

**SEMAFORİN 3F’NİN ALTIN NANOPARTİKÜLLERE
BAĞLANMASI, KARAKTERİZASYONU, HUVEC VE A549
HÜCRE HATLARINDA ANTİ-PROLİFERATİF ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

**ATTACHMENT OF SEMAPHORIN 3F ONTO GOLD
NANOPARTICLES, ITS CHARACTERIZATION,
INVESTIGATION OF ITS ANTI-PROLIFERATIVE EFFECT
ON HUVEC AND A549 CELL LINES**

GAMZE TAN

Prof. Dr. MEHMET ALİ ONUR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

GENEL BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2014

Gamze Tan'ın hazırladığı “**Semaforin 3F'nin Altın Nanopartiküllere Bağlanması, Karakterizasyonu, HUVEC ve A549 Hücre Hatlarında Anti-Proliferatif Etkisinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **GENEL BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN

Danışman

Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Üye

Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

Üye

Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL

Üye

Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canım Aileme...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

19/08/2014

Gamze TAN

ÖZET

SEMAFORİN 3F’NİN ALTIN NANOPARTİKÜLLERE BAĞLANMASI, KARAKTERİZASYONU, HUVEC VE A549 HÜCRE HATLARINDA ANTI-PROLİFERATİF ETKİSİNİN İNCELENMESİ

GAMZE TAN

Doktora, Genel Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. MEHMET ALİ ONUR

Eş Danışmanı: Prof. Dr. WOLFGANG J. PARAK

Ağustos 2014, 141 sayfa

Bu çalışmada anti-anjiyogenik ve anti-tümöral etkileri olan Semaforin 3F ile fonksiyonelleştirilen altın nanopartikülleri kullanarak normal hücrelere zarar vermeