)NH₂ karışımı ile modifiye edilmiş nanokabukların yüzeylerine doğrudan antiKDN monoklonal antikorları kovalent olarak bağlanmıştır. Antikor bağlanması işlemi nanoçubuklara uygulanan yöntem ile aynıdır. Kısaca antikor (21.3 g/L) öncelikle ultra saf su içinde çözülmüştür. Bu stok çözeltiden 100 µl alınarak içine 100 µl'lik fosfat tampon içinde çözünmüş N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid (EDC) (7.4×10^{-4} veya 3.7×10^{-4} M) çözeltisi ve N-hidroksisüksinimid (NHS) (5 mM) eklenmiştir. Bu antikor çözeltisi nanokabuk çözeltisine (130 mg altın atomu/L) eklenmiştir. Reaksiyon gece boyunca +4°C'de bırakılmıştır. Bir gece inkübasyon süresinden sonra reaksiyona girmemiş ürünleri ve yan ürünleri uzaklaştırmak için çözelti 13500 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek 3 kez ultrasaf su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası antikor-konjuge nanokabuklar liyofilizatör ile kurutulmuştur.

3.4 Altın Nanoparçacıkların In Vitro Değerlendirilmesi

3.4.1 Hücre Kültürü

Prostat kanser (DU 145) ve meme kanser (MCF7) hücre hatları %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 kültüründe, prostat epitel hücre hattı (RWPE-1) ise BPE (bovin pituitary extract), EGF Recombinant Human Protein ve %1 penisilin/streptomisin içeren keratinosit kültüründe 37°C' de %5 CO₂ atmosferinde çoğaltılmışlardır. Meme epitel hücre hattı (MCF 10A) ise EGF Recombinant Human Protein, insulin, hidrokortizon, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 kültüründe 37°C'de %5 CO₂ atmosferinde çoğaltılmışlardır. Hücreler %80 doluluk oranına ulaştığı zaman pasajlanmışlardır. Yüzeye tutunan hücreler % 0.05'lik Tripsin-EDTA yardımıyla kültür kabı yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Tripsin inaktivasyonu için her kültür kabına uygun miktarda besiyeri (serum içeren) eklenerek hücreler 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonraki adımda, ortam pipet ile nazikçe çekilip ve hücreler yeni besiyeri içerisinde pipetaj yapılarak tekrar süspansiyona alınmıştır.

3.4.2 MTT Hücre Canlılık Testi

Canlı hücre sayıları tripan mavi boyası ile belirlendi. Hücreler Neuber lamı ile ışık mikroskobu altında sayıldılar. Hücre süspansiyonları, 10^4 hücre/kuyucuk konsantrasyonda olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı. Hücreler 37°C 'de %5 CO_2 atmosferinde 24 saat büyümeye bırakıldı. Ardından hücreler, PBS içerisinde farklı konsantrasyondaki örnekler ile 24, 48 veya 72 saat inkübe edilmiştir. Sadece besiyeri içeren ve %5'lik PBS içeren hücreler kontrol grupları olarak kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra PBS içinde çözünmüş MTT boyası (5 mg/ml) her kuyucuğa eklenmiştir ve plakalar 3 saat inkübatörde bekletilmişlerdir. Bunun ardından hücreleri çöktürmek için plakalar, 1800 rpm'de 10 dk santrifüj edilmişlerdir. Kuyucuklardaki besiyerleri nazikçe alınmıştır. Hücrelere kuyucuk başına 100 ul olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir. DMSO eklendikten sonra plakalar 125 rpm'de 5 dk çalkalanmıştır. Çözeltilerin absorbans değerleri Varioscan cihazı ile 570 nm'de ölçülmüştür. Deneyler en az üç tekrarlı yapılmıştır.

3.4.3 Muse Hücre Analiz Cihazı ile Hücre Sayısı ve Canlılığının Belirlenmesi

Hücre sayısı ve canlılığı Muse™ Count & Viability Kit kullanılarak Muse™ Cell Analyzer ile de belirlenmiştir. Yöntem, reaktif içindeki DNA-bağlayıcı boyaların, membran bütünlüğünün hücreler tarafından kaybedilmesi ile ölü ve canlı hücre nükleusunun ayrı ayrı boyanması prensibine dayanmaktadır. 6 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekilmiştir. Hücrelerin plaka yüzeyine tutunup morfolojilerini geri kazanmaları için 24 saat beklendikten sonra üzerlerine farklı konsantrasyonlarda nanoparçacıklar, 24 veya 48 saatlik inkübasyon süresinde kontrol grubu ile birlikte inkübasyona bırakılmıştır. Deney kontrol grubuna sadece besiyeri eklenmiştir. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra kuyucuklardaki besiyeri toplanıp ayrı ayrı etiketlenmiş santrifüj tüplerine alınmıştır. Ardından her kuyucuğa 0.5'er ml % 0.05 Tripsin-EDTA eklenerek 37°C 'de yaklaşık olarak 4 dakika tutularak hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Tripsin inaktivasyonu için her kuyucuğa 2'şer ml besiyeri (serum içeren) eklenerek her kuyucuktaki hücreler ayrı ayrı etiketlenmiş santrifüj tüplerine alınmıştır. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve sonra üzerlerine 5'er ml besiyeri eklenerek resuspanse edilmişlerdir. 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine hücre süspansiyonlarından 20'şer μl ve Muse™ Count & Viability reaktifinden 380'er μl alınarak 5 dk oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edilerek Muse™ Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapılmıştır. Deneyler en az üç tekrarlı yapılmıştır.

3.4.4 Anneksin-V ile Apoptoz Analizi

Apoptoz analizi, Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit kullanılarak Muse™ Cell Analyzer ile yapılmıştır. Annexin-V hücrenin dış yüzeyine transloke olan ve fosfotidilserine (PS) bağlanabilen bir proteindir. Normalde hücre iç yüzeyine yerleşmiş olan PS, apoptotik hücrelerde hücre zarının dış yüzeyine transloke olur. Annexin-V dış yüzeye transloke olan PS'e bağlanarak apoptotik hücrelerin görülmesini sağlar. 6 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 5×10^4 hücre olacak şekilde RWPE-1, DU 145, MCF 10A ve MCF7 hücreleri ekilmiştir. Hücrelerin plate yüzeyine tutunup morfolojilerini geri kazanmaları için 24 saat beklendikten sonra besiyeleri çekip attıktan sonra hücrelerin üzerlerine 100 μ M nanoçubuk çözeltilerinden eklenerek (kontrol grupları için sadece besiyeri kullanılmıştır) 24 saatlik inkübasyon süresinde kontrol grubu ile birlikte inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra kuyucuklardaki besiyeri toplanıp ayrı ayrı etiketlenmiş santrifüj tüplerine alınmıştır. Ardından her kuyucuğa 1'er ml % 0.05 Tripsin-EDTA eklenerek 37°C'de yaklaşık 4 dakika tutularak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Tripsin inaktivasyonu için her kuyucuğa 2'şer ml besiyeri (serum içeren) eklenerek her kuyucuktaki hücreler ayrı ayrı etiketlenmiş santrifüj tüplerine alınmıştır. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve sonra üzerlerine 5'er ml besiyeri eklenerek resuspense edilmiştir. 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine hücre süspansiyonlarından 100'er μ l ve Muse™ Annexin V & Dead Cell reaktifinden 100'er μ l ilave edilerek 20 dk oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edilerek Muse™ Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapılmıştır. Yapılan analizler en az 2'şer kez tekrar edilmiştir.

3.4.5 Muse Hücre Analiz Cihazı ile Hücre Döngüsü Analizleri

Hücre döngü analizleri, Muse™ Cell Cycle Kit kullanılarak Muse™ Cell Analyzer ile yapılmıştır. Muse™ Hücre Döngüsü Kiti, propidium (PI) ve özel bir formulasyonda RNAse A içeren bir reaktif içermektedir. 6 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 5×10^4 hücre olacak şekilde normal prostat hücreleri, prostat kanseri hücreleri, normal meme hücreleri, meme kanseri hücreleri ekilmiştir. Hücrelerin plaka yüzeyine tutunup morfolojilerini geri kazanmaları için 24 saat beklendikten sonra üzerlerine 100 μ M olacak şekilde örnek çözeltilerinden eklenerek (kontrol grupları için sadece besiyeri kullanılmıştır) 24 saatlik inkübasyon süresinde kontrol grubu ile birlikte inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Önce her kuyucuğa 1'er ml PBS eklenerek yıkama yapılmış ve PBS uzaklaştırılmıştır. Ardından her kuyucuğa 1'er ml % 0.05 Tripsin-EDTA eklenerek 37°C'de yaklaşık 4 dakika tutularak hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Tripsin inaktivasyonu için her kuyucuğa 2'şer ml besiyeri (serum içeren) eklenerek her kuyucuktaki hücreler ayrı ayrı etiketlenmiş santrifüj tüplerine alınmıştır. 1000

rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve sonra üzerlerine 5'er ml besiyeri eklenerek resuspansiye edilmişlerdir. 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine hücre süspansiyonlarından 100'er µl alınarak üzerlerine 1 ml PBS eklenip karıştırılarak hücreler yıkanmış ve 300 rpm'de 5 dk santrifüj edilmişlerdir. Süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine bu kez buz soğukluğunda 100'er µl PBS eklenip yavaşça karıştırarak yine üzerlerine daha önceden hazırlanan buz soğukluğunda olan % 70'lik etanolden 200 µl eklenerek karıştırılmış ve -20°C' de en az 3 saat inkübe edilmişlerdir. Süre dolduktan sonra hücreler 300 rpm'de 5'er dk santrifüj edilmişler ve üzerlerine Muse™ Cell Cycle reaktifinden 200'er µl eklenerek oda sıcaklığında, karanlıkta 30'ar dk inkübe edilerek Muse™ Cell Analyzer cihazında ölçümleri yapılmıştır.

3.4.6 Hücre Alımının ICP-MS ile Belirlenmesi

Hücreler doluluk oranları %80 olduğunda falkon tüpler içinde toplandı ve 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler besiyeri içerisinde süspansiyon edildi. Daha sonra hücreler 10⁶ hücre/kuyu konsantrasyonlarında 6 kuyucuklu plakalar içerisine uygun besiyeri içinde aktarıldı (2 ml) ve 24 saat boyunca 37 °C' de %5'lik CO₂ atmosferinde büyütülmüşlerdir. Daha sonra hücrelere, belirli konsantrasyonlarda örnekler (PBS içinde, eklenen hacim 50 µl, %2,5) eklenmiş ve belirli süreler boyunca inkübe edilmiştir. Sadece besiyeri içinde hücreler ve sadece besiyeri içinde altın nanoparçacıklar kontrol grupları olarak kullanıldı. İnkübasyon süresi dolduktan sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuk ikişer kez PBS çözeltisi ile yıkandı. PBS ortamdan uzaklaştırıldı, yıkanan hücrelerin üzerine lizis tamponu (1X) eklendi ve yarım saat bekleme süresinin ardından hücreler mikroskopta incelendi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıklarına emin olunduktan sonra falkon tüplere aktarıldı.

Hücre süspansiyonu, İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektroskopisi (ICP-MS) ölçümlerine kadar +4 °C'de saklandı. ICP-MS ölçümlerinde hücre alımlarının belirlenmesi için, hücreler, sulu HCl, HNO₃ ve H₂O₂ karışımı içinde 180°C'de mikrodalga fırın içinde bozunduruldu. Bozundurmada çıkarılan örnekler 20 ml'ye seyreltildi ve ICP-MS ile altın içerikleri ölçüldü. Her deney seti, kendi içinde en az 3 tekrarlı olarak en az 2 bağımsız deney seti olarak yapılmıştır.

3.4.7 Hücre Alımının Akış Sitometresi ile Belirlenmesi

Antikor bağlı olan ve olmayan nanoparçacıkların hücreler tarafından alımları, ICP-MS tekniği dışında akış sitometresi (BD, FACSCanto, USA) ile de belirlenmiştir. Bu deneylerde Alexa Fluor 647 işaretli nanoparçacıklar kullanılmıştır. Antikor konjuge edilmiş

nanoparçacıkların test edildiği durumda öncelikle antikolar Alexa Fluor 647 ile floresans işaretlenmiştir ve bu işaretli antikolar aşağıda anlatılan yöntemle nanoparçacıklara konjuge edilmiştir.

Antikolar, floresans boya ile kısaca şöyle işaretlenmiştir: Alexa Fluor 647 floresans boya konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde 100 µl DMSO içerisinde çözüldü ve 10 tüpe eşit olarak bölündü. 50 µl antikor (21.3 mg/ml) NaHCO₃ (0.1 M, pH 8) içinde 1000 µl'ye seyreltildi. Antikor ve boya EDC/Sulfo-NHS kimyası kullanılarak (1mg/80 µl EDC, 1mg/ 20 µl Sulfo-NHS) çözelti karanlık bir odada 4 saatlik inkübasyona bırakıldı. Çözelti daha sonra karanlıkta 3 gün boyunca 50000 MWCO membran kullanılarak diyaliz edilmiş ve en son basamakta liyofilizasyon ile kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası boya ile işaretlenmiş antikolar, PEG kaplı altın nanoparçacıklar ile tekrar EDC/Sulfo NHS kimyası kullanılarak (50mM EDC, 10 mM Sulfo-NHS) konjuge edilmişlerdir.

Antikor konjuge edilmemiş nanoparçacıkların test edildiği durumda ise nanoparçacıklar, floresans boya ile kısaca şöyle işaretlenmiştir: NH₂-PEG-SH su içerisinde çözüldü (1ml 1mM) ve üzerine 2 µl stok floresans boya çözeltisinden eklendi. Reaksiyon 24 saat sonra 3 gün boyunca 3500 MWCO membran kullanılarak diyaliz edildi. Diyaliz işleminden sonra polimer-boya konjugatı liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası boya ile işaretlenmiş PEG, altın nanoparçacıklar ile 3.3.2'de anlatıldığı şekilde konjuge edilmişlerdir.

Antikor bağlı olan ve olmayan nanoparçacıkların hücreler tarafından alımlarının belirlenmesinde Bölüm 3.4.6'da anlatıldığı şekilde hücreler ile floresans işaretli örnekler inkübe edilmiştir. Kontrol grupları olarak PBS kullanılmıştır. Hücreler 12 kuyucuklu plakalar içerisinde 24 saat 37 °C' de %5'lik CO₂ atmosferinde inkübasyona bırakılmıştır. Antikor konjuge olan ve olmayan floresans boya bağlı altın nanoyapıların hücreye alımları değişen inkübasyon sürelerinde incelendi. Inkübasyon süresi dolduktan sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri falkon tüplere alındı ve hücreler PBS ile yıkandı. Hücreler tripsin ile toplanarak santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve elde edilen pellet soğuk PBS içerisinde çözüldü.

3.4.8 Fototermal Etkinin Belirlenmesi

Nanoparçacık örneklerinin fototermal etkisi öncelikle nanoparçacıkların varlığında hücre içermeyen sulu çözeltilerin sıcaklık artışlarının izlenmesi ile belirlendi. Kısaca, farklı konsantrasyonlarda altın nanoparçacık içeren PBS çözeltileri, sırasıyla, 100 mW, 200 mW ve/veya 500 mW güç yoğunluğunda 780 nm ve 808 nm diyot lazer ışımaya belirli süre boyunca maruz bırakıldı. Çözeltilerdeki sıcaklık artışı takip edildi. Bu deneyler sonucu en yüksek sıcaklık artışı sağlanan ışımaya süresi ve lazer dalga boyu belirlenerek hücre kültürleri

üzerinde gerçekleştirilen fototermal etki deneylerinde kullanıldı. Hücre hatları ile gerçekleştirilen fototermal etki deneyleri kısaca şöyledir: Hücre hatları $7,5 \times 10^3$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Her kuyucuk içindeki son hacim 200 μ l olarak ayarlandı. Sadece hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. Hücrelerin plaka yüzeyine tutunup morfolojilerini geri kazanmaları için 24 saat beklendikten sonra üzerlerine belirlenen konsantrasyonda nanoparçacıklar ilave edilip 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Nanoçubuk ve nanokabuk örnekleri için inkübasyon süreleri dolduktan sonra besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler iki kez PBS ile yıkanıp, taze besiyeri eklenmiş ve kuyucuklara 808 nm (500 mW) dalga boyunda lazer uygulanmıştır. Bazı nanokabuk örnekleri için ise inkübasyon süresi dolduktan herhangi bir yıkama işlemi gerçekleştirilmeden kuyucuklara 808 nm (500 mW) dalga boyunda lazer uygulanmıştır. Lazer uygulaması yapıldıktan sonra hücrelerin canlılığı MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Deneyler üç tekrarlı yapılmıştır.

3.5 Altın Nanoparçacıkların In Vivo Değerlendirilmesi

3.5.1 Sağlıklı Farelerde Biyodağılım

Öncelikle altın nanoparçacıkların vücut içerisindeki biyodağılımı deney (n=2) ve kontrol (n=2) grupları olmak üzere sağlıklı dişi farelerde incelenmiştir. Tüm deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar yerel etik kurulunca belirtilmiş etik kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı farelerde gerçekleştirilen biyodağılım deneylerinde, PEG'lenmiş altın nanoçubuklar PR2 (boy:en=4.33), PR3 (boy:en=7) ve DPPC/DSPE-PEG karışımı esaslı nanokabuklar kullanılmıştır. Nanoçubuklar, 1.2 mM (yaklaşık doz 1.5 μ g altın/g fare) ve 2.8 Mm (yaklaşık doz 3.5 μ g altın/g fare) olarak iki farklı dozda denenmiştir. Nanokabuklar ise 2.8 Mm (yaklaşık doz 3.5 μ g altın/g fare) şeklinde tek dozda uygulanmıştır. Deneyler kısaca şöyledir: 12-14 haftalık dişi farelere anestezi işlemi uygulanmadan önce tartılmışlardır. Farelere 300 μ l ketasol uygulanarak anestezi altına alınmıştır. Enjeksiyon işleminin başarılı bir şekilde yapılabilmesi kuyruk damar yolu ısı lambası veya sıcak su uygulanarak genişletilmiştir. Kontrol grubuna 200 μ l steril PBS ve deney grubuna 200 μ l steril PBS içerisinde değişen konsantrasyonlarda PEG'lenmiş altın nanoçubuklar (PR2 veya PR3) veya altın nanoçubuklar içeren DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabuklar (LR) enjekte edilmiştir. Hayvanların enjeksiyon sırasında şoka girmesini engellemek için enjeksiyon kısa sürede gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon işleminden 6, 12 ve/veya 24 saat sonra kontrol ve deney hayvanlarından organlar ve kan örnekleri toplanarak tartılmıştır. Toplanan örnekler sıvı nitrojen içerisinde dondurulmuş ve oda sıcaklığında yüksek vakum altında kurutulmuştur. Kurutulan örnekler içerisindeki altın miktarlarının ICP-MS analizi ile belirlenmesi için her örneğe HCl, HNO₃, ve H₂O₂ karışımı ilave edilerek mikrodalga bozundurma prosedürü uygulanarak ICP-MS ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.5.2 Tümörlü Farelerde Biyodağılım

Projede öncelikle erkek nude farelerde DU 145 hücrelerinin enjeksiyonu ile prostat tümörü oluşturulmuştur. Prostat tümörü oluşturmak amacıyla 2×10^6 DU-145 hücresi, 8 haftalık erkek nude farelerin arka bacak ile kalça arasına enjekte edildi. Enjeksiyonlar 100 μ l 1:1 Matrigel:PBS karışımı içinde yapıldı. Tümör oluşumu 7 ila 10 gün içinde meydana geldi. Öncelikle fluoresans ile işaretlenmiş serbest monoklonal antikor (4.26 mg/200 μ l)'un biyodistribüsyonu IVIS mikroskobu ile 24 saat boyunca belirli aralıklar ile canlı hayvanda incelendi. 24 saat sonunda fareler öldürülerek akciğer, karaciğer, beyin, dalak, böbrek ve kan dokuları toplandı. Kontrol grubuna 200 μ l steril PBS ve deney grubuna 200 μ l steril PBS içerisinde çözülmüş serbest antikor, antikor bağlı PEGlenmiş altın nanoçubuklar (Ab-PR2) ve DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabuklar (Ab-LR) i.v. enjekte edilmiştir. Bu deneylerde antikor ve nanoparçacıklar Alexa Fluor 647 fluoresans boyası ile etiketlenmiştir. Her iki nanoparçacık (Ab-PR2 ve Ab-LR) türünün de uygulanan dozu 132 μ g Au/200 μ l (3.5 mM) olarak ayarlanmıştır. Biyodistribüsyon IVIS mikroskobu ile 24 saat boyunca belirli aralıklar ile canlı hayvanda incelenmiştir. Ayrıca enjeksiyon işleminden 24 saat sonra kontrol (n=2) ve deney hayvanlarından (n=3) akciğer, karaciğer, beyin, dalak, böbrek ve tümör örnekleri toplanmıştır. Toplanan organ örnekleri ICP-MS analizi öncesi liyofilizatörde 3 gün süresince kurutulmuşlardır.

Prostat tümörüne sahip nude farelerde yapılan deneylerden sonra dişi nude farelere MDA-MB-231-Luc2-GFP hücrelerinin enjeksiyonu ile meme tümörü oluşturulmuştur. Meme tümörü oluşturmak amacıyla 2×10^6 MDA-MB-231-Luc2-GFP hücresi 8 haftalık dişi nude farelerin meme bölgesine enjekte edildi. Meme tümörünün oluşumu yaklaşık 15-20 gün içerisinde meydana geldi. Oluşturulan deney setinde PBS-lazer ve PBS+lazer kontrol grubu, PR2 ve Ab-PR2 grubu olmak üzere 4 ana grup vardır. Nanoçubuk gruplarında 3 hayvan, PBS gruplarında ise 2 hayvan kullanılmıştır. Ab-PR2, Alexa Fluor 647 fluoresans boyası ile etiketlenmiş antikor ile hazırlanmıştır. PR2 ise, aynı boya ile etiketlenmiş PEG ile hazırlanmıştır. Uygulanan nanoçubukların dozu 132 μ g Au/200 μ l (3.5 mM) olarak ayarlanmıştır. Biyodistribüsyon IVIS mikroskobu ile 24 saat boyunca belirli aralıklar ile canlı hayvanda incelenmiştir. Ayrıca enjeksiyon işleminden 24 saat sonra kontrol (n=2) ve deney hayvanlarından (n=3) akciğer, karaciğer ve tümör örnekleri toplanmıştır. Toplanan organ örnekleri ICP-MS analizi öncesi liyofilizatörde 3 gün süresince kurutulmuşlardır.

3.5.3 Tümörlü Farelerde Fototermal Etkinin Belirlenmesi

Öncelikle prostat kanseri nude farelere Ab-PR2 (132 μ g Au/200 μ l PBS; 3.5 mM) ve Ab-LR (270 μ g Au/200 μ l PBS; 8.2 mM) kuyruktan enjeksiyon yapılmıştır. Kontrol grubu olarak

tümörlü farelere sadece PBS (200 µl) enjeksiyonu yapılmıştır. Tüm farelere 3'er gün arayla aynı dozda toplam 3 enjeksiyon yapılmıştır. Her enjeksiyondan 8 ve 24 saat sonra tüm farelerde izofluran anestezi yapıp karanlık bir ortamda tümör bölgesine lazer (808 nm, 500 mW) 10 dakika süre ile uygulanmıştır. Deney düzeneği Şekil 3.1'de gösterilmektedir. Kontrol grubu fareler, kendi içerisinde lazer uygulaması yapılan (PBS+lazer) ve lazer uygulaması yapılmayan (PBS-lazer) olarak ikiye ayrılmıştır. Deney planındaki tüm deney grupları (PBS-lazer kontrol grubu hariç) 2 tekrarlı olarak yapılmıştır (n=2). PBS-lazer kontrol grubunda tek denek kullanılmıştır. İlk enjeksiyonu takip eden 7 gün boyunca farelerdeki tümör hacimleri elektronik kumpas ile ölçülmüştür. Aynı zamanda farelerin ağırlıkları düzenli olarak takip edilmiştir.



Şekil 3.1. In vivo fototermal etki için lazer uygulama deney düzeneği

Prostat tümörüne sahip nude farelerde fototermal etkinin belirlenmesinden sonra meme tümörüne sahip dişi nude farelerde yukarıdakine benzer şekilde fototermal etki belirlenmiştir. Meme kanseri nude farelere PR2 ve Ab-PR2 (132 µg Au/200µl PBS; 3.5 mM) kuyruktan enjeksiyon yapılmıştır. Kontrol grubu olarak tümörlü farelere sadece PBS (200 µl) enjeksiyonu yapılmıştır. Tüm farelere 5'er gün arayla aynı dozda toplam 3 enjeksiyon yapılmıştır ve tüm hayvanlar ilk enjeksiyonlarından sonra 15 gün boyunca tümör hacimlerindeki değişimler ve ağırlıkları takip edilmiştir. İlk 7 günlük takipte her enjeksiyondan 24 saat sonra ve takip eden ikinci 7 günlük zaman diliminde ise her enjeksiyondan 8 ve 24 saat sonra tüm farelerde izofluran anestezi yapıp karanlık bir ortamda tümör bölgesine lazer (808 nm, 500 mW) 10 dakika süre ile uygulanmıştır. Deney düzeneği Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Kontrol grubu fareler, kendi içerisinde lazer uygulaması yapılan (PBS+lazer) ve lazer uygulaması yapılmayan (PBS-lazer) olarak ikiye ayrılmıştır. Deney planındaki tüm kontrol grupları (n=2) 2 tekrarlı ve deney grupları (n=3) 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.5.4 Tümörlü Fare Dokularında Histopatolojik İncelemeler

3.5.4.1 Doku Takibi

Meme tümörüne sahip kontrol ve deney gruplarından fototermal tedavi sonrası toplanan tümör dokusu, karaciğer, akciğer, dalak, böbrek ve beyin dokuları hazırlanan % 4 fosfat tamponlu paraformaldehit (pH 7.4) çözeltisi içerisinde 24 saat bekletilerek tespit edilmiştir. Tespit aşaması bittikten sonra dokular bir gece boyunca fosfat tamponu (PBS) içerisinde yıkama yapılarak tespit solusyonu uzaklaştırılmıştır. Daha sonra rutin histolojik takip işlemleri uygulanmıştır. Rutin doku takibinde öncelikle yükselen derecelerdeki alkol serisi %60 alkolden başlanarak, kontrollü olarak, ortalama 1 saat süreyle ve sırasıyla %70, %80, % 96, %100 (I), % 100 (II) ve %100 (III) şeklinde uygulanmıştır. Bu aşamayı takiben şeffaflandırma işlemi yapılmıştır. Ksilol I, ksilol II ve ksilol III'de 15'er dakika bekletilmiştir. Daha sonra doku örnekleri 30 dk parafinde bekletilmiştir. Parafinden çıkarılan örnekler erimiş parafin blokların içerisine gömülmüştür. Parafin bloklardan, mikrotomda (Leica MR 21455) 5 µm kalınlığında kesitler poly-L-lysin'li lamlara alınmıştır.

3.5.4.2 Hematoksilen & Eozin Boyama

Kesiti alınan dokular Hematoksilen-eozin boya ile boyanmıştır. Dokular kesildikten sonra, 60 °C 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra dokular 30'ar dk ksilol-I-II-III aşamalarından geçirilmiştir. Ksilol aşamasından sonra azalan alkol serilerinde (%100-95-80) 2'şer dk bekletilmiştir. Alkol serilerinden sonra, kesitler distile suda yıkanmıştır. Kesitler hematoksilen boyası ile 3 dk muamele edilmiştir. Sonrasında, akarsu içerisinde 5 dk bekletilmiştir. Hafif pembe renk oluşana kadar asit alkol içerisinde bekletildikten sonra akarsuda yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra, kesitler mor renk oluşana kadar amonyaklı su ile muamele edildikten sonra iyice yıkanmıştır. Daha sonra, kesitler eozin boyası (2.5dk) ile boyanmıştır. Eozin boyamadan sonra, artan alkol serilerinden (%95-100-100) geçirilmiştir. Bunu takiben hücreler 15'er dk ksilol serilerinden (ksilol-I-II-III) geçirilmiştir. Sonrasında, kesitler entellan ile kapatılmıştır. Kapatma işleminden sonra, doku Olympus BX51 mikroskobu yardımıyla görüntülenmiştir.

3.5.5 Tümörlü Farelerde RAMAN Spektroskopisi ile Görüntüleme

Meme tümörüne sahip dişi nude farelerde Raman spektroskopisi ile görüntüleme yapılmadan 24 saat önce kontrol grubuna (n=2) 200 µl PBS ve deney grubuna (n=2) Raman kromoforu bağlı Ab-PR2 (132 µg Au/200µl PBS; 3.5 mM) kuyruktan enjeksiyon yapılmıştır. Raman spektrumları Olympus görüntüleme sistemine sahip Renishaw Raman mikroskobunun

5x objektif ve 150 mW gücündeki 830 nm lazeri kullanılarak alınmıştır. Raman spektrumları 470 cm^{-1} ve 2000 cm^{-1} aralığında alınmıştır. Raman Spektroskopisi ile yapılan görüntülemeye ilişkin deney düzeneği Şekil 3.2'de gösterilmektedir. Görüntüleme işlemine tüm deney grubundaki hayvanlara 20 μl ketamin ve ksilaz karışımı verilerek bayıltıldıktan sonra başlanmıştır ve kontrol ve deney grubundaki hayvanların akciğer, karaciğer, dalak, böbrek ve tümör dokularının Raman spektroskopisi altında görüntüleme işlemi yapılmıştır.



Şekil 3.2. RAMAN spektroskopisi ile görüntüleme deney düzeneği.

3.6 İstatistiksel Analizler

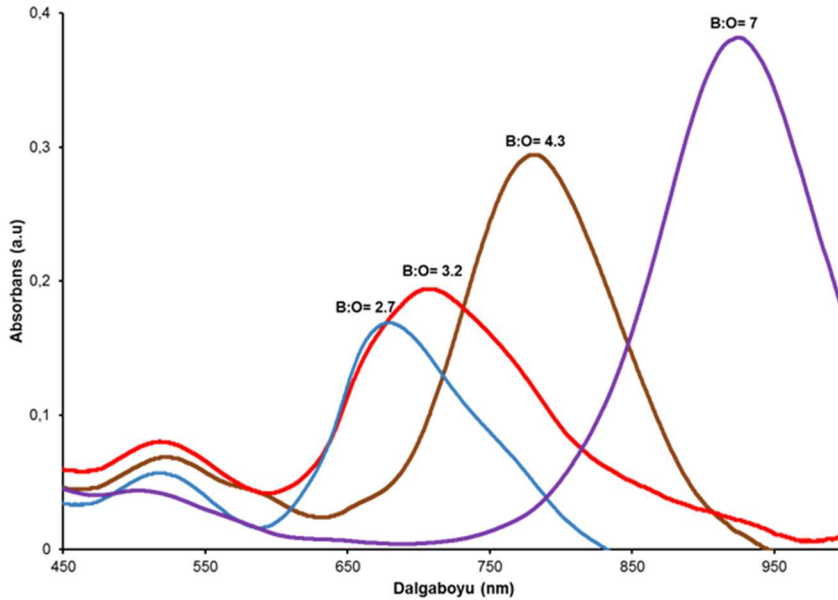
Elde edilen verilerin büyüklüğünün uygun olduğu durumda verilerin istatistiksel analizi çift taraflı t-test analizi ile yapılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. En az üç tekrar ile yapılan deneylerin sonuçları ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Nanoçubuklar İle Elde Edilen Bulgular

4.1.1 Nanoçubukların Sentezi, PEG ile Modifikasyonu ve Karakterizasyonu

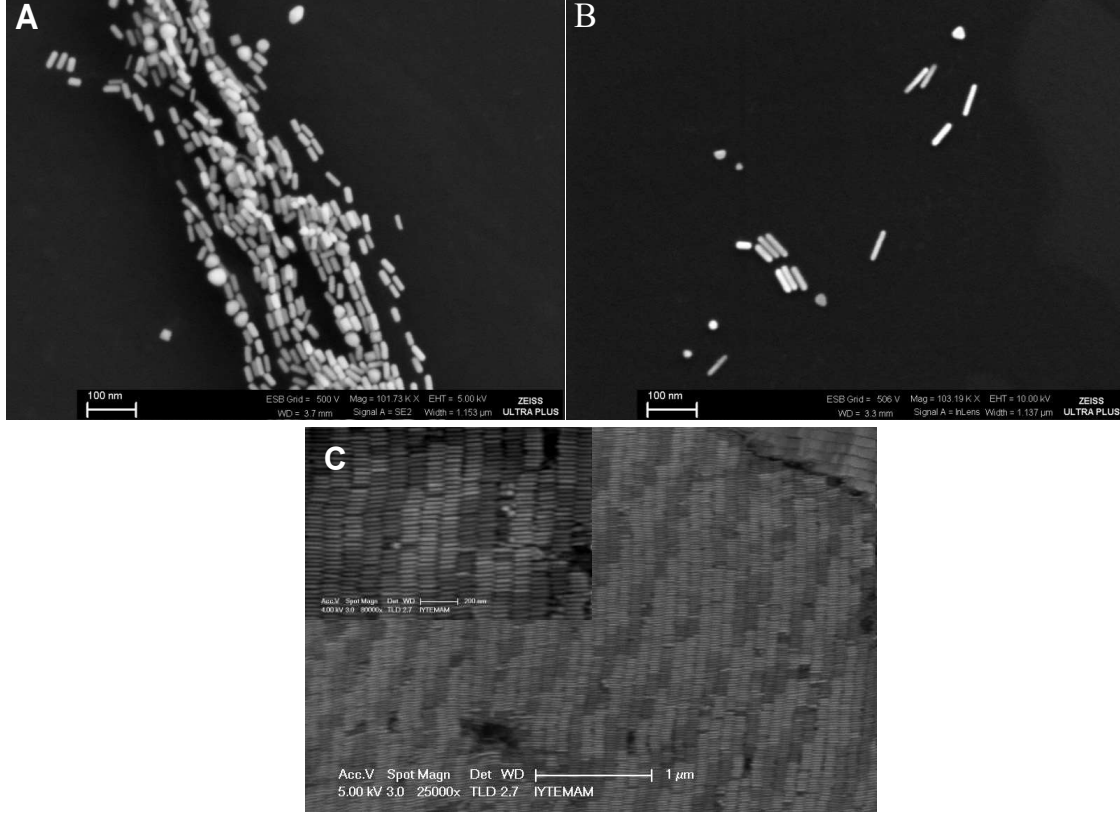
Değişen boy:en oranlarında altın nanoçubuklar sentezlenmiştir. Sentezlenen nanoçubukların karakterizasyonu öncelikle LSPR/UV-vis spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Altın nanoçubuklar spesifik iki absorpsiyon pikine sahiptir. Bunlardan ilki altın nanoçubukların çapı ile ilgili olan enine absorpsiyon pikidir. Diğeri ise boyu ile ilgili olan boyuna absorpsiyon pikidir. Nanoçubukların boylarının artması ile ikinci boyuna absorpsiyon pikinin kırmızı bölgeye kayması beklenir. Şekil 4.1 farklı uzunluklara sahip altın nanoçubukların LSPR spektrumunu göstermektedir. İlk pik olan enine plazmon bandı, değişen uzunluklardaki nanoçubuk örneklerinin tümünde yaklaşık olarak 510-530 nm aralığında gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, altın nanoçubukların çapının değişmediğini gösterir. İkinci pik olan boyuna plazmon bandı çubuk yapısının oluştuğunu gösterir. Bu pik, AgNO_3 konsantrasyonu değişimi ile birlikte 670 nm'den 920 nm'e kaymıştır. Enine plazmon bandının kırmızıya kayma miktarı nanoçubukların boyunun artması ile artar.



Şekil 4.1. Farklı boy:en oranlarındaki (B:O) altın nanoçubukların LSPR/UV-vis spektrumları.

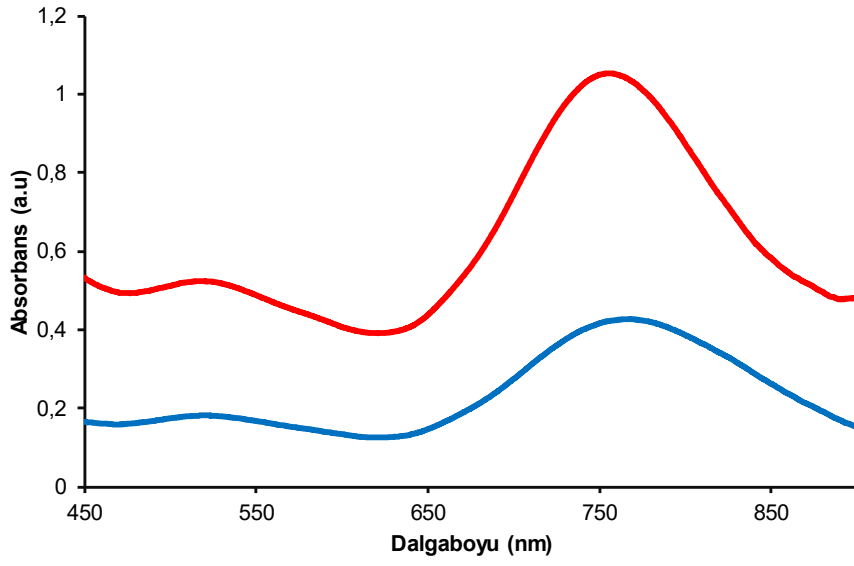
Farklı boy:en oranlarında üretilmiş olan nanoçubuklar taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir (Şekil 4.2). Bu inceleme sonucu nanoçubukların eni yaklaşık 15 nm, boyu ise ortalama 40 ve 65 nm olarak bulunmuştur. Bu da boy: en oranı olarak yaklaşık 2.66 (R1) ve

4.33 (R2) olarak hesaplanmıştır. Yüksek boy:en oranında (R3) üretilmiş olan nanoçubukların yaklaşık boyu 105 nm, eni 15 nm olup, boy:en oranı 7'dir (Şekil 4.2). Ayrıca SEM görüntüleri altın nanoçubukların yüksek konsantrasyonda sentez edildiklerini göstermektedir.

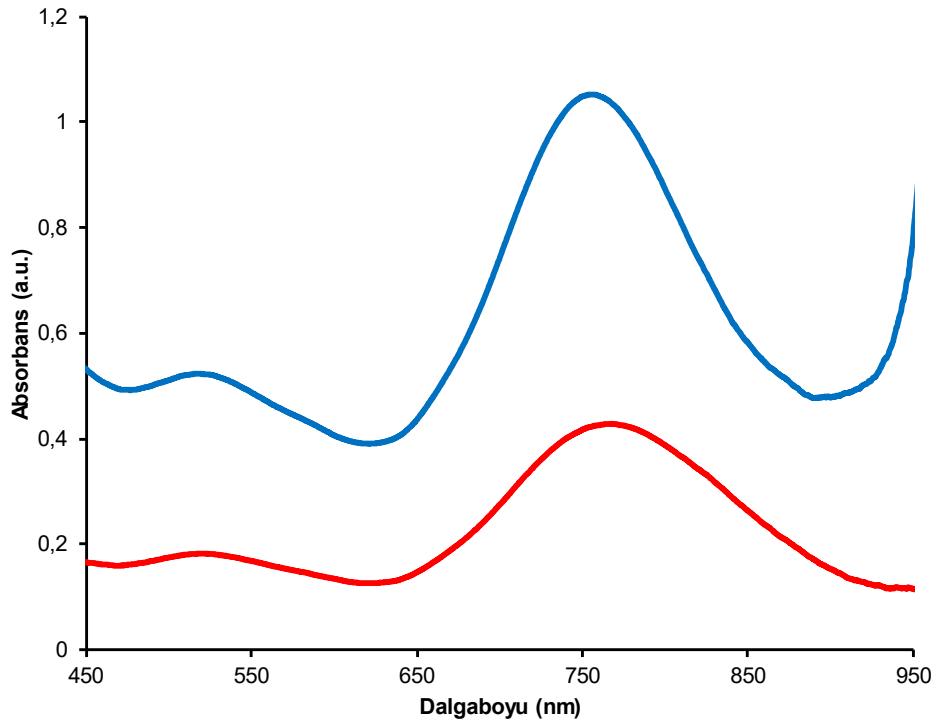


Şekil 4.2. Farklı boy:en oranlarında hazırlanmış altın nanoçubukların merceği SEM görüntüleri. Boy:en oranı= 2.66 (A), 4.33 (B) ve 7.0 (C).

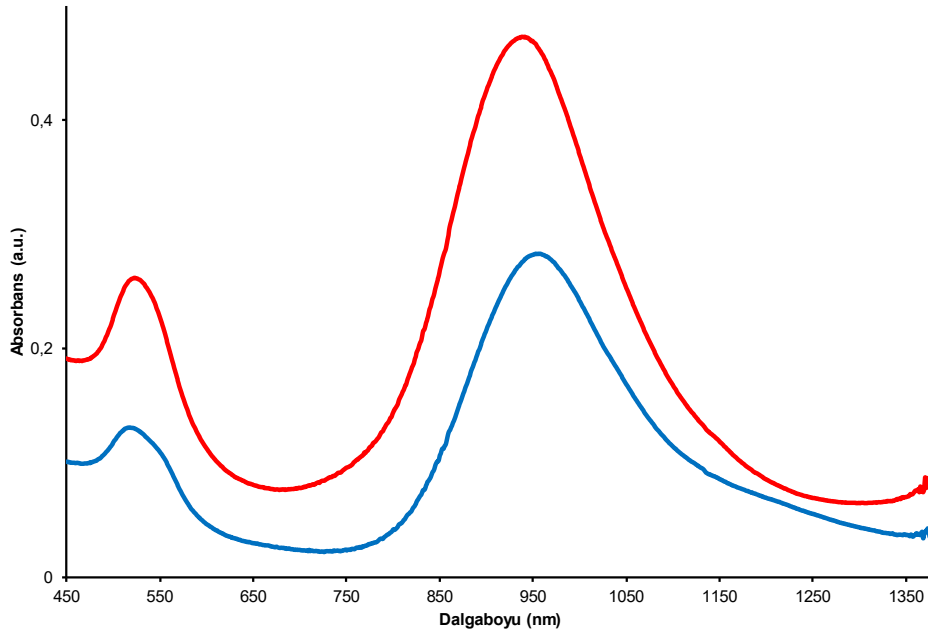
Altın nanoçubuklar istenilen boylarda yüksek verimde üretildikten sonra nanoçubukların yüzeyi PEG ile modifiye edilmiştir. PEG-modifiyeli altın nanoçubukların karakterizasyonu LSPR/UV-vis spektroskopisi, Raman spektroskopisi, XPS, SEM, AFM ve DLS/zeta potansiyel ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. PEG'leme (mPEG-SH:NH₂-PEG-SH, 4:1) öncesi ve sonrası örnek LSPR spektrumları Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5 üzerinde gösterilmektedir. PEG'leme sonrası boylamsal pik 661 nm'den (mavi pik) 668 nm'ye (Şekil 4.3) ve 760 nm' den 768 nm'ye kayarken (Şekil 4.4), enlemsel pik 520 nm de kalmıştır. Şekil 4.5'te boy:en oranı 7 olan altın nanoçubukların PEG'leme sonrası boyuna plazmon bandı 920 nm'den 930 nm'ye kaydığı gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Boy:en oranı= 2.82 olan nanoçubukların PEG'lenme öncesi (mavi) ve sonrası (kırmızı) alınmış LSPR spektrumları.



Şekil 4.4. Boy:en oranı= 3.52 olan nanoçubukların PEG'lenme öncesi (mavi) ve sonrası (kırmızı) alınmış LSPR spektrumları.



Şekil 4.5. Boy:en oranı= 7 olan nanoçubukların PEG'lenme öncesi (mavi) ve sonrası (kırmızı) alınmış UV-Vis spektrumları.

Altın nanoçubukların (R2, boy:en oranı= 4.33) PEG ile modifiye edilmesi öncesi ve sonrası alınmış örnek XPS ölçümlerine ait sonuçlar Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de özetlenmektedir. Tablo 4.1'de CTAB kaplı altın nanoçubukların XPS analiz sonuçları görülmektedir. PEG'leme öncesi N1s taramasında alınan azot atomu sinyalleri CTAB molekülü yapısında bulunan azot atomlarından kaynaklanmaktadır. PEG ile modifikasyonunun ardından yapılan XPS analizlerinden elde edilen veriler Tablo 4.2'de görülmektedir. Bu ölçümlerde PEG moleküllerinin altın yüzeyi ile etkileşime giren S atomu gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra CTAB molekülünü altına bağlayan Br atomlarına ise rastlanmamıştır.

Tablo 4.1. CTAB kaplı altın nanoçubukların PEG'lenme öncesi XPS analizi sonuçları

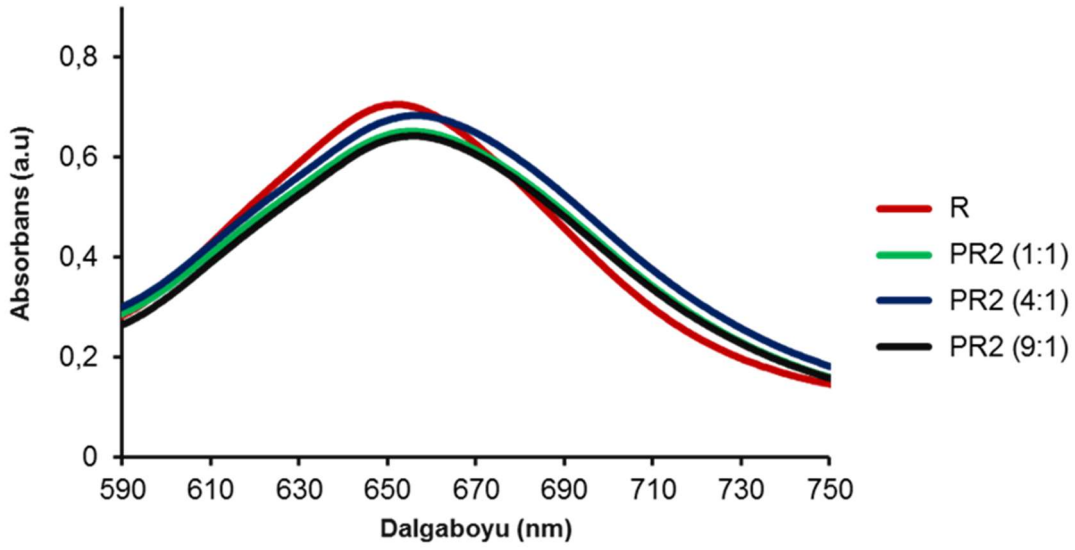
Element	Bağlanma Enerjisi (eV)	Atomik %
Br3d	68.01	1.71
C 1s	285.22	54.70
Ag 3d	368.09	0.37
N 1s	402.42	2.47
O 1s	532.99	13.58
Au4f7	84.16	4.65
Si2p	99.92	22.52

Tablo 4.2. CTAB kaplı altın nanoçubukların PEG'lenme sonrası XPS analizi sonuçları

Element	Bağlanma Enerjisi (eV)	Atomik %
Br3d	68.01	1.71
C 1s	285.22	54.70
Ag 3d	368.09	0.37
N 1s	402.42	2.47
O 1s	532.99	13.58
Au4f7	84.16	4.65
Si2p	99.92	22.52

Altın nanoçubukların (R2, boy:en 4.33) değişen oranlarda PEG karışımı ile fonksiyonelleştirme işleminden önce ve sonra alınmış LPSR spektrumları Şekil 4.6'da verilmektedir. En yüksek dalga boyu kayması mPEG-SH: amin-PEG-SH oranının 4:1 olduğu durumda yaklaşık 10 nm olarak elde edilmiştir. Bu da PEG kaplamasının en yoğun olduğu durumu göstermektedir. Bu nedenle in vitro/in vivo çalışmalar için hazırlanan örneklerde bu oranın kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.3'de altın nanoçubukların (R2, boy:en 4.33) değişen oranlarda PEG karışımı ile fonksiyonelleştirme işleminden önce ve sonra DLS/zeta potansiyelleri ölçüm sonuçları gösterilmiştir. Altın nanoçubuklar fonksiyonelleştirilmeden önce zeta potansiyeli pozitif olarak ölçülmüştür. PEG karışımı ile etkileşmeden sonra zeta-potansiyeli pozitiften negatif değerlere kaymıştır. Zeta-potansiyelinde meydana gelen azalma, hidrofilik uç grup olarak kuaterner amonyuma sahip CTAB moleküllerinin uzaklaştırılmış olması ve yerine PEG moleküllerinin bağlanmış olmasına atfedilmiştir. PEG karışımı ile fonksiyonelleştirilmeden sonra altın nanoçubukların beklendiği gibi katyonik özelliği azalmıştır (Liopo vd., 2012). Zeta-potansiyelde meydana gelen azalma, CTAB moleküllerinin uzaklaştırılmış olması ve yüzeye PEG moleküllerinin başarılı bir şekilde bağlanmış olmasına atfedilmiştir. DLS ölçümleri ile PEG'li altın nanoçubukların hidrodinamik boyutu 13 nm olarak ölçülmüştür. Elde edilen bu değer nanoçubukların SEM görüntüsünde ölçülen en değeri ile uyum sağlamaktadır.



Şekil 4.6. Altın nanoçubukların (R2, boy: en 4.33) değişen mPEG-SH:amin-PEG-SH oranlarında PEG karışımı ile fonksiyonelleştirme işleminden önce ve sonra alınmış LSPR spektrumları.

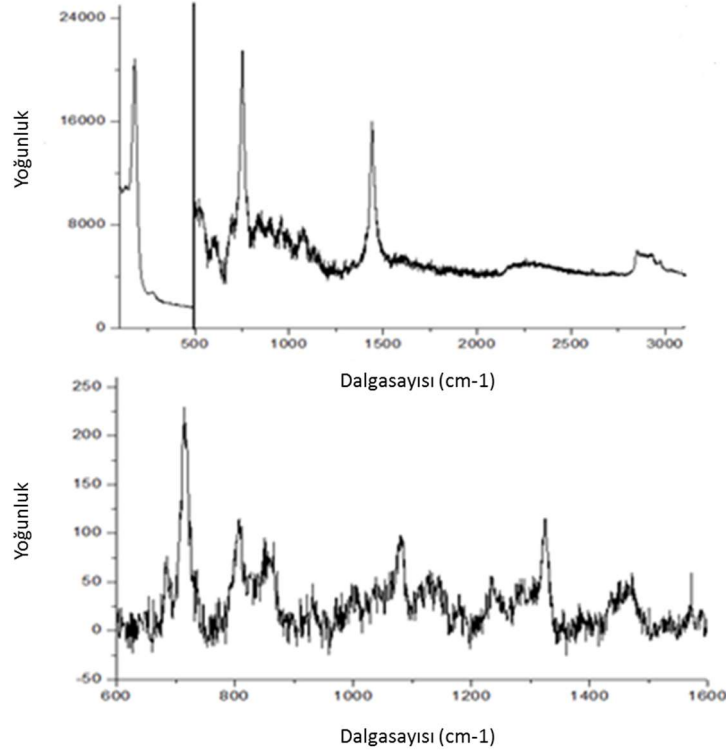
Tablo 4.3. Altın nanoçubukların (R2, boy:en 4.33) değişen mPEG-SH:amin-PEG-SH oranlarında PEG karışımı ile fonksiyonelleştirme işleminden önce ve sonra zeta potansiyel ve hidrodinamik boyut değerleri (n=3)

Örnek	Zeta Potansiyel (mV) (Su)	Sayıcı Boyut (nm) (PBS)
R2 (PEG'leme öncesi, CTAB kaplı)	11.1±0.2	261 ±19
PR2 (1:1) (mPEG-SH:SH-PEG-NH ₂)	-6.6±0.1	--
PR2 (4:1) (mPEG-SH:SH-PEG-NH ₂)	-8.8±0.2	13±0.1
PR2 (9:1) (mPEG-SH: SH-PEG-NH ₂)	-13.8±0.3	--

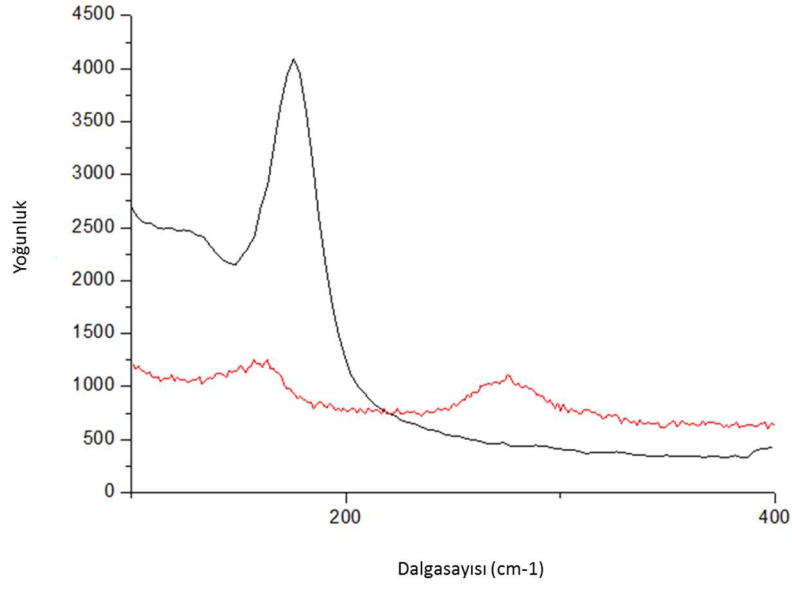
Altın nanoçubukların PEG karışımı ile fonksiyonelleştirme işlemi öncesi ve sonrası alınan Raman ölçümleri Şekil 4.7'de görülmektedir. Şekil 4.7'de üst spektrum PEG ile fonksiyonelleştirme işlemi öncesini göstermektedir. Sentezlenme aşamasında kullanılan katyonik yüzey aktif malzeme CTAB, altın nanoçubukların yüzeyine Au-Br etkileşimi ile tutunmaktadır. Altın nanoçubukların 785 nm lazer ile uyarılması ile elde edilen spektrumda, CTAB'in karakteristik pikleri kuvvetli bir şekilde görülmektedir (Au-Br etkileşiminden kaynaklanan 174 cm⁻¹'deki pik). Bunun dışında, görece düşük yoğunluklu, 759 cm⁻¹ ve 1444 cm⁻¹ noktalarındaki pikler sırasıyla p(CH₂) ve CH₂, CH₃ deformasyon bağ titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 2800 cm⁻¹ ve 3000 cm⁻¹ arasındaki sinyal molekül yapısında bulunan

karbon zincirinden ve bu zincir üzerindeki $\nu_s(\text{CH}_2)$ (2847 cm^{-1}) titreşiminden kaynaklanmaktadır. Bu pikler literatürde daha önce de benzer örnekler için gözlenmiştir (Lee vd., 2011).

Altın nanoçubukların PEG karışımı ile yüzey modifikasyonu işleminin ardından alınan Raman ölçümleri Şekil 4.7 alt spektrumunda görülmektedir. 713 cm^{-1} çevresinde gözlemlenen pikler C-C asimetrik bükülme titreşimlerinden gelen sinyallerdir. 807 ve 857 cm^{-1} arasında kalan bölge ise iskelet titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1350 cm^{-1} çevresindeki pikler CH_2 dalgalanma ve sallanma titreşimlerinden gelen sinyallerdir. Şekil 4.8'de nanoçubukların PEG'leme öncesi Au-Br bağına işaret eden sinyali kuvvetli bir şekilde 174 cm^{-1} 'de görülmektedir. Yüzeyin PEG ile modifikasyonundan sonra ise, bu sinyalin çok zayıflayıp yerini Au-S bağından kaynaklanan 270 cm^{-1} civarındaki sinyale bıraktığı görülmüştür (Liao ve Hafner, 2005).

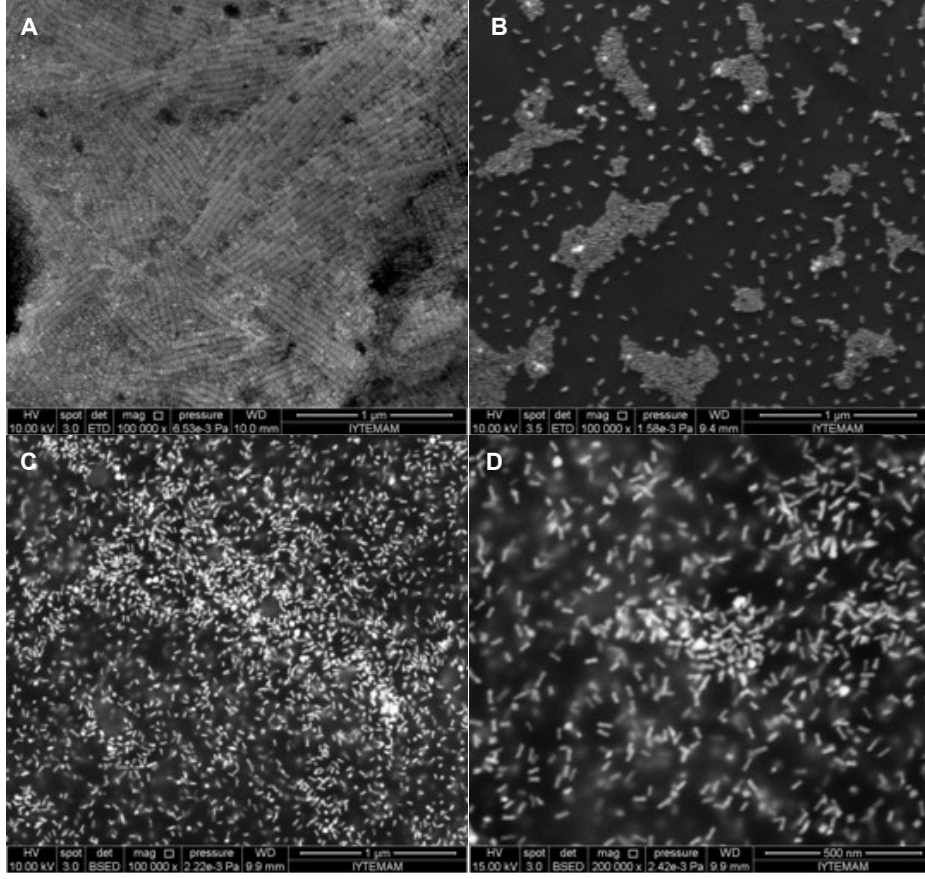


Şekil 4.7. Altın nanoçubukların PEG karışımı ile yüzey modifikasyonu öncesi (üst) ve sonrası (alt) Raman spektrumları.



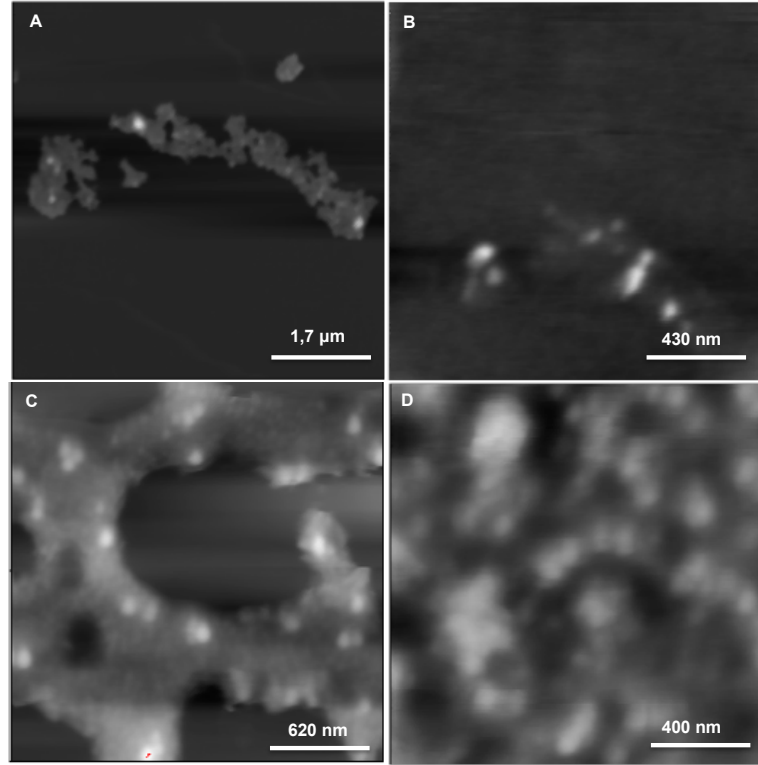
Şekil 4.8. CTAB stabilize (siyah pik) ve PEG karışımı ile modifiye edilmiş (kırmızı pik) altın nanoçubukların 0-400 cm^{-1} dalga boyu aralığında Raman spektrumları.

Şekil 4.9, altın nanoçubukların PEG karışımı (4:1) ile fonksiyonelleştirilmeden önce ve sonraki örnek SEM görüntülerini içermektedir. Şekil 4.9A ve B saf altın nanoçubukların fonksiyonelleştirilmeden önce SEM görüntüleridir. Elde edilen görüntülere göre altın nanoçubukların bölgesel olarak kümeleştiği bazı bölgelerde ise tek tek yerleştiği de gözlenmiştir. Şekil 4.9C ve D ise altın nanoçubukların fonksiyonelleştirilmeden sonraki SEM görüntülerini göstermektedir.



Şekil 4.9. (A-B) Altın nanoçubukların fonksiyonelleştirilmeden önce ve (C-D) PEG karışımı ile fonksiyonelleştirilmesinden sonra farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri.

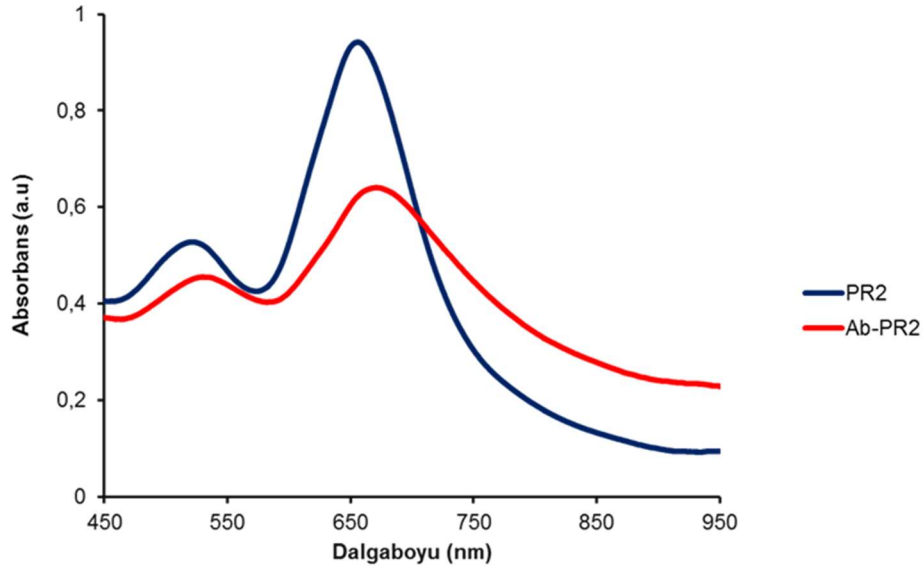
AFM görüntüleri SEM'den elde edilen sonuçları desteklemek için alınmıştır. Altın nanoçubukların PEG (4:1) ile işlevselleştirilmesinden önce ve sonra tıklamalı mod kullanılarak AFM görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.10). Altın nanoçubuklar üzerinde bulunan PEG tabakası AFM görüntülerinde açık ve yoğun bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.10. (A ve B) Altın nanoçubukların ve (C ve D) PEG'lenmiş altın nanoçubukların düşük ve yüksek çözünürlüklü topografik AFM görüntüleri.

4.1.2 PEG'lenmiş Nanoçubuklara Antikor Bağlanması ve Karakterizasyonu

Altın nanoçubuklara monoklonal antikor bağlanması LSPR spektrometresi, DLS/zeta potansiyel, XPS ve AFM ile karakterize edilmiştir. Örnek bir LSPR analizinde PEG ile modifiye olmuş nanoçubukların (PR2) üzerine antikor bağlandıktan sonra, yüzey plazmon rezonansında 660 nm'den 665 nm'ye 5 nm'lik bir kayma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. PR2'nin monoklonal antikor ile konjugasyon işlemi öncesi (mavi) ve sonrası (kırmızı) ölçülen LSPR spektrumları.

Antikor ile konjugasyon işlemi öncesi ve sonrası zeta potansiyel ve dinamik ışık saçılım analizlerinin sonuçları sırasıyla Tablo 4.4 ve 4.5'de görülmektedir. Altın nanoçubukların (boy:en oranı= 4.3) PEG'lenme öncesi (R2), sonrası (PR2) ve antikor konjugasyonu sonrası (Ab-PR2) zeta potansiyelleri ölçülmüş ve Tablo 4.4'de sonuçlar gösterilmiştir. Zeta potansiyel ölçümü, altın nanoçubuklar üzerinde gerçekleştirilen fonksiyonelleştirme işlemleri sonucunda yüzey yükünde meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Üretilen altın nanoçubukların (R2) etrafında stabilizasyonu sağlayan katyonik bir molekül olan CTAB molekülü bulunmaktadır ve bundan dolayı herhangi bir modifikasyon işlemine maruz kalmamış altın nanoçubukların yüzey yükü pozitifdir. Altın nanoçubukların PEG ile etkileşiminden sonra altın nanoçubukların zeta-potansiyeli 11 mV'dan -8.8 mV'a düşmüştür. Zeta-potansiyelde meydana gelen azalma, CTAB moleküllerinin uzaklaştırılmış olması ve yüzeye PEG moleküllerinin başarılı bir şekilde bağlanmış olmasına atfedilmiştir. Altın nanoçubukların PEG ile modifikasyonundan sonra antikor konjugasyonu yapılmıştır. AntiKDN monoklonal antikorunun konjugasyonu sonucu PEG'lenmiş nanoçubukların zeta potansiyeli -1.6 mV olarak ölçülmüştür. Dolayısıyla antikor bağlanması sonucu PEG'lenmiş nanoçubukların zeta potansiyel değeri -8.8'dan -1.6 mV'a yükselmiştir. Meydana gelen bu artış konjugasyon işleminin gerçekleşmiş olmasına atfedilmiştir. Antikor konjugasyon deneylerinde, antikorun kullanılmadığı ancak nanoçubukların aynı konjugasyon prosedürüne maruz bırakıldığı kontrol deneyleri sonucu nanoçubukların zeta potansiyel değerlerinde değişiklik gözlenmemiştir.

Fosfat tamponuna %10 oranında serum eklendiğinde PEG'lenmiş nanoçubuklar (PR2) hariç diğer iki örnekte (R2 ve Ab-PR2) muhtemel protein (albumin) adsorpsiyonu nedeniyle zeta potansiyel değerlerinde negatif yüke doğru artış olmuştur.

Tablo 4.4. Altın nanoçubukların (boy:en= 4.3), PEG'lenme ve antikor bağlanması sonrası zeta potansiyeli (mV) değerleri (n=3)

Örnek	Zeta Potansiyel (mV) (PBS)	Zeta Potansiyel (mV) (PBS+%10 serum)
PEG'leme öncesi altın nanoçubuk (R2)	10.3 ±0.8	-11.5 ±0.15
PEG'leme sonrası altın nanoçubuk (PR2)	-8.8±0.2	-4.8±0.15
Antikor Konjuge PR2 (Ab-PR2)	-1.60±0.01	-8.5±0.26

PEG'li altın nanoçubukların antikor konjugasyonu öncesi ve sonrası boyutlarındaki değişim dinamik ışık saçılımı (DLS) ile ölçülmüştür ve Tablo 4.5'de sonuçlar gösterilmiştir. DLS ölçümü zeta potansiyel ölçümleri ile paralel yapılmıştır. Literatürde DLS ölçümlerinin nanoçubukların boyutlarını doğru göstermeyeceği, sadece görünür bir boyut göstereceği bilinmektedir. Bu deneyler ile nanoçubukların yüzeylerindeki modifikasyonlara göre görünür boyuttaki değişimleri belirleyerek modifikasyonlar hakkında fikir sahibi olmak amaçlanmıştır. Antikor bağlanmamış PEG'li altın nanoçubukların hidrodinamik boyutu 13.2 nm olarak ölçülmüştür. PEG kaplı altın nanoçubukların antikor ile etkileştirilmesi sonucu hidrodinamik boyutu 48.7 nm olarak ölçülmüştür. Fosfat tamponuna %10 oranında serum eklendiğinde zeta potansiyel sonuçlarını destekler nitelikte PEG'lenmiş nanoçubuk dışındaki diğer nanoçubuklarda (CTAB kaplı ve Ab-konjuge) boyut artışı gözlenmiştir.

Tablo 4.5. Altın nanoçubukların (boy:en= 4.3), PEG'lenme ve antikor bağlanması sonrası dinamik ışık saçılımı ile ölçülen hidrodinamik çapları (n=3)

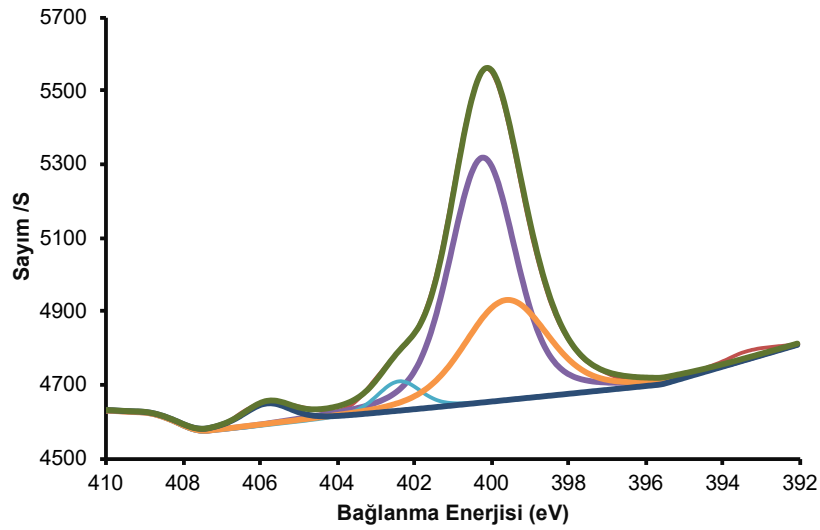
Örnek	Sayıcı Ortalama Boyut (nm) (PBS)	Sayıcı Ortalama Boyut (nm) (PBS+%10 serum)
PEG'leme öncesi altın nanoçubuk (R2) (CTAB kaplı)	261.3 ±18.8	103.3 ±6.21
PEG'leme sonrası altın nanoçubuk (PR2)	13.2±0.06	72.2±1.12
Antikor Konjuge PR2 (Ab-PR2)	48.7±1.70	122.3±2.1

Antikor ile konjugasyon işleminin ardından gerçekleştirilen XPS analizlerinin sonuçları Tablo 4.6'da görülmektedir. Konjugasyon sonrası XPS analizlerinde azot atomu için detaylı tarama gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.12). PEG kaplı nanoçubuklarda gözlenmeyen azot atomu

(Tablo 4.6), antikör konjugasyonu sonrası belirgin bir şekilde gözlenmiştir.

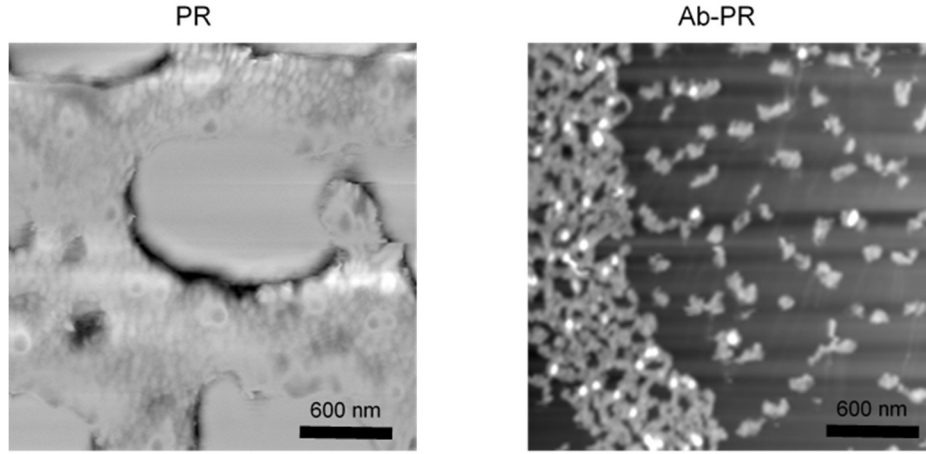
Tablo 4.6. Antikör bağlanması sonrası altın nanoçubukların (PR2) XPS analizi sonuçları

	PR2		Ab-PR2	
	Bağlanma Enerjisi	Atomik %	Bağlanma Enerjisi	Atomik %
C 1s	285.91	74.97	286.35	38.50
Ag 3d	367.90	0.44	368.27	1.78
N1s	-	-	400.95	5.04
O 1s	532.85	21.24	533.11	25.29
Au4f7	84.06	1.09	84.34	5.10
Si2p	-	-	100.09	25.49
Na1s	1071.33	1.38	1072.07	0.74
S2p	167.35	0.90	-	-



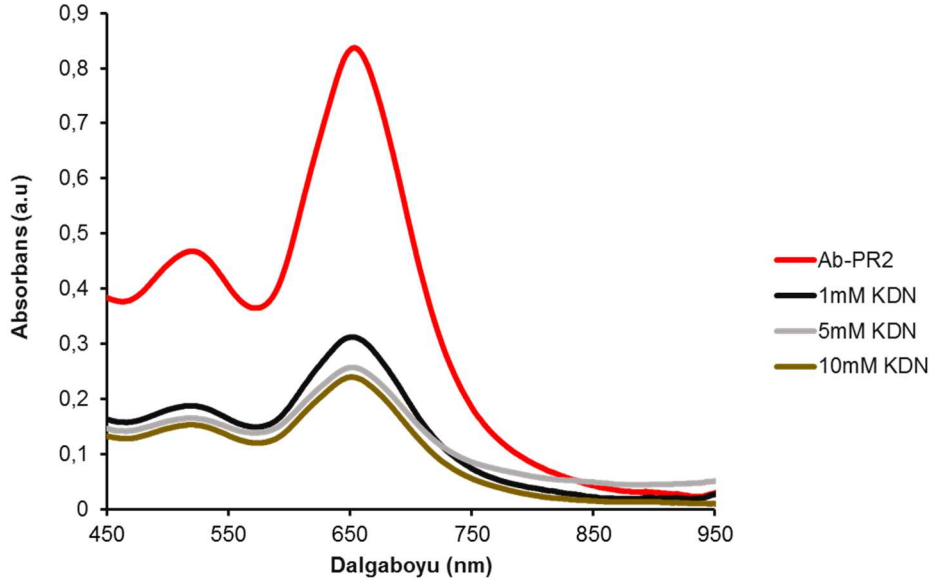
Şekil 4.12. Altın nanoçubukların (PR2) monoklonal antikör ile konjugasyonu sonrası N1s XPS spektrumları.

Antikör konjuge edilmiş nanoçubuklar AFM ile görüntülenmiştir. PEG'lenmiş nanoçubuklar (PR2) ve antikör konjuge edilmiş nanoçubuklar (Ab-PR2) ile tıklamalı modda alınmış AFM mikrografları Şekil 4.13'de verilmektedir. Antikör konjugasyonu sonrası PEG'lenmiş nanoçubuklarda görülen yoğun PEG tabakası görünmemektedir. Ayrıca nanoçubukların çubuk şekli görece kaybolmuştur.



Şekil 4.13. Altın nanoçubukların, PEG'lenme sonrası (PR2) ve antikor konjugasyonu sonrası (Ab-PR2) tıklamalı modda alınmış AFM görüntüleri.

Antikor konjuge edilmiş nanoçubuklara spesifik olarak KDN bağlanması PBS tampon ortamında (pH: 7.4) değişen konsantrasyonlarda (1, 5 ve 10 mM) KDN çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Antikor konjuge edilmiş nanoçubuklar ile KDN çözeltisi 1 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Nanoçubuklara KDN bağlanması LSPR spektrometresi ve zeta potansiyel ölçümleri ile incelenmiştir. LSPR analizlerinde (Şekil 4.14) KDN bağlanması sonrası nanoçubukların spektrumunun şiddetinin düştüğü ve pikin genişlemiş olduğu görülmüştür. Antikor konjuge altın nanoçubuklara kıyasla değişen konsantrasyonlarda KDN bağlanması sonrası, 1, 5 ve 10 mM konsantrasyonlar için, pik dalga boyu sırasıyla 3, 4 ve 4 nm'lik kayma göstermiştir.



Şekil 4.14. Antikor bağlı altın nanoçubukların, değişen konsantrasyonlarda KDN çözeltisi ile etkileştirilmesi sonrası ölçülen LSPR spektrumları.

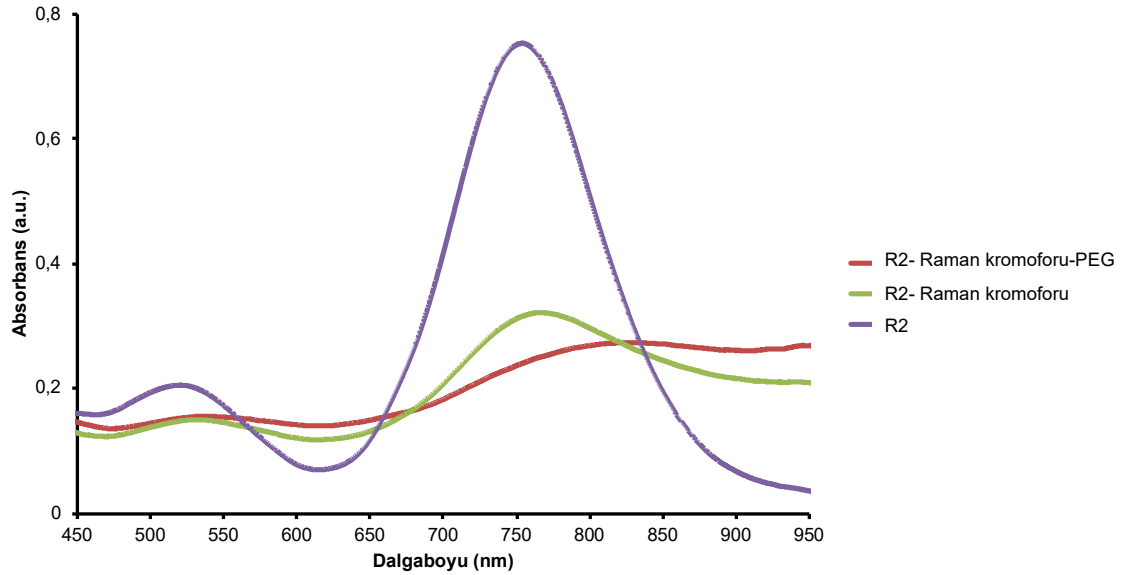
Antikor bağlı nanoçubuklar ile değişen konsantrasyonlarda KDN etkileşimi sonrası zeta potansiyelleri ölçülmüştür ve Tablo 4.7’de sonuçlar gösterilmiştir. Antikor bağlı nanoçubukların KDN ile etkileşiminden sonra zeta potansiyel değerleri artan KDN konsantrasyonu ile sırasıyla -1.6’dan -14.2, -15.9 ve -19.6 değerlerine düşmüştür. KDN 1 mM konsantrasyonda nanoçubuk yüzeyindeki antikora afinite bağlanması sonucu nanoçubukların yüzey yükünü belirgin ölçüde negatife çekmiştir (-1.6’dan -14.2’ye). KDN konsantrasyonunun artması ile yüzey yükü daha negatif hale gelmiştir (5 mM için -15.9, 10 mM için -19.6).

Tablo 4.7. Monoklonal antikor konjuge nanoçubukların değişen konsantrasyonlarda KDN ile etkileşimi sonrası zeta potansiyel değerleri (n=3)

Örnek	Zeta Potansiyel (mV)
Antikor-PR2	-1.6±0.01
Antikor-PR2+1 mM KDN	-14.2±0.46
Antikor-PR2+5 mM KDN	-15.9±1.45
Antikor-PR2+10 mM KDN	-19.6±0.20

4.1.3 PEG'lenmiş Nanoçubuklara Raman Kromoforu Bağlanması ve Karakterizasyonu

In vivo görüntüleme kullanmak amacıyla hazırlanan altın nanoçubukların yüzeylerine Raman kromoforu bağlanmıştır. Bu işlem, PEG'leme işlemi öncesinde yapılmıştır. Kromofor bağlandıktan sonra PEG'leme prosedürü gerçekleştirilmiştir. Raman kromoforu takılı altın nanoçubukların karakterizasyonu LSPR ve Raman spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.15, altın nanoçubukların sırasıyla Raman kromoforu ve PEG ile fonksiyonelleştirilme öncesi ve sonrası LSPR spektrumlarını göstermektedir. Altın nanoçubukların modifiye edilmemiş halinin LSPR spektrumu 745 nm (mor pik) olarak ölçülmüştür. Altın nanoçubuklar DTTC ile 24 saatlik inkübasyonu sonrası LSPR λ_{max} değeri 760 nm (yeşil pik) olarak ölçülmüştür. LSPR spektrumundaki 15 nm değişim Raman kromoforun altın nanoçubuk yüzeyine bağlandığını işaret etmektedir. Raman kromoforu bağlı altın nanoçubukların üzerine PEG bağlanması sonrası LSPR dalga boyu 785 nm olarak ölçülmüştür. PEG'lenme sonrası oluşan 25 nm'lik plazmon band değişimi PEG moleküllerinin raman kromoforu bağlı altın nanoçubuk yüzeyine başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir. Ayrıca spektrumda görüldüğü üzere sırasıyla raman kromoforu ve PEG ile modifikasyon işlemleri sonrası boylamsal pikte genişleme görülmemesi fonksiyonelleştirilmiş altın nanoçubukların çözelti içerisinde agregasyona uğramadığının göstergesidir.

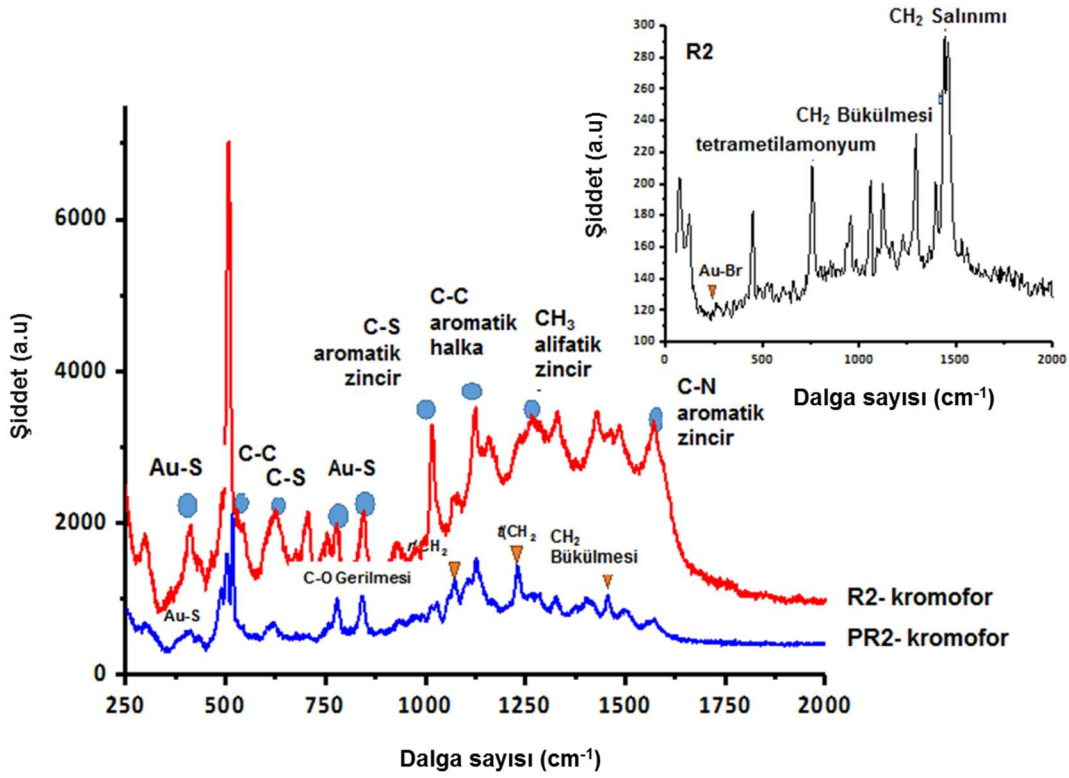


Şekil 4.15. CTAB kaplı altın nanoçubukların (R2) (mor), Raman kromoforu bağlanmış altın nanoçubukların (yeşil), kromofor ve PEG bağlanmış altın nanoçubukların (kırmızı) LSPR spektrumları.

Şekil 4.16, altın nanoçubukların önce raman kromoforu ve daha sonra PEG ile fonksiyonelleştirilme sonrası Raman spektrumlarını göstermektedir. Altın nanoçubukların fonksiyonelleştirme işlemi öncesi yapılan raman ölçümlerinde, altın nanoçubukların sentezlenme aşamasında kullanılan katyonik yüzey aktif malzeme CTAB'in varlığı karakteristik piklerin görülmesi ile doğrulanmıştır. CTAB altın nanoçubukların yüzeyine Au-Br etkileşimi ile tutunmaktadır. Altın nanoçubukların 785 nm lazer ile uyarılması ile elde edilen spektrumda, Au-Br etkileşimi 174 cm^{-1} 'de görülmektedir. Bunun yanısıra, 760 cm^{-1} dalga boyundaki sinyal, CTAB üzerinde bulunan trimetilamonyum grubundan gelmektedir. 1076 cm^{-1} ve 1148 cm^{-1} dalga boylarındaki pikler sırasıyla alkan zincirinin deformasyon bağ titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1273 ve 1448 cm^{-1} noktalarındaki pikler (CH_2) kıvrılma ve sallanım titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Bu pikler literatürde daha önce de benzer örnekler için gözlenmiştir.

Altın nanoçubuklar daha sonra raman kromoforu olarak DTTC kullanılarak fonksiyonelleştirilmiştir. DTTC molekülünün spesifik raman pikleri 502 , 632 , 778 , 841 , 1080 , 1380 ve 1610 cm^{-1} dalga boylarında gelmektedir. DTTC altın nanoçubuklara Au-S etkileşimi ile tutunmaktadır. 380 cm^{-1} noktasında gelen raman piki Au-S etkileşimini göstermekte olup ortaya çıkan bu spektrum DTTC 'nin altın nanoçubuk yüzeyine bağlandığının en önemli göstergeleri arasındadır. 502 ve 632 cm^{-1} noktalarındaki gelen pikler sırasıyla C-C ve C-S alifatik zincirlerine karşılık gelmektedir. Ayrıca DTTC ait spesifik raman sinyallerinden biri de 1129 cm^{-1} noktasında ölçülen C-C aromatik halka titreşimidir. DTTC'nin diğer karakteristik pikleri 1080 , 1380 ve 1610 cm^{-1} noktalarında ölçülmüştür. Bu pikler sırasıyla, C-S aromatik zinciri, CH_3 alifatik zinciri ve C=N aromatik zinciri göstermektedir.

Altın nanoçubukların DTTC ile modifikasyonundan sonra, altın nanoçubuk-DTTC kompleksinin üzerine PEG bağlanmıştır. PEG bağlandıktan sonra yapılan raman ölçümleri sonucunda 380 , 1065 , 1073 , 1237 ve 1486 cm^{-1} dalga boylarında pikler elde edilmiştir. 380 cm^{-1} 'deki Raman spektrumu PEG'in sahip olduğu tiyol uç grubundan dolayı altın nanoçubukların yüzeyinde oluşturduğu Au-S bağı göstermektedir. 1065 ve 1073 cm^{-1} ortaya çıkan sinyaller C-O ve $p(\text{CH}_2)$ bağlarını ifade etmektedir. Ayrıca, 1237 ve 1486 cm^{-1} civarındaki pikler sırasıyla CH_2 bağlarına atfedilebilir (Koenig ve Angood, 1970).



Şekil 4.16. Altın nanoçubukların (R2; siyah) DTTC (R2-kromofor; kırmızı) ve PEG (PR2-kromofor; mavi) konjugasyonları sonrası Raman spektrumları.

4.1.4 Nanoçubukların In Vitro Değerlendirmeleri

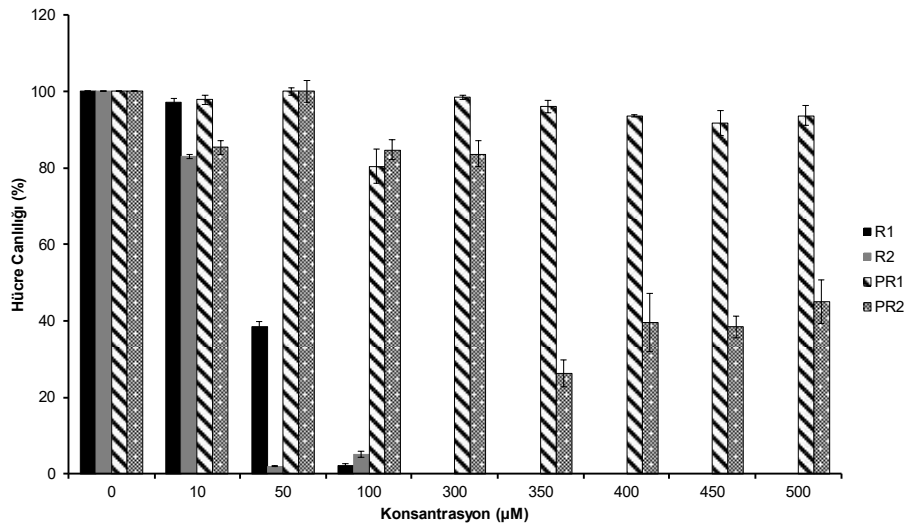
4.1.4.1 Hücre Canlılığı, Apoptoz ve Hücre Döngüsü Analizleri

Nanoçubuklar ile gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda örnekler için kullanılan kodlar Tablo 4.8'de açıklanmıştır. Öncelikle meme ve prostat epitel hücrelerine PEG'lenmemiş ve PEG'lenmiş nanoçubuk örneklerinin uygulanmasından sonra hücre canlılıkları belirlenmiştir. Bu sonuçlardan elde edilen IC_{50} değerleri üzerinden uygulanacak 'güvenli doz'lar belirlenmiştir. Ayrıca kanser hücrelerinde PEG'lenmiş nanoçubuklar uygulanarak güvenli dozda Annexin V, apoptoz testi ve hücre döngüsü incelemesi yapılmıştır. Ayrıca yine kanser hücrelerinde güvenli dozda antikor konjuge edilmiş nanoçubuklar (Ab-PR2)'ın toksisitesi antikor taşımayan nanoçubuklar (R2) ile karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.8. In vitro çalışmalarda kullanılan örnek kodları

Örnek Kodu	Örnek Açıklaması	Örnek Kodu	Örnek Açıklaması	Örnek Kodu	Örnek Açıklaması
R1	PEG'lenmemiş nanoçubuk; boy:en=2.66	PR1	PEG'lenmiş nanoçubuk; boy:en=2.66		
R2	PEG'lenmemiş nanoçubuk; boy:en=4.33	PR2	PEG'lenmiş nanoçubuk; boy:en=4.33	Ab-PR2	Ab konjuge PEG'lenmiş nanoçubuk; boy:en=4.33
R3	PEG'lenmemiş nanoçubuk; boy:en=7.00	PR3	PEG'lenmiş nanoçubuk; boy:en=7.00	Ab-PR3	Ab konjuge PEG'lenmiş nanoçubuk; boy:en=7.00

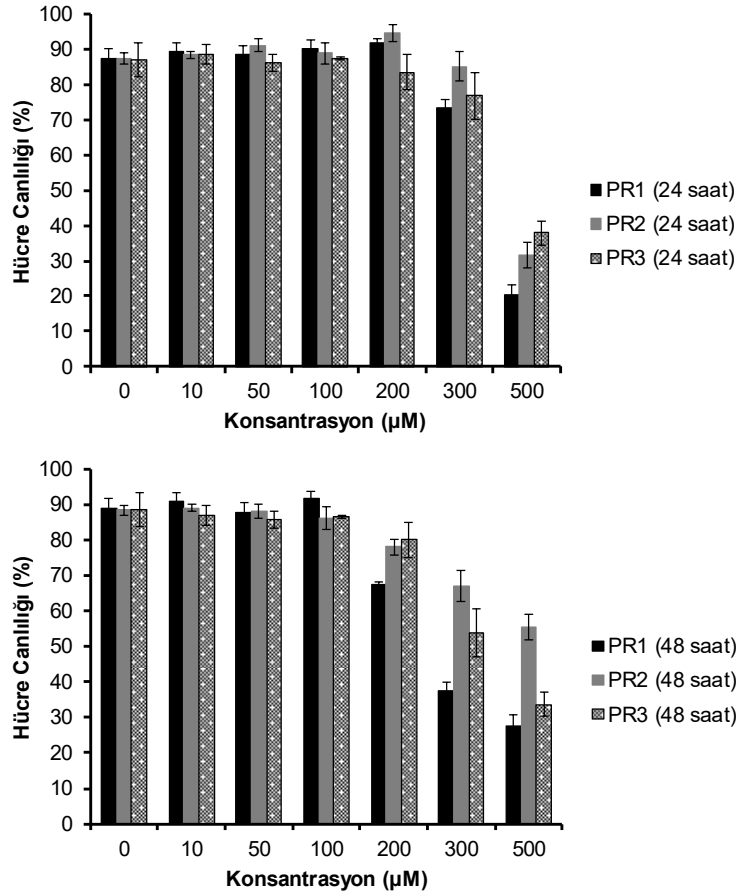
Öncelikle nanoçubukların PEG'leme öncesi ve sonrası arasındaki toksisite farkını görmek için meme MCF 10A epitel hücrelerinde canlılığına 24 saat inkübasyon sonrası bakılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.17'de gösterilmektedir. Sonuçlara göre PEG'leme öncesi R1 ve R2 yüksek toksisiteye sahiptirler ve düşük dozlarda hücrelere ölümcül etki göstermektedirler. PEG'lenmiş nanoçubuklarda ise, PR1 test edilen hiçbir dozda ölümcül etki göstermemiştir, PR2 için ise 300 – 350 μ M arasında IC_{50} değeri saptanmıştır. Standart sapmalar dikkate alındığında, R1 – PR1 ve R2 – PR2 grupları arasındaki farkların tümü istatistiksel olarak anlamlı farklıdır.



Şekil 4.17. MCF 10A meme epitel hücrelerinin farklı dozlarda nanoçubuklar (R1, R2, PR1 ve PR2) ile 24 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılığı sonuçları (n=3).

PEG'lenmiş nanoçubukların, CTAB kaplı nanoçubuklara göre çok daha düşük toksisiteye sahip olduğu meme epitel hücrelerde gösterildikten sonra nanoçubuk boy:en

oranının toksisiteye etkisi prostat RWPE-1 epitel hücreleri ile gösterilmiştir ve aynı zamanda bu hücre türü için IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Prostat epitel hücrelerin viabilitesini incelemek için, hücrelerin plaka yüzeyine tutunup morfolojilerini geri kazanmaları için 24 saat beklendikten sonra üzerlerine PEG ile kaplanmış olan nanoçubuklar (PR1, PR2 ve PR3) farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri ile etkileştirilmiştir. Sonuçlar, Şekil 4.18'de özetlenmektedir. Sonuçlara göre PEG'lenmiş nanoçubukların IC₅₀ değerleri 300 – 500 µM arasında saptanmıştır. 48 saat verileri dikkate alındığında, test edilen üç farklı boy:en oranından en az toksik olarak PR2 bulunmuştur. En küçük boy:en oranına sahip olan PR1 test edilen örnekler arasında standart sapmalar dikkate alındığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde en fazla toksik etkiye sahip nanoçubuk örneğidir. Bu nedenle çalışmanın geri kalan kısmında PR2 ve PR3 kullanılmıştır. Bu iki nanoçubuk için güvenli doz olarak 100 µM konsantrasyon uygun bulunmuştur.

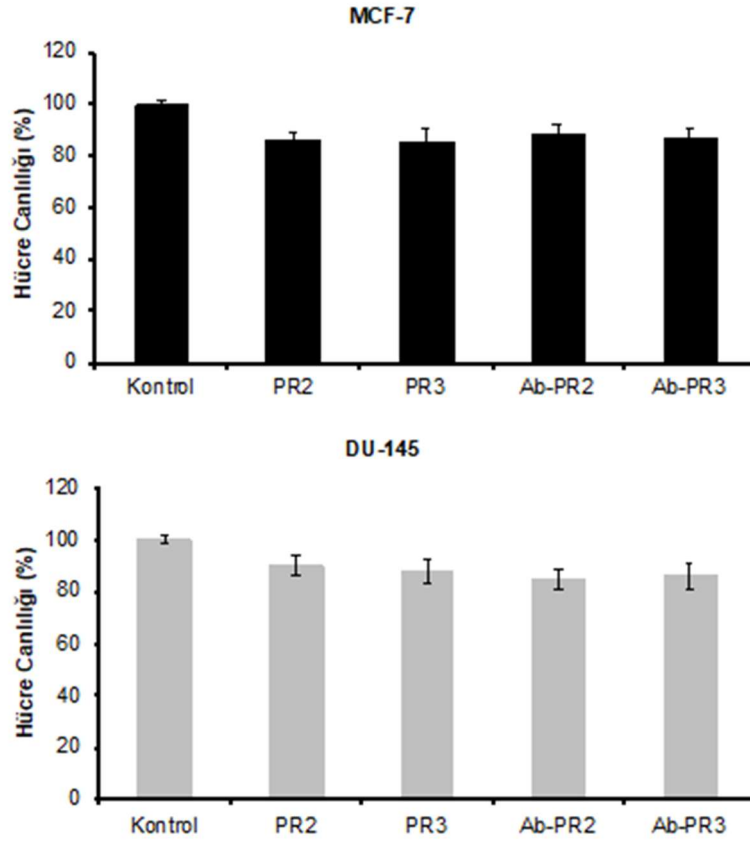


Şekil 4.18. RWPE-1 hücrelerin farklı dozlarda PR1, PR2 ve PR3 nanoçubuklar ile 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra canlılık sonuçları (n=3).

Sonraki aşamada, kanser hücreleri güvenli dozda (100 µM) PR2 ve PR3 ile 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra canlılık değerlendirmesi yapılmıştır. Ayrıca antikor konjuge edilmiş PR2 ve PR3 örnekleri 100 µM dozda benzer şekilde hücreler ile inkübe edilmiş ve hücre canlılık değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.9 ve Şekil 4.19'da verilmektedir. Görüleceği üzere uygulanan güvenli dozda PR2 ve PR3, kanser hücreleri canlılığına istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermemiştir. Ayrıca antikor konjugasyonu, uygulanan dozda nanoçubukların toksisitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sebep olmamıştır.

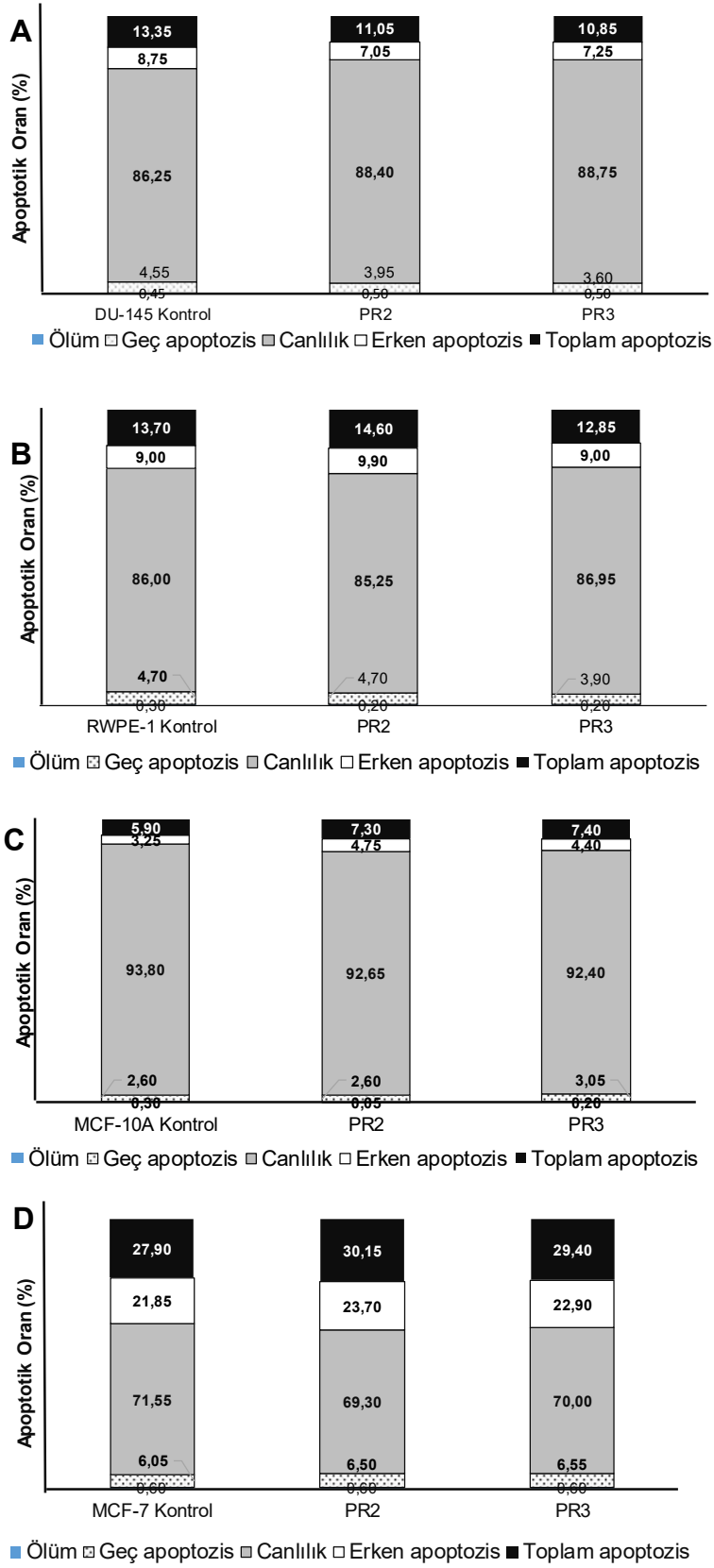
Tablo 4.9. Meme ve prostat kanseri hücre hatlarında PR2 ve PR3 (100 µM) uygulandıktan 24 saat sonra % canlılık değerleri (n=3)

Hücre Türü ve Uygulama	Ortalama Canlılık (%)
MCF7	100
MCF7+PR2	86
MCF7+PR3	85
MCF7+Ab-PR2	88
MCF-7+Ab-PR3	87
DU 145	100
DU 145+PR2	90
DU 145+PR3	88
DU 145+Ab-PR2	85
DU 145+Ab-PR3	86



Şekil 4.19. Meme ve prostat kanseri hücre hatlarında 100 μ M konsantrasyonda PR2, PR3, Ab-PR2 ve Ab-PR3 uygulandıktan 24 saat sonra canlılık değerleri. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).

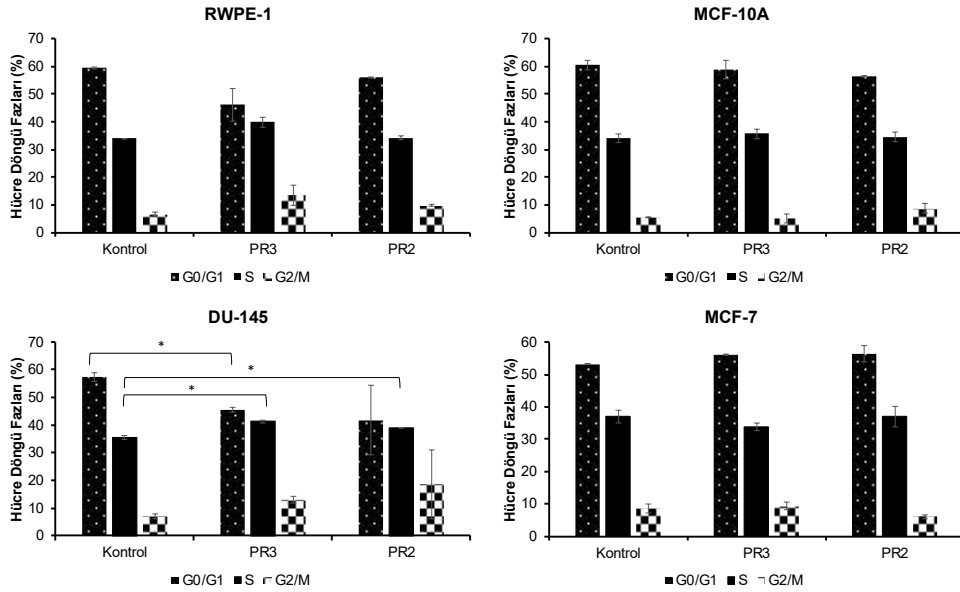
Bir sonraki adımda Annexin-V yöntemi ile PR2 ve PR3 (100 μ M) ile 24 saat inkübe edilmiş hücrelerin apoptoz analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar aşağıda verilmektedir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Annexin V ile apoptoz sonuçları (n=2).

Dört hücre türünde (RWPE-1, DU 145, MCF 10A ve MCF7) PR2 ve PR3 ile güvenli 100 μ M dozda gerçekleştirilen Annexin V testi sonuçlarına göre, total apoptotik ve canlı hücre popülasyonları karşılaştırıldığında, apoptotik hücreler canlılardan çok daha düşük yüzdeye sahiptirler. Total apoptoz değerlerini karşılaştırdığımızda, PR2 ve PR3 nanomalzemeler, meme kanseri MCF7 hücrelerinde, normal meme hücrelerine göre daha çok apoptotik etkiye sahiptirler. Benzer bir farklılık prostat kanseri ve normal prostat hücrelerinde gözlenmemiştir. PR2 ve PR3 ile muamele edilmiş her dört hücre popülasyonunda, total apoptoz değerlerinin incelenmesi bu iki nanomalzemenin yaklaşık aynı apoptotik etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

In vitro deneylerde bir sonraki aşamada PR2 ve PR3 ile 24 saat inkübe edilmiş hücrelerde hücre döngüleri incelenmiştir. Hücrelerin plaka yüzeyine tutunup morfolojilerini geri kazanmaları için 24 saat beklendikten sonra üzerlerine 100 μ M olacak şekilde PR2 ve PR3 çözeltilerinden eklenerek (kontrol grupları için sadece besiyeri kullanılmıştır) 24 saatlik inkübasyon süresinde kontrol grubu ile birlikte inkübasyona bırakılmışlardır. Bulunan değerler ve sonuçlar aşağıda verilmektedir (Şekil 4.21).



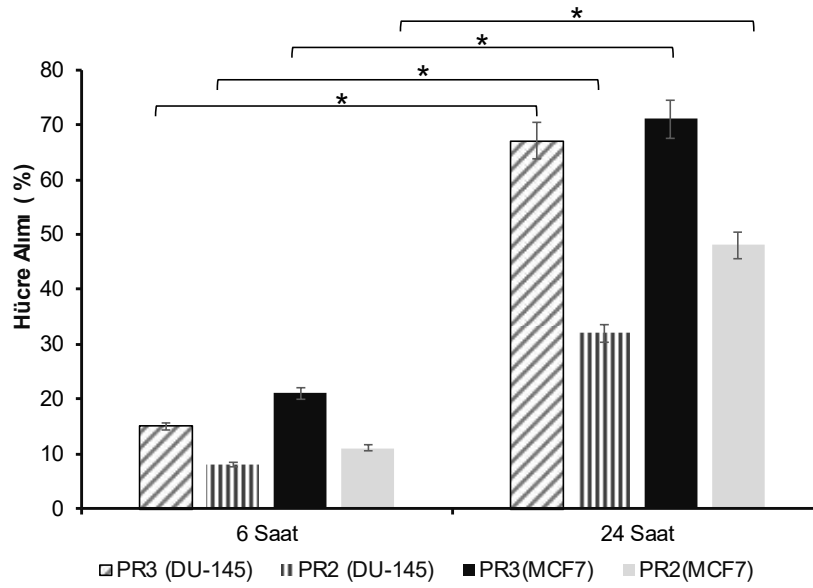
Şekil 4.21. Hücre döngüsü deneyleri sonuçları. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p < 0.05).

Hücre döngüsü deneylerinin sonuçlarına göre, prostat normal epitel RWPE-1 hücrelerinde, PR2 ve PR3 nanomalzemelerin uygulaması bu hücrelerin yaşam döngülerinde kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Prostat kanser DU-145 hücrelerinde ise, PR3 ve PR2 uygulamasının hücrelerin DNA replikasyon (S) fazında istatistiksel anlamlı etkisi gözlenmiştir. Ancak bu etki, %5'den daha azdır. Bu nanomalzemelerin aynı dozda meme

normal epitel MCF 10A hücelere ve meme kanseri MCF7 hücelere uygulanması sonrası kontrol hücelere ile karşılaştırdığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

4.1.4.2 Hücre Alımı

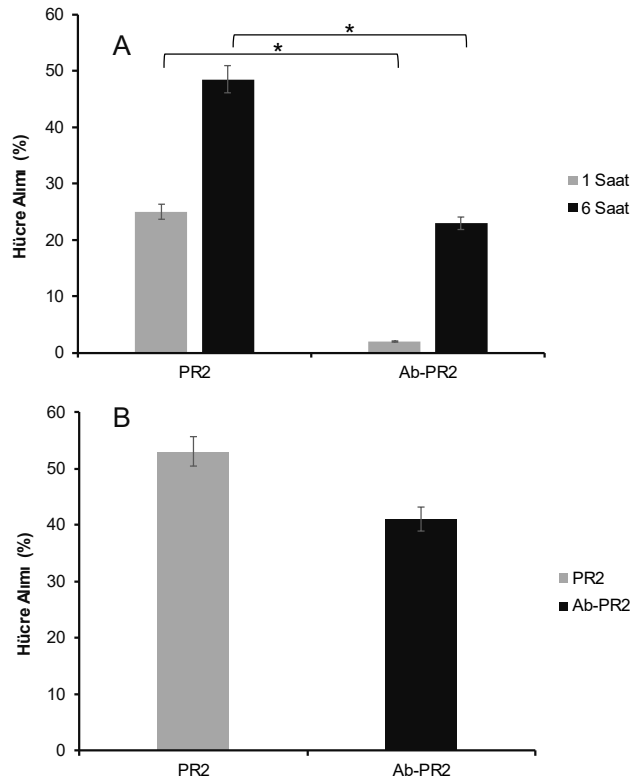
Öncelikle antikor içermeyen PEG'lenmiş iki farklı boy:en oranındaki nanoçubukların (PR2 ve PR3) DU145 ve MCF7 prostat ve meme kanser hüceleri tarafından zamana karşı alımı ICP-MS analizleri ile incelenmiştir. İnceleme sonuçları Şekil 4.22'de verilmektedir.



Şekil 4.22. DU145 prostat ve MCF7 meme kanser hüceleri tarafından farklı boy:en oranına sahip PEG'lenmiş nanoçubukların zamana bağlı alımları. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).

Düşük boy:en oranına sahip altın nanoçubukların (PR2), DU145 hüceleri tarafından alımı, 6 saat ve 24 saat için, kontrole kıyasla %7.9' dan %31.6'ya yükselmiştir. Benzer şekilde yüksek boy:en oranına sahip altın nanoçubukların (PR3) hücelere tarafından alımı da, kontrole kıyasla %15.4'den % 66.5'e yükselmiştir. MCF7 hücelerinde de benzer bir alım profili gözlenmiştir. PR2'lerin MCF7 hüceleri tarafından alımı, 6 saat ve 24 saat için, kontrole kıyasla %10.8'den %47.4'e yükselmiştir. Benzer şekilde yüksek boy:en oranına sahip PR3 altın nanoçubukların MCF7 hüceleri tarafından alımı da kontrole kıyasla %21.2'den %71.4'e yükselmiştir. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı şekilde zamanla nanomalzemelerinin alımlarının arttığını işaret etmektedir.

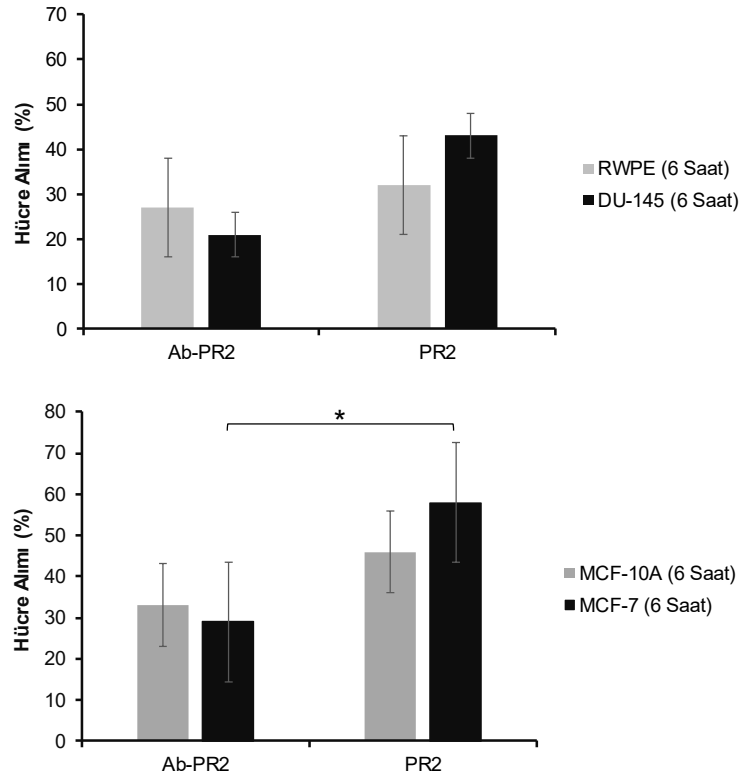
Bir sonraki adımda monoklonal antikor (Ab) konjuge edilmiş PR2 ile hücre alımı deneyi iki farklı inkübasyon süresi ile gerçekleştirilmiştir. Ab-PR2 ile hücre alımı deneylerinde prostat normal ve kanser (RWPE-1 ve DU 145) hücreleri ile nanoçubuklar 1 saat ve 6 saat boyunca inkübe edilmiş ve belirlenen süre sonunda hücre örnekleri ICP-MS ile analiz edilmiştir. Bu deneylerde nanoçubuklar düşük konsantrasyonda (20 μ M) kullanılarak Ab konjugasyonundan kaynaklanan hücre alım profilindeki farklılıkların gözlenmesi amaçlanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.23 A'da verilmektedir. Beklenenin tersine, DU 145 prostat kanser hücreleri tarafından PEG kaplı nanoçubukların, Ab konjuge nanoçubuklara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde çok daha fazla alındığı belirlenmiştir. Bunun üzerine PEG karışımında mPEG:amin-PEG oranı 4:1'den 9:1'e ve Ab konjugasyon derecesi yarıya (%0.1'den %0.05'e) düşürülerek deney 6 saat inkübasyon süresi için tekrar edilmiştir. Hücre alımı profilinde antikor hedeflemesini ön plana çıkaran istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.23B). Antikor miktarının oldukça kısıtlı olması nedeni ile antikor ve nanoçubuk konjugasyon deneyleri daha fazla tekrar edilememiş olup hücre türünün alıma etkisi incelenmiştir.



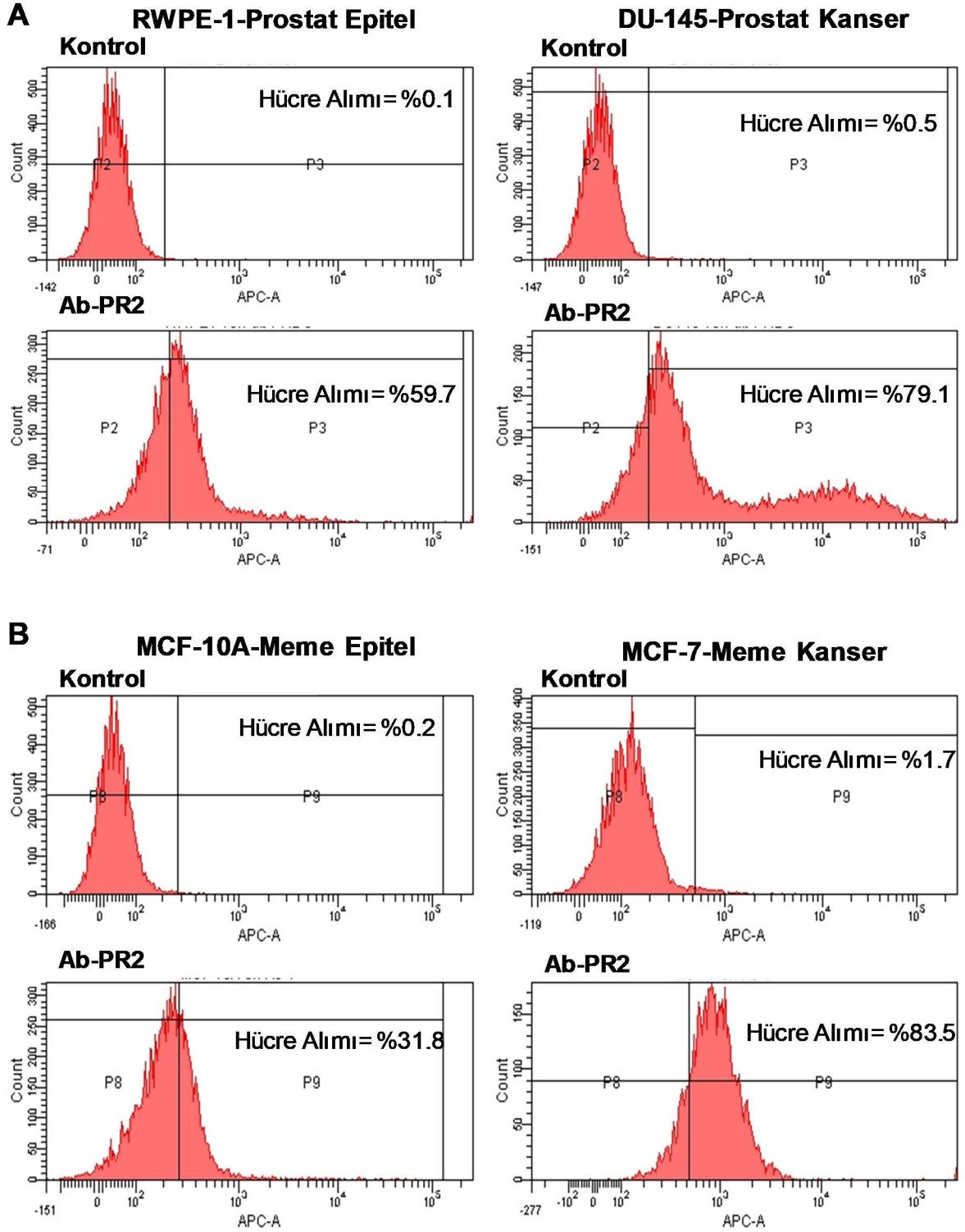
Şekil 4.23. A) DU 145 prostat kanser hücreleri tarafından mAb konjuge edilmiş (Ab-PR2) ve edilmemiş (PR2) nanoçubukların 1 ve 6 saatte alımı. Bu örneklerde mPEG:aminPEG oranı 4:1 ve amin-PEG'lerin teorik olarak %0.1'ine antikor bağlanacak şekilde konjugasyon gerçekleştirilmiştir. B) DU 145 prostat kanser hücreleri tarafından monoklonal antikor konjuge edilmiş (Ab-PR2) ve edilmemiş (PR2) nanoçubukların 6 saatte alımı. Bu örneklerde

mPEG:amin-PEG oranı 9:1 ve amin-PEG'lerin teorik olarak %0.05'ine antikor bağlanacak şekilde konjugasyon gerçekleştirilmiştir. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).

Önceki rapor dönemlerinde Ab-PR2'nin antikor aracılı hedefleme yeteneğinin belirlenmesi için, sağlıklı epitel ve kanser hücreleri (RWPE-1 ve DU 145; MCF10A ve MCF7) ile Ab-PR2 nanoçubuklar 6 saat boyunca inkübe edilmiş ve bu süre sonunda hücre örnekleri ICP-MS ile analiz edilmiştir (Şekil 4.24). Şekilden görüleceği üzere kanser ve sağlıklı hücreler arasında Ab konjuge edilmiş ve edilmemiş nanoçubuklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ab konjugasyonu fizikokimyasal teknikler ile konfirme edilmiş, aynı zamanda Ab konjuge nanoçubuklara KDN antijeninin spesifik şekilde bağlanması LSPR ile doğrulanmış olmasına rağmen antikor konjuge nanoçubukların kanser hücrelerine göre normal hücreler tarafından daha fazla alınmasının nedenleri açıklanamamıştır. Bu nedenle, final rapor döneminde, sağlıklı ve kanser hücre hatlarında Ab-PR2'nin alım deneyleri tekrarlanmış ancak bu sefer nanoçubukların hücreler tarafından alım profilleri akış sitometresi ile belirlenmiştir. Bu amaçla nanoçubuklara Alexa Fluor ile etiketlenmiş anti-KDN monoklonal antikor konjuge edilmiştir. Meme ve prostat, normal ve kanser hücreleri fluoresans etiketlenmiş Ab-PR2'ler ile inkübe edilmişler (meme hücre hatları için 100 μ M dozda 6 saat süre ile, prostat hücre hatları için 100 μ M dozda 15 saat süre ile) ve inkübasyon süresi sonunda akış sitometresi ile incelenmişlerdir. Akış sitometresinden elde edilen örnek veriler Şekil 4.25'de sunulmuştur. Şekilden görüleceği üzere, Ab-konjuge edilmiş nanoçubuklar prostat kanser hücreleri tarafından, normal prostat hücre hattına göre, yaklaşık 1.5 kat, meme kanser hücreleri tarafından, normal meme hücre hattına göre, yaklaşık 2.6 kat daha fazla alınmıştır.



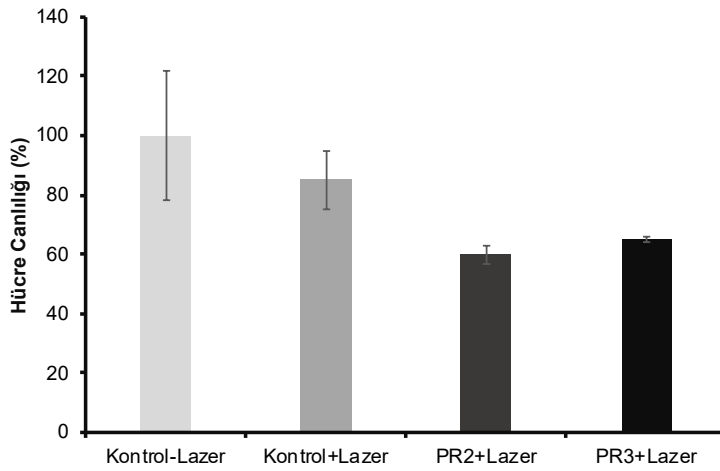
Şekil 4.24. Kanser ve epitel hücreler tarafından antikor konjuge edilmiş ve edilmemiş nanoçubukların alımı. Deneylerde PR2 ve Ab-PR2 (20 μ M) kullanılmıştır. İnkübasyon süresi= 6 saat. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).



Şekil 4.25. Kanser ve epitel hücrelerin Alexa Fluor işaretli antikor konjuge edilmiş nanoçubuklar (Ab-PR2) ile inkübasyonu sonrası alınmış akış sitometre ölçümlerinin örnek sonuçları (n=3).

4.1.4.3 Fototermal Etki

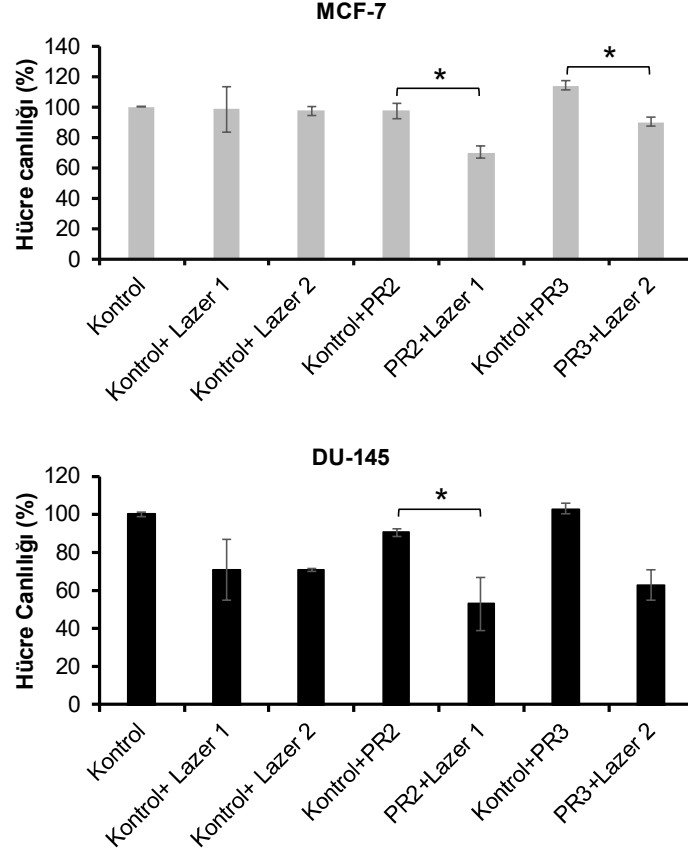
Fototermal etkinin araştırılması amacıyla yapılan ilk deneylerde DU145 prostat kanser hücrelerine 100 μ M konsantrasyonda PR2 veya PR3 ilave edilip 24 saat süresince kontrol grubu ile birlikte inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra hücreler PBS ile yıkanmıştır. Ardından kuyucuklara besiyeri ilave edilip kuyucuklara 780 nm dalga boyunda lazer (100 mW) 30 dakika süre ile uygulanmıştır. Lazer uygulaması yapıldıktan sonra hücrelerin canlılığı MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. % hücre canlılık değerleri, muamele edilmemiş hücrelerin viabilitesini 100% kabul ederek hesaplanmıştır. Fototermal uygulama deneylerinden elde edilen hücre canlılık değerleri Şekil 4.26'da görülmektedir. Elde edilen sonuçlarda altın nanoçubuk eklenmiş hücrelerin, nanoçubuk eklenmemiş hücrelere göre, lazer uygulaması sonrası canlılık oranlarında belirgin azalma gözlenmiştir (PR2 için yaklaşık %25, PR3 için yaklaşık %15'lik azalma).



Şekil 4.26. DU 145 prostat kanser hücrelerinin farklı boy:en oranlarında nanoçubuklar ile inkübasyonu sonrası 30 dk 780 nm lazer (100 mW) uygulanan kuyucuklardan elde edilen hücre canlılık oranları (n=2).

Bu durum dikkate alınarak yüksek boy:en oranına (7) sahip PR3 nanoçubukları için fototermal dönüşüm değerinin daha yüksek olabileceği yüksek dalga boyunda (940 nm) lazer kullanılarak fototermal etki değeri DU145 ve MCF7 kanser hücreleri ile tekrar edilmiştir. Benzer şekilde PR2 ve PR3 dozu güvenli doz olan 100 μ M konsantrasyonda sabit tutulmuştur. Lazer dalga boyu, PR2 için 780 nm ve PR3 için 940 nm olarak kullanılmıştır. Işıma süresi önceki deneydeki gibi 30 dakika olarak sabit tutulmuştur. Sonuçlar Şekil 4.27'de sunulmuştur. Hem MCF7 hem de DU145 hücrelerinde uygulanan şartlarda hücre canlılığında PR2 + Lazer (780 nm) etkisi ile, sadece kontrol + PR2 grubuna göre, anlamlı bir düşüş (yaklaşık %30) gözlenmektedir. Bununla birlikte PR3 + Lazer (940 nm) uygulamasında ise MCF-7

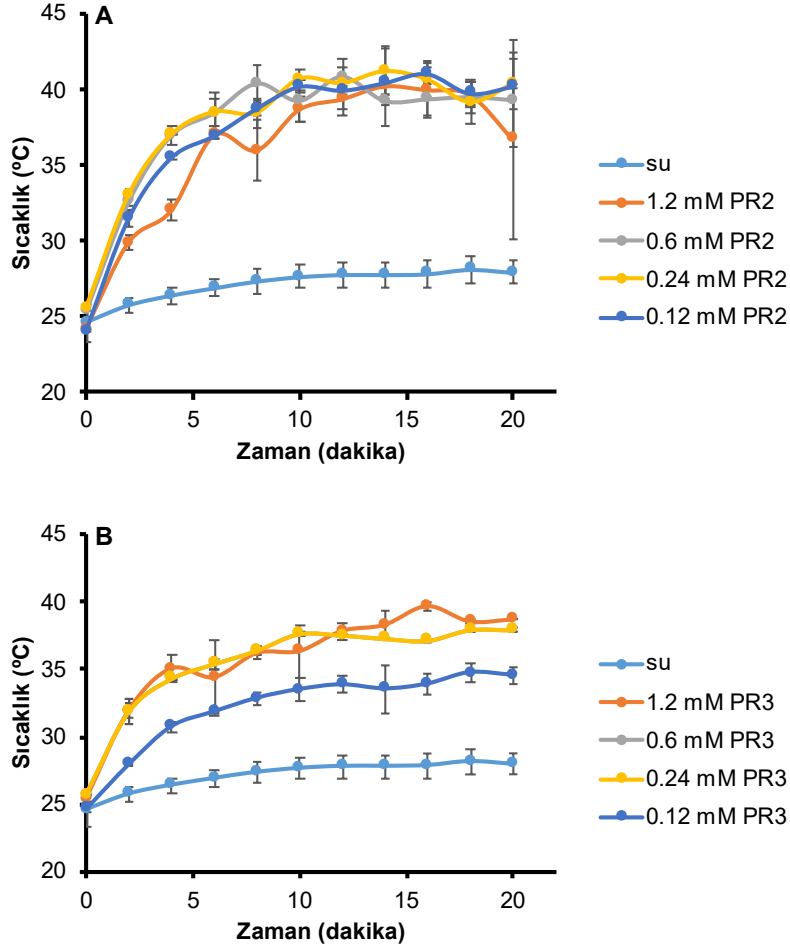
hücrelerinde anlamlı küçük bir düşüş (yaklaşık %10) gözlenirken DU-145 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir. Ayrıca DU145 hücreleri 940 nm boyundaki lazere istatistiksel olarak belirgin şekilde duyarlılık göstermişlerdir.



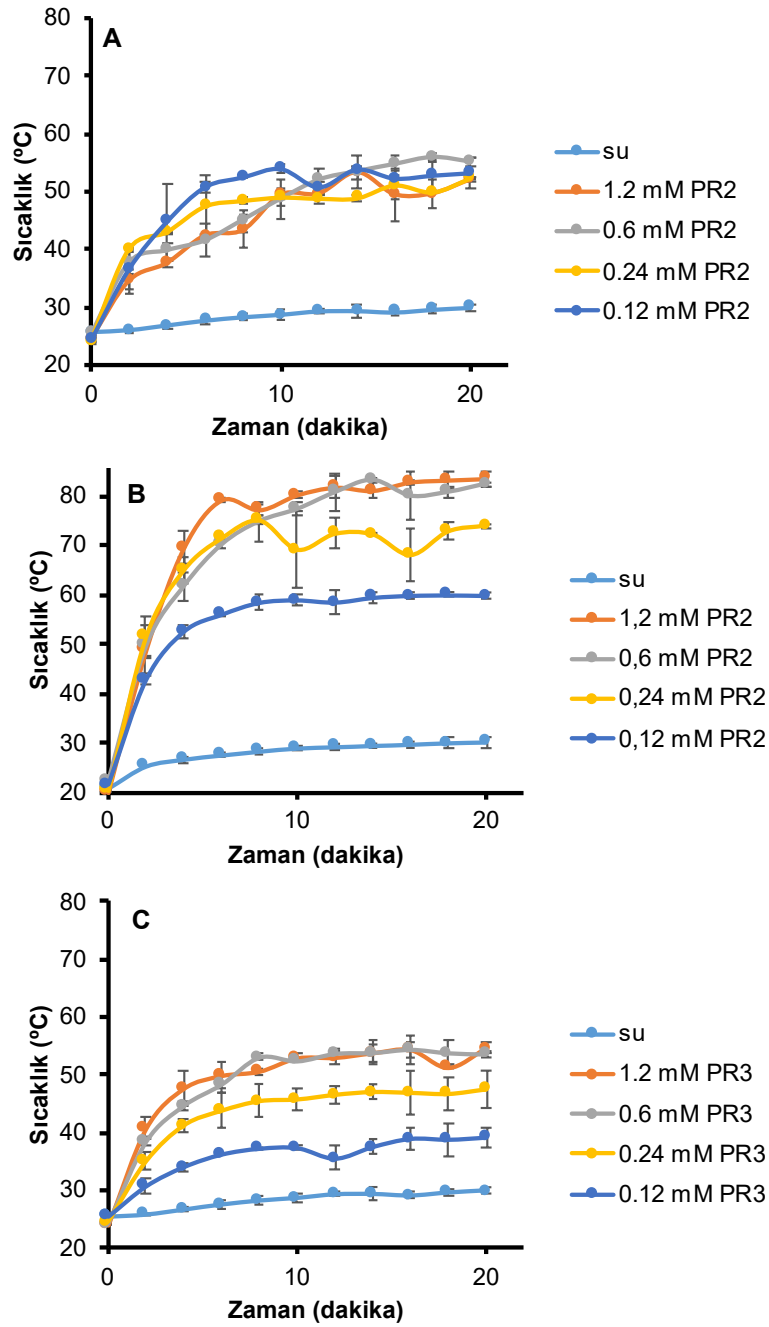
Şekil 4.27. PR2 ve PR3 ile inkübe edilmiş MCF7 meme ve DU 145 prostat kanser hücrelerinin lazer uygulaması sonrası hücre canlılığı. PR2 için lazer 1= 780 nm (100 mW); PR3 için lazer 2=940 nm (100 mW) kullanılmıştır. Işıma süresi 30 dakika. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p < 0.05).

Bu deneylerden sonra iki farklı boy:en oranındaki nanoçubukların, lazer gücü, ışım süresi ve konsantrasyona göre içindeki buldukları sulu ortamın sıcaklığını artırma kapasitelerinin belirlenmesinin sonuçları açıklamaya yardımcı olacağına karar verildi. PR2 ve PR3'in değişen konsantrasyonlarda PBS içindeki çözeltileri, 20 dakika boyunca iki farklı güçte (780nm lazer (100 mW) ve 808 nm lazer (200 mW ve 500 mW)) diyot lazer ışımına maruz bırakılarak çözeltilerdeki sıcaklık artışı takip edildi. Sonuçlar, Şekil 4.28 ve 29'da verilmektedir. Çözeltilerin hepsinde nanoçubuk içermeyen boş çözeltiliye göre belirgin şekilde farklı sıcaklık artışı olduğu gözlenmiştir. Sıcaklık artışı bütün örnekler için 10 ila 20 dk içinde sabit değerlere ulaşmaktadır. PR2 120 μ M konsantrasyonda dahi ortamın sıcaklığını, lazer gücüne bağlı olarak 40°C (100 mW) ve yaklaşık 55°C (200 mW) ve 60°C (500 mW)'ye yükseltmiştir. PR3'ün

aynı şartlar altında sebep olduğu sıcaklık artışları görece düşük kalmıştır. Bu sonuçlar ışığında fototermal etki deneylerinde PR2'nin, yüksek güçte (200 veya 500 mW, 808 nm) lazerin ve 10 ila 20 dk ışımaya süresinin kullanılmasının uygun olduğuna karar verilmiştir.



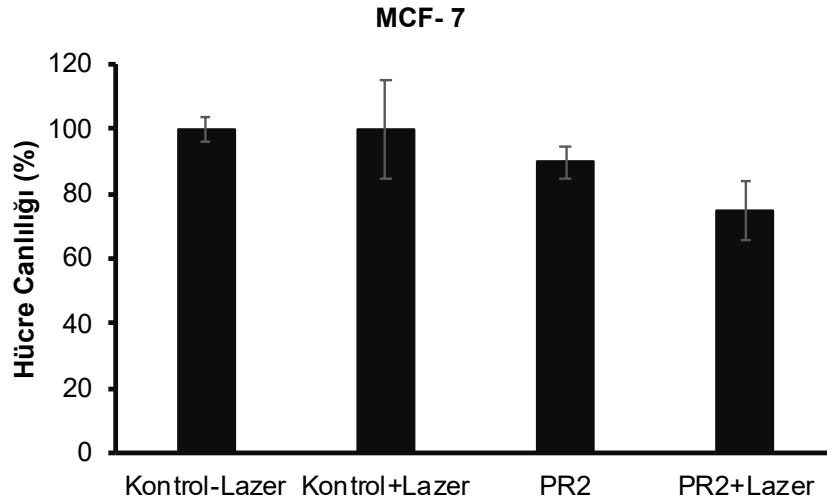
Şekil 4.28. Lazere (780 nm, 100 mW) maruz bırakılan (A) PR2 ve (B) PR3 çözeltilerinin zamana bağlı sıcaklık değişimleri (n=3).



Şekil 4.29. Lazere (808 nm, 200 mW) maruz bırakılan (A) PR2 ve (B) PR3 çözeltilerinin zamana bağlı sıcaklık değişimleri. (C) Lazere (808 nm, 500mW) maruz bırakılan PR2 çözeltilisinin zamana bağlı sıcaklık değişimi (n=3).

Daha sonra, hücelere giren nanoçubuk miktarını dolayısıyla elde edilecek fototermal etkiyi arttıracak, ancak hücre canlılığının %80 ve üzerinde olacağı yüksek bir konsantrasyonda (300 μ M konsantrasyonda) PR2, MCF7 meme kanseri hücreleri ile 24 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra hücreler iki kez PBS ile yıkanmıştır. Ardından

kuyucuklara besiyeri ilave edilip 808 nm dalga boyunda görece yüksek güçte lazer (200 mW) 15 dakika süre ile uygulanmıştır. Lazer uygulaması yapıldıktan sonra hücrelerin canlılığı MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Canlılık sonuçları, lazer ile muamele edilmemiş hücrelerin (Kontrol-Lazer) viabilitesi 100% kabul edilerek hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.30'da verilmektedir. Elde edilen sonuçlarda MCF7 hücrelerinde uygulanan şartlarda PR2 + lazer etkisi ile hücre canlılığı yaklaşık 75 ± 10 'a düşmüştür. Kontrol gruplarında, PR2 eklenmemiş hücrelerde lazer uygulanan (+Lazer) ve uygulanmayan (-Lazer) arasında belirgin bir canlılık farkı gözlemlenmemiştir (yaklaşık %100). Bunun yanı sıra PR2 eklenmiş ve lazer uygulanmamış hücrelerin canlılığı ise yaklaşık 92 ± 6 'dır. Hücre canlılığı arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



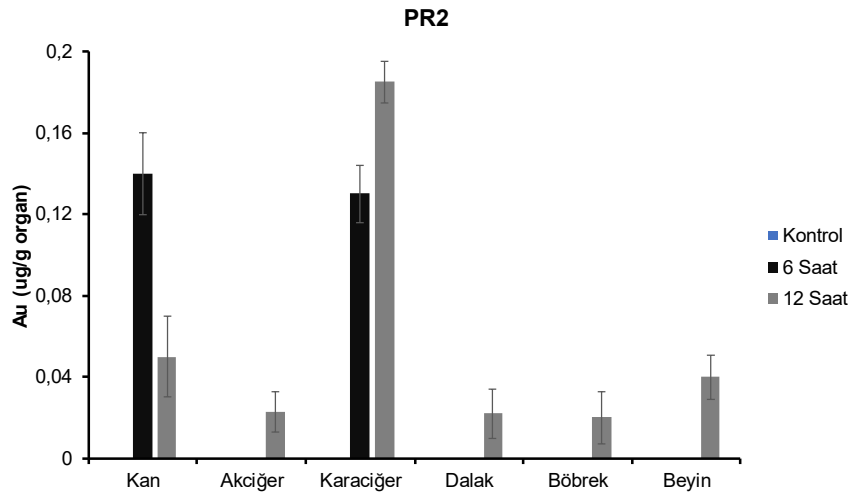
Şekil 4.30. 300 μ M PR2 ile inkübe edilmiş MCF7 meme kanser hücrelerinin 15 dk lazer (808 nm, 200 mW) uygulaması sonrası hücre canlılık yüzdeleri. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p < 0.05).

4.1.5 Nanoçubukların In Vivo Değerlendirmeleri

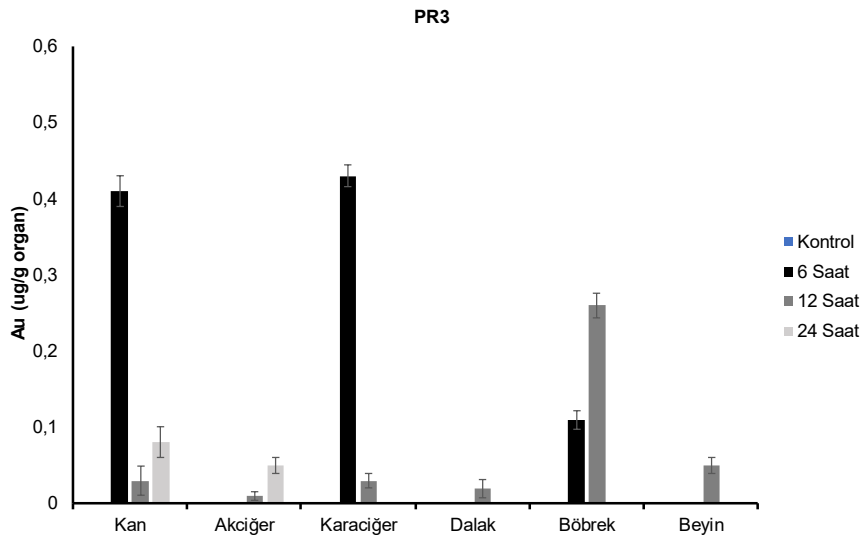
4.1.5.1 Sağlıklı Farelerde Biyodağılım ve Doz Denemeleri

Öncelikle PR2 ve PR3'ün biyodağılımları, sağlıklı farelerde 1.2 mM konsantrasyonda (yaklaşık doz 1.5 μ g altın/g fare) 6, 12 ve 24 saat süre ile incelenmiştir. Kontrol grubuna 200 μ l steril PBS ve deney grubuna 200 μ l steril PBS içerisinde çözülmüş PEGlenmiş altın nanoçubuklar (PR2 ve PR3) kuyruktan enjekte edilmiştir. Enjeksiyon işleminden 6, 12 ve 24 saat sonra kontrol ve deney hayvanlarından organlar ve kan örnekleri toplanarak tartılmış, kurutulmuş ve ICP-MS ile analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçları Şekil 4.31 ve 4.32'de

sunulmaktadır. Her iki nanoçubuk uygulamasında da farelerde 24 saat boyunca hiçbir olumsuz değişiklik gözlenmemiştir. 24 saat sonucu toplanan çoğu organda metabolik aktivite sonucu ölçülebilir altın değerleri elde edilememiştir. Sonuçlar incelendiğinde PR2 ilk 6 saatte en fazla kanda görülmüştür. 12 saatin sonunda ise kandaki oranın azaldığı gözlenmiştir. Karaciğerde birikimin arttığı gözlenmiştir. 24 saat sonunda organlarda ICP-MS ile ölçülebilir altın miktarı gözlenmemiştir. PR3'ten elde edilen sonuçlara göre ilk 6 saatte en fazla karaciğer ve kanda yoğunluk görülmüştür. 12 saatin sonunda ise karaciğer ve kandaki altın oranı azalıp böbrekte artış göstermiştir. 24 saat sonunda kan ve akciğerde az miktarda altın gözlenmiştir.

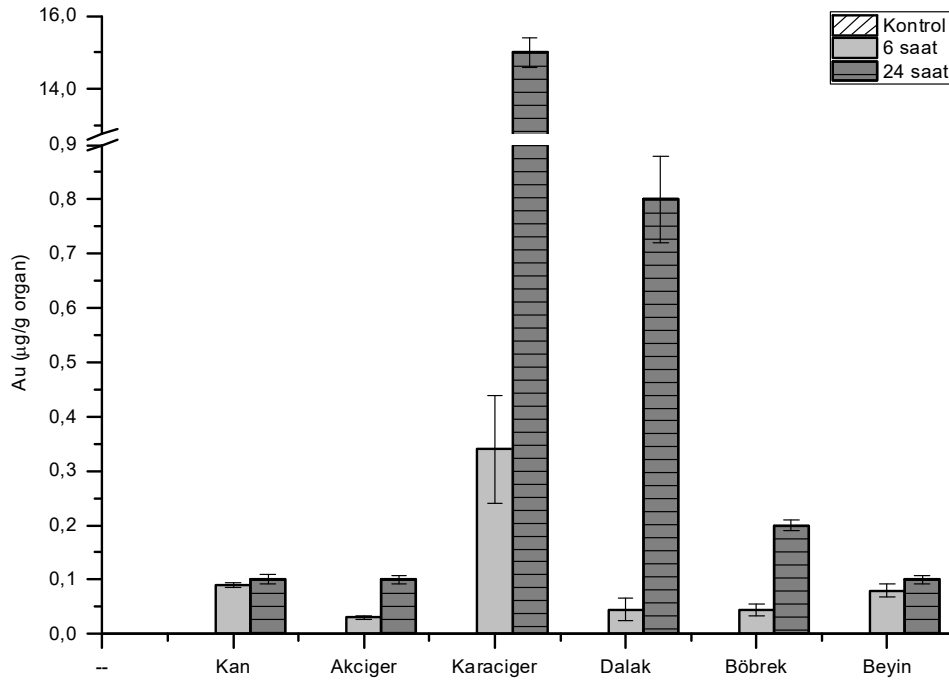


Şekil 4.31. PR2'nin (1.2 mM) sağlıklı dişi farede farklı zamanlarda biyodağılımı (μg altın/g organ) (n=2).

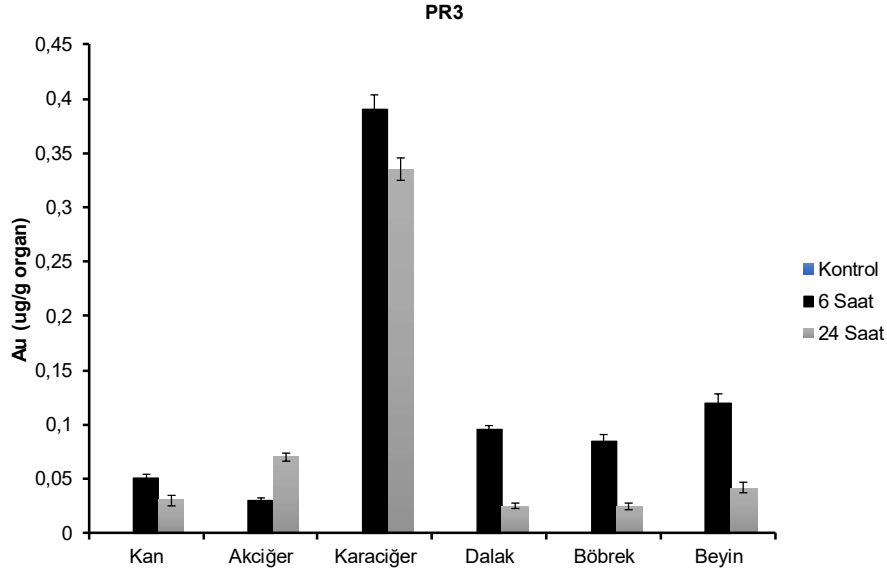


Şekil 4.32. PR3'nin (1.2 Mm) sağlıklı dişi farelerde farklı zamanlarda biyodağılımı (μg altın/g organ) (n=2).

Sonraki aşamada nanoçubukların dozu yaklaşık 2.3 kat artırılmıştır (2.8 Mm, yaklaşık doz 3.5 μg altın/g fare) PR2 ve PR3 farelere enjekte edilmiş ve 6 ve 24. saatlerde biyodistribüsyon belirlenmiştir. Denenen bu yüksek dozda da farelerde 24 saat boyunca hiçbir olumsuz gelişme gözlenmemiştir. Şekil 4.33 ve Şekil 4.34'de sonuçlar sunulmaktadır. Sonuçlar incelendiğinde önceki deneye yakın sonuçlar bulunmuştur. PR2'nin ilk 6 saatte kanda ve karaciğerde olduğu 24 saatte ise kandaki oranı azalıp karaciğerde birikimin arttığı gözlenmiştir. PR3'ten elde edilen sonuçlarda ise ilk 6 saatte en fazla karaciğer ve çok daha az kanda yoğunluk görülmüş, 24 saatin sonunda ise kandaki altın oranı azalıp karaciğerde artış göstermiştir. PR3 çok belirgin olmakla beraber her iki nanoçubuğun da beyin dokusunda olduğu görülmüştür.



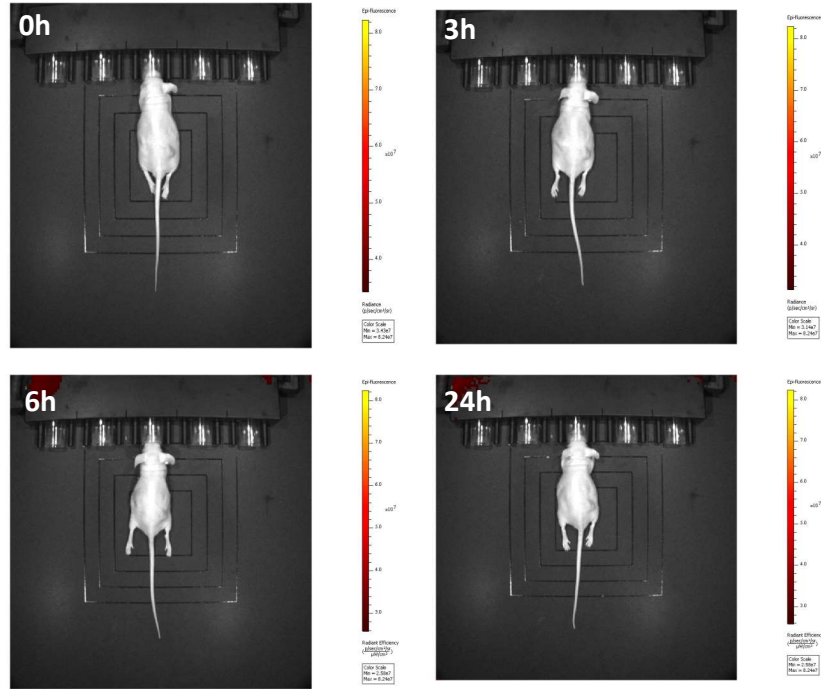
Şekil 4.33. PR2'nin (2.8 Mm) sağlıklı dişi farede farklı zamanlarda biyodağılımı (μg altın/g organ) (n=2).



Şekil 4.34. PR3'nin (2.8 Mm) sağlıklı dişi farede farklı zamanlarda biyodağılımı (μg altın/g organ) (n=2).

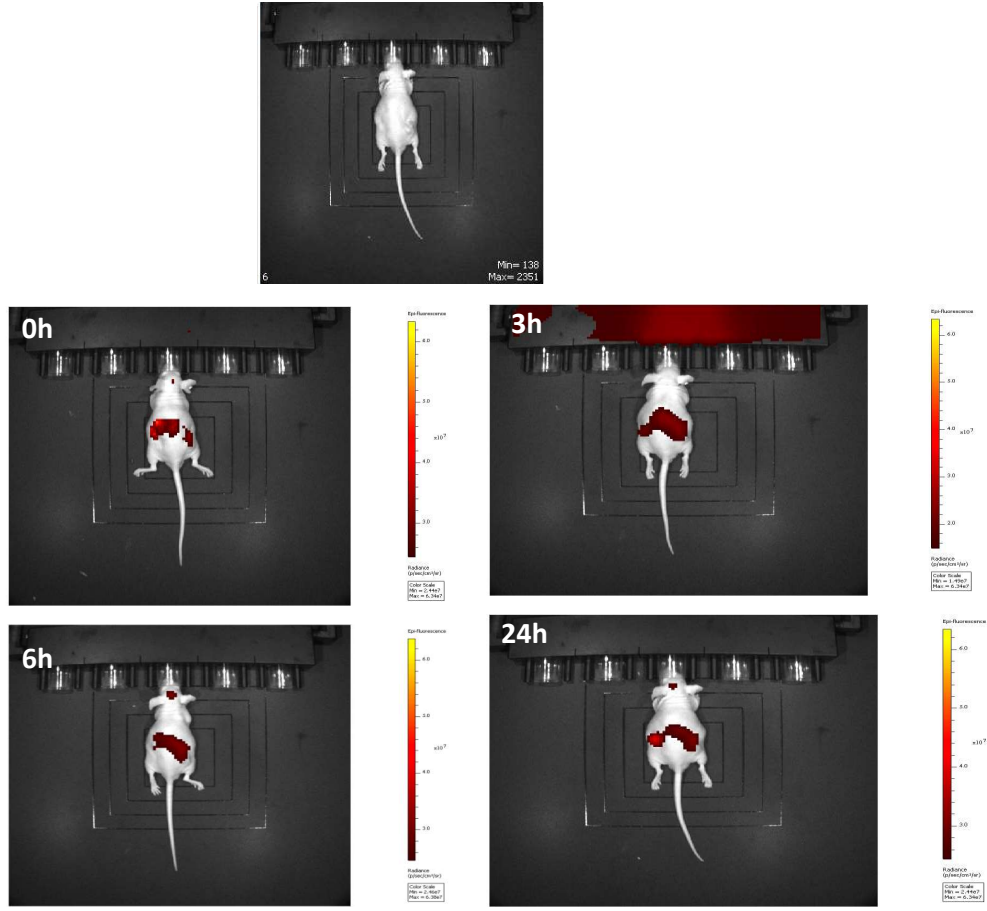
4.1.5.2 Tümörlü Farelerde Biyodağılım

Öncelikle erkek nude farelerde DU-145 hücrelerinin enjeksiyonu ile prostat tümörü oluşturuldu. İlk olarak fluoresans ile işaretlenmiş serbest monoklonal antikor (4.26 mg/200 μl)'un biyodistribüsyonu IVIS mikroskobu ile 24 saat boyunca belirli aralıklar ile canlı hayvanda incelendi. 24 saat sonunda fareler öldürülerek akciğer, karaciğer, beyin, dalak, böbrek ve kan dokuları toplandı. Enjeksiyon sonrası 0. saat (yaklaşık ilk 15 dk içinde), 3., 6. ve 24. saat sonrası alınmış IVIS mikroskop sonuçları Şekil 4.35'de gösterilmektedir. Aynı zamanda sadece PBS enjekte edilmiş farenin IVIS mikroskop görüntüleri de kontrol grubu olarak Şekil 4.36'da görülmektedir. Görüntülerden, enjeksiyondan 6 saat sonra enjekte edilen antikorun tümörde toplanmaya başladığı ve 24 saat içinde çok yüksek yoğunlukta tümörde toplandığı görülmüştür.



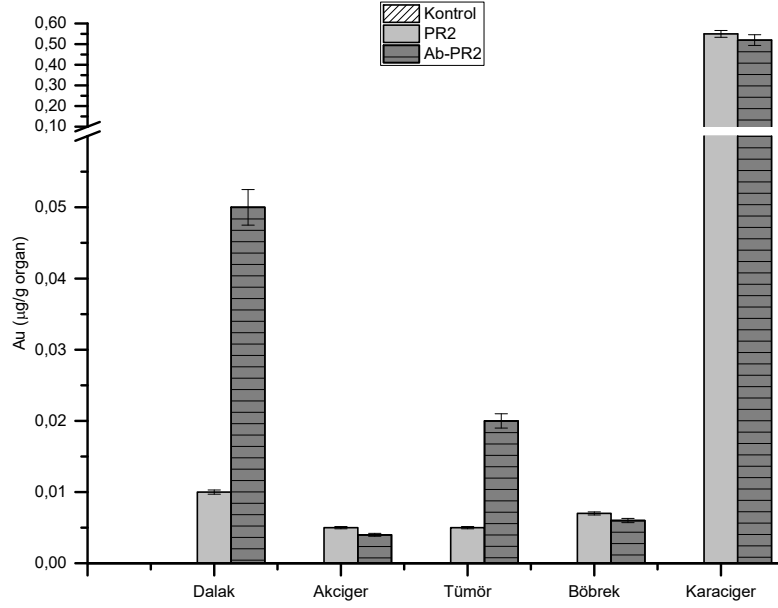
Şekil 4.36. Prostat tümörlü farelerin, sadece PBS i.v. enjeksiyonu 3, 6, ve 24 saat sonrası IVIS mikroskop ile alınmış floresans görüntüleri.

Serbest antikor enjeksiyonuna paralel, fluoresan ile işaretlenmiş Ab-PR2 ve işaretli PR2, yüksek dozda (3.5 mM, 132 µg Au/200µl PBS) prostat tümörlü farelere i.v. yolu ile kuyruktan enjekte edilmiştir (n=2). Ab-PR2'nin biyodistribüsyonu IVIS mikroskobu ile 24 saat boyunca belirli aralıklar ile canlı hayvanda incelendi. 24 saat sonunda fareler öldürülerek akciğer, karaciğer, beyin, dalak, böbrek ve kan dokuları toplandı. Enjeksiyon sonrası 0. saat, 3., 6. ve 24. saat sonrası alınmış IVIS mikroskop sonuçları Şekil 4.37'de gösterilmektedir. Sonuçlardan görüleceği üzere Ab-PR2 de hem tümör hem de karaciğer dokusunda enjeksiyondan hemen sonra birikmeye başlamıştır. 24 saat sonunda karaciğerde daha yoğun olmakla beraber tümörde de tamamen homojen olmamakla beraber birikimi olduğu açıktır.



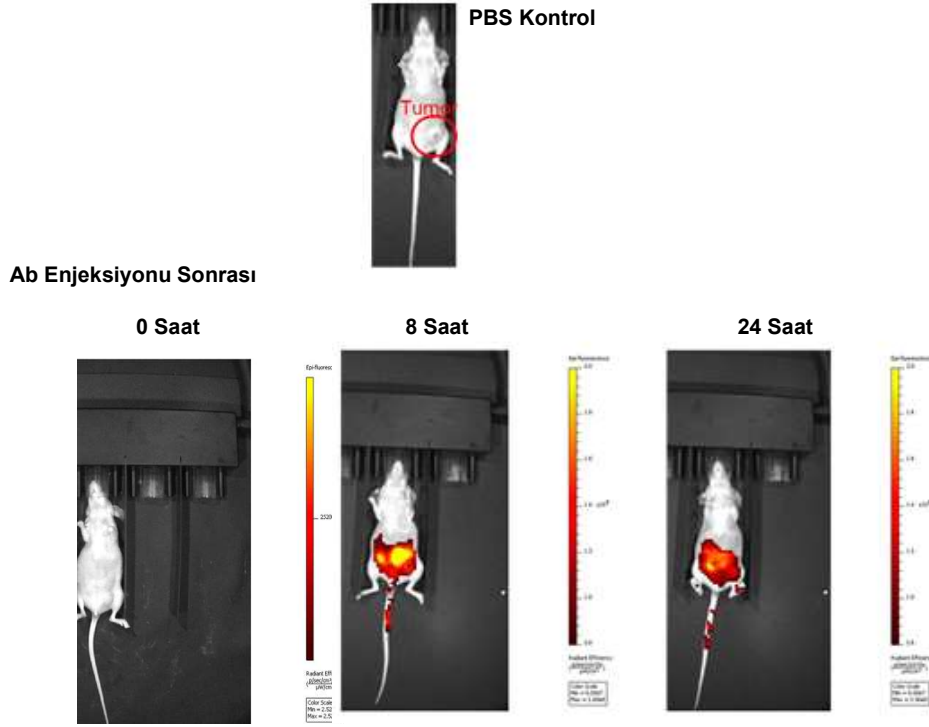
Şekil 4.37. Prostat tümörlü farelerin, PR2 ve Ab-PR2 i.v. enjeksiyonu 3., 6. ve 24. saat sonrası IVIS mikroskop ile alınmış floresans görüntüleri. PR2 ve Ab-PR2, Alexa Flor-647 ile işaretlenmiştir.

Prostat tümörü modelinden toplanan dokular ayrıca ICP-MS ile de incelenmiştir. Bu incelemeler için, PR2 ve Ab-PR2 (3.8 mM, 150 µg Au/200µl PBS) kuyruktan enjekte edilmiştir. Enjeksiyonun işleminden 24 saat sonra kontrol (n=2) ve deney (n=2) hayvanlarından organlar toplanarak tartılmış, kurutulmuş ve ICP-MS ile analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçları Şekil 4.38'de sunulmaktadır. Her iki nanoçubuk uygulamasında da farelerde 24 saat boyunca hiçbir olumsuz değişiklik gözlenmemiştir. Sonuçlar incelendiğinde PR2 ve Ab-PR2'nin 24 saatte büyük oranda karaciğerde olduğu gözlenmiştir. Ayrıca antikor bağlı altın nanoçubukların (Ab-PR2), PR2'ye göre, tümörde birikimlerinin hafifçe daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Akciğer ve böbrekte her iki nanoçubuk da birbirlerine yakın biyodağılım göstermişlerdir. Prostat tümörü modellerinde histolojik inceleme, doku örneklerinin fiksasyonunda yaşanan deneysel bir sorun nedeni ile gerçekleştirilememiştir.

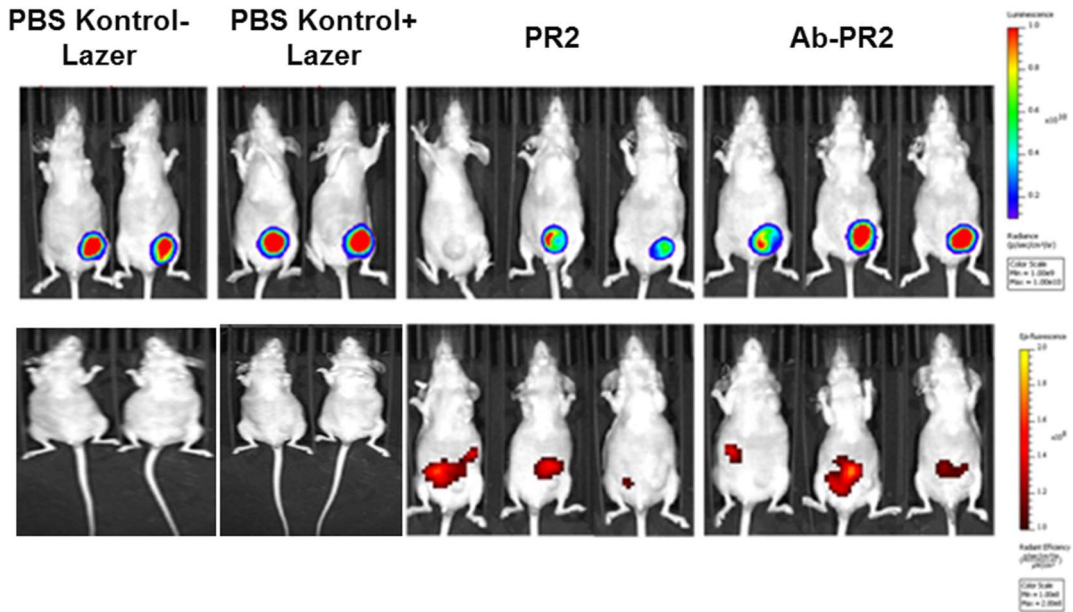


Şekil 4.38. PR2 ve Ab-PR2'nin (3.8 Mm) prostat tümörlü fare modellerinde, ICP-MS ile belirlenmiş 24 saat sonundaki biyodağılımı (μg altın/g organ) (n=2).

Final rapor döneminde, antikor (Ab), PR2 ve Ab-PR2'in biyodağılımları, hem lümünesans hem de floresans özelliğe sahip MDA-MB-231-Luc2-GFP meme kanseri hücrelerinin enjeksiyonu ile meme tümörü oluşturulmuş dişi farelerde de incelenmiştir. Bu amaçla Alexa Flor işaretli antikor veya nanoçubuklar (PR2 ve Ab-PR2) kuyruktan i.v. enjekte edilmiş (n=3) ve 24 saat süre ile IVIS mikroskobu ile incelenmiştir. Kontrol grubuna (Kontrol-Lazer n=2, Kontrol+Lazer n=2) 200 μl steril PBS enjeksiyonu yapılmıştır. Nanoçubuklar, 3,8 mM konsantrasyonda (yaklaşık doz 150 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ PBS; 5 μg altın/g fare) olacak şekilde enjekte edilmiştir. Antikorum zamanla biyodağılımını gösteren IVIS mikroskop floresans görüntüleri Şekil 4.39'da, PR2 ve Ab-PR2 gruplarının enjeksiyondan 24 saat sonra IVIS mikroskobu ile alınmış biyolimünesans ve floresans görüntüleri ise Şekil 4.40'da sunulmuştur. Tümörde toplanan antikor miktarı, karaciğer, böbrekler ve diğer organlara göre belirgin bir şekilde düşüktür. Buna uygun olarak, Ab-PR2 ve PR2 gruplarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

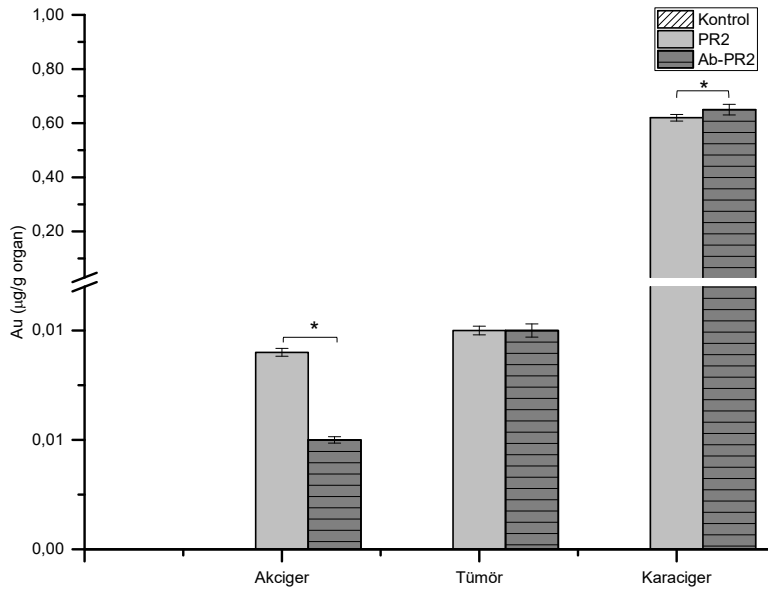


Şekil 4.39. Meme tümörlü farelerin, serbest antikörün (Ab) i.v. enjeksiyonu 0, 8 ve 24 saat sonrası IVIS mikroskobu ile alınmış floresans görüntüleri. Antikör, Alexa Flor-647 ile işaretlenmiştir.



Şekil 4.40. Meme tümörlü farelerin, PBS kontroller (-Lazer, n=2; +Lazer, n=2), ve nanoçubuk örnekleri PR2 (n=3) ve Ab-PR2 (n=3) i.v. enjeksiyonu 24 saat sonrası IVIS mikroskop ile alınmış biyolimünenans ve floresans görüntüleri. PR2 ve Ab-PR2 Alexa Flor-647 ile işaretlenmiştir.

Meme tümör modellerinin ICP-MS analizleri için enjeksiyon işleminden 24 saat sonra kontrol ve deney hayvanlarından organlar toplanarak tartılmış, kurutulmuş ve ICP-MS ile analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçları Şekil 4.41'de sunulmaktadır. Sonuçlar incelendiğinde PR2 ve Ab-PR2'nin 24 saatte büyük oranda karaciğerde toplandığı görülmektedir. Ayrıca PR2 'nin akciğerdeki birikim oranı Ab-PR2 göre daha fazladır. PR2 ve Ab-PR2'nin tümör birikim değerlerinde bir farklılık yoktur. ICP-MS sonuçları da IVIS mikroskop görüntülerini destekler niteliktedir.

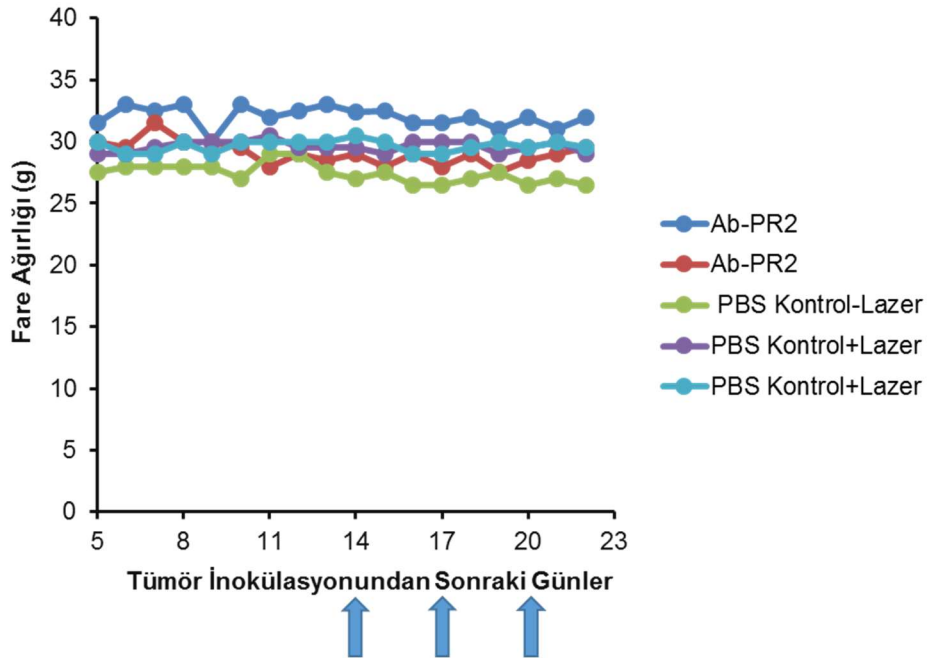


Şekil 4.41. Meme tümürlü farelerin, PBS kontroller (-Lazer, n=2; +Lazer, n=2), ve nanoçubuk örnekleri PR2 (n=3) ve Ab-PR2 (n=3) i.v. enjeksiyonu 24 saat sonrası ICP-MS ile belirlenmiş biyodağılım sonuçları. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n= 3; * p <0.05).

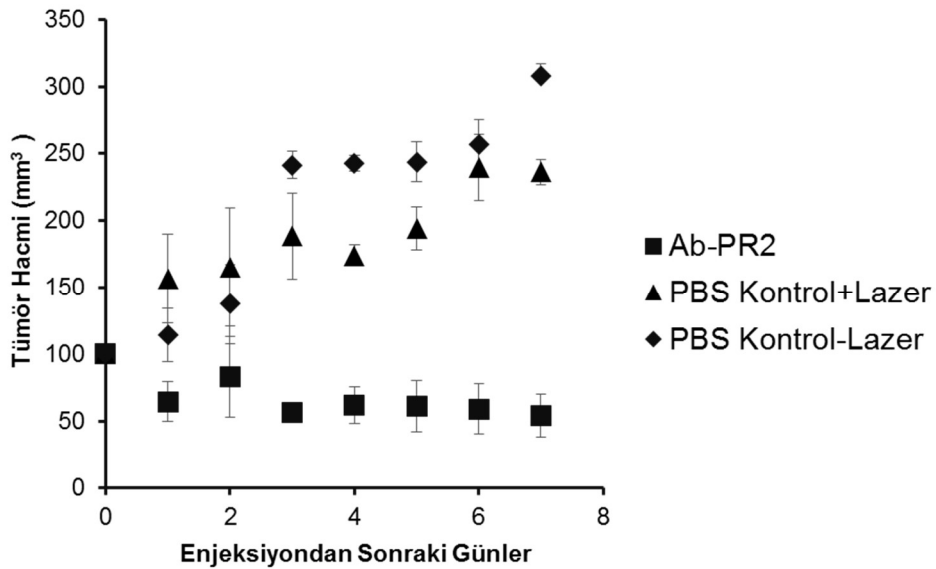
4.1.5.3 Tümürlü Farelerde Fototermal Terapi

Prostat tümürlü farelerde, ilgili formülasyonların enjeksiyonları sonrası lazer (808 nm, 500 mW güç, 10 dakika) uygulamasının tümör hacmine etkisi 7 gün süre ile takip edilmiştir. PBS enjekte edilmiş lazer uygulaması yapılmış (PBS Kontrol+ Lazer, n=2) ve yapılmamış (PBS Kontrol-Lazer, n=1) fareler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Tüm deney süresince farelerin ağırlıklarında önemli bir değişiklik olmamıştır (Şekil 4.42). Ab-PR2 enjekte edilmiş farelerde (n=2) lazer uygulaması sonrası tümör hacminin değişimi Şekil 4.43'de görülmektedir. Görüleceği üzere tümör hacmi altın nanoçubuk enjekte edilmiş farelerde (n=2) 7 gün içinde %54'e düşmüştür. PBS kontrol grubunda, lazer uygulanmış farelerde (n=2) aynı süre içinde tümör hacminde %250, lazer uygulanmamış farede (n=1) %300 artış olmuştur. Standart

sapmalar dikkate alındığında kontrol grupları ile nanoçubuk (Ab-PR2) grubu arasındaki fark oldukça belirgindir.

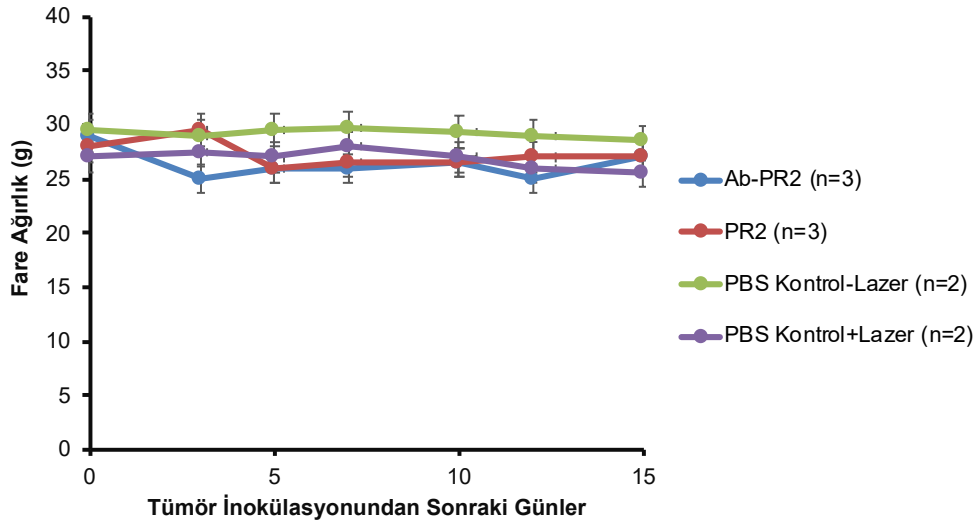


Şekil 4.42. Prostat tümürlü farelerde tümör oluşumundan fototermal deney sonucuna kadar ağırlıklarındaki değişim. Oklar Ab-PR2 ve PBS (kontrol) enjeksiyonlarının yapıldığı günleri göstermektedir.

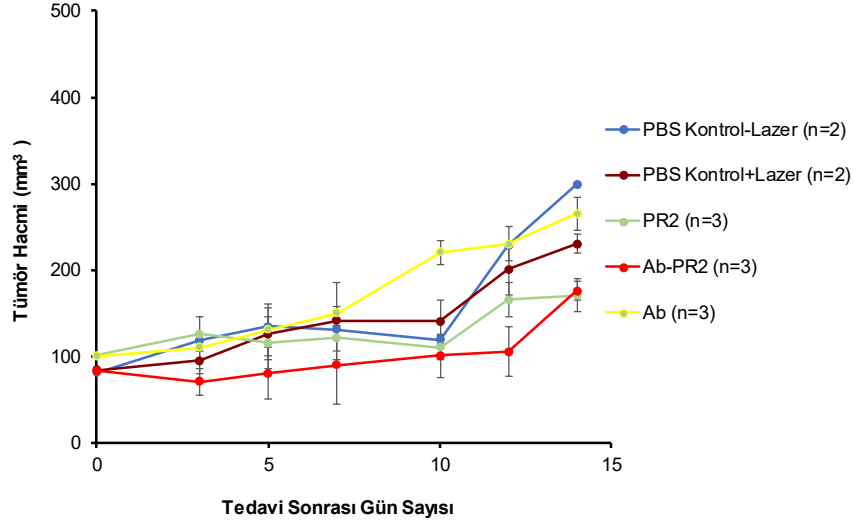


Şekil 4.43. Prostat tümürlü farelerde Ab-PR2 kullanılarak gerçekleştirilen fototermal terapi uygulaması ile tümör hacminin değişimi (Ab-PR2 n=2; PBS Kontrol+Lazer n=2; PBS Kontrol-Lazer, n=1)

Benzer şekilde meme tümörlü dişi farelerde de 808 nm, 500 mW lazer ile enjeksiyonlar sonrası yapılan fototermal terapi deneyleri gerçekleştirilmiştir. Fareler iki hafta süre ile takip edilmiştir. Tedavi sırasında fare ağırlıklarında belirgin bir değişiklik olmamıştır (Şekil 4.44). Tümör haciminin takibi sonucu, PBS-Lazer ve PBS+Lazer kontrollerine göre, Ab-PR2 + lazer uygulaması ile tümör büyümesinin bir süre hafif bir şekilde baskılandığı ancak ikinci haftanın sonunda farklı uygulamalar sonucu tümör boyutlarında istatistiksel belirgin bir farklılık olmadığı görülmüştür (Şekil 4.45). Tümör baskılanmasının, tek başına antikordan kaynaklanıp kaynaklanmadığının anlaşılması için ayrı bir deneyde serbest antikör enjeksiyonu (21.3g/L) sonrası takip edilmiş olan tümör hacim değerleri de aynı grafik üzerinde sunulmuştur. Serbest antikörün meme tümörü büyümesini baskılamadığı görülmektedir.



Şekil 4.44. Meme tümörlü farelerde tümör oluşumundan fototermal deney sonucuna kadar ağırlıklarındaki değişimi göstermektedir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (PR2, Ab-PR2 ve Ab için n = 3; PBS-Lazer ve PBS+Lazer için n=2; * p <0.05).

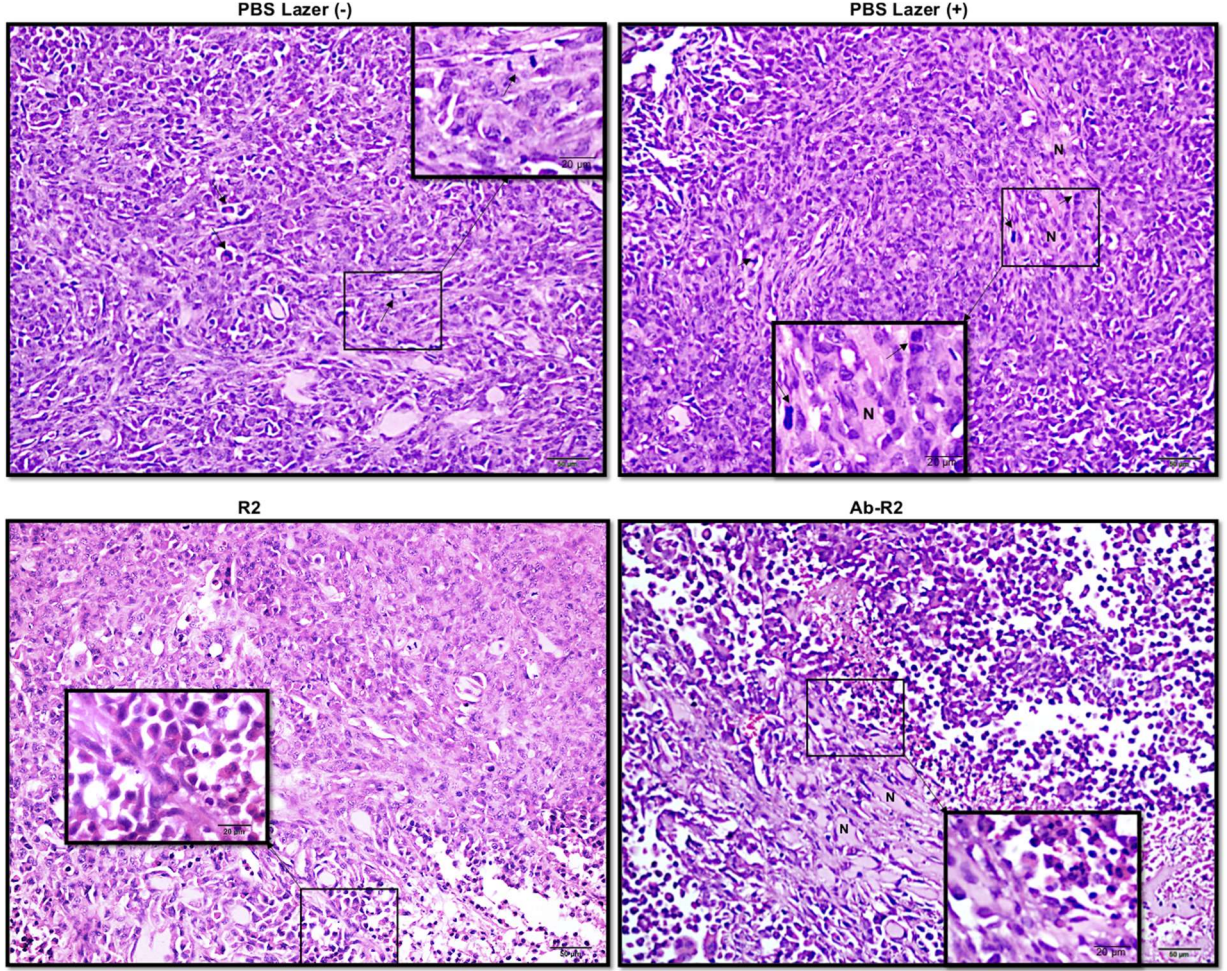


Şekil 4.45. Meme tümörlü farelerde tümör oluşumundan fototermal deney sonucuna kadar tümör hacmindeki değişim. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (PR2, Ab-PR2 ve Ab için n = 3; PBS-Lazer ve PBS+Lazer için n=2; * p <0.05).

4.1.5.4 Histolojik İncelemeler

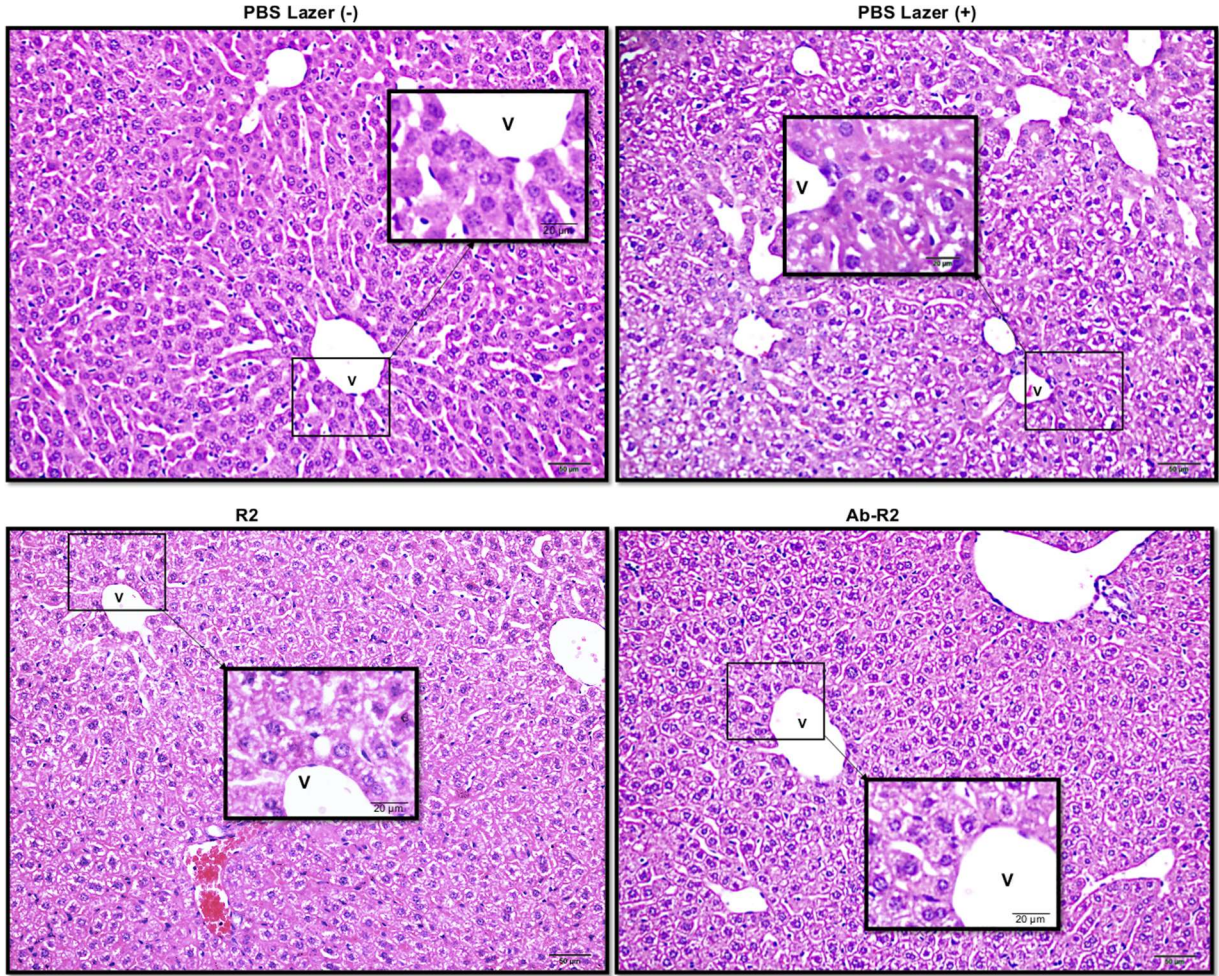
In vivo meme kanser modelinde, tedavi edilen ve tedavi edilmeyen gruplara ait olan tümör dokusu, karaciğer, akciğer, dalak, böbrek ve beyin dokuları alınarak histolojik incelemeler için kullanılmıştır. Alınana doku örneklerinin histolojik takipleri yapılmıştır. Takibi yapılan dokulardan 5 μ m kalınlığında kesitler alınarak H&E boyama işlemleri yapılarak değerlendirilmiştir.

Tümör dokusunun H&E boyama sonuçları, parankim ve meme dokusu stromasında hücrelerinin hızlı ve kontrolsüz büyümesine bağlı olarak belirli alanda tipik ve atipik mitotik figürler saptanmıştır. Bazı kısımlarda nekrotik alanlar tespit edilmiştir. PBS Kontrol-Lazer ve PBS Kontrol+Lazer gruplarında yüksek malignite ile ilişkili özelliklerin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu gruplarda, yüksek proliferasyon aktivitesi ile ilişkili mitotik figürlerin yoğun olduğu saptanmıştır. Ayrıca, bu gruplarda belirli bölgelerde nekrotik alanların varlığı tespit edilmiştir. Ab-PR2 grubunda ise daha az alanda mitotik figürlerin olduğu görülmüştür. Ab-PR2 grubunda yoğun bir şekilde nekrotik alanların varlığı saptanmıştır (Şekil 4.46).



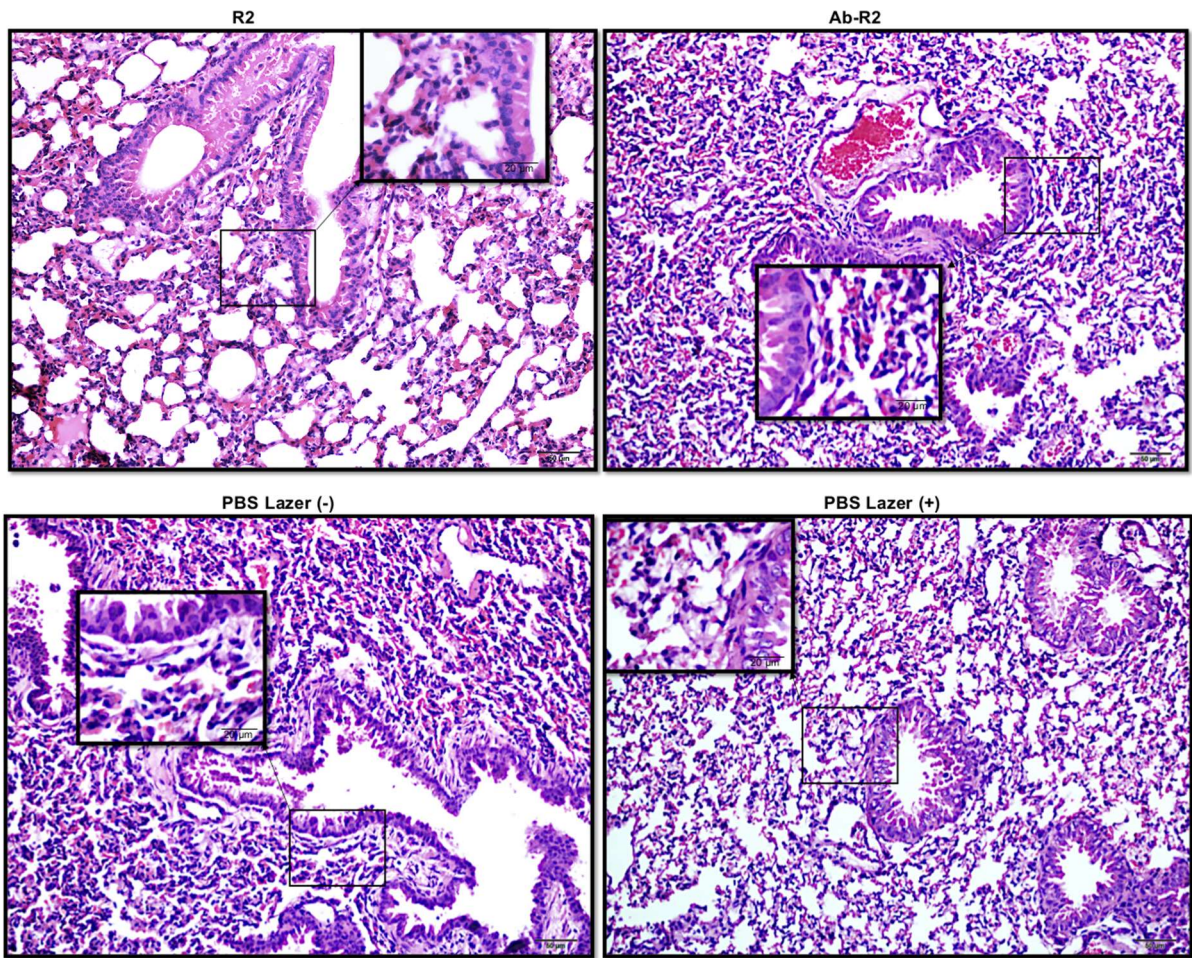
Şekil 4.46. Meme tümör dokularına ait histolojik görünümü. Oklar mitotik figürler ve (N) nekrotik alanlara ait imajları göstermektedir (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).

Işık mikroskopunda H&E boyamalarında, PBS lazer(-) grubuna ait karaciğer dokusunun temel histolojik yapısının korunduğu saptanmıştır. Vena centralis, interlobüler alanlar, Hepatositlerin ve sinüzoidal yapının normal görünümde olduğu gözlemlendi. Gruba ait karaciğer dokularında hepatositlerde yoğun makro ve mikroveziküler yağ vakuelleri görüldü (Şekil 4.47. a, b). Bu vakuoller parankimdeki hepatositlerin çoğunda saptandı. PBS lazer(+), PR2 ve Ab-PR2 gruplarında ise, karaciğer dokularında hepatositlerde yoğun vakuolar tarzda dejenerasyonlar görülmüştür (Şekil 4.47). Bu vakuoller görünümünün parankimdeki hepatositlerin çoğunda olduğu saptanmıştır.



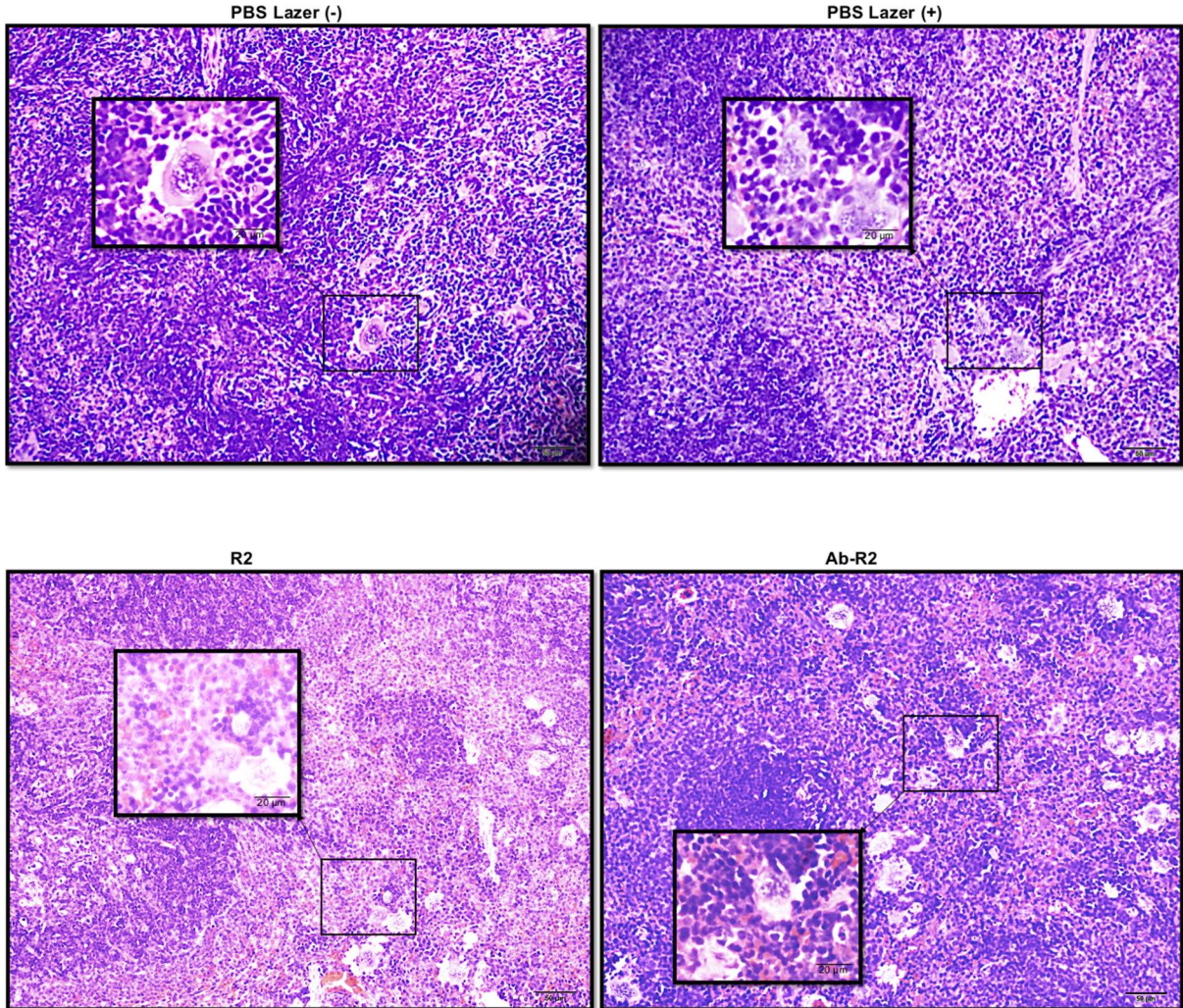
Şekil 4.47. Karaciğer dokularına ait histolojik görünümü. (V) Vena centralis (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).

Gruplara ait akciğer preparatlarının ışık mikroskopik değerlendirmesinde, hematoksilin-eosin ile boyanmış akciğer dokusu örneklerini incelemesinde genel olarak herhangi bir histopatolojik bulgu saptanmamıştır. Gruplara ait akciğer doku kesitleri incelendiğinde, terminal bronşiyoller, respiratoruar bronşiyoller, duktus alveolaris, sakkus alveolaris ve pulmoner interstisyum yapılarının normal olduğu görülmüştür (Şekil 4.48). Genel olarak epitel yapısının bütünlüğünün korunduğu tespit edilmiştir. Damar duvar kalınlığının normal olarak izlenmiştir. PBS lazer(-) grubu dışındaki diğer gruplarda yer yer terminal bronşiyol yapılarında önemsenmeyecek derecede az miktarda hücre debrisinin olduğu görülmüştür.



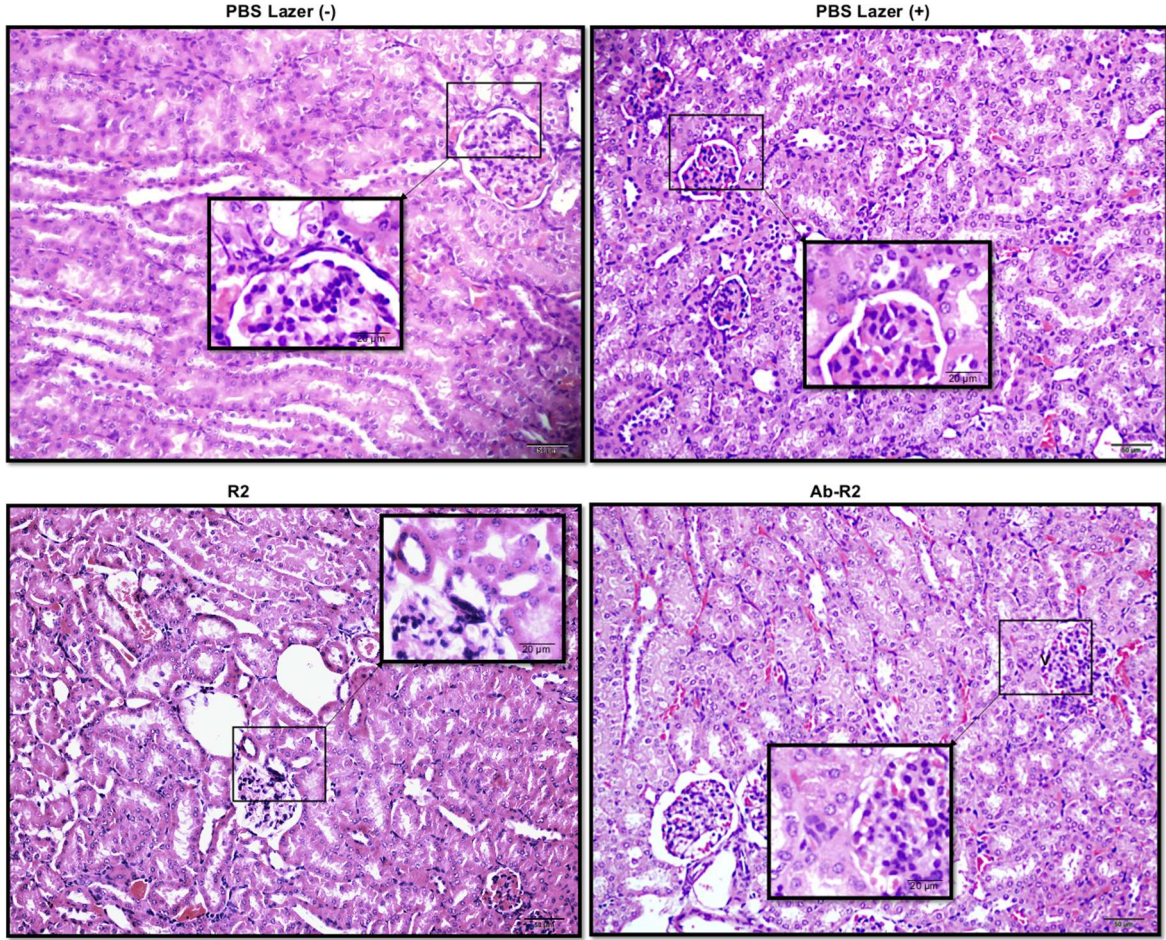
Şekil 4.48. Akciğer dokularına ait histolojik görünümü (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).

Tümör modellerinde, dalak organına bağlı bazı makroskobik ve mikroskobik bulgular önem arz etmektedir. Dalak ile ilgili yapılan makroskobik gözlemlerde, dalakta herhangi bir büyümenin (splenomegali) olmadığını saptanmıştır. Mikroskobik analizlerdeki H-E boyama sonuçları tüm deney gruplarında, dalağın normal histolojik yapısının korunduğu tespit edilmiştir. Kırmızı ve beyaz pulpa alanlarının birbirinden marjinal zonla ayrıldıkları görülmektedir. Beyaz pulpaya ait foliküler yapılar ve kırmızı pulpaya ait sinüzoidal yapıları normal olarak izlenmiştir. Dalakta en ilgi çekici özellik, bazı alanlarda özellikle kırmızı pulpa alanlarında megakaryosit serisine ait hücrelerin varlığı saptanmıştır. PBS lazer (-) grubu ile kıyaslandığında, diğer gruplarda bu hücrelerin sayıca daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bunun dışında, R2 ve Ab-R2 gruplarına ait dalak kesitlerinde kırmızı pulpa alanlarında eritroblastik hücre gruplarının daha yoğun olduğu görülmüştür (Şekil 4.49).



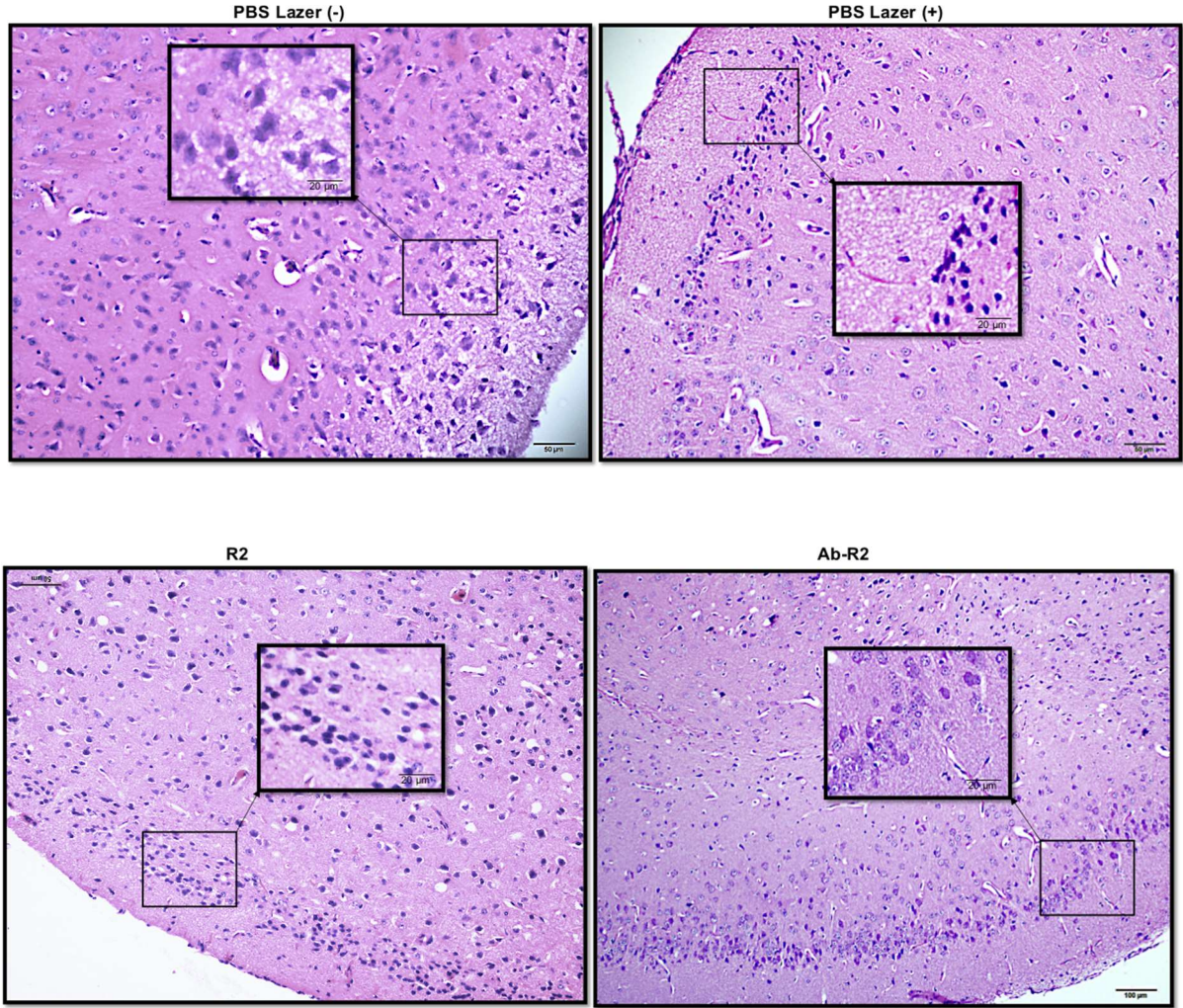
Şekil 4.49. Dalak dokularına ait histolojik görünümü (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).

Böbrek dokusuna ait kesitlerin histolojik değerlendirmelerde, tüm gruplara ait böbrek dokuları normal olarak izlenmiştir. Korteks ve medullar alanların normal histolojik görünümde olduğu saptanmıştır. Bowman boşluğunun normal genişlikte olduğu görülmüştür. Korteks alanlarındaki glomerul yapısının düzenli olduğu saptanmıştır. Proksimal tübüllerle ait nükleus ve mikrovillus yapılarının normal olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde, distal ve boşaltım tübüllerinde herhangi bir anormal görünüm tespit edilmemiştir (Şekil 4.50).



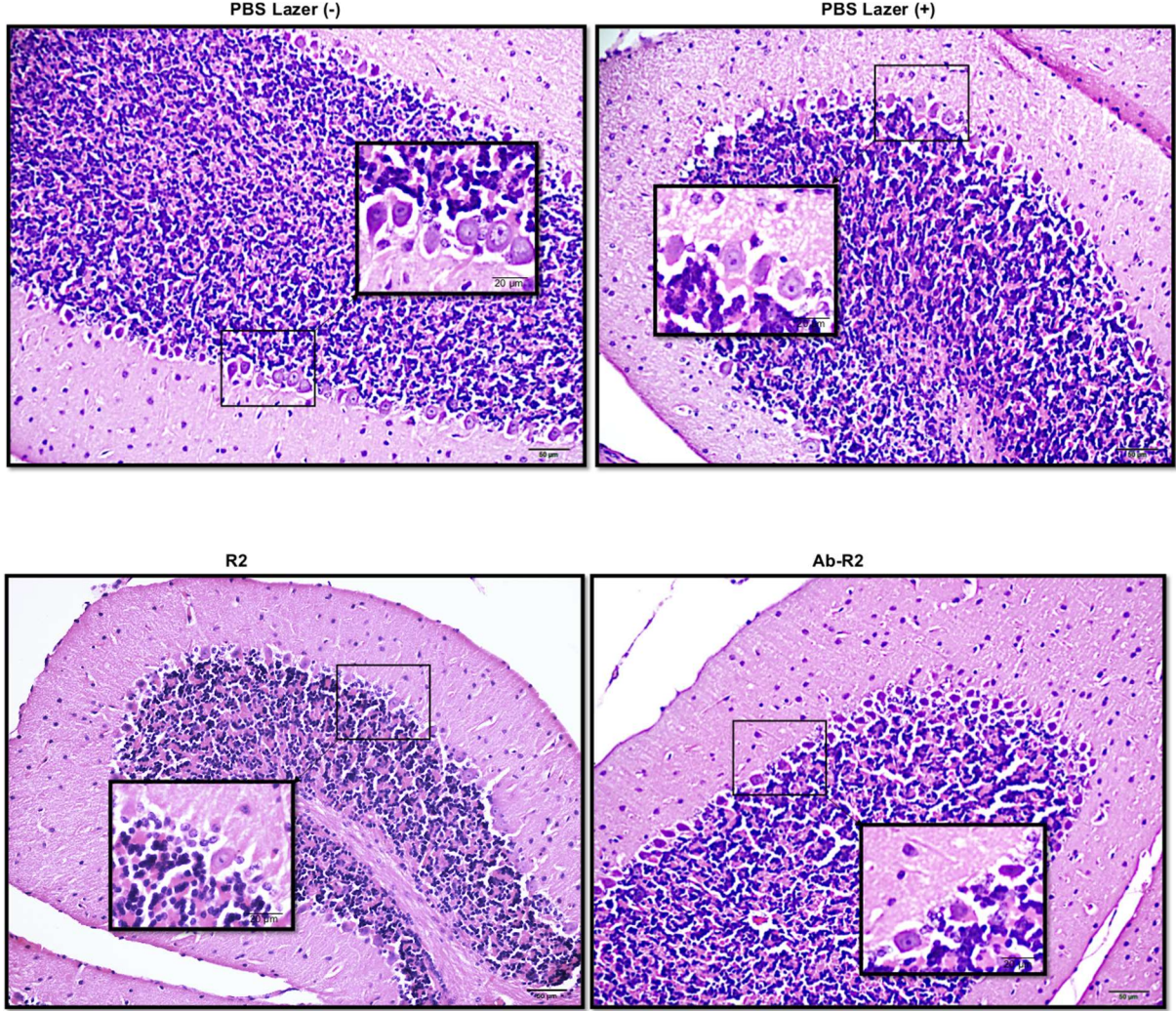
Şekil 4.50. Böbrek dokularına ait histolojik görünümü (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).

Cerebrum dokularına ait kesitler ile yapılan IHC boyama sonuçları, PBS lazer (-), PBS lazer (+), R2 ve Ab-R2 gruplarında anti-KDN antikörünün negatif boyandığını göstermiştir. Cerebrum dokusuna ait hücrelerde anti-KDN antikörünün boyanmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.51).



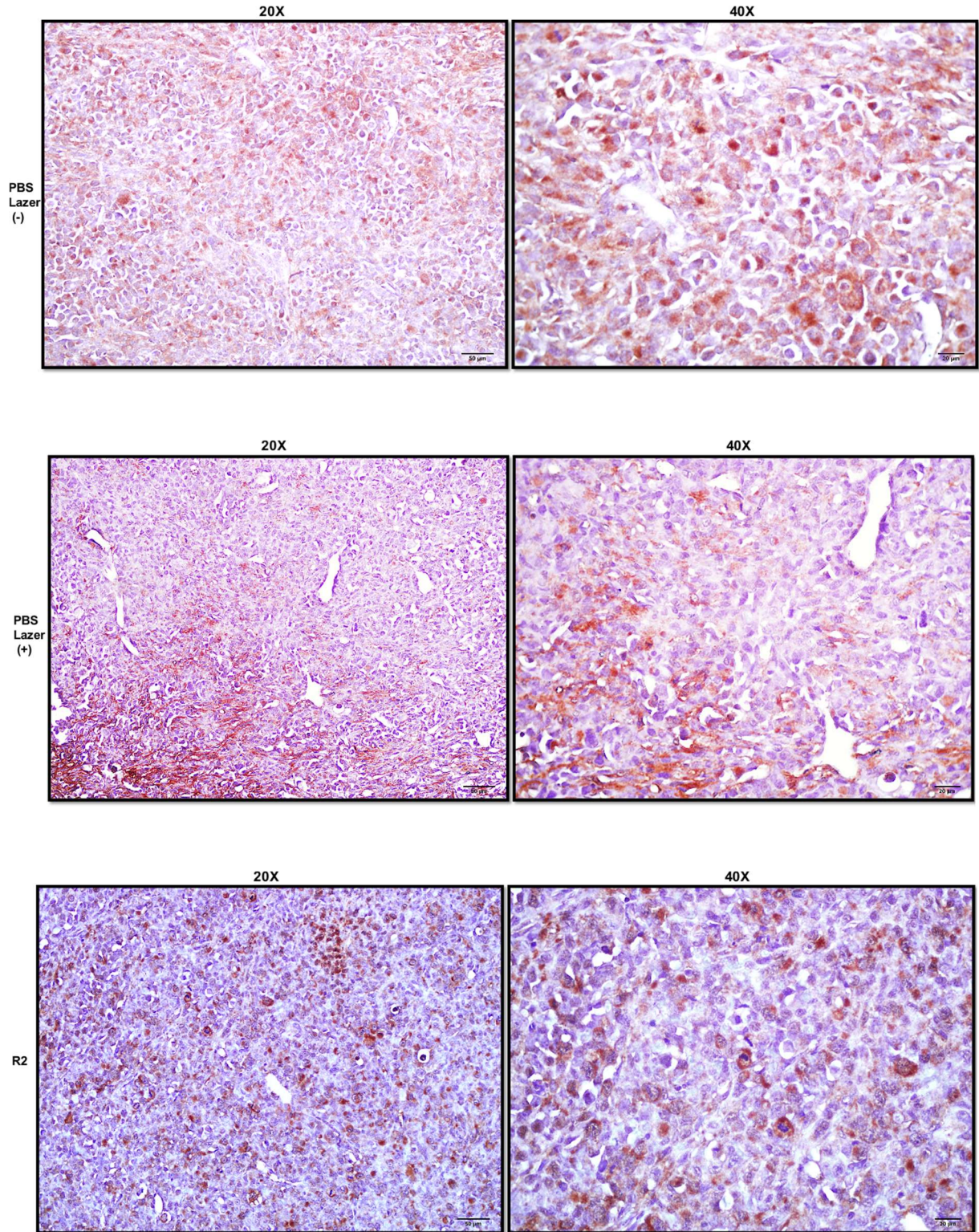
Şekil 4.51. Cerebrum dokularına ait histolojik görünümü (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).

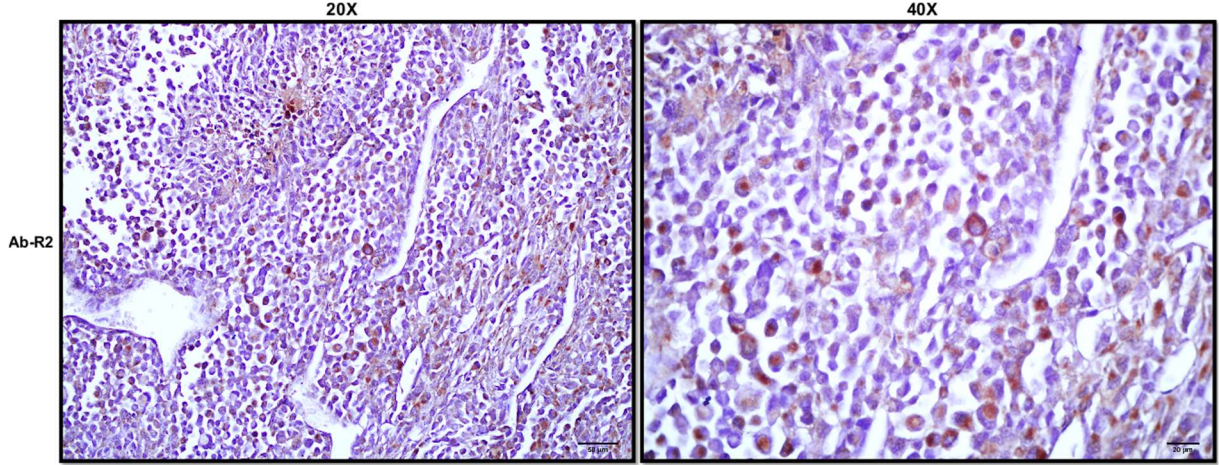
Tüm gruplarda cerebrum dokusu normal histolojik görünümde izlenmiştir. Cerebrum korteksinde bulunan nöronların normal histolojik görünümde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.51). Cerebruma benzer şekilde cerebellum dokusuna ait kesitlerde herhangi anormal bir bulgu saptanmamıştır. Cerebellum substantia griseasına ait stratum molekulare, stratum gangliozum ve stratum granulosum tabakalarının düzenli yapıda olduğu tespit edilmiştir. Bu tabakalarda yer alan sepet hücreleri, purkinje ve granüler hücrelerin normal yapıda olduğu saptanmıştır (Şekil 4.52).



Şekil 4.52. Cerebellum dokularına ait histolojik görünümü (H&E boyama, Scale bar: 50 µm; iç kısım kare 20 µm).

Ayrıca, anti-KDN antikorunun immunreaktivitesinin değerlendirilebilmesi için alınan doku örnekleri ile IHC boyaması yapılmıştır. Tümör dokularında yapılan IHC boyama sonuçları, anti-KDN antikorunun tümör dokusu içerisindeki hücreleri spesifik olarak boyadığını göstermiştir. Tüm gruplardaki anti-KDN immunreaktivitesi değerlendirildiğinde, PBS lazer (-) ve PBS lazer (+) gruplara ait kesitlerin oldukça yoğun olduğu saptanmıştır (Şekil 4.49). PBS lazer (-) ve PBS lazer (+) grupları ile kıyaslandığında, PR2 ve Ab-PR2 gruplarında anti-KDN pozitif boyanan hücre sayısının daha az olduğu tespit edilmiştir. PR2 ve Ab-PR2 grupları kendi içinde kıyaslandığında ise, Ab-PR2 grubuna ait örneklerde daha az sayıda pozitif boyanan hücrelerin olduğu saptanmıştır (Şekil 4.53). Diğer dokulara ait IHC boyama sonuçları, tümör dokusu dışındaki diğer organlarda (karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, cerebrum, cerebellum) herhangi bir immunreaktivitenin olmadığını göstermiştir (veriler gösterilmemiştir).

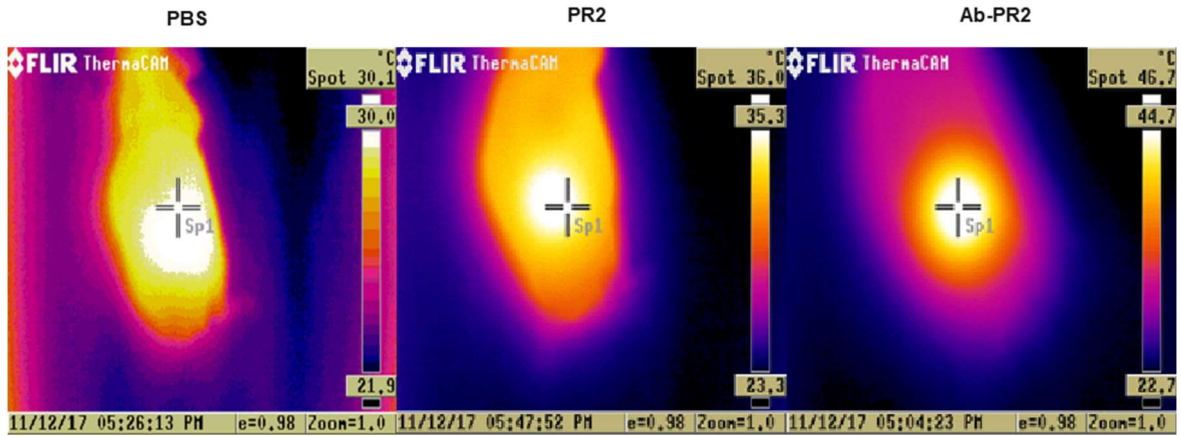




Şekil 4.53. Tümör dokularına ait anti-KDN immunreaktivitesi (IHC boyama, Scale bar 50 µm; 20 µm).

4.1.5.5 In Vivo Görüntüleme

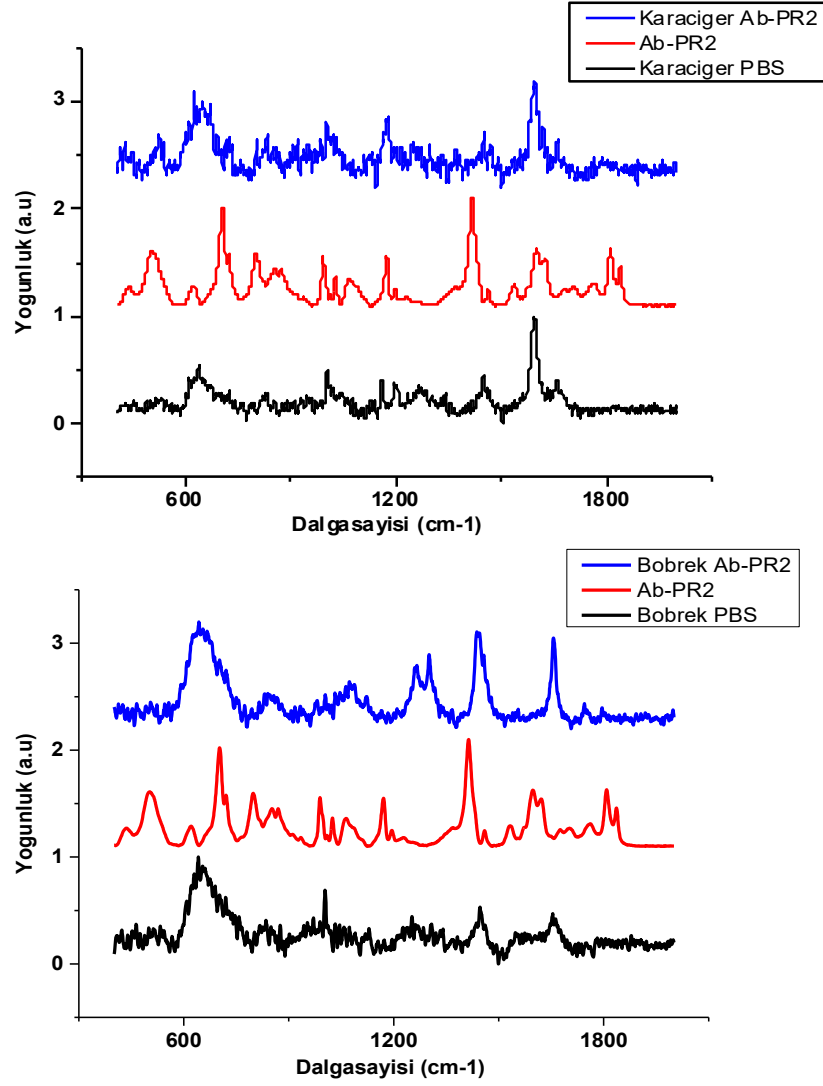
Prostat tümürlü farelerde fototermal terapi uygulaması sırasında termal kamera ile tümör bölgesinin görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.54). Termal kamera görüntüsü PBS, PR2 ve Ab-PR2 enjeksiyonları sonrası lazer uygulamaları sırasında alınan termal kamera görüntülerinden Ab-PR2 uygulamasının, PBS ve daha önemlisi PR2'ye kıyasla, sırasıyla 9.4 ve 14.7°C'lik sıcaklık artışına sebep olduğunu göstermiştir.



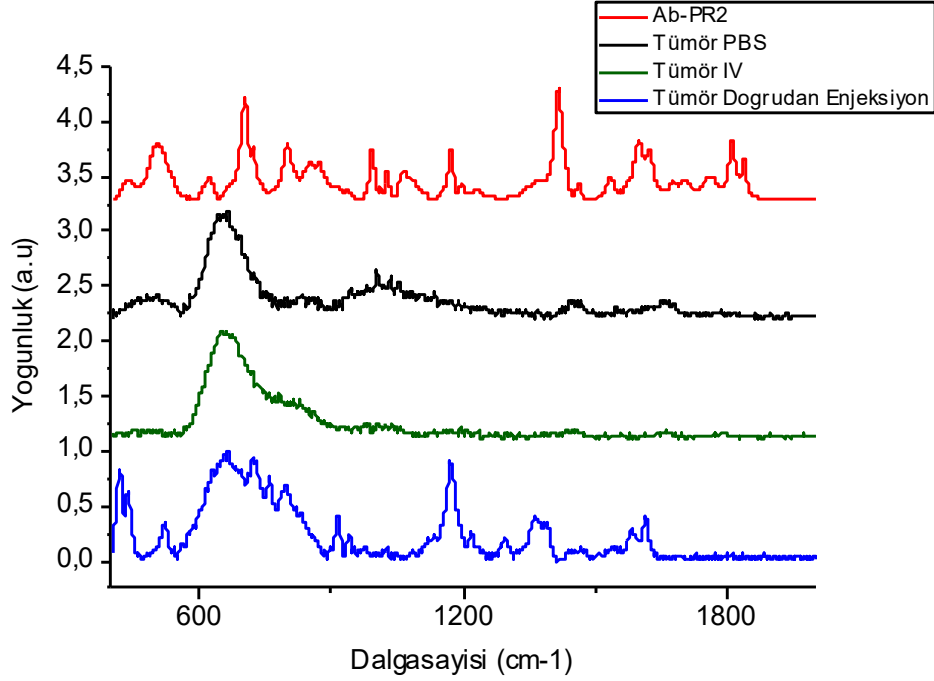
Şekil 4.54. Prostat tümürlü farelerde 10 dk süresince 808 nm, 500 mW lazer uygulamasından sonra tümör bölgesinin termal kamera görüntüleri

Ayrıca SERS tekniği ile altın nanoçubukların görüntülenmesine yönelik gerçekleştirilen deneyler, meme tümürlü fareler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu nanomalzemelerin görüntüleme ajanı olarak potansiyelini gösterebilme adına meme tümürlü farelere öncelikle i.v.

enjeksiyon ile Ab-PR2 (n=2) ve PBS (n=2) uygulanmış ve 24 saat sonra farelerin tümör, karaciğer, dalak, böbrek ve akciğer dokuları toplanarak Raman spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Şekil 4.55 ve 4.56 (yeşil çizgi, Tümör IV örneği)'da, elde edilen spektrumlardan karaciğer, böbrek ve tümör dokularına ait olanlar görülmektedir. Genel olarak i.v. enjeksiyonla uygulanmış Ab-PR2 örneklerinin Raman spektrumlarında sinyaller zayıftır. Bu durum özellikle tümör dokusu için geçerlidir. Karaciğerde sinyal artışı hafifçe görülmekle beraber, sinyal artışının en belirgin olarak görüldüğü organ böbreklerdir. Daha sonra meme tümörlü farede tümör bölgesine doğrudan enjeksiyon ile Ab-PR2 (n=1) veya PBS (n=1) uygulanmış ve deneğin tümör dokusu alınarak Raman spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Spektrumlar, Şekil 4.56'da görülmektedir. Görüleceği üzere, doğrudan enjeksiyon sonucu tümör dokusundan kuvvetli Raman sinyali alınabilmektedir.



Şekil 4.55. İ.V. enjeksiyon ile Ab-PR2 (n=2) ve PBS (n=2) uygulanmış meme tümörlü farelerden toplanmış karaciğer ve böbrek dokularının Raman spektrometresi ile görüntülenmesi.

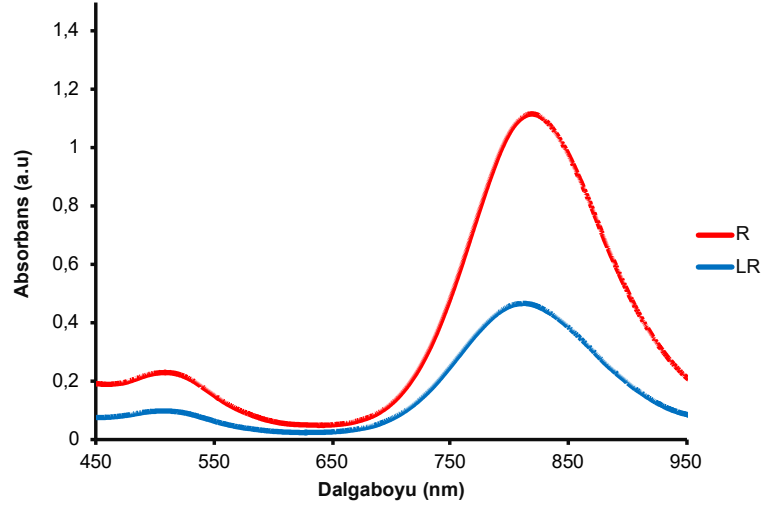


Şekil 4.56. Doğrudan tümöre enjeksiyon ile Ab-PR2 (n=1) ve PBS (n=1) uygulanmış meme tümörlü farelerden toplanmış tümör dokularının Raman spektrometresi ile görüntülenmesi.

4.2 Nanokabuklar ile Elde Edilen Bulgular

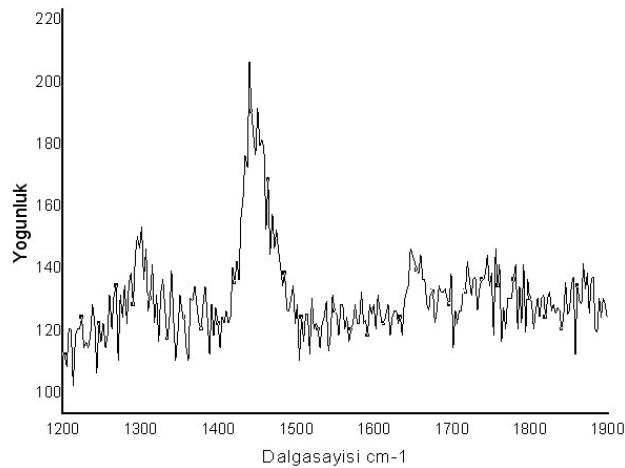
4.2.1 Nanokabukların Sentezi ve Karakterizasyonu

POPC esaslı nanokabuklar ilk önce LSPR spektroskopisi ile incelenmiştir. CTAB ile sentezlenen altın nanoçubukların ve POPC esaslı nanokabukların UV-Vis spektrumları Şekil 4.57'de gösterilmektedir. CTAB'li altın nanoçubukların enine plazmon absorpsiyon piki 510 nm civarında iken, POPC'li altın nanokabuklar için bu değer 524 nm'de gözlemlenmiş ve kırmızıya kayma meydana gelmiştir. Konjugasyondan sonra boylamsal pik ise mavi bölgeye doğru 13-15 nm bir kayma göstermiştir.



Şekil 4.57. CTAB ile stabilize edilmiş altın nanoçubuklar (mavi pik) ve POPC esaslı altın nanokabukların (kırmızı pik) UV-Vis spektrumları.

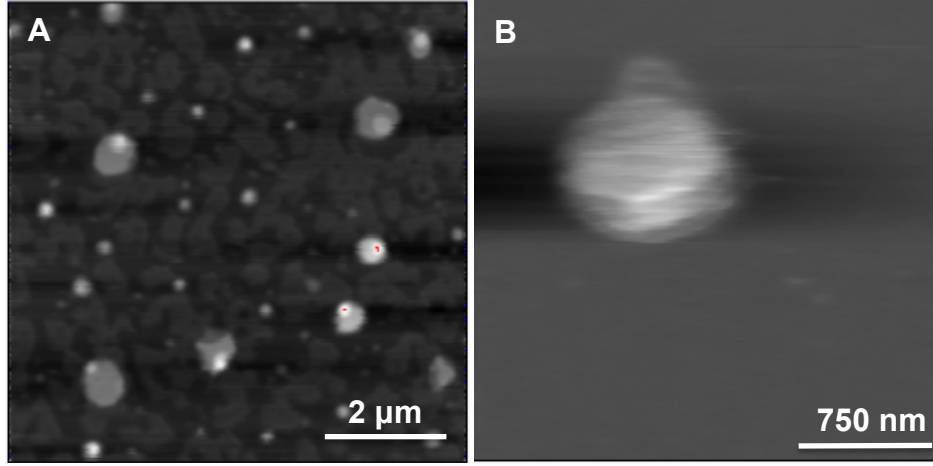
Altın nanoçubuk yüzeyininin POPC ile modifikasyonundan sonra ölçülen Raman spektrumu Şekil 4.58’de görülmektedir. 1300 cm^{-1} ’de görülen sinyal CH_2 moleküllerinin düzlem üzerinde kıvrılma titreşiminden kaynaklanmaktadır. CH_2 moleküllerinin makaslanma modundan kaynaklanan pikler 1450 cm^{-1} ve çevresinde gözlemlenmiştir. Bunlara ek olarak 1665 cm^{-1} ’de görülen kuvvetli pik oleol zincirinde bulunan cis karbon çift bağından gelmektedir (Lee ve Bain, 2005).



Şekil 4.58. POPC esaslı nanokabukların Raman spektrumu.

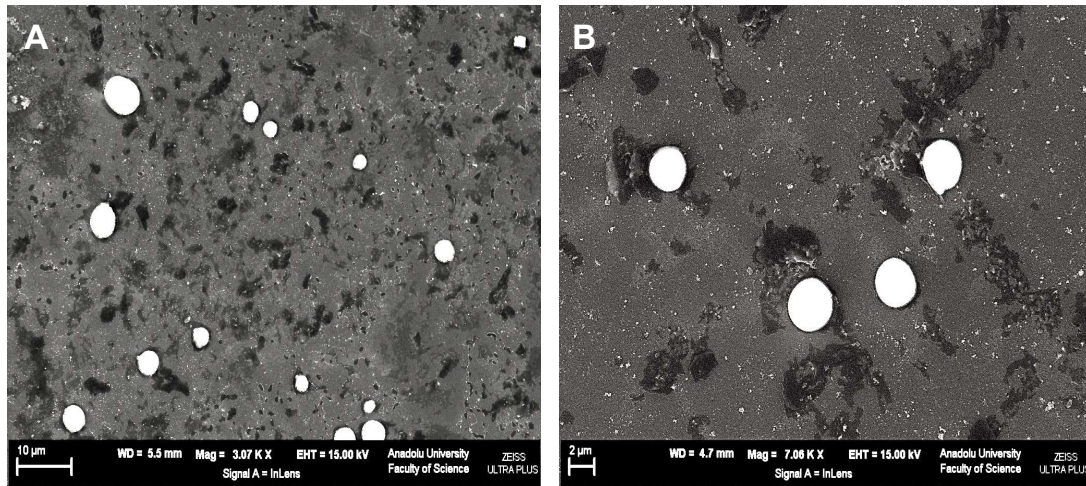
POPC esaslı nanokabukların AFM görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.59). Şekil 4.59A’daki bazı yapılar 120-180 nm aralığında ölçülmüştür. Bunun yanısıra 500-600 nm boyutunda

büyümüş olan yapılar da mevcuttur. Şekil 4.59B'de tek nanokabuk yapısı yüksek çözünürlükte gösterilmektedir.



Şekil 4.59. POPC esaslı altın nanokabukların düşük (A) ve yüksek çözünürlüklü (B) AFM görüntüleri.

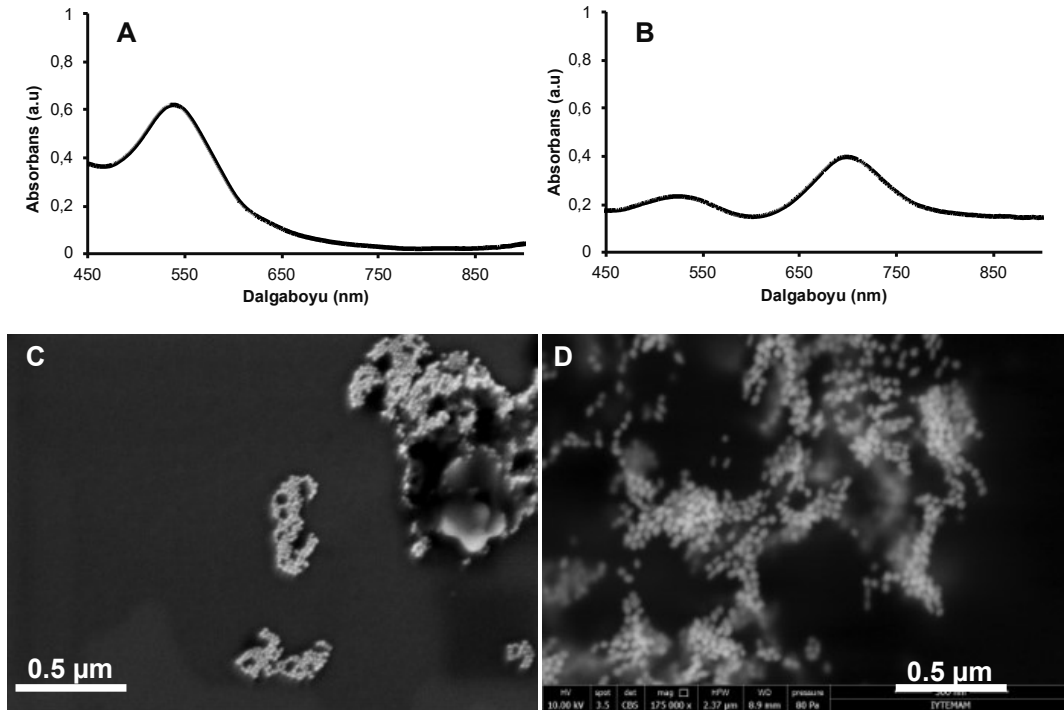
Şekil 4.60 POPC esaslı altın nanokabukların SEM görüntülerini içermektedir. AFM görüntülerini destekler şekilde SEM görüntüleri geniş boy dağılımına sahip yapıların varlığını göstermiştir. Bu nedenle POPC yerine CTAB benzeri katyonik bir lipid olan DDAB'ın kullanılması planlanmıştır.



Şekil 4.60. POPC esaslı nanokabukların farklı büyütmelelerdeki mercek içi SEM görüntüleri.

DDAB kaplı nanoçubuk sentezinde farklı lipid konsantrasyonlarının denendiği çok sayıda deney gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler iki aşamalıdır: İlk aşamada öncelikle DDAB kaplı nanoçubuk sentezi gerçekleştirilmiştir. Buradan elde edilen deney şartları kullanılarak DDAB

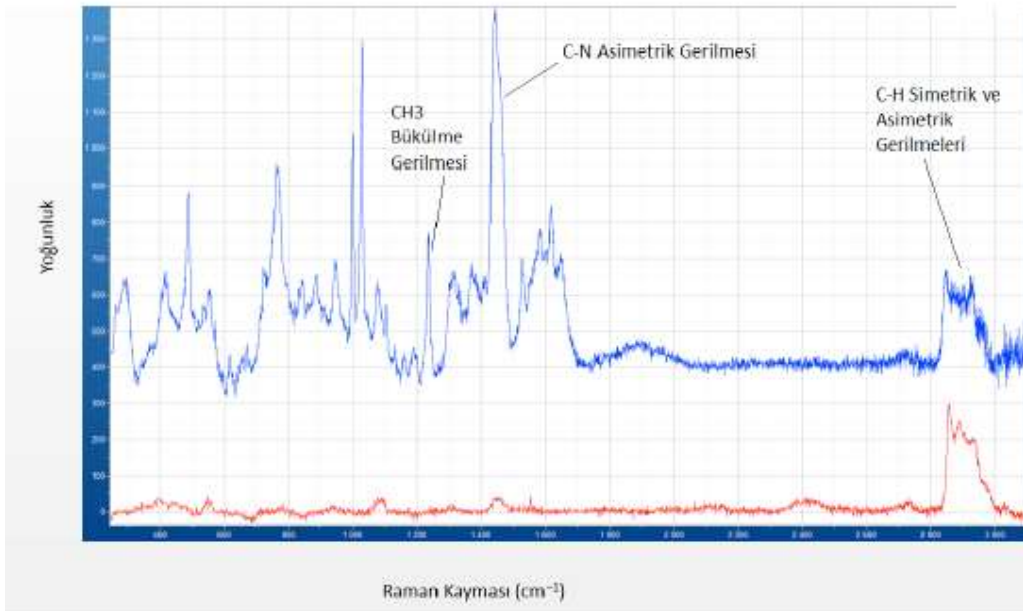
kaplı nanokabuk sentezine çalışılmıştır Değişen lipid konsantrasyonları ile gerçekleştirilen deneylerin sonucunda nanoçubuk üretiminin olup olmadığını anlamak için öncelikle LSPR/UV-Vis spektrometre analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda en yüksek verimde altın nanoçubuk eldesinin lipid konsantrasyonu çekirdek çözeltisi içinde 15 mM, büyütme çözeltisi içinde 20 mM olduğu durumda (Deney No 3.4, Tablo 3.2) olduğu görülmüştür (Şekil 4.61). Bu değerler dışındaki diğer konsantrasyon değerlerinde altın nanoçubuklar yerine altın nanopartikül oluşumu gözlenmiştir. Şekil 4.61A ve 4.61B’de, sırasıyla Deney No 4.4 ve 3.4 (Tablo 3.2) ile hazırlanmış olan nanopartiküllerin LSPR/UV-Vis spektrumları vardır. Görüleceği gibi Deney No 4.4 ile hazırlanan partiküllerin çubuk şeklinde olmadığı sadece 530 nm’de bir plazmon pikinin varlığı ile bellidir. Şekil 4.61B’de ise enine plazmon pikinin 520 - 530 nm’de, boyuna plazmon pikinin ise 680 nm civarında varlığı, oluşan partiküllerin çubuk şeklinde olduğunu ispatlamaktadır. Şekil 4.61C ve 4.61D’de sırasıyla lipid kaplı altın nanopartiküller ve nanoçubukların SEM görüntülerini göstermektedir. Nanoçubukların oluşumu net olarak gözlenmektedir.



Şekil 4.61. DDAB kaplı altın nanopartiküllerin LSPR/UV-vis spektrumları ve farklı büyütmelerdeki mercek içi SEM görüntüleri. A ve C, Deney No 4.4 ile hazırlanmış nanopartiküller; B ve D Deney No 3.4 ile hazırlanmış nanoçubuklar.

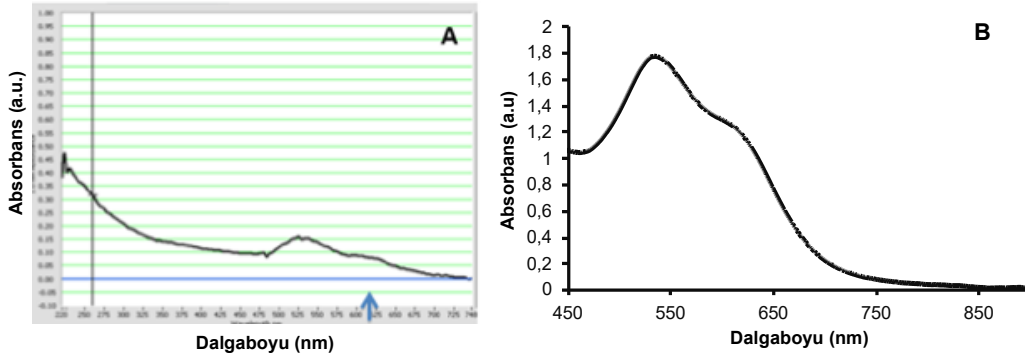
Deney No 3.4’ de verilen şartlarda sentezlenmiş olan nanoçubukların DDAB lipidi ile kaplı olduğunu ispatlamak için Raman spektroskopisi ile inceleme yapılmıştır. Bu inceleme

amacıyla öncelikle aynı konsantrasyona sahip lipid ile lipid esaslı altın nanoçubukların Raman spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.62). Bu spektrumlarda nanoçubukların sinyal şiddetleri sadece lipid örnekleriyle karşılaştırıldığında çok daha yüksek bulunmuştur. Bu altın nanoçubukların çok iyi birer yüzey arttırılmış Raman spektroskopisi (SERS) altlıkları olmasına atfedilmiştir. Dolayısıyla bu durum, spektrumda görülen lipid yapısının altın nanoçubukların yüzeyinde olduğunu belli etmektedir. DDAB molekülü yapısında gözlemlenen metilen gruplarının C-H bağ gerilim titreşimleri 2918 (asimetrik) ve 2850 cm^{-1} (simetrik) civarında gözlemlenmiştir. Diğer önemli bantlar metilen gruplarının bükülmesi sonucu oluşan titreşimlerdir ve 1100 ile 1470 cm^{-1} arasında gözlemlenmiştir. 1489 cm^{-1} 'de ise amonyum gruplarından gelen karakteristik C-N asimetrik gerilme bandı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar literatür ile uyumludur. (Choosakoonkriang ve ark., 2001)



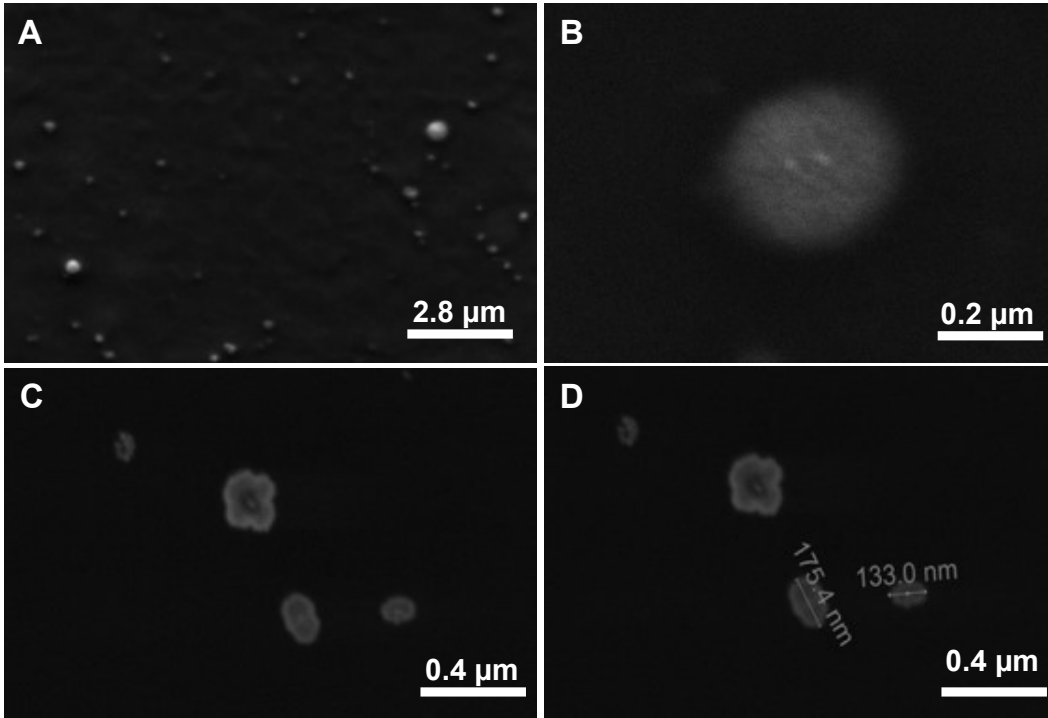
Şekil 4.62. DDAB kaplı altın nanoçubukların (üst) ve sadece DDAB'in (alt) Raman spektrumları.

DDAB kaplı nanoçubuk karakterizasyonundan sonra DDAB esaslı nanokabukların karakterizasyon aşamasında ilk olarak LSPR/UV-Vis spektrumu alınmıştır. Şekil 4.63A'da DDAB kaplı nanokabukların spektrumu görülmektedir. 540 nm'de enine plazmon piki açıkça görülmektedir. Bununla birlikte 625 nm'de boyuna plazmon piki baskılanmış şekildedir. Daha önce grubumuz tarafından sentezlenmiş CTAB kaplı nanokabukların UV-vis spektrumu Şekil 4.63B'de görülmektedir. Bu spektrum proje kapsamında üretilmiş DDAB kaplı nanokabukların spektrumu ile uyum içindedir.



Şekil 4.63. (A) DDAB kaplı nanokabukların UV-Vis spektrumu (B) CTAB kaplı nanokabukların UV-Vis spektrumu.

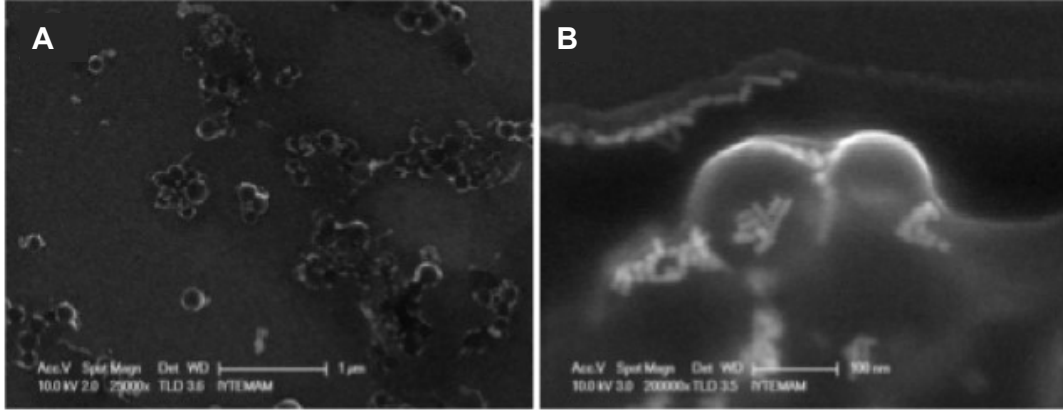
Şekil 4.64, DDAB kaplı nanokabukların SEM görüntüsünü sunmaktadır. SEM görüntülerine göre, oldukça homojen boy dağılımında yaklaşık 100 ila 300 nm arasında çapa sahip küresel nanokabuklar üretilmiştir. Yüksek magnifikasyonda alınmış görüntüde (Şekil 4.64B) nanokabuk içinde birden fazla nanoçubuğun varlığı bellidir.



Şekil 4.64. DDAB kaplı nanokabukların SEM görüntüleri.

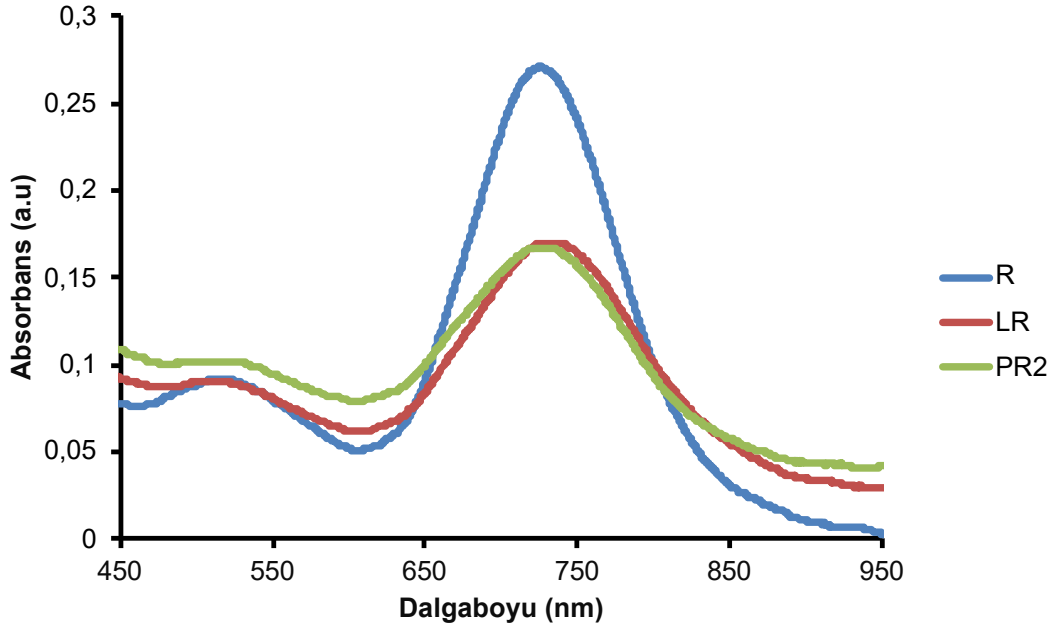
DDAB kaplı nanokabuk sentezi başarılı olmuştur ancak DDAB katyonik bir lipid olup toksisitesi literatürde bildirilmiştir (Filion ve Philips, 1997). DDAB kaplı nanokabukların katyonik lipidden kaynaklanan sitotoksitesini azaltmak için biyouyumlu ve düşük toksisiteli fosfolipid kolin

türevi lipidler olan DSPE-PEG (2000) ve DSPC, DDAB nanokabuk yapısına katılmaya çalışılmıştır. DDAB/DSPE-PEG/DSPC karışımı esaslı nanokabukların SEM görüntüleri Şekil 4.65'de gösterilmiştir. Şekil 4.65A'da nanokabukların büyük alan SEM görüntüsünde yapıların yoğun bir şekilde elde edildiği gözlenmektedir. Şekil 4.65B'de yüksek büyütmede alınan SEM görüntüsünde ise tek nanokabuk yapısının içerisindeki altın nanoçubuklar net bir şekilde görülmektedir.



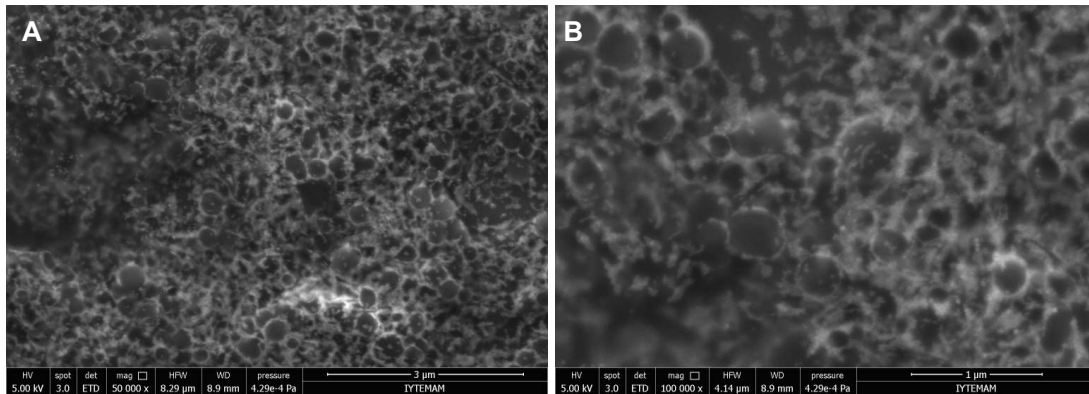
Şekil 4.65. DDAB/DSPE-PEG/DSPC karışımı esaslı nanokabukların (A) büyük alan ve (B) yüksek büyütme SEM görüntüleri.

DDAB/DSPE-PEG/DSPC karışımı esaslı nanokabukların in vitro sitotoksikite sonuçlarına göre yapıya DSPE-PEG/DSPC katılmış olmasına rağmen 50 µM ve altında konsantrasyonlarda toksik etki göstermişlerdir. Bu sonuç nedeni ile nanokabuk sentezinde DDAB tamamen elimine edilmiş ve biyoyumlu/toksik olmayan DPPC/DSPE-PEG lipidleri içeren karışım kullanılarak altın nanoçubuklar içeren PEG'lenmiş nanokabuklar sentezlenmiştir. Bu yöntemde önce PEG-SH (1000) ile PEG'lenmiş nanoçubuklar üretilmiş, daha sonra bu nanoçubuklar DPPC/DSPE-PEG lipid kabuğu içinde gaz varlığında süspansiyon haline getirilmiştir. Şekil 4.66'da boy:en oranı=2.7 olan nanoçubukların PEG'lenme öncesi ve sonrası alınmış LSPR spektrumları görülmektedir. PEG'lenme sonrası boylamsal plazmon pikinde 727 nm'den 733 nm'ye, yaklaşık 6 nm kadar bir kırmızıya kayma gözlemlenmiştir. PEG'lenmiş altın nanoçubukların lipid kabuk içinde hapsolmesinden sonra ise 736 nm'ye kayma gözlemlenmiştir.

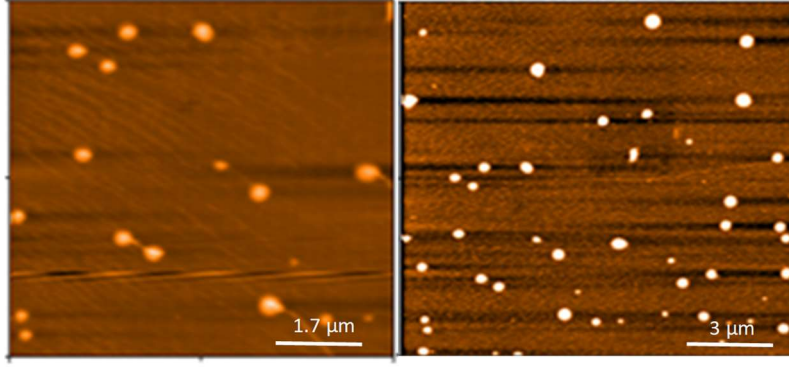


Şekil 4.66. İçinde PEG'lenmiş nanoçubuk içeren DPPC/DSPE-PEG kaplı nanokabukların LSPR spektrumu. Nanoçubukların PEG'lenme öncesi (mavi), sonrası (yeşil), lipid kapıklama sonrası (kırmızı) alınmış LSPR/UV-Vis spektrumları.

Şekil 4.67 ve 4.68, DPPC/DSPE-PEG kaplı nanokabukların SEM ve AFM görüntülerini göstermektedir. SEM ve AFM görüntülerine göre, oldukça homojen boy dağılımında yaklaşık 200 ile 400 nm arasında çapa sahip küresel nanokabuklar üretilmiştir. Yüksek magnifikasyonda alınmış görüntüde (Şekil 4.67B) nanokabuk içerisinde ve duvarlarında birden fazla nanoçubuğun varlığı bellidir. Ayrıca SEM görüntüleri altın nanoçubuk içeren DPPC/DSPE-PEG kaplı nanokabukların yüksek konsantrasyonda sentezlendiklerini göstermektedir.



Şekil 4.67. DPPC/DSPE-PEG kaplı nanokabukların farklı büyütme ölçeklerindeki içi SEM görüntüleri.



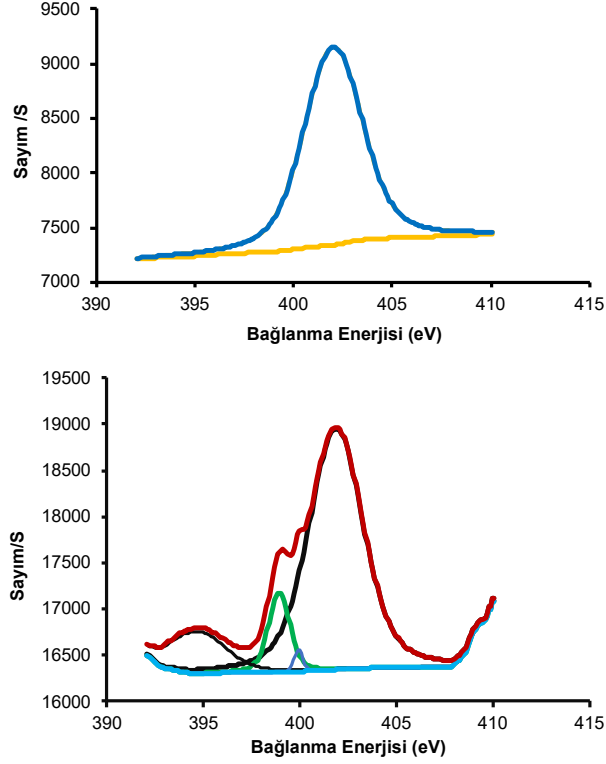
Şekil 4.68. DPPC/DSPE-PEG kaplı nanokabukların AFM görüntüleri.

4.2.2 Nanokabuklara Antikor Konjugasyonu ve Karakterizasyonu

DPPC/DSPE-PEG kaplı nanokabukların oluşumu LSPR/UV-vis spektroskopisi, SEM ve AFM analizleri ile belirlendikten sonra lipid kabuktaki DSPE-PEG-amin lipidinin amin grupları üzerinden NHS/EDC kimyası ile nanoçubuklara benzer şekilde monoklonal anti-KDN antikorları kovalent olarak konjuge edilmiştir. Antikor bağlanması XPS ve DLS/zeta potansiyel ölçümleri ile belirlenmiştir (Tablo 4.10 ve 4.11; Şekil 4.69). XPS analiz sonuçlarına bakıldığında altın yüzeydeki C, O içeriği azalırken N ve S oranı artmıştır. Ayrıca, N1s spektrumunda antikor konjugasyonu sonrası peptid bağı azotuna karakteristik 399-400 eV bağlanma enerjisine sahip sinyal, antikor konjugasyonu öncesi ise sadece 402-404 eV enerjide primer amin grubu içindeki azota ait pik gözlenmiştir.

Tablo 4.10. DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabukların Ab konjugasyonu öncesi (LR) ve sonrası (Ab-LR) XPS analiz sonuçları

	LR		Ab-LR	
	Bağlanma Enerjisi	Atomik %	Bağlanma Enerjisi	Atomik %
C 1s	285.2	38.9	286.3	35.7
N1s	400.1	0.9	402.3	2.3
O 1s	532.2	10.6	532.4	9.4
Au4f7	84.1	0.4	84.1	0.7
S2p	168.1	0.3	168.7	1.1



Şekil 4.69. Altın nanokabukların antikor konjugasyonu (A) öncesi ve (B) sonrası N1s XPS analizi.

Tablo 4.11. DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabukların Ab konjugasyonu öncesi (LR) ve sonrası (Ab-LR) XPS analiz sonuçlarından hesaplanmış element oranları

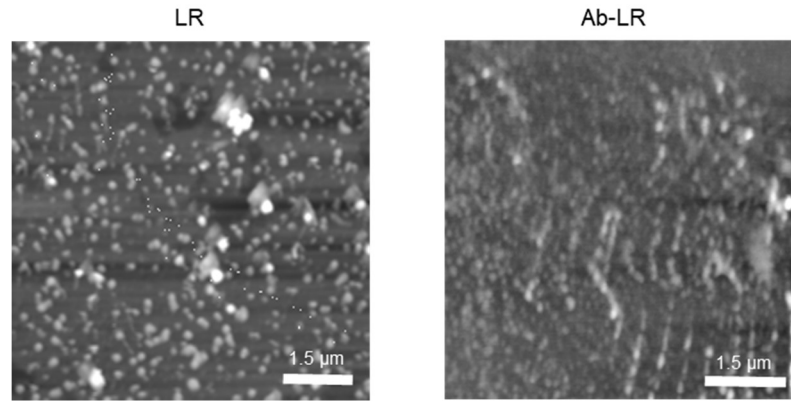
	Element Oranı LR	Element Oranı Ab-LR
C/Au	99.8	48.3
O/Au	27.2	12.8
N/Au	2.4	3.1

DLS/zeta potansiyel ölçüm sonuçlarına bakıldığında Ab konjugasyonu sonrası hidrodinamik boyutta artış görülmüştür (Tablo 4.12). Nanokabukların ortalama hidrodinamik çap 117 nm civarındadır. Zeta potansiyel ölçümlerinde antikorların konjugasyonu sonucu nanokabuk yüzey yükü pozitif doğru kaymıştır. Serum ortamında nanokabukların hidrodinamik çapları küçülmüştür.

Tablo 4.12. DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabukların Ab konjugasyonu öncesi (LR) ve sonrası (Ab-LR) DLS/Zeta potansiyel ölçüm sonuçları (n=3)

Örnek Kodu	Örnek Açıklaması	Zeta Potansiyel (mV) (PBS)	Dinamik Parçacık Boyutu (nm) (PBS)	Dinamik Parçacık Boyutu (nm) FBS+PBS
LR	Nanokabuk	-13.7± 0.17	117.3± 4.3	63.2± 0.8
Ab-LR	Antikor Bağlı Nanokabuk	-2.31± 0.45	162.7± 2.7	100.2± 0.05

Antikor konjuge edilmiş nanokabuklar AFM ile görüntülenmiştir. Nanokabuklar (LR), ve antikor konjuge edilmiş nanokabuklar (Ab-LR) 'ın tıklamalı modda alınmış AFM mikrografları Şekil 4.70'de verilmektedir. Antikor konjugasyonu sonrası nanokabuk morfolojisinde belirgin bir değişiklik gözlenememiştir.

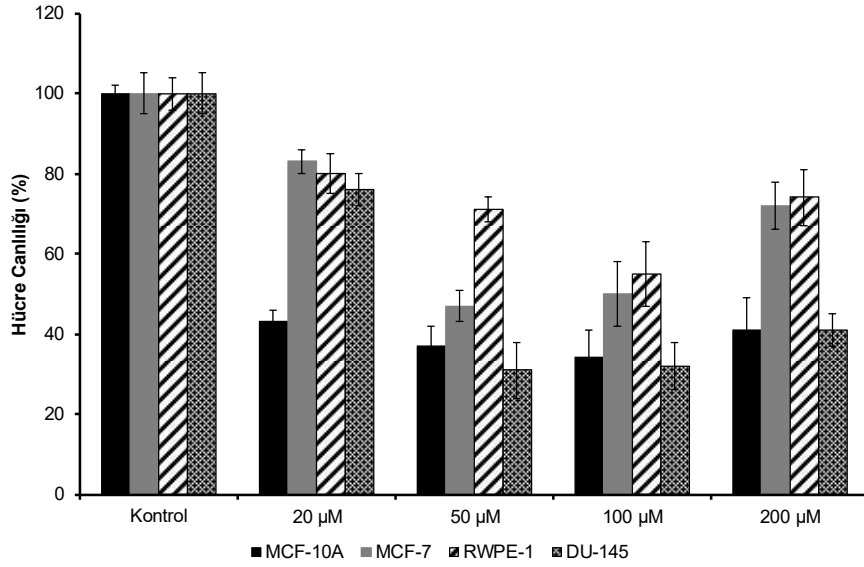


Şekil 4.70. Altın nanoçubukların, antikor konjugasyonu öncesi (LR) ve sonrası (Ab-LR) tıklamalı modda alınmış AFM görüntüleri.

4.2.3 Nanokabukların In Vitro Değerlendirmeleri

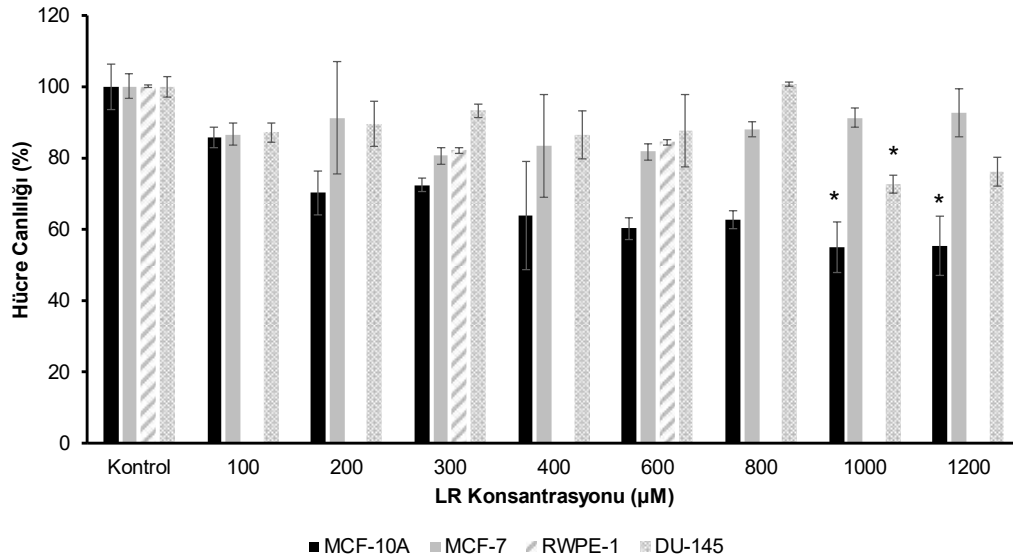
4.2.3.1 Hücre Canlılığı

Öncelikle üretilen nanokabuk formülasyonlarının sitotoksik analizleri yapılmıştır. Kronolojik şekilde ilk kararlı PEGlenmiş nanokabuk yapıları olan DDAB/DSPE-PEG/DSPC karışımı ile hazırlanmış DDAB esaslı PEG'lenmiş nanokabukların toksisiteleri belirlendi. Canlılık sonuçları, muamele edilmemiş hücrelerin viabilitesini 100% baz alarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.71'de sunulmuştur. Görüleceği üzere bu nanokabuklar tüm hücre türlerinde düşük dozlarda oldukça yüksek toksisite göstermiştir. Bu nedenle yukarıda anlatıldığı şekilde farklı nanokabuk sentezlerine devam edilmiştir.



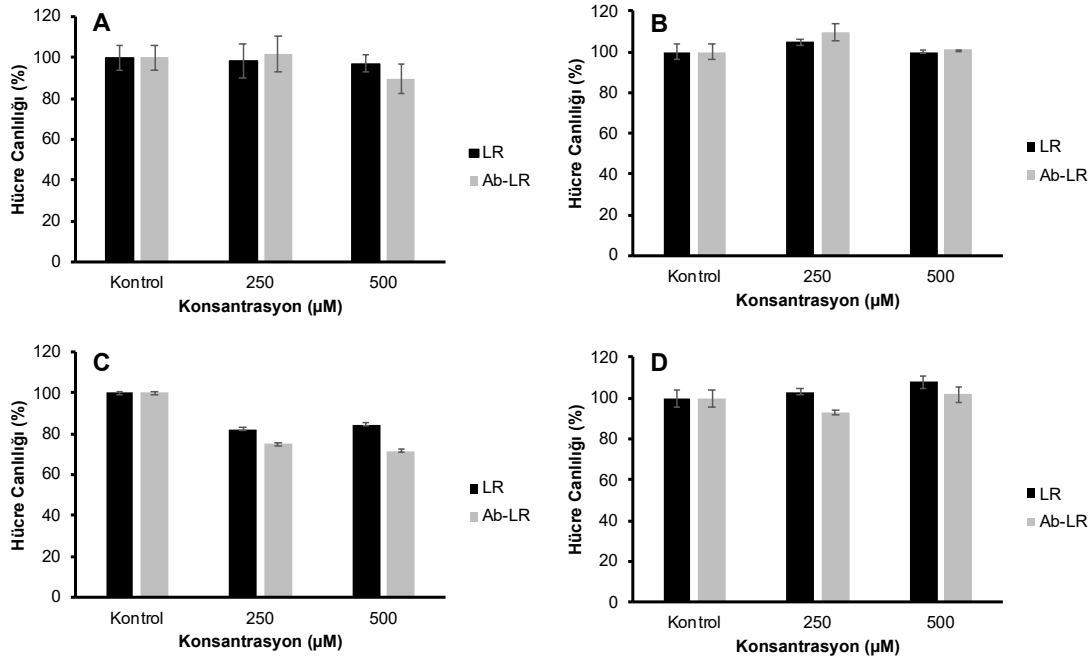
Şekil 4.71. DDAB/DSPE-PEG/DSPC esaslı nanokabukların hücre canlılığına etkileri (n=3).

Kararlı şekilde üretilen DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabukların toksisitesi MTT analizi ile belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.72'de verilmektedir. Bu nanokabuklar DU145 ve MCF-7 kanser ve MCF-10A epitel hücre hatlarında 1000 µM gibi yüksek konsantrasyonlara kadar kontrole kıyasla istatistiksel olarak belirgin bir toksik etki göstermemişlerdir. RWPE-1 normal epitel hücre hattında ise denenen en yüksek doz olan 600 µM gibi konsantrasyonlara kadar anlamlı bir toksik etki gözlenmemiştir.



Şekil 4.72. DPPC/DSPE-PEG nanokabukların (LR) hücre canlılığına etkileri (24 saat). Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p < 0.05).

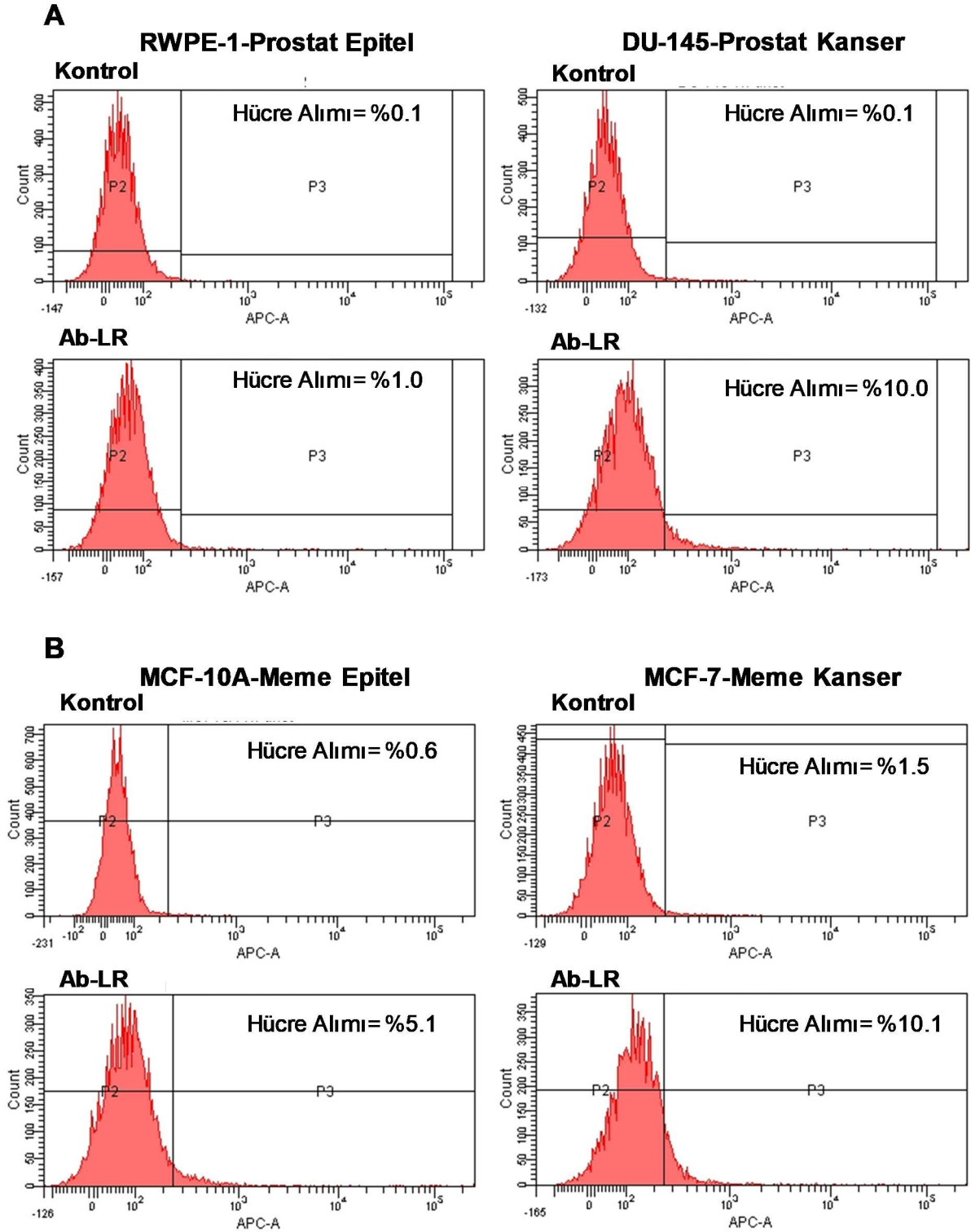
Bir sonraki aşamada, antikor konjuge edilmiş nanokabukların toksisiteleri, antikor taşımayan nanoçubuklar ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.73'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, antikor bağlı nanokabuklar ile antikor taşımayan nanokabukların toksisiteleri arasında istatistiksel olarak belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.73. Antikor konjuge edilmiş DPPC/DSPE-PEG nanokabukların (Ab-LR) hücre canlılığına etkileri (24 saat): A) MCF 10A; B) MCF 7; C) RWPE-1; D) DU-145. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p < 0.05).

4.2.3.2 Hücre Alımı

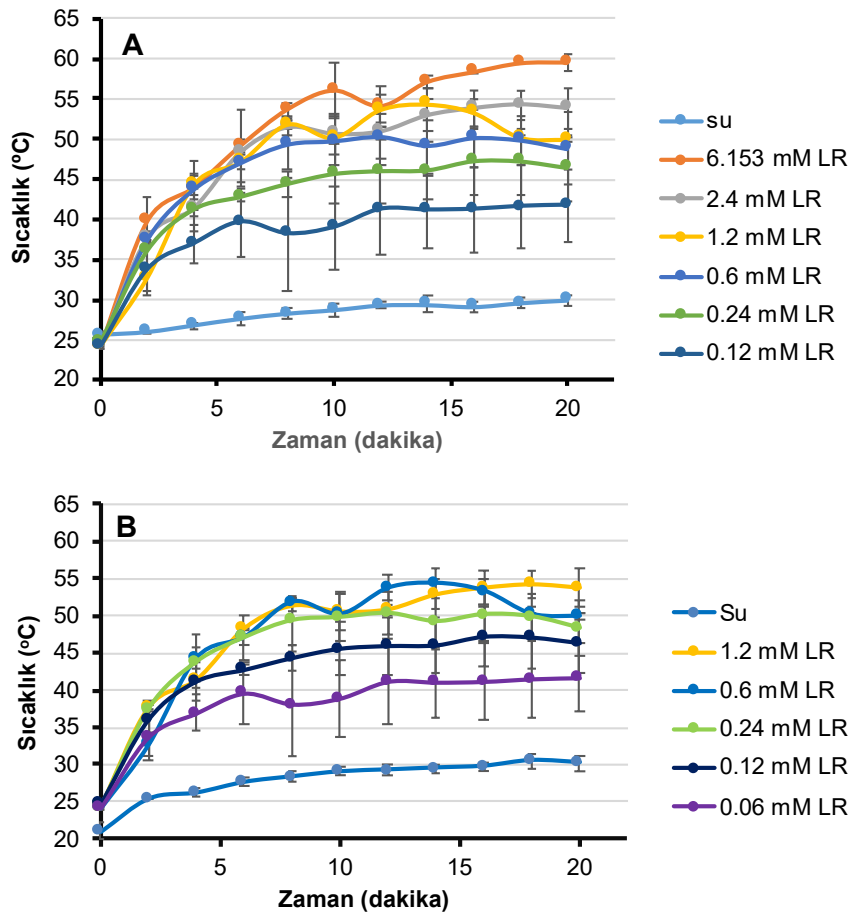
Sağlıklı ve kanser hücre hatlarında nanokabukların hücreler tarafından alım profilleri akış sitometresi ile belirlenmiştir. Bu amaçla nanokabuklara Alexa Fluor ile etiketlenmiş anti-KDN monoklonal antikorunu konjuge edilmiştir. Meme ve prostat, normal ve kanser hücreleri fluoresans etiketlenmiş Ab-LR'ler ile inkübe edilmişler (meme hücre hatları için 50 µM dozda 1 saat süre ile, prostat hücre hatları için 100 µM dozda 1 saat süre ile) ve inkübasyon süresi sonunda akış sitometresi ile incelenmişlerdir. Akış sitometresinden elde edilen örnek veriler Şekil 4.74'de sunulmuştur. Şekilden görüleceği üzere, Ab-konjuge edilmiş nanokabuklar, prostat kanser hücreleri tarafından normal prostat hücre hattına göre yaklaşık 10 kat, meme kanser hücreleri tarafından normal meme hücre hattına göre yaklaşık 2 kat daha fazla alınmıştır.



Şekil 4.74. Kanser ve normal epitel hücrelerin Alexa Fluor işaretli antikor konjuge edilmiş nanokabuklar (Ab-LR) ile inkübasyonu sonrası alınmış akış sitometre ölçümleri (n=3).

4.2.3.3 Fototermal Etki

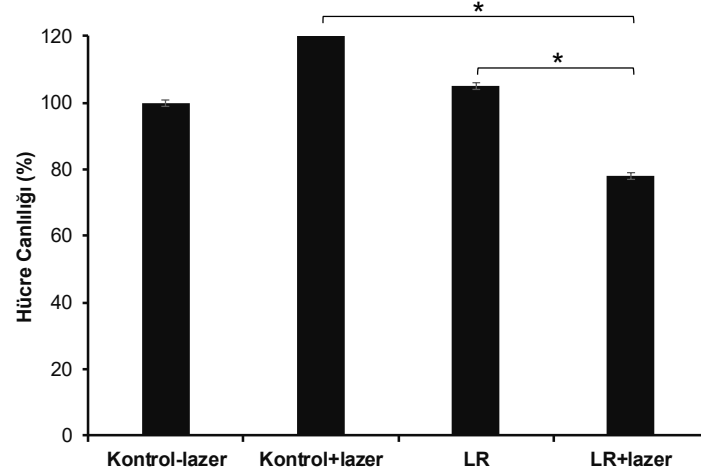
Öncelikle DPPC/DSPE-PEG nanokabukların (hücresiz) sulu ortamın sıcaklığını lazer etkisi ile artırıp artırmadığı belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda nanokabuklar ile gerçekleştirilmiş deney sonuçları Şekil 4.75’de görülmektedir. 808 nm (200 mW veya 500 mW) lazer ışığına 20 dakika süre ile maruz bırakılan nanokabukların ortam sıcaklığını konsantrasyona bağlı şekilde belirgin bir biçimde arttırdığı belirlenmiştir. Lazer gücünün belirli bir etkisi gözlenmemiştir. Nanokabukların, sulu ortamda, nanoçubuklara göre, fototermal etkide belirgin bir üstünlüğü maalesef gözlenememiştir.



Şekil 4.75. Lazere (808 nm, 200 mW (üst), 500 mW (alt)) maruz bırakılan farklı konsantrasyonlardaki DPPC/DSPE-PEG nanokabuk çözeltilerinin zamana bağlı sıcaklık değişimleri (n=3).

Nanokabukların hücresiz ortamda fototermal etkisinin belirlenmesinden sonra hücre varlığında gerçekleştirilen deneylere geçilmiştir. DPPC/DSPE-PEG nanokabukların (600 µM) MCF7 meme kanseri hücreleri ile inkübasyonu sonrası 808 nm (500 mW) lazerine maruz

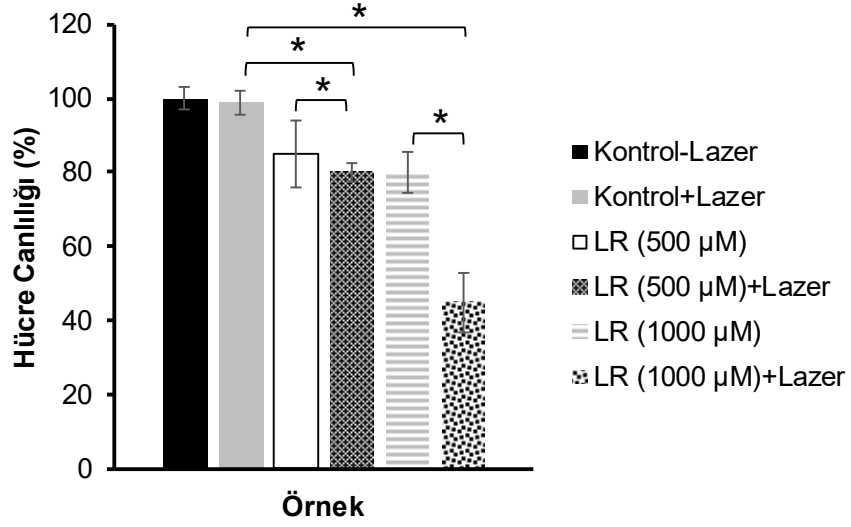
birakılması sonucu hücre canlılıkları belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak nanokabuklar ile muamale edilmemiş ve lazer ışmasına maruz bırakılmış veya bırakılmamış hücreler (Kontrol+Lazer veya Kontrol-Lazer) kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.76'da sunulmaktadır. Görüleceği üzere; nanokabuk+lazer uygulaması sonucu, hücre canlılığında yaklaşık %25'lik bir düşüş yaşanmıştır.



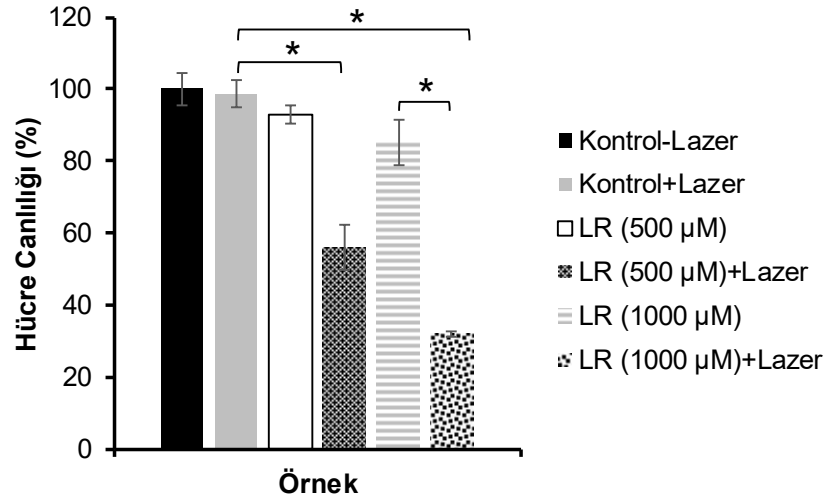
Şekil 4.76. DPPC/DSPE-PEG nanokabuk (600 μ M) ile inkübe edilmiş MCF7 meme kanser hücrelerinin 15 dk lazer (808 nm, 500 mW) uygulaması sonrası hücre canlılık yüzdeleri. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p <0.05).

Fototermal etki deneylerinde son olarak, literatürde kullanılan farklı bir yöntem kullanılmıştır (Li vd., 2018). MCF-7 meme kanseri ve DU145 prostat kanseri hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen bu deneylerde, hücreler her kuyucukta 2.5×10^4 olacak şekilde 96'lık plakalara ekilmiş, 24 saatlik inkübasyondan sonra, LR eklenmiş ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İki farklı nanokabuk dozu uygulanmıştır (500 μ M ve 1000 μ M). İnkübasyon süresi sonunda ortam uzaklaştırılmadan 15 dakika boyunca 500 mW güç ile 808 nm diyot lazer ışması hücrelere uygulanmıştır. Lazer uygulamasından 2 saat sonra hücre canlılığı MTT testi ile ölçülmüştür. Kontrol grubu olarak nanokabuklar ile muamale edilmemiş ve lazer ışmasına maruz bırakılmış veya bırakılmamış hücreler (Kontrol+Lazer veya Kontrol-Lazer) kullanılmıştır. Canlılık sonuçları lazer uygulanmayan kontrol grubu (Kontrol-Lazer) değerleri %100 varsayılarak hesaplanmıştır. MCF-7 ve DU-145 hücrelerinin %canlılık değerleri Şekil 4.77 ve 4.78'de gösterilmektedir. LR'nin 500 μ M konsantrasyonda uygulaması sonucunda hücre canlılığı, kontrole (+lazer) kıyasla, MCF-7 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı ancak oldukça az (yaklaşık %20'lik) bir düşüş gösterirken, DU-145 hücrelerinde %60'a düşmüştür. LR'nin 1000 μ M dozunda ise hücre canlılığı, MCF-7 ve DU-145 hücreleri, sırasıyla, %43 ve %45'e düşmüştür. Lazer uygulanmış kontrol hücrelerin canlılıklarında ise, lazer uygulanmamış

kontrole göre anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.77. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin, iki farklı dozda nanokabuklar ile inkübasyonu sonrası yıkama işlemi yapmadan uygulanan lazer (808 nm) sonrası hücre canlılıkları. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p < 0.05).

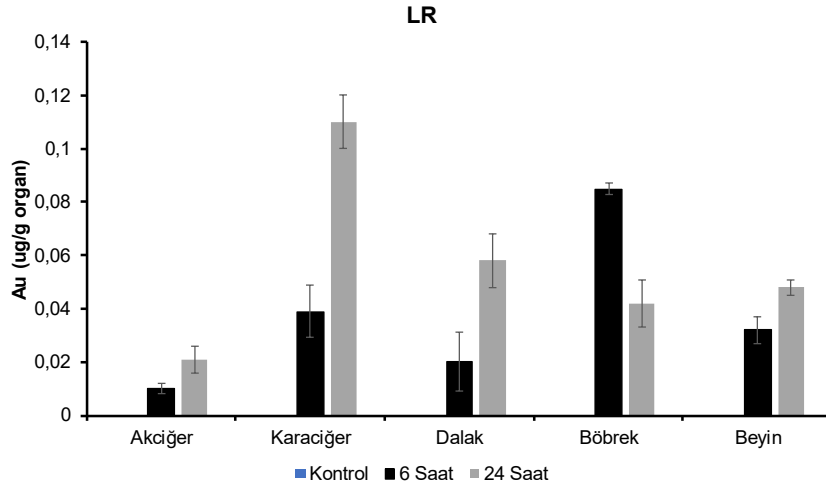


Şekil 4.78. DU-145 meme kanseri hücrelerinin, iki farklı dozda nanokabuklar ile inkübasyonu sonrası yıkama işlemi yapmadan uygulanan lazer (808 nm) sonrası hücre canlılıkları. Veriler çift taraflı t-test ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak belirtilmiştir (n = 3; * p < 0.05).

4.2.4 Nanokabukların In Vivo Değerlendirmeleri

4.2.4.1 Sağlıklı Farelerde Biyodağılım

Öncelikle DPPC/DSPE-PEG nanokabukların biyodağılımları, sağlıklı farelerde 2,8 mM konsantrasyonda (yaklaşık doz 105 µg altın/g fare) 6 ve 24 saat süre ile incelenmiştir. Kontrol grubuna 200 µl steril PBS ve deney grubuna 200 µl steril PBS içerisinde çözülmüş nanokabuklar kuyruktan enjekte edilmiştir. Enjeksiyonun işleminden 6 ve 24 saat sonra kontrol ve deney hayvanlarından organlar ve kan örnekleri toplanarak tartılmış, kurutulmuş ve ICP-MS ile analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçları Şekil 4.79'da sunulmaktadır. Farelerde 24 saat boyunca hiçbir olumsuz değişiklik gözlenmemiştir. Nanokabuk (LR) örneği ilk 6 saatte en fazla böbrek, karaciğer, beyin ve dalakta görülmüştür. 24 saat sonunda tüm organlarda birikimin arttığı gözlenmiştir. 24 saat sonunda karaciğer ve dalak birikimi artmakla beraber beyinde de belirgin şekilde nanokabuk varlığı gözlenmiştir.



Şekil 4.79. Nanokabukların (LR) (2.8 mM) sağlıklı dişi farede farklı zamanlarda biyodağılımı (µg altın/g organ) (n=2).

4.2.4.2 Tümörlü Farelerde Biyodağılım

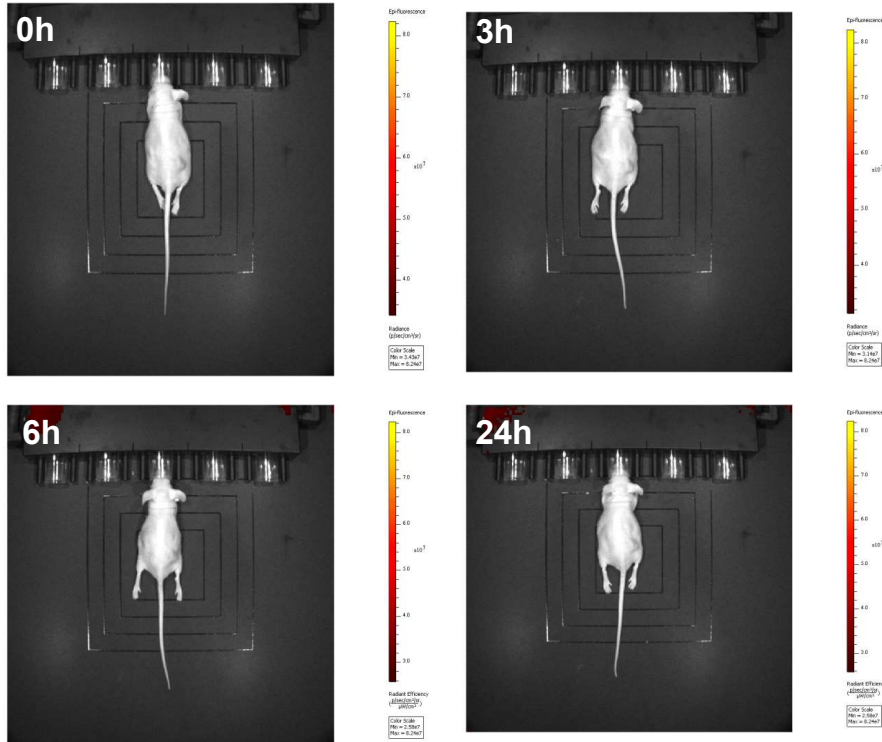
Prostat tümörlü farelerde fluoresans etiketli ve antikor konjuge edilmiş DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabukların (Ab-LR) biyodağılımı öncelikle IVIS mikroskobu ile izlenmiştir. Antikor konjuge nanokabuklar tek bir dozda (3,5 mM, 132 µg Au/200µl PBS) prostat tümörlü farelere i.v. yolu ile kuyruktan enjekte edilmiştir (n=2). Biyodistribüsyon IVIS mikroskobu ile 24 saat boyunca belirli aralıklar ile canlı deneklerde incelenmiştir. 24 saat sonunda fareler öldürülerek akciğer, karaciğer, beyin, dalak, böbrek ve kan dokuları toplanmıştır. PBS ve nanokabuk enjeksiyonu sonrası 0. saat, 3., 6. ve 24. saat sonrası alınmış IVIS mikroskop sonuçları Şekil 4.80 ve Şekil 4.81'de gösterilmektedir. IVIS sonuçlarından görüleceği üzere

antikor konjuge nanokabuklar, karaciğer ve böbrek dokusunda enjeksiyondan hemen sonra birikmeye başlamıştır. 24 saat sonunda karaciğerde yoğun şekilde birikmiş, tümörde de kısmi şekilde çok daha az şekilde birikim olmuştur.

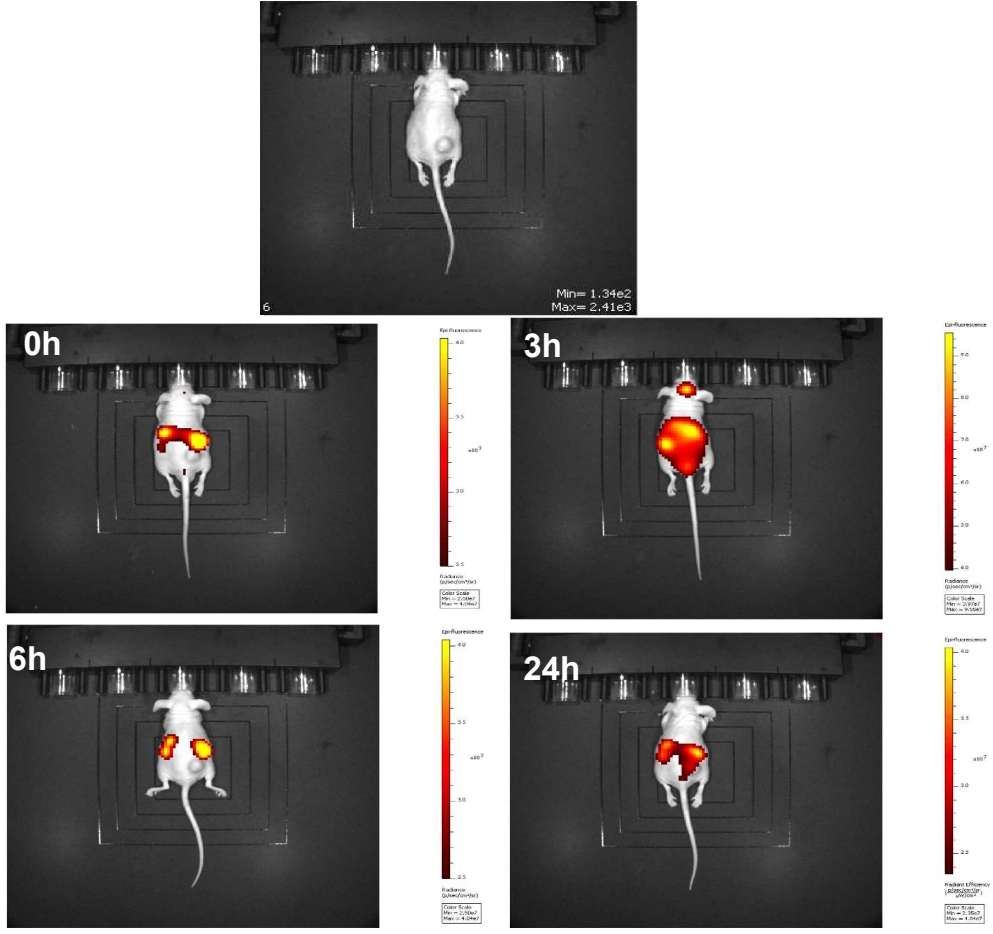
IVIS incelemelerinin yanı sıra, antikor konjuge olan (Ab-LR) ve olmayan (LR) nanokabukların prostat tümürlü farelerde biyodağılımları, ICP-MS ile nicel olarak da belirlenmiştir (Şekil 4.82). Sonuçlar incelendiğinde; LR ve Ab-LR 'nin 24 saatte büyük oranda karaciğerde biriktiği gözlenmiştir. Ayrıca, Ab-LR'nin, LR'ye kıyasla tümörde hafif şekilde daha fazla biriktiği gözlenmiştir.

Ab-LR ve LR uygulanmış prostat tümürlü farelerden toplanan dokuların histolojik incelemesi, toplanan dokuların fiksasyonunda yaşanan problem nedeni ile gerçekleştirilememiştir.

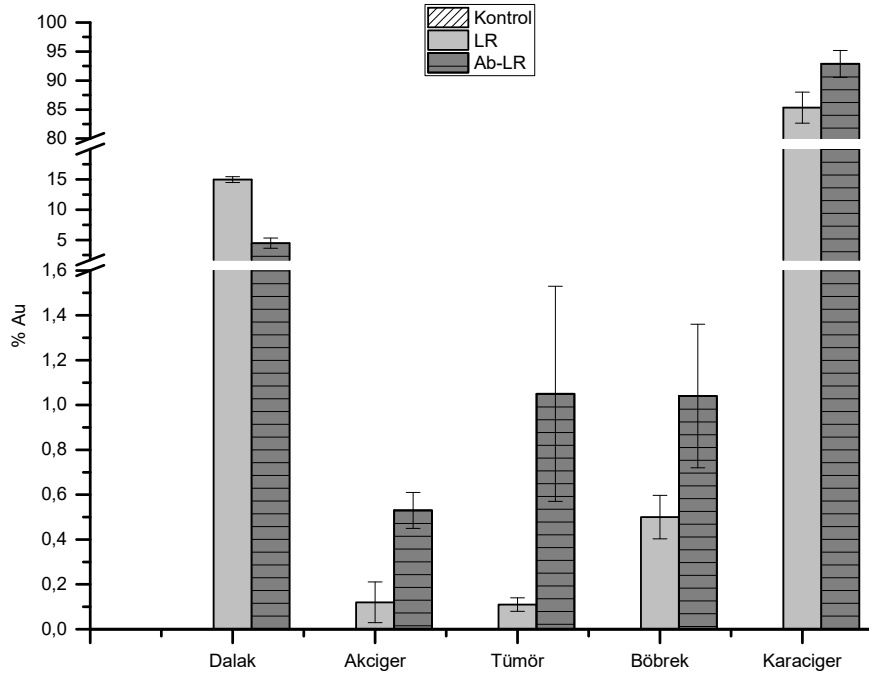
Ayrıca, projenin son döneminde Ab-LR ve LR'nin meme tümürlü dişi farelerde de biyodağılım deneylerinin yapılması planlanmıştır. Bu amaçla Boğaziçi Üniversitesi Vivarium'dan 12 adet dişi nude fare temin edilmiş olup bu farelere standart protokol ile MDA-MB-231-Luc2-GFP enjeksiyonları yapılmıştır. Ancak 4 hafta beklenmesine rağmen farelerde oluşan tümörler deneylere başlamak için gerekli büyüklüğe (yaklaşık 100 mm³) ulaşamamıştır ve fareler yaşlanmıştır. Bu nedenle, meme tümürlü dişi farelerde Ab-LR ve LR'nin biyodağılım ve fototermal terapi deneyleri yapılamamıştır.



Şekil 4.80. Sadece PBS'in prostat tümürlü erkek farelere i.v. enjeksiyonu 0. saat (yaklaşık ilk 15 dk içinde), 3., 6. ve 24. saat sonrası alınmış IVIS mikroskop sonuçları (n=2).



Şekil 4.81. Antikor konjuge nanokabuk (Ab-LR)'ların prostat tümörlü erkek farelere i.v. enjeksiyonu sonrası 0. saat (yaklaşık ilk 15 dk içinde), 3., 6. ve 24. saat sonrası alınmış IVIS mikroskop sonuçları (n=2). LR, Alexa Flor-647 ile işaretli antikorlar konjuge edilerek deney öncesinde işaretlenmiştir.

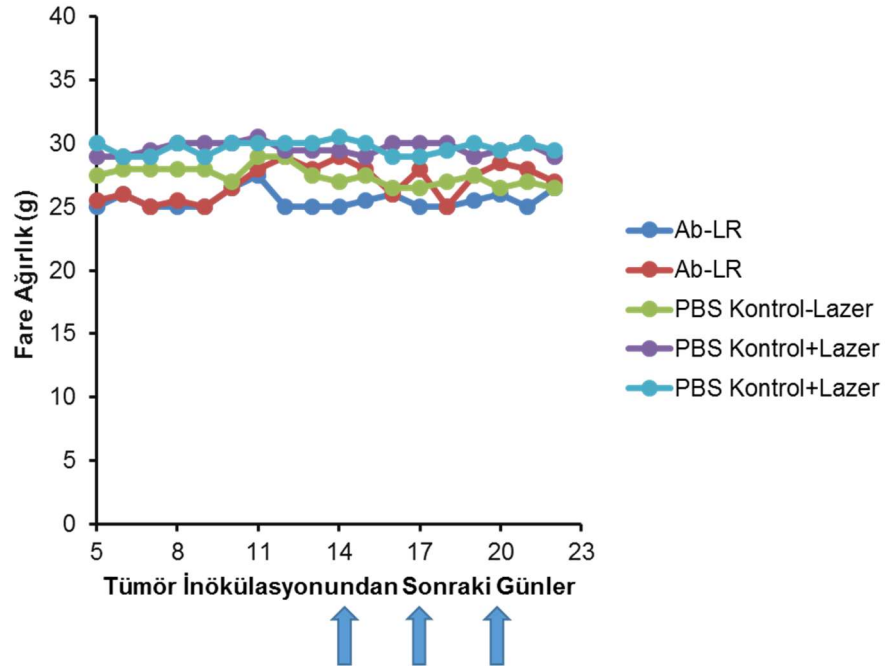


Şekil 4.82. Antikor bağılı nanokabuk (Ab-LR) ve antikor taşımayan nanokabuk (LR) örneklerinin prostat tümürlü erkek farelere i.v. enjeksiyonu 24. saat sonrası belirli dokular için alınan ICP-MS sonuçları (n=2).

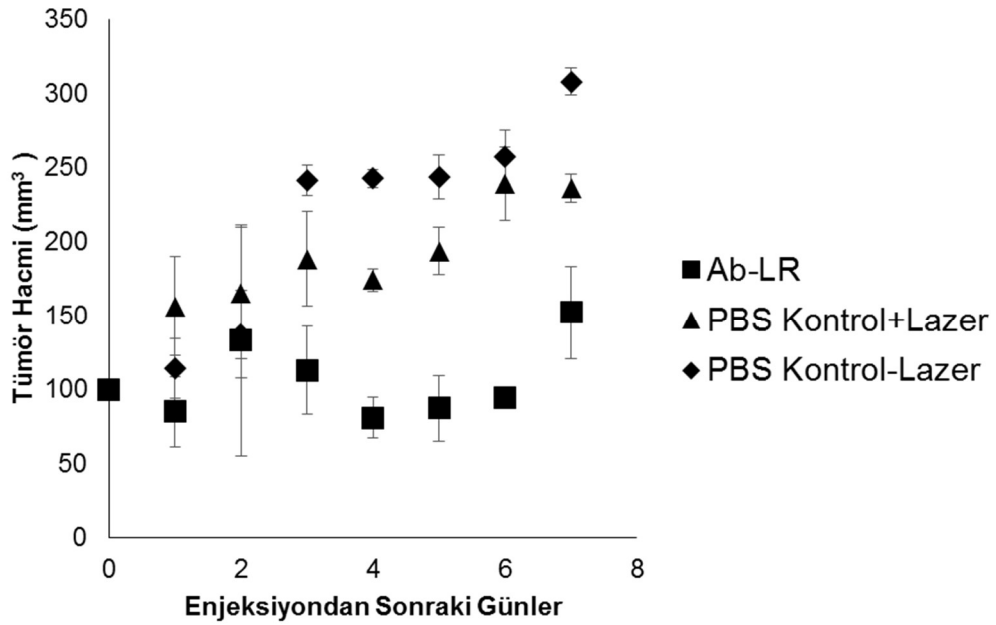
4.2.4.3 Tümürlü Farelerde Fototermal Terapi

Prostat tümürlü erkek farelerde Ab-LR formülasyonunun enjeksiyonu sonrası lazer uygulamasının tümör hacmine etkisi 7 gün süre ile takip edilmiştir. PBS enjekte edilmiş lazer uygulaması yapılmış ve yapılmamış fareler kontrol grupları olarak kullanılmıştır. Tüm deney süresince farelerin ağırlıklarında hiçbir değişiklik olmamıştır (Şekil 4.83). Ab-LR enjekte edilmiş farelerde lazer uygulaması sonrası tümör hacminin değişimi Şekil 4.84'te görülmektedir. Tümör hacmi, Ab-LR enjekte edilmiş farelerde (n=2) 7 gün içinde yaklaşık aynı kalmıştır. PBS kontrol grubunda, lazer uygulanmış farelerde (n=2) aynı süre içinde tümör hacminde %250, lazer uygulanmamış farede (n=1) %300'e çıkmıştır.

Ab-LR ve LR uygulanmış prostat tümürlü farelerden toplanan dokuların histolojik incelemesi, toplanan dokuların fiksasyonunda yaşanan problem nedeni ile gerçekleştirilememiştir.



Şekil 4.83. Prostat tümörlü farelerin tümör oluşumundan fototermal deney sonucuna kadar ağırlıklarındaki değişim (n=2). Oklar Ab-LR ve PBS (kontrol) enjeksiyonlarının yapıldığı günleri göstermektedir.



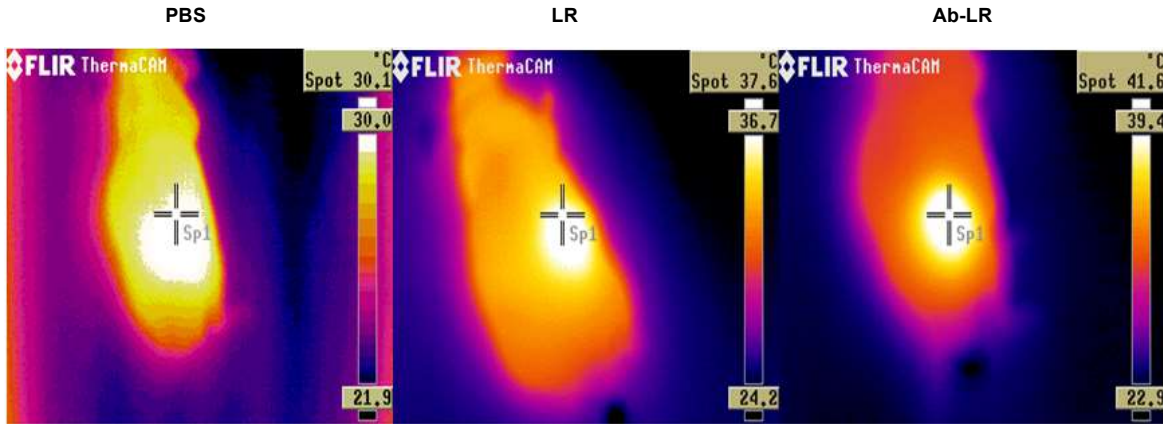
Şekil 4.84. Prostat tümörlü farelerde Ab-LR kullanılarak gerçekleştirilen fototermal terapi ile tümör hacminin değişimi (n=2).

Projenin son döneminde Ab-LR ve LR'nin meme tümörlü dişi farelerde fototermal terapi deneylerinin yapılması planlanmıştır. Bu amaçla Boğaziçi Üniversitesi Vivarium'dan 12 adet

dişi nude fare temin edilmiş olup bu farelere standart protokol ile MDA-MB-231-Luc2-GFP enjeksiyonları yapılmıştır. Ancak 4 hafta beklenmesine rağmen farelerde oluşan tümörler deneylere başlamak için gerekli büyüklüğe (yaklaşık 100 mm³) ulaşamamıştır ve fareler yaşlanmıştır. Bu nedenle, meme tümörlü dişi farelerde Ab-LR ve LR'nin biyodağılım ve fototermal terapi deneyleri yapılamamıştır.

4.2.4.4 In Vivo Görüntüleme

Prostat tümörlü farelerde fototermal terapi uygulaması sırasında termal kamera ile tümör bölgesinin görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.85). PBS, LR ve Ab-LR enjeksiyonları sonrası lazer uygulamaları sırasında tümör bölgesinin termal kamera görüntülerinden Ab-LR uygulamasının, PBS ve LR'ye kıyasla, sırasıyla 11.5°C ve 4°C'lik sıcaklık artışına sebep olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.85. Ab-LR, LR ve PBS uygulanmış prostat tümörlü farelerde 10 dk süresince 808 nm, 500 mW lazer uygulamasından sonra tümör bölgesinin termal kamera görüntüleri (n=2)

Projenin son döneminde meme tümörlü farelerde Ab-LR kullanılarak SERS tekniği ile in vivo görüntüleme deneylerinin yapılması planlanmış olmasına rağmen, yukarıdaki bölümlerde açıklandığı üzere meme tümörlü dişi farelerde Ab-LR ile in vivo deneyler gerçekleştirilemediği için bu nanomalzemenin SERS görüntüleme ajanı olarak kullanılabilme potansiyeli belirlenememiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu projenin amacı, sağlıklı dokulara zarar vermeden seçici olarak meme ve prostat kanseri tümörlerini hedef alıp, bu tümör hücrelerini yok eden, aynı zamanda tümörün görüntülenmesine de olanak tanıyan nanoteknoloji ürünü teranostik bir sistem geliştirmek ve teşhis ve tedavi etkinliğini in vitro ve in vivo deneyler ile ispatlamaktır. Bu amaca yönelik olarak, biyoyumlu, seçici olarak meme ve prostat kanseri hücrelerini hedefleyebilen altın nanoçubuk ve nanokabukların üretilmesi, bu nanotanecekler kullanılarak farelerdeki tümörlerin fototermal lazer terapi ile yok edilmesi ve aynı zamanda görüntülenmesi de hedeflenmiştir.

5.1 Nanoçubuklar Üzerine Tartışma ve Sonuç

Bu hedefler doğrultusunda öncelikle değişen boy:en oranlarında altın nanoçubuklar sentezlenmiştir. Sentezlenen nanoçubukların karakterizasyonu öncelikle LSPR/UV-vis spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Bu incelemeler, eni yaklaşık 15 nm, boyu ise ortalama 40 nm ila 105 nm arasında değişen altın nanoçubukların yüksek konsantrasyonda sentez edildiklerini göstermiştir. Uzunluklardaki değişiklikler, nanoçubuk sentezinde kullanılan büyüme çözeltilisindeki $AgNO_3$ konsantrasyonu ile kontrol edilebilmektedir (Feng vd., 2015). Nanoçubukların boylarının artması, LSPR spektrumlarındaki boyuna absorpsiyon piklerinin kırmızı bölgeye doğru kayması ile ilişkilendirilir (Nikoobakht ve El-Sayed, 2003).

Altın nanoçubuklar istenilen boylarda yüksek verimde üretildikten sonra nanoçubukların yüzeyi PEG ile modifiye edilmiştir. Burada amaç, altın nanoçubukları suda kolay dağıtılabılır, kolloidal kararlılığa sahip ve biyoyumlu hale getirmektir. Altın nanoçubukların kolloidal kararlılıklarının ve biyoyumluluklarının artırılması amacı ile PEG'lenmesi literatürde yaygın şekilde kullanılan bir stratejidir (Alkilany vd., 2009). PEG'leme sonrası alınan LSPR ölçümleri nanoçubukların tipik UV-Vis karakteristiğini göstermiştir. PEG'leme sonrası, denenen farklı boylardaki nanoçubuk örneklerinin hepsinde boylamsal pikin kırmızı bölgeye kaydığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, literatür ile uyumlu olup beklenen bir sonuçtur (Niidome vd., 2009). PEG'leme sonrası boylamsal pikte genişleme görülmemesi PEG ile fonksiyonelleştirilmiş altın nanoçubukların suda çok iyi dispers edildiğinin bir göstergesidir (Oyelere vd., 2007). PEG'leme sonrası absorbans değerlerindeki düşüş, ortamda bulunan fazla PEG moleküllerinin santrifüj ile uzaklaştırılması sırasında altın nanoçubukların bir kısmının uzaklaşmış olmasından kaynaklanmaktadır. Altın nanoçubukların PEG ile modifiye edilmesi öncesi yapılmış XPS analizlerinden (Tablo 4.1) altın yüzeyine Au-Br etkileşimi ile CTAB molekülünün bağlanmış olduğu görülmüştür. N1s taramasında alınan azot atomu

sinyalleri CTAB molekülü yapısında bulunan azot atomlarından kaynaklanmaktadır. PEG ile modifikasyonunun ardından yapılan XPS analizlerinden elde edilen veriler (Tablo 4.2), PEG moleküllerinin altın nanoçubukların etrafını kaplayan CTAB moleküllerinin yerini yüksek verimle aldığını göstermiştir. PEG'leme sonrası yapılan XPS analizlerinde ilginç olarak, iki fonksiyonel gruba sahip NH_2 -PEG-SH moleküllerinin NH_2 uç grubundan kaynaklanan azot atomları gözlenmemiştir. Bu durum, makromoleküler yapıda olan PEG zincirlerinin (molekül ağırlığı= 5000 g/mol) katlanmasından dolayı fonksiyonel uç grupların molekül içerisine gömülmesinden veya XPS analizleri sırasında kullanılan ölçüm açısı nedeniyle uygulanan X-ışınlarının nanoçubuk yapıların en dışında yer alan PEG-amin gruplarını ölçemeyecek kadar derine inmiş olmasından kaynaklanmış olabilir. Benzer şekilde altın nanoçubukların XPS analizinde yüzeydeki bazı fonksiyonel grupların gözlenemediği literatürde bildirilmiştir (Techane vd., 2011)

Altın nanoçubukların değişen oranlarda mPEG-SH:SH-PEG-amin karışımı ile fonksiyonelleştirme işleminden önce alınan DLS/zeta potansiyelleri ölçüm sonuçları (Tablo 4.3), nanoçubukların yüzeyinde zeta potansiyelinin pozitif olduğunu göstermiştir. CTAB katyonik bir molekül olduğu için CTAB ile stabilize edilmiş altın nanoçubuklar katyonik yüzey özelliği göstermiştir. PEG karışımı ile etkileşmeden sonra altın nanoçubuklar yüzeylerinde baskın olarak bulunan CTAB moleküllerinin yerini PEG moleküllerinin aldığına göstergesi olarak, zeta-potansiyeli pozitiften hafif negatif değerlere kaymıştır. Zeta-potansiyelinde meydana gelen azalma, hidrofilik uç grup olarak kuaterner amonyuma sahip CTAB moleküllerinin uzaklaştırılmış olması ve yerine PEG moleküllerinin bağlanmış olması ile açıklanabilir. PEG karışımı ile fonksiyonelleştirmeden sonra altın nanoçubukların beklendiği gibi katyonik özelliği azalmıştır (Liopo vd., 2012). Zeta-potansiyelde meydana gelen azalma, CTAB moleküllerinin uzaklaştırılmış olması ve yüzeye PEG moleküllerinin başarılı bir şekilde bağlanmış olmasına atfedilmiştir. Literatürde mPEG ile kaplı nanoparçacıkların net yükünün hafif negatif olduğu bildirilmiştir (Zhang vd., 2014). Bizim deneylerimizde mPEG ve amin-modifiye PEG karışımı kullanılmış olup amin pozitif yükünün mPEG tarafından örtülmesi (shielding) muhtemeldir. XPS sonuçları da bu hipotezi destekler niteliktedir. mPEG-SH:SH-PEG-amin oranının azalması ile zeta potansiyel değerlerinin arttığı görülmüştür. Bu durum, yüzeyde bifonksiyonel PEG'in sahip olduğu amin gruplarının artmasına atfedilmiştir. Literatürde DLS ölçümlerinin nanoçubukların hidrodinamik boyutlarını doğru göstermeyeceği, sadece görünür bir boyut göstereceği bilinmektedir (Glidden ve Muschol 2012). Yaptığımız DLS ölçümleri ile nanoçubukların yüzeylerindeki modifikasyonlara göre görünür boyuttaki değişimleri belirleyerek modifikasyonlar hakkında fikir sahibi olmak amaçlanmıştır. Beklendiği üzere, PEG'leme sonrası altın nanoçubukların hidrodinamik boyutları belirgin şekilde 261 nm'den 13 nm'ye düşmüştür.

Altın nanoçubukların PEG karışımı ile fonksiyonelleştirme öncesi ve sonraki Raman ölçümleri (Şekil 4.7 ve 4.8) ise yüzeyde olan değişiklikleri açık bir şekilde göstermiştir. Katyonik yüzey aktif malzeme CTAB, altın nanoçubukların yüzeyine Au-Br etkileşimi ile tutunmaktadır. PEG'leme öncesi nanoçubuk örneklerinde CTAB'in karakteristik pikleri kuvvetli bir şekilde görülmüştür. Bu piklerin düşük konsantrasyonda bu kadar kuvvetli olmasının sebebi altın nanoçubukların çok iyi birer Yüzey Arttırılmış Raman Spektroskopisi (SERS) alttaşı olmalarıdır (Tian vd., 2014). Altın nanoçubukların lazer ile uyarılmasının sonucunda çubukların etrafında oluşan elektromanyetik alan Raman sinyallerini çok büyük oranda geliştirir. En kuvvetli sinyal olarak gözükten Au-Br etkileşiminden kaynaklanan 174 cm^{-1} 'deki pik bunun göstergesidir. Altın nanoçubuğa en yakın olan Au-Br bağı yüzey geliştirmeden en çok etkilenen bağ olmuştur. Altın nanoçubukların PEG karışımı ile yüzey modifikasyonu işleminin ardından Raman spektrumunda PEG piklerinin baskın olarak gözlenmesi, CTAB sinyallerinin ciddi şekilde düşmesi ve Au-S bağından kaynaklanan sinyallerin (270 cm^{-1}) oluşması altın nanoçubukların PEG molekülleri ile etkili bir şekilde çevrelendiğini göstermiştir (Yamini vd., 2014; Zhang ve Lin, 2014; Liao ve Hafner, 2005). Ek olarak, altın nanoçubukların PEG karışımı (4:1) ile fonksiyonelleştirilmesinden sonraki SEM ve AFM görüntüleri (Şekil 4.9 ve 4.10) altın nanoçubuklar etrafındaki PEG tabakasını gayet net bir şekilde görsel olarak kanıtlamıştır.

Altın nanoçubuklara monoklonal antikor bağlanması LSPR spektrometresi, DLS/zeta potansiyel, XPS ve AFM ile karakterize edilmiştir. LSPR analizlerinde (Şekil 4.11) PEG ile modifiye olmuş nanoçubuklara antikor bağlandıktan sonra, yüzey plazmon rezonansında kırmızı bölgeye kayma gözlenmiştir. Rezonansta kayma, antikorların altın yüzeye bağlanmasını doğrudan gösteren beklenen bir sonuçtur ve literatür ile uyumludur (Liopo vd, 2012).

Antikor ile konjugasyon işlemi öncesi ve sonrası zeta potansiyel ve dinamik ışık saçılım analizlerinin sonuçları (Tablo 4.4 ve 4.5) altın nanoçubukların PEG ile etkileşiminden sonra altın nanoçubukların zeta-potansiyelinin 11 mV 'dan -8.8 mV 'a düştüğünü göstermiştir. Yukarıdaki paragraflarda açıklandığı üzere, zeta-potansiyelde meydana gelen azalma, CTAB moleküllerinin uzaklaştırılmış olması ve yüzeye PEG moleküllerinin başarılı bir şekilde bağlanmış olmasına atfedilmiştir. Altın nanoçubukların PEG ile modifikasyonundan sonra antikor konjugasyonu yapılmıştır. Antikorlar nötral pH'da net pozitif yüke sahiptirler (Boswell vd., 2010). Teorik olarak PEG kaplı altın nanoçubuklara antikor bağlandıktan sonra zeta potansiyel değerinin artması beklenmektedir. AntiKDN monoklonal antikorunun bağlanması sonucu PEG'lenmiş nanoçubukların zeta potansiyel değeri -8.8 'dan -1.6 mV 'a yükselmiştir. Meydana gelen bu artış konjugasyon işleminin gerçekleşmiş olmasına atfedilmiştir. İşlevselleştirilmiş nanoçubukların in vivo özelliklerinin daha gerçekçi belirlenebilmesi için, zeta

potansiyel ölçümleri, ayrıca serum içeren PBS ortamında gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlerde PEG'lenmiş nanoçubuklar (PR2) hariç diğer iki örnekte (R2 ve Ab-PR2) muhtemel albumin proteinin adsorpsiyonu nedeniyle zeta potansiyel değerlerinde negatif yüke doğru artış olmuştur. Bu sonuç da nanoçubuk yüzeyinde PEG ve Ab modifikasyonlarının gerçekleştiğinin doğrudan bir göstergesi sayılabilir. PR2'nin yüzeyindeki PEG tabakası, protein itici bir tabakadır. Dolayısıyla protein adsorpsiyonuna direnç gösterir (Alkilany vd.,2010). Öte yandan CTAB kaplı nanoçubuklar (R2) ve antikor kaplı nanoçubukların (Ab-PR2) yüzeyindeki pozitif yüklü gruplar özellikle negatif yüklü albumin ve diğer serum proteinlerinin adsorpsiyonunu kolaylaştırır. PEG'li altın nanoçubukların antikor konjugasyonu öncesi ve sonrası boyutlarındaki değişim DLS (Tablo 4.5) ile ölçülmüştür. Bu ölçüm sonuçları, diğer sonuçları destekler niteliktedir. Sadece görünür boyut bilgisinin alınabileceği DLS ölçümlerinde PEG kaplı altın nanoçubukların antikor ile etkileştirilmesi sonucu hidrodinamik boyutunun 13.2 nm'den 48.7 nm'ye çıktığı belirlenmiştir. Yaklaşık 35 nm'lik artış antikorların literatürde verilen boyutları ile örtüşmektedir. (Alvaro vd., 2000) Serum varlığında gerçekleştirilen DLS ölçümlerinde ise PEG'lenmiş nanoçubuk dışındaki diğer nanoçubuklarda (CTAB kaplı ve Ab-konjuge) protein adsorpsiyonunu ve muhtemel partikül agregasyonunu işaret eden boyut artışı gözlenmiştir. Pozitif yüklü nanoçubuk yüzeyine albumin gibi negatif yüklü proteinlerin adsorpsiyonu ve buna bağlı olarak partikül agregasyonu literatürde sıkça karşılaşılan bir sorundur (Mahmoud vd., 2016).

Antikor ile konjugasyon işleminin ardından gerçekleştirilen XPS analizleri (Tablo 4.6, Şekil 4.12) PEG kaplı nanoçubuklarda gözlenmeyen azot atomunun varlığını belirgin şekilde göstermiştir. Protein yapısından dolayı çok sayıda azot atomu içeren antikor molekülleri nedeniyle nanoçubuk yüzeyinde azot miktarının artması beklenen bir sonuçtur ve yüzeye antikorların bağlandığını ispatlamaktadır.

Son olarak AFM görüntüleri, antikor konjugasyonu sonrası PEG'lenmiş nanoçubuklarda görülen yoğun PEG tabakasının, muhtemelen uzun süre yapılan diyaliz nedeniyle, uzaklaştığını ve nanoçubukların çubuk şeklinin, muhtemelen antikor bağlanması nedeniyle, hafifçe kaybolduğunu göstermiştir.

Antikor konjugasyonunu doğrulamak adına son olarak, anti-KDN antikorları ile işlevselleştirilmiş nanoçubuklara spesifik antijen olan KDN molekülünün bağlanması incelenmiştir (Şekil 4.14 ve Tablo 4.7). LSPR analizlerinde artan konsantrasyonlarda KDN bağlanması sonrası, artan şekilde rezonans kayması gözlenmiştir. Bu durum KDN moleküllerinin altın yüzeye bağlandığını göstermektedir. Sonuçlara bakıldığında 1 ila 5 mM KDN konsantrasyonu aralığında antikor-antijen etkileşimi doygunluğa ulaşmıştır. Zeta potansiyel ölçümleri ise artan KDN konsantrasyonu ile nanoçubukların yüzeyinin daha fazla

negatif yüklendiğini göstermiştir. KDN molekülü bir sialik asit türevi olup nötral şartlarda anyonik bir moleküldür. KDN konsantrasyonunun artması ile yüzey yükü daha negatif hale gelmekle beraber yüksek konsantrasyonlarda yüzey yükündeki değişim azdır (5 mM için -15.9, 10 mM için -19.6). Bu nanoçubukların doyunluğa ulaşması veya spesifik olmayan bağlanmalar nedeni ile olabilir. Zeta potansiyel değerleri LSPR sonuçlarını destekler niteliktedir. Sonuç olarak; LSPR, DLS/zeta potansiyel ve XPS ve AFM sonuçlarının tümü antikor konjugasyon işleminin başarılı olduğunu kanıtlamıştır.

Nanoçubuklar ile gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda öncelikle bu nanomalzemelerin hücre canlılığına etkileri ve güvenli dozları belirlenmiştir (Şekil 4.17- 4.19). Sonuçlara göre, PEG'leme öncesi CTAB kaplı nanoçubuklar oldukça düşük dozlarda sağlıklı meme ve prostat epitel hücrelerine toksik etki yapmıştır. Literatürde CTAB kaplı nanoçubukların yüksek toksisiteye sahip olduğu bildirilmiştir (Alkilany vd., 2012). Katyonik bir yüzey aktif ajan olan CTAB, hücre membranıyla yüksek derecede etkileşerek hücre canlılığını düşürmektedir. PEG'leme işlemi ile yüzeydeki CTAB molekülleri yerlerini toksik olmayan, nötral PEG moleküllerine bırakmaktadır. Bu nedenle PEG'leme sonrası nanoçubukların toksisitesi belirgin şekilde düşmüştür. Farklı uzunluktaki nanorodlar karşılaştırıldığında ise orta boy:en oranına (PR2; boy:en=4.33) sahip nanoçubukların en az toksik olduğu ve nanoçubuk boyunun azalması ve artması ile toksisitenin arttığı bulunmuştur. Hücre türüne de bağlı olmak üzere, proje kapsamında test edilen üç farklı boy:en oranında nanoçubuklardan en küçük boy:en oranına sahip, en küçük nanoparçacık olan PR1 test edilen örnekler arasında en fazla toksik etkiye sahip nanoçubuk örneğidir. Belirli bir boyutun altında çok küçük nanopartiküllerin hücreler tarafından çok daha fazla alınmaları nedeni ile görece yüksek toksisiteye sahip olduğu literatürde bilinmektedir (Huang vd., 2017). Ayrıca boy:en oranı yüksek nanomalzemelerin biyolojik membranlar ile etkileşimlerinin, diğer morfolojilere göre, çok daha fazla olduğu ve bu nedenle toksisitelerinin görece yüksek olduğu yine literatürde bildirilmiştir (Lee vd., 2014; Fubini vd., 2011).

Sonraki aşamada, kanser hücreleri üzerinde fototermal terapinin etkilerini incelemeyen seçilen güvenli dozda (100 μ M) nanoçubukların kanser hücrelerine toksik etki yaratıp yaratmadığına bakılmıştır. Seçilen güvenli dozda PEG'lenmiş nanoçubukların kanser hücreleri üzerinde belirgin bir toksik etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Ayrıca antikor konjugasyonunun uygulanan dozlarda nanoçubukların toksisitesinde bir etkiye sebep olmadığı da *in vitro* deneyler ile gösterilmiştir.

Dört hücre türünde (RWPE-1, DU 145, MCF 10A ve MCF7) PR2 ve PR3 ile güvenli 100 μ M dozda gerçekleştirilen Annexin V testi sonuçlarına göre (Şekil 4.20-4.21), nanoçubukların kayda değer apoptoza sebep olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar viabilite

testlerinde elde ettiğimiz sonuçları valide etmiştir. Nanoçubukların boy:en oranının, çalışılan aralıkta (4.3 ve 7) apoptoz üzerinde farklılık yaratmadığı anlaşılmıştır. Bununla birlikte hücre türüne göre nanomalzemelerin apoptotik etkisi farklılık göstermiştir. PR2 ve PR3, meme kanseri MCF7 hücrelerinde, normal meme hücrelerine göre daha çok apoptotik etkiye sahiptir. Ancak bu apoptotik etki oldukça düşüktür. PR2 ve PR3'ün hücre döngüsü üzerine etkisi hücre döngüsü kiti kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.21). Hücre Döngüsü Kiti, propidium (PI) ve özel bir formulasyonda RNase A içeren bir reaktif içermektedir. PI, DNA boyanma spesifikasyonunu artırmak için RNase'in varlığında diferansiyel DNA içeriğine bağlı olarak hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki hücreleri ayırt etmektedir (Cecchini vd., 2012). Dinlenme halindeki hücreler (G0/G1) her bir kromozomun iki kopyasını içerir (Hunt vd., 2011). Hücre bölünmeye başladığında, hücreler kromozomal DNA sentezlerler (S-fazı). PI floresans yoğunluğu tüm kromozomal DNA ikiye katlandığında (G0/G1) artar. Bu aşamada, G2/M hücreler iki hücreye bölünür. Her bir hücre döngüsü fazındaki hücrelerin ölçülmesi PI bağlanması ile yapılır (Pozarowski ve Darzynkiewicz, 2004). Hücre döngüsü deneylerinin sonuçlarına göre, prostat normal epitel RWPE-1 hücrelerinde, PR2 ve PR3 nanomalzemelerin uygulaması bu hücrelerin yaşam döngülerinde kontrole göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Prostat kanser DU-145 hücrelerinde ise, PR3 ve PR2 uygulamasının hücrelerin DNA replikasyonunu çok az bir şekilde indüklediği düşünülmektedir. Bu nanomalzemelerin aynı dozda meme normal epitel MCF 10A hücrelere ve meme kanseri MCF7 hücrelere uygulanması sonrası kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Tüm bu sonuçlar ışığında uygulanan nanoçubukların hücre döngüsü üzerinde hücre tipine özgün etki gösterdiği söylenebilir. Hücre döngüsü sonuçları ile apoptoz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, bu nanoçubukların uygulanan güvenli dozda, prostat hücrelerinde daha çok proliferatif ve meme hücrelerinde daha çok apoptotik yönde etkisi olduğu sonucuna varılmıştır.

PR2 ve PR3 nanoçubuklarının hücreler tarafından zamana bağlı olarak etkin şekilde alındığı ICP-MS ölçümleri ile ispatlanmıştır. Boy: en oranı daha yüksek olan PR3'ün hücreler tarafından alımı, PR2'ye göre çok daha hızlıdır. Bu bulgu, boy: en oranı yüksek nanomalzemelerin biyolojik membranlar ile etkileşimin daha yüksek olduğunu bildiren literatürü desteklemektedir (Lee vd., 2014; Fubini vd., 2011). Ayrıca hücre alımı sonuçları, hücre canlılığı sonuçlarını destekler niteliktedir. Beklendiği gibi nanoçubukların hücreler tarafından alımı zamanla artmaktadır.

Monoklonal antikor (Ab) konjuge edilmiş PR2 (Ab-PR2) ve antikor taşımayan PR2 nanoçubuklarının kanser ve sağlıklı hücreler tarafından alımlarının ICP-MS ölçümleri ile karşılaştırılması sonucu, Ab konjuge edilmiş ve edilmemiş nanoçubuklar arasında anlamlı bir

fark gözlenmemiş veya Ab-konjuge nanoçubuklar kanser hücreleri tarafından daha az alınmıştır (Şekil 4.23 ve 4.24). Zeta potansiyel ve DLS ölçümlerinin işaret ettiği şekilde Ab-konjuge nanoçubukların serum ortamında protein adsorpsiyonu ve agregasyon eğilimi nedeniyle hücreler tarafından daha az alınıyor olması muhtemeldir. Bu sorunu çözmek için PEG karışımında mPEG:amin-PEG oranı 4:1'den 9:1'e ve Ab konjugasyon derecesi yarıya (%0.1'den %0.05'e) düşürülerek deney tekrar edilmiştir. Ancak hücre alımı profilinde antikor hedeflemesini ön plana çıkaran bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.23). Ab konjugasyonu fizikokimyasal teknikler ile konfirme edilmiş, aynı zamanda Ab konjuge nanoçubuklara KDN antijeninin spesifik şekilde bağlanması LSPR ile doğrulanmış olmasına rağmen antikor konjuge nanoçubukların kanser hücrelerine göre normal hücreler tarafından daha fazla alınmasının nedenleri anlaşılamamıştır. Bu nedenle son derece küçük altın miktarları ile gerçekleştirilen bu deneylerde hücre alımının daha hassas şekilde ölçülmesi amacıyla akış sitometresinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu doğrultuda Ab-konjuge nanoçubuklar floresans ile işaretlenmiş ve hücre alım deneyleri tekrar edilmiştir. Akış sitometresinden elde edilen sonuçlara (Şekil 4.25) göre Ab-konjuge edilmiş nanoçubuklar hem prostat hem de meme kanser hücreleri tarafından normal prostat ve normal meme hücre hattına göre daha fazla alınmıştır. Ab-PR2'nin prostat normal epitel hücrelerine kıyasla prostat kanser hücreleri tarafından alımı yaklaşık 1.5 kat daha fazladır. Öte yandan meme kanser ve normal epitel hücre hatları arasında yaklaşık 2.6 kat fark gözlenmiştir. Bu sonuç, nanoçubuklar üzerinde anti-KDN monoklonal antikorunun meme ve prostat kanserinde, normal epitel hücrelere göre çok daha fazla eksprese edilen KDN reseptörlerine bağlanarak kanserli hücreler tarafından daha fazla alınmasına atfedilmiştir.

In vitro hücre kültürleri üzerinde nanoçubukların neden olduğu fototermal etki MTT hücre canlılığı testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.26 ve 4.27). Elde edilen sonuçlarda altın PR2 eklenmiş hücrelerin, nanoçubuk eklenmemiş hücrelere göre, lazer uygulaması sonrası canlılık oranlarında standart sapmalar dikkate alındığında istatistiksel olarak belirgin azalma gözlenmiştir. Düşük boy:en oranına sahip nanoçubuklarla muamele edilen hücrelerde gözlemlenen daha yüksek hücre ölümünün (yaklaşık %25) bu deneylerde uygulanan lazerin dalga boyu ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Lazer ışımından ısı enerjisine geçişteki fototermal dönüşüm verimi absorpsiyon/uyarma oranı arttıkça artan bir değerdir (Jiang vd., 2013). Literatürde de daha önce kanıtlandığı gibi fototermal dönüşüm verimi, uygulanan 780 nm dalgaboyundaki lazer dikkate alındığında düşük boy:en oranına sahip altın nanoçubuklar için daha yüksektir (Hong vd., 2012).

İki farklı boy:en oranındaki nanoçubukların, lazer gücü, ışınma süresi ve konsantrasyona göre içindeki buldukları sulu ortamın sıcaklığını arttırma kapasitelerinin karşılaştırılması

sonucu PR2'nin 120 μM konsantrasyon gibi düşük konsantrasyonlarda dahi ortamın sıcaklığını, lazer gücüne bağlı olarak 40°C ila 60°C arasında yükselttiği bulunmuştur. PR3'ün aynı şartlar altında sebep olduğu sıcaklık artışları görece düşük kalmıştır. Bu sonuçlar ışığında fototermal etki deneylerinde PR2'nin, yüksek güçte (200 veya 500 mW, 808 nm) lazerin ve 10 ila 20 dk ışımaya süresinin kullanılmasının uygun olduğuna karar verilmiştir. Bu bilgiler ışığında, PR2 ile 300 μM gibi yüksek altın konsantrasyonunda orta güçte lazer ile fototermal etki deneyleri gerçekleştirilmiş olup her iki kanser hücre türünün de canlılığında %25'e varan ancak istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüşler elde edilmiştir. Yüksek konsantrasyon PR2 ve yüksek güçte lazer uygulaması da dahil olmak üzere hücre canlılık değerlerindeki düşüş en fazla %25 kadardır. Burada PR2 nanoçubukların 808 nm (200 mW) lazer etkisi ile kısa sürede ortamın sıcaklığını 55°C'ye çıkarmasına rağmen belirgin şekilde hücre ölümüne yol açmamasının en önemli sebebi olarak hücre içine alınan küçük miktarda altın nanoçubukların çıkardığı ısının, hücre kültür deney düzeneğinde plaka dışına aktarımının pratik tüm önlemlere rağmen önüne geçilememesi görülmektedir.

In vivo deneylerde öncelikle PR2 ve PR3'ün biyodağılımları, sağlıklı farelerde incelenmiştir (Şekil 4.31 - 4.34). Bu incelemeler sonucu PR2 ve PR3'ün her ikisinin de karaciğerde birikiminin olduğu, ancak 24 saat sonunda metabolize oldukları görülmüştür. PR3, PR2'ye göre daha hızlı karaciğerde birikmiş ve böbrekler yolu ile atılmıştır. İlginç olarak hem PR2 hem de PR3 beyinde görülmüştür. Bu sonuçlar literatür ile uyumludur (Qian vd., 2008).

In vitro ve sağlıklı hayvanlardaki in vivo sonuçların tümü değerlendirildiğinde PR2 (boy:en=4.33) formülasyonunun PR3 (boy:en= 7) formülasyonuna göre, toksisite, fototermal etki ve karaciğer ve beyin birikimi açılarından daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle tümörlü hayvanlarda, sadece PR2 formülasyonun etkilerinin incelenmesine karar verilmiştir. Bu yaklaşım aynı zamanda tümörlü deney hayvanı sayısını da kısıtlı tutmamızı sağlamıştır.

Tümörlü hayvan modellerindeki deneylere prostat tümörü taşıyan erkek nude farelerde floresans ile işaretlenmiş serbest monoklonal antikorun biyodistribüsyonunun incelenmesi ile başlanmıştır (Şekil 4.35-4.36). IVIS mikroskop görüntülerinden, enjeksiyondan 6 saat sonra enjekte edilen antikorun tümörde toplanmaya başladığı ve 24 saat içinde çok yüksek yoğunlukta tümörde toplandığı görülmüştür. Bu sonuç, proje kapsamında üretilen ve dünya çapında tamamen yeni olan KDN antikorunun prostat tümörü dokusunu çok yüksek seçicilik ile tanıyıp bağlandığını açık bir şekilde göstermiştir. Bu sonuç, yeni antikorun hedefleme kapasitesi için son derece önemlidir.

Serbest antikorun biyodistribüsyon çalışmasından sonra floresan ile işaretlenmiş Ab-PR2 ve işaretli PR2'nin, prostat tümörlü farelerde biyodistribüsyonu incelenmiştir (Şekil 4.37

ve 4.38). Ab-PR2'nin hem tümör hem de karaciğer dokusunda enjeksiyondan hemen sonra birikmeye başladığı, 24 saat sonunda karaciğerde çok daha yoğun olmakla beraber tümörde de tamamen homojen olmamakla beraber birikimi olduğu gözlenmiştir. Antikor taşımayan PR2'nin enjeksiyondan 24 saat sonra belirlenen biyodistribüsyonu, Ab-PR2'ye çok benzerdir. Ancak, Ab-PR2'nin PR2'ye göre, tümörde birikimi ICP-MS sonuçlarına göre daha fazladır. ICP-MS sonuçları, Ab-PR2'nin IVIS mikroskobu ile belirlenmiş dağılım sonuçlarını desteklemektedir. Akciğer ve böbrekte her iki nanoçubuk da birbirlerine yakın biyodağılım göstermişlerdir. Nanopartiküllerin RES tarafından tutulması literatürde çok yaygın olarak yaşanan önemli bir problemdir (Jokerst vd., 2011). PEG'leme ile uzun sirküle eden parçaçık sistemlerinin geliştirilmesine çalışılmış ancak günümüze kadar henüz RES'ten etkin bir şekilde kaçabilen bir partikül sistemi literatürde bildirilmemiştir (Jokerst vd., 2011). Prostat tümörü modellerinde histolojik inceleme, doku örneklerinin fiksasyonunda yaşanan deneysel bir sorun nedeni ile gerçekleştirilememiştir.

Antikor (Ab), PR2 ve Ab-PR2'in biyodağılımları, hem lüminesans hem de floresans özelliğe sahip MDA-MB-231-Luc2-GFP meme kanseri hücrelerinin enjeksiyonu ile meme tümörü oluşturulmuş dişi farelerde de IVIS mikroskobu ve ICP-MS ile incelenmiştir (Şekil 4.39 ve 4.40). Anti-KDN antikor, meme tümörünü, prostat tümörüne göre daha az seçici şekilde hedeflemiştir. Tümörde toplanan antikor miktarı, karaciğer, böbrekler ve diğer organlara göre belirgin bir şekilde düşüktür. Buna uygun olarak, Ab-PR2 ve PR2 gruplarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.41). Nanoçubuklar meme tümörüne belirgin bir şekilde hedefleme yapmamış, bu örneklerle daha çok karaciğer, dalak, böbrek ve akciğer dokularında rastlanmıştır.

Prostat tümürlü farelerde, ilgili formülasyonların enjeksiyonları sonrası lazer uygulamasının tümör hacmine etkisi 7 gün süre ile takip edilmiştir (Şekil 4.42-4.43). Tümör hacmi altın nanoçubuk (Ab-PR2) enjekte edilmiş farelerde (n=2) 7 gün içinde %54'e düşmüştür. PBS kontrol grubunda, lazer uygulanmış farelerde (n=2) aynı süre içinde tümör hacminde %250, lazer uygulanmamış farede (n=1) %300 artış olmuştur. Ab-PR2 grubunda, standart sapmalar dikkate alındığında tümör hacminde çok belirgin azalma meydana gelmiştir. Bu azalma, altın nanoçubukların lazer ışınması sonucu fototermal etkisi ile tümör dokusunu yakmasına atfedilmiştir. Biyodistribüsyon deneylerinde görüldüğü üzere Ab-PR2'lerin az da olsa tümörde toplanması ile lazer ışınması sonucu altın nanoçubuklar, tümör dokusunun sıcaklığını arttırmış ve tümörün küçülmesine sebep olmuşlardır. Gerçekten de prostat tümürlü farelerde PBS, PR2 ve Ab-PR2 enjeksiyonları sonrası lazer uygulamaları sırasında alınan termal kamera görüntülerinden Ab-PR2 uygulamasının, PBS ve daha önemlisi PR2'ye kıyasla, tümör dokusunda, sırasıyla 9.4 ve 14.7°C'lik sıcaklık artışına sebep olduğunu göstermiştir

(Şekil 4.54). Bu sonuç, fototermal terapi sırasında görülen tümör hacminin küçülmesi sonucunu destekler niteliktedir.

Benzer şekilde meme tümörlü dişi farelerde de fototermal terapi deneyleri gerçekleştirilmiştir. Fareler iki hafta süre ile takip edilmiştir (şekil 4.44-4.45). Tümör hacminin takibi sonucu, Ab-PR2 + lazer uygulaması ile tümör büyümesinin bir süre hafif bir şekilde baskılandığı ancak ikinci haftanın sonunda kontrollere göre tümör boyutlarında istatistiksel belirgin bir farklılık olmadığı görülmüştür. Tümör baskılanmasının, tek başına antikordan kaynaklanıp kaynaklanmadığının anlaşılması için gerçekleştirilen ayrı bir deney, serbest antikoru meme tümörü büyümesini baskılamadığını göstermiştir (Şekil 4.45).

Biyodağılım ve fototermal terapi sonuçları topluca değerlendirildiğinde, anti-KDN antikorusunun, DU-145 hücreleri ile oluşturulmuş prostat tümörü dokusunu, nude farelerde yüksek seçicilikle hedeflediğini, anti-KDN antikoru konjuge edilmiş altın nanoçubukların az miktarda da olsa prostat tümör dokusunda toplandığını ve tümör dokusunun sıcaklığını belirgin bir şekilde arttırarak tümörün küçülmesini sağladığı söylenebilir. Benzer bir etki meme tümöründe elde edilememiştir. Bunun temel sebebi, kullanılan anti-KDN antikoru klonunun meme tümörüne çok daha düşük afinite göstermesi olabilir. Ab-PR2 nanoçubuklar da meme tümör dokusunda hemen hemen hiç toplanmamıştır. Ayrıca meme tümör dokusuna fototermal terapi sırasında lazer uygulaması, prostat tümörü deneylerinde kullanılanlardan daha seyrek uygulanmıştır (prostatta 3 günde bir, memede 5 günde bir). IVIS biyodistribüsyon deneylerinin aksine meme tümör dokusunda gerçekleştirilen histolojik incelemeler, Anti-KDN antikorusunun spesifik olarak tümör dokusundaki hücreler ile immunreaktivitesi olduğunu göstermiştir. PR2 ve Ab-PR2 gruplarında ise anti-KDN için pozitif boyanan hücre sayısının azaldığı saptanmıştır. PBS lazer (-) ve PBS lazer (+) gruplarında mevcut tümör kitlesi içerisindeki anti-KDN-pozitif popülasyonunun oldukça yoğun olduğunu saptanmıştır. PR2 ile kıyaslandığında, Ab-PR2 grubunda azalan immunreaktivite ise Ab'nin PR2 anti-tümör etkinliğini artırdığını göstermektedir. H&E boyanma sonuçları ile beraber değerlendirildiğinde, kontrol gruplarında proliferasyon indeksinin yüksek olmasına karşın, tedavi gruplarında apoptotik indeksin yüksek olması tümör dokusu içerisindeki hücrelerin bir kısmının ortadan kaldırıldığını göstermiştir.

Altın gibi soy metallerde, iletken banttaki elektronların toplu salınımı rezonans elektromanyetik radyasyon ile etkileşime girdiğinde, altının ışımaya özelliği büyük ölçüde arttıran güçlü elektrik alanları oluşmaktadır (Kneipp vd., 1999). Altın nanoçubukların bu özellikleri onları; organik boyalardan ve moleküllerden daha güçlü ışık emilimi yapmalarını sağlamaktadır (Jiang vd., 2011). Bu yüzden altın nanoçubuklar sensör uygulamalarında ve yeni görüntülenme ajanları olarak kullanımı giderek artmaktadır (Huang vd., 2006). Proje kapsamında SERS tekniği ile altın nanoçubukların tümörde görüntülenmesine yönelik

gerçekleştirilen deneyler, meme tümörlü fareler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.55 ve 4.56). Genel olarak i.v. enjeksiyonla uygulanmış Ab-PR2 örneklerinin Raman spektrumlarında yeterince sinyal artışı olmamıştır. Bu da 24 saat sonra dokularda yetersiz miktarda altının toplandığını göstermektedir. Bu durum özellikle tümör dokusu için geçerlidir. Karaciğerde sinyal artışı hafifçe görülmekle beraber, sinyal artışının en belirgin olarak görüldüğü organ böbreklerdir. Bu sonuç, nanoçubukların 24 saat sonra idrar yolu ile atıldığını göstermektedir. Yine meme tümörlü farede tümör bölgesine doğrudan enjeksiyon ile Ab-PR2 uygulaması sonucu tümör dokusundan kuvvetli Raman sinyali alınabilmektedir. Bu sonuçlar, altın nanoçubukların, yeterli bir şekilde tümör dokusunda veya başka dokularda birikmesi durumunda SERS tekniği ile etkin bir şekilde görüntülenebilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir.

5.2 Nanokabuklar Üzerine Tartışma ve Sonuç

Proje kapsamında biyouyumlu lipidler ile kaplı, içerisinde birden fazla nanoçubuk taşıyan nanokabuk yapılarının üretilmesi için çok sayıda reçete ve yöntem denenmiştir (Şekil 4.57-4.68). Geliştirilen malzemeler, LSPR, SEM ve AFM ile karakterize edilmiştir. POPC esaslı nanokabukların LSPR ölçümlerinde enine plazmon absorpsiyon piki 524 nm'de gözlemlenmiş ve CTAB'li nanokabuklara göre kırmızıya kayma meydana gelmiştir. Enine absorpsiyon pikinde meydana gelen bu kırmızıya kaymanın fiziksel değişimlerden kaynaklanan nedenleri vardır. Bunlar altın nanoparçacık çapı, lokal kırılma indisindeki artış ya da nanoparçacık etkileşimlerinden kaynaklı plazmon eşleşmesidir (Burgmeier vd., 2015). POPC'nin kırılma indisi CTAB'in kırılma indisine benzer olduğundan (Orendorff vd., 2009) enine absorpsiyondaki kırmızıya kaymanın sebebi nanokabuklar arasındaki eşleşme ve lipid tabakasının boyut değişiminden kaynaklı olabilir. Bu da POPC-altın nanokabuklarının çözelti içerisinde yan yana öz düzenli hale geldiğini ve bununda enine absorpsiyonda plazmon eşleşmesine ve kırmızıya kaymaya sebep olduğunu göstermektedir (Orendorff vd., 2009). Konjugasyondan sonra boylamsal pik mavi bölgeye doğru 13-15 nm bir kayma göstermiştir ki bu kaymanın sebebi daha önceden de bahsedildiği gibi parçacıklar arası etkileşimler ve etkileşmeden ortamda bulunan fazla altın nanoçubukların santrifüj ile uzaklaştırılmasından ileri gelebilmektedir (Colangelo VD., 2017). POPC esaslı nanokabukların Raman incelemesi, POPC'ye ait karakteristik piklerin varlığını açık bir şekilde göstermiştir. Bu da altın nanorodların çevresinde POPC esaslı lipid tabakasının oluştuğunun kanıtıdır. POPC esaslı nanokabukların SEM ve AFM görüntüleri, 120 nm ile 600 nm arasında boy dağılımına sahip küresel nanokabukların oluştuğunu göstermiştir. Boy dağılımı, projenin in vivo uygulama amacına uygun değildir.

POPC esaslı nanokabukların boy dağılımları uygun olmadığı için farklı lipid türleri denenmiştir. Bunlar arasında DDAB esaslı nanokabukların sentezi sırasında lipid ile kaplı nanoçubukların sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.61). Raman spektroskopisi ile ölçümler, DDAB kaplı nanoçubukların sentezlendiğini doğrulamıştır. DDAB esaslı nanokabukların karakterizasyon aşamasında, LSPR/UV-Vis spektroskopisi ölçümleri, 540 nm'de enine plazmon pikini ve 625 nm'de baskılanmış bir boyuna plazmon pikini göstermiştir. Literatürde, nanokabukların UV-Vis spektrumu nanoçubuklar ile karşılaştırıldığında baskılanmış bir boyuna plazmon pikinin görülmesi bildirilmiş olup nanokabukların etrafını çevreleyen yoğun stabilizör tabakasından, bizim durumumuzda ise lipid tabakasından, kaynaklanmaktadır (Lozano vd., 2012; Tomak ve Zareie, 2015). SEM görüntüleri içinde birden fazla nanoçubuk içeren, oldukça homojen boy dağılımında yaklaşık 100 ila 300 nm arasında çapa sahip küresel nanokabukların üretildiğini göstermiştir (Şekil 4.64).

DDAB kaplı nanokabuk sentezi başarılı olmuştur ancak DDAB katyonik bir lipid olup toksisitesi literatürde bildirilmiştir (Filion ve Philips, 1997). Literatürde biyoyumlu nanopartikül üretmek için ilk başvuru yöntemler genel olarak metal parçacıkların PEG (polietilen glikol) ya da polielektrolit malzemelerle kaplanmasıdır. (Zhao vd., 2008), (Zhu vd., 2013) Kullanılan bu metotlar dışında yapılan çalışmalarda lipid esaslı olarak üretim metodu olarak yalnızca nanopartikül üretimi yapılmıştır (Zhang vd., 2006). Lipidler nanopartiküller ile konjuge edildiği zaman nanopartiküllerin fizyolojik ortam içerisinde stabilizasyonu sağlar ve nanopartiküllerin in vivo çalışmalarda hedef dokuya ulaşmasını artırır (Matthews vd., 2015). Proje kapsamında üretilen DDAB kaplı nanokabukların katyonik lipidden kaynaklanan sitotoksitesini azaltmak için biyoyumlu ve düşük toksisiteli fosfotil kolin türevi lipidler olan DSPE-PEG (2000) ve DSPC, DDAB nanokabuk yapısına katılmaya çalışılmıştır (Şekil 4.65). DDAB/DSPE-PEG/DSPC karışımı esaslı nanokabukların in vitro sitotoksitesine sonuçlarına göre yapıya DSPE-PEG/DSPC katılmış olmasına rağmen 50 µM ve altında konsantrasyonlarda toksik etki göstermişlerdir. Bu sonuç nedeni ile nanokabuk sentezinde DDAB tamamen elimine edilmiş ve biyoyumlu/toksik olmayan DPPC/DSPE-PEG lipidleri içeren karışım kullanılarak altın nanoçubuklar içeren PEG'lenmiş nanokabuklar sentezlenmiş ve LSPR ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.66). SEM ve AFM görüntüleri, içerisinde ve duvarlarında birden fazla nanoçubuğun bulunduğu homojen, 200 ile 400 nm arasında boy dağılımında, küresel nanokabukların üretildiğini ispatlamıştır (Şekil 4.67-4.68). Böylece biyoyumlu lipidlerden oluşan yeni bir nanokabuk yapısı proje kapsamında başarıyla üretilmiştir.

Üretilen DPPC/DSPE-PEG kaplı nanokabuklara monoklonal anti-KDN antikolları kovalent olarak konjuge edilmiştir (Tablo 4.10 ve 4.11; Şekil 4.69). XPS analiz sonuçlarına bakıldığında altın yüzeydeki C, O içeriği azalırken N ve S oranı artmıştır. Lipid esaslı

nanokabuklarda ve içlerindeki nanoçubuklarda PEG-aminden kaynaklanan azot bulunmaktadır. Antikor bağlanması sonucu peptid yapısı nedeni ile yüzeydeki azot miktarının artması beklenir. Benzer şekilde nanokabuk içindeki altın nanoçubukların yüzeyindeki PEG-SH nedeni ile kükürt elementi LR örneklerinde beklenmektedir. Antikor bağlanması sonrası kükürtün artması protein yapısındaki sistein kalıntıları nedeni ile beklenir. N1s spektrumunda antikor konjugasyonu sonrası peptid bağı azotuna karakteristik 399-400 eV bağlama enerjisine sahip sinyalin belirmesi, antikor konjugasyonu öncesi ise sadece 402-404 eV enerjide primer amin grubu içindeki azota ait pikin varlığı antikor konjugasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca, DLS/zeta potansiyel ölçümleri Ab konjugasyonu sonrası hidrodinamik boyutta ve nanokabuk yüzey yükünde artış göstermiştir (Tablo 4.12). Bu beklenen bir sonuçtur. Zira zeta potansiyel ölçümlerinde PEG'lenmiş fosfolipid tabakası nedeni ile nanokabuklar hafif negatif yüklüdür. Pozitif yüklü antikorların konjugasyonu sonucu nanokabuk yüzey yükü pozitif doğru kaymıştır. Ayrıca serum ortamında nanokabuklar kararlılıklarını korumuştur. Tüm bunlar in vitro ve in vivo uygulamalar için nanokabukların uygunluğunu gösteren özelliklerdir.

Nanokabuk üretim denemeleri sonucunda DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabuklar stabil ve hedeflenen boy özelliklerine en yakın özelliklere sahip yapılar olarak ortaya çıkmıştır. Bu yapılar toksik olan DDAB lipidi kullanılmadan üretilmişlerdir. Kullanılan lipid karışımı biyouyumlu ve toksik olmayan lipidleri içermektedir ve yüzeyin doğrudan PEG'lenmiş olmasını mümkün kılmaktadır (Nag ve Awasthi, 2013). Sonuçta kararlı şekilde üretilen DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabukların toksisitesi MTT analizi ile belirlenmiştir (Şekil 4.72). RWPE-1 normal prostat hücreleri zor büyüyen ve dış şartlardan çok kolay etkilenen hücreler olup bu hücrelerin büyütülmesinde ciddi sorunlar yaşanmıştır. RWPE-1 hücre hattında yaşadığımız sorunları çözmeyi ve nanokabukların toksisite analizini yapmayı hedeflemiş olmamıza rağmen final rapor döneminde bu hücre hattı ile ilgili yaşanan hassasiyet sorunları tam olarak çözülememiştir. Bu nedenle RWPE-1 normal prostat hücrelerinde nanokabukların toksisitesi sadece iki konsantrasyonda değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabuklar, DU145 ve MCF-7 kanser ve MCF-10A epitel hücre hatlarında 1000 µM gibi yüksek konsantrasyonlara kadar istatistiksel olarak belirgin bir toksik etki göstermemişlerdir. RWPE-1 normal epitel hücre hattında ise denenen en yüksek doz olan 600 µM gibi konsantrasyonlara kadar anlamlı bir toksik etki gözlenmemiştir. Ayrıca, antikor bağlı nanokabuklar ile antikor taşımayan nanokabukların toksisiteleri arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.73).

Nanokabuklar ile hücre döngüsü ve apoptoz deneyleri gerçekleştirilmemiştir. Çünkü, nanokabukların in vitro fototermal etki deneyleri sonuçlarından bu nanomalzemelerin

nanoçubuklara göre fototermal etkide ek bir üstünlük sağlamadığı belirlenmiştir (Bknz Bölüm 4.2.3.3).

Sağlıklı ve kanser hücre hatlarında floresans boya ile işaretlenmiş antikor konjuge nanokabukların (Ab-LR) hücreler tarafından alım profilleri akış sitometresi ile belirlenmiştir (Şekil 4.74). Ab-konjuge edilmiş nanokabuklar hem prostat hem de meme kanser hücreleri tarafından normal prostat ve normal meme hücre hattına göre daha fazla alınmıştır. Bu sonuç, nanokabuklar üzerinde antiKDN monoklonal antikorunun meme ve prostat kanserinde, normal epitel hücrelere göre çok daha fazla eksprese edilen KDN reseptörlerine bağlanarak kanserli hücreler tarafından daha fazla alınmasına atfedilebilir.

Önemli olarak, DPPC/DSPE-PEG nanokabukların, (hücresiz) sulu ortamın sıcaklığını konsantrasyona bağlı şekilde belirgin bir biçimde arttırdığı, ancak, nanoçubuklara göre, fototermal etkide belirgin bir üstünlüğe maalesef sahip olmadığı gözlenmiştir. DPPC/DSPE-PEG nanokabuklar, 600 μ M konsantrasyonda, MCF-7 meme kanseri hücre hattı ile inkübasyonu ve sonrasında lazer uygulaması sonucu, hücre canlılığında yaklaşık %25'lik bir düşüşe sebep olmuştur (Şekil 4.76). Bu sonuç, 100-300 μ M konsantrasyonda nanoçubuklar ile gözlenen fototermal etki ile çok benzerdir.

Kullanılan nanokabuk dozunun (600 μ M), nanoçubuklara (100-300 μ M) göre çok daha yüksek olduğu da dikkate alındığında nanokabukların, nanoçubuklara göre fototermal etki açısından tercih edilmelerini gerektiren bir üstünlüğün olmadığı ortaya çıkmıştır. İleriki zamanlarda daha yüksek miktarda ve farklı uzunluklarda altın nanoçubuklar yüklenmiş nanokabukların sentezi, sentez parametreleri ve nanokabuk fiziksel özelliklerinin fototermal özelliğine etkilerinin belirlenmesi konusunda yeni araştırma projeleri gerçekleştirilebilir.

Nanokabuklar ile fototermal etki deneylerinde son olarak, literatürde kullanılan farklı bir yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemin tek farklılığı hücreler ile altın nanoparçacıkların inkübasyonu sonrası hücreler PBS ile yıkanmadan lazer ışığına maruz bırakılarak hücre canlılığının belirlenmesidir (Li vd., 2018). MCF-7 meme kanseri ve DU145 prostat kanseri hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen bu deneylerde (Şekil 4.77 ve 4.78), LR'nin 500 μ M konsantrasyonda uygulaması sonucunda hücre canlılığı, kontrole (+lazer) kıyasla, MCF-7 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı ancak oldukça az (yaklaşık %20'lik) bir düşüş gösterirken, DU-145 hücrelerinde %40'lık bir düşüş ile %60'a düşmüştür. LR'nin 1000 μ M dozunda ise hücre canlılığı, MCF-7 ve DU-145 hücreleri, sırasıyla, %43 ve %45'e düşmüştür. Nanokabuklar ile inkübasyon sonrası hücreler yıkanmadan yapılmış olan bu deney sonuçları, nanokabukların hücre türüne göre ancak 1000 μ M gibi çok yüksek konsantrasyonda kaydedeğer bir fototermal etkisinin olduğunu göstermiştir.

DPPC/DSPE-PEG nanokabukların biyodağılımları, öncelikle sağlıklı farelerde

incelenmiştir (Şekil 4.79). Sonuçlar, nanoçubukların biyodağılım sonuçlarından oldukça farklıdır ve nanokabukların, PEG'lenmiş nanoçubuklara göre daha uzun sirküle edebildiğini ve daha geç RES tarafından elimine edildiğini göstermiştir. Ayrıca nanokabuklar da böbrekler tarafından kolayca atılabilmektedir. Ancak, prostat tümörlü farelerde floresans etiketli ve antikör konjuge edilmiş DPPC/DSPE-PEG esaslı nanokabukların (Ab-LR) biyodağılım sonuçları, sağlıklı farelerden farklı çıkmıştır (Şekil 4.80-4.82). IVIS sonuçlarından görüleceği üzere antikör konjuge nanokabuklar, karaciğer ve böbrek dokusunda enjeksiyondan hemen sonra birikmeye başlamıştır. 24 saat sonunda karaciğerde yoğun şekilde birikmiş, tümörde de kısmi şekilde çok daha az şekilde birikim olmuştur. ICP-MS sonuçları da nanokabuk formülasyonlarının 24 saatte büyük oranda karaciğerde biriktiğini göstermiştir. Ayrıca, Ab-LR'nin, LR'ye göre tümörde birikimi hafifçe daha fazla olmuştur.

Nanokabukların prostat tümörlü farelerde biyodağılımı, fototermal terapi sonuçlarını da destekler niteliktedir. Şöyle ki; prostat tümörlü erkek farelerde Ab-LR formülasyonunun enjeksiyonu sonrası lazer uygulamasının sonucunda (Şekil 4.83 ve 4.84), tümör hacmindeki büyüme, 7 gün boyunca baskılanmıştır. PBS kontrol grubunda, lazer uygulanmış farelerde aynı süre içinde tümör hacminde %250, lazer uygulanmamış farede %300'e çıkmıştır. Bu sonuçlar; PR2'ye göre fototermal terapi etkisi daha düşük çıkmış olmakla birlikte nanokabuklardan kaynaklanan bir fototermal etkinin olduğunu göstermektedir ve bu literatür için yeni olan yapılar açısından oldukça umut vaatmektedir. Bununla birlikte; biyodistribüsyon profile dikkate alındığında nanokabukların tümörde birikimleri nanoçubuklara göre çok daha azdır. Ayrıca in vitro fototermal etki deneylerinde de nanokabukların fototermal özelliklerinin, nanoçubuklara göre daha düşük olduğu anlaşılmıştır. Dolayısıyla nanokabuklara ait in vivo fototermal terapi sonuçları elde edilmiş olan diğer deneylerin sonuçları ile uyumludur.

Ab-LR ve LR uygulanmış prostat tümörlü farelerden toplanan dokuların histolojik incelemesi, toplanan dokuların fiksasyonunda yaşanan problem nedeni ile gerçekleştirilememiştir.

Meme tümörlü farelerde nanokabuklar kullanılarak fototermal terapi uygulaması sırasında termal kamera ile alınan tümör bölgesinin görüntüleri (Şekil 4.85), Ab-LR uygulamasının, PBS ve LR'ye kıyasla, sırasıyla 11.5°C ve 4°C'lik sıcaklık artışına sebep olduğunu göstermiştir. Ölçülen değerler, nanoçubuklara kıyasla, nanokabukların tümör bölgesinin sıcaklığında daha düşük bir artışa sebep olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, fototermal terapi sırasında tümör hacminde görülen yavaş küçülme sonuçlarını da destekler niteliktedir. Projenin son döneminde meme tümörlü farelerde Ab-LR kullanılarak SERS tekniği ile in vivo görüntüleme deneylerinin yapılması planlanmış olmasına rağmen, yukarıdaki bölümlerde açıklandığı üzere meme tümörlü dişi farelerde Ab-LR ile in vivo deneyler

gerçekleştirilemediği için bu nanomalzemenin SERS görüntüleme ajanı olarak kullanılabilme potansiyeli henüz belirlenememiştir.

Sonuç olarak, proje kapsamında üretilen nanokabuk yapılarının in vitro deneyleri tamamlanmış ve in vivo deneylerinde ise sağlıklı fareler ve prostat tümörüne sahip farelerde deneyler gerçekleştirilmiştir. Hem in vitro deneylerin, hem de prostat tümör modelinde yapılan in vivo deneylerin sonuçlarına göre; nanokabukların fototermal terapi etkisi, nanoçubuklara kıyasla, daha düşüktür. Ayrıca nanokabukların biyodağılım profili dikkate alındığında nanokabukların tümörde birikimlerinin, nanoçubuklara göre, çok daha az olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla gerçekleştirilmiş olan tüm deneyler, denenen nanokabukların tedavi ajanı olarak potansiyellerinin genel olarak nanoçubuklara göre daha düşük olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak; projede hazırlanan nanokabuklar, umut vaadedici yeni ajanlar olmakla beraber, fototermal terapi etkinliği açısından yapısal iyileştirmeye ihtiyaç duymaktadırlar. Bununla birlikte, proje başvurusunda önerildiği için, proje süresi içinde, nanokabukların meme tümörlü farelerde deneylerinin yapılması yönünde girişimde bulunulmuştur. Bu amaçla Boğaziçi Üniversitesi Vivarium'dan 12 adet dişi nude fare satın alınmış ve bu farelerde standart protokol ile meme tümörü oluşturulmaya çalışılmıştır. Ancak temin edilen farelerin görece yaşlarının ileri olması nedeni ile 4 hafta beklenmesine rağmen farelerde oluşan tümörler deneylere başlamak için gerekli büyüklüğe (yaklaşık 100 mm³) ulaşamamış ve fareler deneyleri gerçekleştiremeyecek kadar yaşlanmıştır. Bu nedenle, meme tümörlü farelerde nanokabukların deneyleri yapılamamıştır. Neticede bütçe ve süre kısıtları nedeni ile eksik kalan in vivo deney seti gerçekleştirilememiştir. Özellikle, nanoçubuklara kıyasla, üretilen nanokabuk yapılarının tedavi ajanı olarak potansiyellerinin daha düşük olduğunu ve yapısal iyileştirmelerin gerekli olduğunu gösteren tüm in vitro ve in vivo deney sonuçlarını da dikkate alarak, nanokabuk kısmında eksik kalan in vivo meme tümörü modeli deneyinin, proje final raporuna dahil edilmemesi hususunda yapılmış olan talebimiz, TÜBİTAK Mühendislik Araştırma Destek Grubu'nun 13/11/2018 tarih ve 73873223/161.11.1/E.226638 sayılı yazısı ile uygun görülmüştür.

5.3 Öneriler

Proje sonuçları topluca değerlendirildiğinde aşağıdaki çalışmaların gelecekte yapılması önerilmektedir:

1. Bu proje ile ilk defa, prostat ve meme tümörlerini hedefleme potansiyeli ortaya çıkarılmış olan ve hedefleyici ajan olarak son derece umut vaadeden antiKDN antikoronun antitümör tedavi etkinliğinin in vivo deneyler ile belirlenmesi yerinde

olacaktır. Buna paralel olarak, Anti-KDN antikoru ve polimerik kemoterapötiklerin birleştirilmesi ile yeni hedefli ilaç taşıma sistemlerinin oluşturulması ve in vivo denemelerinin yapılması gelecek çalışmaların konusunu oluşturacaktır.

2. Hem tedavi hem de görüntüleme ajanı olarak oldukça umut vaadeden altın nanoçubuk yapılarının in vivo denemelerinin prostat ve meme tümör modellerinde daha çok denek ile istatistiksel analizlere elverişli şekilde gerçekleştirilmesi yerinde olacaktır. Bu in vivo çalışmalarda nanoçubukların yüzeyindeki anti-KDN antikorumlarının sayısının ve yüzey modifikasyon stratejisinin, malzemelerin tedavi ve görüntüleme performansına etkilerinin belirlenmesi ve in vivo sonuçlar ile ilişkilendirilebilmesi önemli olabilir.
3. Anti-KDN antikorumları ile işlevselleştirilmiş nanoçubukların doğrudan tümöre enjeksiyon yolu ile tedavi ve görüntüleme stratejilerinin geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapılması yerinde olacaktır. Zira, bu malzemelerin, klinikte daha kolay ve hızlı uygulanabilir yeni ajanlar olabilmesi yönünde doğrudan tümöre enjeksiyon etkili bir strateji olabilir.
4. Nanokabuk yapılarının iyileştirilmesi amacıyla daha yüksek miktarda ve farklı uzunluklarda altın nanoçubuklar yüklenmiş nanokabukların sentezi ve lipid kabuk yapısı içinde nanoçubukların daha homojen dağılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilebilir.
5. Nanokabuk sentez parametreleri ve nanokabuk fiziksel özelliklerinin fototermal özelliğine etkilerinin belirlenmesi ve kontrol edilebilmesine yönelik yeni araştırma projeleri gerçekleştirilebilir.
6. Proje çerçevesinde biyoyumlu lipidlerden üretilmiş nanokabuk yapılarının boyları 200-400 nm aralığında olup bu boy aralığının 150 nm'nin altına çekilmesi, ayrıca bu nanokabuk yapılarının kan akışındaki koloidal kararlılıklarının incelenmesi, bu yeni yapıların in vivo uygulanabilirlikleri açısından önemlidir. Buna yönelik araştırmaların gelecekte gerçekleştirilmesi yerinde olacaktır.
7. Nanokabukların meme tümör modelinde in vivo distribüsyon, tedavi ve görüntüleme etkinliklerinin belirlenmesi, bu yapıların tedavi ve görüntüleme potansiyelinin tam olarak ortaya çıkarılması için gereklidir.



KAYNAKLAR

Alkilany, A., Shatanawi, A., Kurtz, T., Caldwell, R., Caldwell, W. 2012. "Toxicity and Cellular Uptake of Gold Nanorods in Vascular Endothelium and Smooth Muscles of Isolated Rat Blood Vessel: Importance of Surface Modification", *Small*, 8(8), 1270-1278.

Alkilany, A. M., Murphy, C. J. 2010. "Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?", *Springer*, 12, 2313–2333.

Alkilany, A. M., Nagaria, P. K., Hexel, C.R., Shaw, T.J., Murphy, C. J., Wyatt, M.D. 2009. "Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects", *Small*, 5, 701–708.

Angata, T., Nakata, D., Matsuda, T., Kitajima, K. 1999. "Elevated Expression of Free Deaminoneuraminic Acid in Mammalian Cells Cultured in Mannose-Rich Media", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261 (2), 326-331.

Boswell, C. A., Tesar, D. B., Mukhyala, K., Theil, F.-P., Fielder, P. J., Khawli, L. A. 2010. "Effects of Charge on Antibody Tissue Distribution and Pharmacokinetics", *Bioconjugate Chemistry* 21, 2153–2163.

Burgmeier, J., Feizpour, A., Schade, W., Reinhard, B. M. 2015. "Plasmonic nanoshell functionalized etched fiber Bragg gratings for highly sensitive refractive index measurements", *Optics Letters*, 40(4), 546-549.

Campion, A., Kambhampati, P. 1998. "Surface-enhanced Raman scattering", *Chemical Society Reviews*, 27 (4), 241-250.

Carpin, L., Bickford, L., Agollah, G., Yu, T.-K., Schiff, R., Li, Y., Drezek, R. 2011. "Immunoconjugated gold nanoshell-mediated photothermal ablation of trastuzumab-resistant breast cancer cells", *Breast Cancer Research and Treatment*, 125 (1), 27-34.

Cecchini, M. J., Amiri, M., Dick, F. A. 2012. "Analysis of Cell Cycle Position in Mammalian Cells", *Journal of Visualized Experiments*, 59, e3491.



Charan, S., Sanjiv, K., Singh, N., Chien, F.-C., Chen, Y.-F., Nergui, N. N., Huang, S.-H., Kuo, C. W., Lee, T.-C., Chen, P. 2012. "Development of Chitosan Oligosaccharide-Modified Gold Nanorods for in Vivo Targeted Delivery and Noninvasive Imaging by NIR Irradiation", *Bioconjugate Chemistry*, 23 (11), 2173-2182.

Choi, W. I., Kim, J.-Y., Kang, C., Byeon, C. C., Kim, Y. H., Tae, G. 2011. "Tumor Regression In Vivo by Photothermal Therapy Based on Gold-Nanorod-Loaded, Functional Nanocarriers", *American Chemical Society Nano*, 5 (3): 1995-2003.

Choosakoonkriang, S., Wiethoff, C. M., Anchordoquy, T. J., Koe, G. S., Smith, J. G., Middaugh, C. R. 2001. "Infrared Spectroscopic Characterization of the Interaction of Cationic Lipids with Plasmid DNA", *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 8037-8043.

Colangelo, E., Comenge, J., Paramelle, D., Volk, M., Chen, Q., Le'vy, R. 2017. "Characterizing Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles", *Bioconjugate Chemistry*, 28, 11–22.

Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., Wyatt, M. D. 2005. "Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity", *Small*, 1 (3), 325-327.

Curado, M.P. 2011. "World incidence and mortality of breast cancer", *Artículo de revisión*, 53, 372-384.

Dickerson, E. B., Dreaden, E. C., Huang, X., El-Sayed, I. H., Chu, H., Pushpanketh, S., McDonald, J. F., El-Sayed, M. A. 2008. "Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice", *Cancer Letters*, 269 (1), 57-66.

Eghtedari, M., Liopo, A. V., Copland, J. A., Oraevsky, A. A., Motamedi, M. 2008. "Engineering of Hetero-Functional Gold Nanorods for the in vivo Molecular Targeting of Breast Cancer Cells", *Nano Letters*, 9 (1), 287-291.

Feng, L., Xuan, Z., Ma, J., Chen, J., Cui, D., Su, C., Guo, J., Zhang, Y. 2015. "Preparation of gold nanorods with different aspect ratio and the optical response to solution refractive index", *Journal of Experimental Nanoscience*, 10:4, 258-267.

Filion, M. C., Philips, N. C. 1997. "Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1329, 345–356.

Fubini, B., Fenoglio, I., Turci, F. 2011. "Effect of chemical composition and state of the surface on the toxic response to high aspect ratio nanomaterial", *Nanotoxicology: Materials & Methods*, 6(5), 899–920.

Glidden, M., Muschol, M. 2012. "Characterizing Gold Nanorods in Solution Using Depolarized Dynamic Light Scattering", *The Journal of Physical Chemistry C*, 116, 8128–8137.

Go, S., Sato, C., Yin, J., Kannagi, R., Kitajima, K. 2007. "Hypoxia-enhanced expression of free deaminoneuraminic acid in human cancer cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357 (2), 537-542.

Green, H. N., Martyshkin, D. V., Rodenburg, C. M., Rosenthal, E. L., Mirov, S. B. 2011. "Gold Nanorod Bioconjugates for Active Tumor Targeting and Photothermal Therapy", *Journal of Nanotechnology*.

Hirsch, L. R., Stafford, R., Bankson, J., Sershen, S., Rivera, B., Price, R., Hazle, J., Halas, N., West, J. 2003. "Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (23), 13549-13554.

Hong, Y., Lee, E., Choi, J., Oh, S. J., Haam, S., Huh, Y.-M., Yoon, D. S., Suh, J.-S., Yang, J. 2012. "Gold Nanorod-Mediated Photothermal Modulation for Localized Ablation of Cancer Cells", *Journal of Nanomaterials*, Article ID 825060, 7 pages.

Pilot Study of AuroLase(tm) Therapy in Refractory and/or Recurrent Tumors of the Head and Neck. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00848042>

Son erişim tarihi: 16 Kasım 2018

Huang, H.-C., Barua, S., Kay, D. B., Rege, K. 2009. "Simultaneous enhancement of photothermal stability and gene delivery efficacy of gold nanorods using polyelectrolytes", *American Chemical Society Nano*, 3(10): 2941-2952.



Huang, X., Tang, S., Liu, B., Ren, B., Zheng, N. 2011. "Enhancing the Photothermal Stability of Plasmonic Metal Nanoplates by a Core Shell Architecture", *Advanced Materials*, 23 (30), 3420-3425.

Huang, X., Tang, S., Mu, X., Dai, Y., Chen, G., Zhou, Z., Ruan, F., Yang, Z., Zheng, N. 2010. "Freestanding palladium nanosheets with plasmonic and catalytic properties", *Nature Nanotechnology*, 6 (1), 28-32.

Huang, Y.-W., Cambre, M., Lee, H.-J. 2017. "The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms", *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 2702.

Hunt, T., Nasmyth, K., Noval, B. 2011. "Introduction The Cell Cycle", *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 366, 3494–3497.

Inoue, S., Kitajima, K. 2006. "KDN (deaminated neuraminic acid): dreamful past and exciting future of the newest member of the sialic acid family", *Glycoconjugate journal*, 23 (5-6), 277-290.

Inoue, S., Kitajima, K., Inoue, Y. 1996. "Identification of 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactonononic acid (KDN, Deaminoneuraminic Acid) Residues in Mammalian Tissues and Human Lung Carcinoma Cells: CHEMICAL EVIDENCE OF THE OCCURRENCE OF KDN GLYCOCONJUGATES IN MAMMALS", *Journal of Biological Chemistry*, 271 (40), 24341-24344.

Inoue, S., Lin, S.-L., Chang, T., Wu, S.-H., Yao, C.-W., Chu, T.-Y., Troy, F. A., Inoue, Y. 1998. "Identification of free deaminated sialic acid (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid) in human red blood cells and its elevated expression in fetal cord red blood cells and ovarian cancer cells", *Journal of Biological Chemistry*, 273 (42), 27199-27204.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M. J. 2008. "Cancer statistics", *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 58(2), 71-96.

Jiang, K., Smith, D. A., Pinchuk, A. 2013. "Size-Dependent Photothermal Conversion Efficiencies of Plasmonically Heated Gold Nanoparticles", *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(51), 27073–27080.

Jiang, L., Qian, J., Cai, F., He, S. 2011. "Raman reporter-coated gold nanorods and their applications in multimodal optical imaging of cancer cells", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 2793–2800.

Jin, H., P. Yang, J. Cai, Wang, J., Liu, M. 2012. "Photothermal effects of folate-conjugated Au nanorods on HepG2 cells", *Applied microbiology and biotechnology*, 94(5), 1199-1208.

Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N., Gambhir, S. S. 2011. "Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy", *Nanomedicine*, 6(4), 715–728.

Kang, X., Guo, X., Niu, X., An, W., Li, S., Liu, Z., Yang, Y., Wang, N., Jiang, Q., Yan, C., Wang, H., Zhang, Q. 2017. "Photothermal therapeutic application of gold nanorodsporphyrin-trastuzumab complexes in HER2-positive breast cancer", *Scientific Reports*, 7, 42069.

Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R. R., Feld, M. S. 1999. "Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy", *Chemical Reviews*, 99(10), 2957-2976.

Koenig, J. L., Angood, A. C. 1970. "Raman Spectra of Poly(ethylene Glycols) in Solution. *Journal of Polymer Science*", 8, 1787-1796.

Koike, T., Kimura, N., Miyazaki, K., Yabuta, T., Kumamoto, K., Takenoshita, S., Chen, J., Kobayashi, M., Hosokawa, M., Taniguchi, A. 2004. "Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: a missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), 8132-8137.

Lee, C., Bain, C. D. 2005. "Raman spectra of planar supported lipid bilayers", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1711 (1), 59–71.

Lee, J. H., Ju, J. E., Kim, B. I., Pak, P. J., Choi, E. K., Lee, H. S., Chung, N. 2014. "Rod-shaped iron oxide nanoparticles are more toxic than sphere-shaped nanoparticles to murine macrophage cells", *Environmental Toxicology Chemistry*, 33(12). 2759-66.

Lee, S., Anderson, L. J. E., Payne, C. M., Hafner, J. H. 2011. "Structural Transition in the Surfactant Layer that Surrounds Gold Nanorods as Observed by Analytical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy", *Langmuir*, 27, 14748–14756.

Liao, H., Hafner, J. H. 2005. "Gold Nanorod Bioconjugates", *Chemistry of Materials*, 17, 4636-4641.

Libutti, S. K., Paciotti, G. F., Byrnes, A. A., Alexander, H. R., Gannon, W. E., Walker, M., Seidel, G. D., Yuldasheva, N., Tamarkin, L. 2010. "Phase I and Pharmacokinetic Studies of CYT-6091, a Novel PEGylated Colloidal Gold-rhTNF Nanomedicine", *Clinical Cancer Research*, 16(24), 6139-6149.

Liopo, A., Conjusteau, A., Tsyboulski, D., Ermolinsky, B., Kazansky, A., Oraevsky, A. 2012. "Biocompatible Gold Nanorod Conjugates for Preclinical Biomedical Research", *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, S2.

Li, X., Zhou, J., Dong, X., Cheng, W.-Y., Duan, H., Cheung, P. C. K. 2018. "In Vitro and In Vivo Photothermal Cancer Therapeutic Effects of Gold Nanorods Modified with Mushroom β -Glucan", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 4091–4098.

Lozano, N., Al-Jama, I. W. T., Taruttis, A., Beziere, N., Burton, N. C., Bossche, J. V., Mazza, M., Herzog, E., Ntziachristos, V., Kostarelos, K. 2012. "Liposome–Gold Nanorod Hybrids for High-Resolution Visualization Deep in Tissues", *Journal of the American Chemical Society*, 134, 13256–13258.

Mahmoud, N. N., Al-Qaoud, K. M., Al-Bakri, A. G., Alkilany, A. M., Khalil, E. A. 2016. "Colloidal stability of gold nanorod solution upon exposure to excised human skin: Effect of surface chemistry and protein adsorption", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 75, 223-231.

Matthews, J. R., Payne, C. M., Hafner, J. H. 2015. "Analysis of Phospholipid Bilayers on Gold Nanorods by Plasmon Resonance Sensing and Surface-Enhanced Raman Scattering", *Langmuir*, 31, 9893–9900.

Merchant, B. 1998. "Gold, the Noble Metal and the Paradoxes of its Toxicology", *Biologicals*, 26(1), 49-59.

Nadano, D., Iwasaki, M., Endo, S., Kitajima, K., Inoue, S., Inoue, Y. 1986. "A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (KDN).

Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs”, *Journal of Biological Chemistry*, 261(25), 11550-11557.

Nag, O. K., Awasthi, V. 2013. “Surface Engineering of Liposomes for Stealth Behavior”, *Pharmaceutics*, 5, 542-569.

Niidome, T., Akiyama, Y., Yamagata, M., Kawano, T., Mori, T., Niidome, Y., Katayama, Y. 2009. “Poly(ethylene glycol)-Modified Gold Nanorods as a Photothermal Nanodevice for Hyperthermia”, *Journal of Biomaterials Science*, 20, 1203-1215.

Nikoobakht, B., El-Sayed, M.A. 2003. “Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method”, *Chemistry of Materials*, 15, 1957–1962.

Orendorff, C. J., Alam, T. M., Sasaki, D. Y., Bunker, B. C., Voigt, J. A. 2009. “Phospholipid-Gold Nanorod Composites”, *American Chemical Society Nano*, 3(4), 971-983.

Oyelere, A. K., Chen, P. C., Huang, X., El-Sayed, I. H., El-Sayed, M. 2007. “Peptide-Conjugated Gold Nanorods for Nuclear Targeting”, *Bioconjugate Chemistry*, 18, 1490-1497.

Paciotti, G. F., Myer, L., Weinreich, D., Goia, D., Pavel, N., McLaughlin, R. E., Tamarkin, L. 2004. “Colloidal Gold: A Novel Nanoparticle Vector for Tumor Directed Drug Delivery”, *Drug Delivery*, 11(3), 169-183.

Paciotti, G. F., Myer, L. D., Kim, T. H., Wang, S., Alexander, H. R., Weinreich, D., Tamarkin, L. 2001. “Colloidal gold: A novel colloidal nanoparticle vector for tumor-directed drug delivery”, *Clinical Cancer Research*, 7(11), 3673S-3674S.

Pissuwan, D., Valenzuela, S. M., Cortie, M. B. 2008. “Prospects for Gold Nanorod Particles in Diagnostic and Therapeutic Applications”, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25(1), 93-112.

Pozarowski, P., Darzynkiewicz Z. 2004. “Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry”. *Checkpoint Controls and Cancer, Methods in Molecular Biology*. Editör: Schönthal, A. H. Humana Press.

Qian, X., Peng, X.-H., Ansari, D. O., Yin-Goen, Q., Chen, G. Z., Shin, D. M., Yang, L., Young, A. N., Wang, M. D., Nie, S. 2007. "In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags", *Nature Biotechnology*, 26(1), 83-90.

Root, S. W., Andrews, G.A., Kniseley, R.M. & Tyor, M.P. 1954. "The distribution and radiation effects of intravenously administered colloidal gold-198 in man", *Cancer*, 7, 856–866.

San Paulo, A., García, R. 2000. "High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes", *Biophysical Journal*, 78(3), 1599–1605.

Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., Sastry, M. 2005. "Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview", *Langmuir*, 21(23), 10644-10654.

Techane, S. D., Gamble, L. J., Castne, D. G. 2011. "X-ray photoelectron spectroscopy characterization of gold nanoparticles functionalized with amine-terminated alkanethiols", *Biointerphases*, 6(3), 98-104.

Tian, F., Bonnier, F., Casey, A., Shanahan, A. E., Byrne, H. J. 2014. "Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: effect of particle shape", *Analytical Methods*, 6, 9116–9123.

Tsai, M.-F., Chang, S.-H. G., Cheng, F.-Y., Shanmugam, V., Cheng, Y.-S., Su, C.-H., Yeh, C.-S. 2013. "Au Nanorod Design as Light-Absorber in the First and Second Biological Near-Infrared Windows for in Vivo Photothermal Therapy", *American Chemical Society Nano*, 7(6), 5330-5342.

Tomak, A. *Nanostructures for Plasmonic Biosensors*, (Yüksek Lisans Tezi), Gediz Üniversitesi, (2013).

Tomak, A., Zareie, H. M. 2015. "Gold nanorod encapsulated bubbles", *Royal Society of Chemistry Advances*, 5, 38842 .

Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., Etzler, M. E., Crocker, P. R. 2009. "I-type lectins".



Vendrell, M., Maiti, K. K., Dhaliwal, K., Chang, Y.-T. 2013. "Surface-enhanced Raman scattering in cancer detection and imaging", *Trends in biotechnology*.

Von Maltzahn, G., Park, J.-H., Agrawal, A., Bandaru, N. K., Das, S. K., Sailor, M. J., Bhatia, S. N. 2009. "Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas", *Cancer research*, 69(9), 3892-3900.

Xiaohua Huang, X., El-Sayed, I. V., Qian, W., El-Sayed, M. A. 2006. "Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods", *Journal of the American Chemical Society*, 128(6), 2115–2120.

Yamini, D., Venkatasubbu, G. D., Kumar, J., Ramakrishnan, V. 2014. "Raman scattering studies on PEG functionalized hydroxyapatite nanoparticles", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117(3), 299-303.

Ye, X., Zheng, C., Chen, J., Gao, Y., Murray, C. B. 2013. "Using Binary Surfactant Mixtures To Simultaneously Improve the Dimensional Tunability and Monodispersity in the Seeded Growth of Gold Nanorods", *Nano Letters*, 13(2), 765–771.

Yin, J., Hashimoto, A., Izawa, M., Miyazaki, K., Chen, G.-Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Furuhashi, K., Cheng, F.-L. 2006. "Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells", *Cancer research*, 66(6), 2937-2945.

Yoo, J.-H., Han, H. S., Lee, C., Yoo, K.-P., Kang, T. 2013. "Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Detection of Molecules in an Aqueous Solution via Lipid-Modified Gold Nanorods", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(11), 7239-7244(6).

Yuan, H., Fales, A. M., Vo-Dinh, T. 2012. "TAT Peptide-Functionalized Gold Nanostars: Enhanced Intracellular Delivery and Efficient NIR Photothermal Therapy Using Ultralow Irradiance", *Journal of the American Chemical Society*, 134(28), 11358-11361.

Zhang, B., Hu, R., Wang, Y., Yang, C., Liu, X., Yong, K.-T. 2014. "Revisiting the principles of preparing aqueous quantum dots for biological applications: the effects of surface ligands on



the physicochemical properties of quantum dots”, Royal Society of Chemistry Advances, 4, 13805–16.

Zhang, L., Sun, X., Song, Y., Jiang, X., Dong, S., Wang, E. 2006. “Didodecyldimethylammonium Bromide Lipid Bilayer-Protected Gold Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Self-Assembly”, Langmuir, 22, 2838-2843.

Zhang, Z., Lin M. 2014. “Fast loading of PEG–SH on CTAB-protected gold nanorods”, Royal Society of Chemistry Advances, 4, 17760.

Zhao, J., Bradbury, C. R., Fermin J. D. 2008. “Long-Range Electronic Communication between Metal Nanoparticles and Electrode Surfaces Separated by Polyelectrolyte Multilayer Films”, The Journal of Physical Chemistry C, 112, 6832-6841.

Zhu, J., Gong, T., Kopwitthaya, A., Hu, R., Law, W. C, Roy, I., Huang, H., Yong, K. T. 2013. “Synthesis of PEGylated gold nanorods (Au NRs) as absorption nanoprobe for near-infrared optical imaging”, Royal Society of Chemistry Advances, 3, 12280.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. ESMA VOLGA BULMUŞ ZAREİE
Proje No:	213M673
Proje Başlığı:	Prostat Ve Meme Kanseri Teşhis Ve Tedavisi İçin Hedefli Plazmonik Nanokabuk Ve Nanoçubukların Geliştirilmesi
Proje Türü:	1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama)
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	VOLKAN SEYRANTEPE, NEFİSE ÜLKÜ KARABAY YAVAŞOĞLU
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. KİMYA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/07/2014 - 01/07/2018
Onaylanan Bütçe:	600380.0
Harcanan Bütçe:	592673.01
Öz:	<p>Gerçekleştirilen projenin amacı, seçici olarak meme ve prostat kanseri tümörlerini hedef alıp bu hücreleri yok eden, aynı zamanda tümörün görüntülenmesine de olanak tanıyan nanoteknoloji ürünü teranostik bir sistem geliştirmek ve bu sistemin teşhis ve tedavi etkinliğini in vitro ve in vivo deneyler ile ispatlamaktır. Bu amaca yönelik olarak, biyoyumlu ve seçici antikorlar ile modifiye edilmiş altın nanoçubuk ve nanokabukların üretilmesi, bu nanotanecikler kullanılarak farelerdeki tümörlerin görüntülenmesi ve fototermal lazer terapi ile etkin bir şekilde yok edilmesi hedeflenmiştir.</p> <p>Altın nanotanecikler, eşsiz biyoyumluluk, optik ve elektronik özellikleri sayesinde teranostik sistemler olarak kullanılmaktadır. Yüzeyleri uygun ligandlar ile modifiye edilmiş altın nanotanecikler kanserli hücreleri seçici olarak hedefleyebilmekte ve plazmonik özellikleri sayesinde zararlı olmayan yakın kızılötesi (near-infrared) (NIR) lazer ışınması altında fototermal etki ile kanser hücrelerini yok edebilmektedirler. Altın nanotanecikler, aynı zamanda ?yüzey artırılmış Raman spektroskopisi? (SERS) ve ?NIR termal görüntüleme? teknikleri için mükemmel ajanlardır. Altın nanoçubuklar ve nanokabuklar, nanoküre geometrisine kıyasla, daha üstün plazmonik özellik gösterir.</p> <p>Gerçekleştirilen projede, poli(etilen glikol) (PEG) ile kaplı altın nanoçubuklar ve birden fazla nanoçubuk içeren lipid esaslı nanokabuklar sentezlenmiştir. Üretilen nanotaneciklerin yüzeylerine, meme ve prostat kanser hücrelerinin membranlarında yüksek miktarlarda bulunduğu son yıllarda belirlenen ve sialik asit ailesinin farklı bir türü olan KDN (2-keto-3-deoxy- D-glycero-D-galacto-nononic acid) reseptörünü hedefleyen seçici antikorlar (anti-KDN antikorları) konjuge edilmiştir. Üretilen hedefli nanotaneciklerin fototermal tedavi etkinlikleri öncelikle in vitro, daha sonra prostat ve meme kanser fare modellerinde in vivo deneyler ile belirlenmiştir. Nanotaneciklerin in vivo görüntüleme potansiyeli, SERS ve NIR termal görüntüleme teknikleri ile ortaya çıkarılmıştır.</p> <p>Anti-KDN antikorları ile hedeflenmiş nanotaneciklerin üretimi ve etkinliklerinin belirlenmesi, bildiğimiz kadarıyla literatürde henüz rapor edilmemiş olup gerçekleştirilen proje tamamen özgün değere sahiptir. Ayrıca, proje kapsamında literatür için yeni, birden fazla nanoçubuk taşıyan lipid nanokabuk yapılar üretilmiş ve ik defa bu yapıların fototermal etkisine yönelik bulgular elde edilmiştir. Proje çalışmaları, özellikle prostat tümörlerini ve potansiyel olarak meme tümörlerini seçici bir şekilde görüntülemeyi ve yoketmeyi sağlayacak yeni bir nanosistemin geliştirilmesi yönünde güçlü bir temel sağlamıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Altın nanotanecik, fototermal terapi, teranostik, nanoçubuk, nanokabuk, hedefleme, kanser
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır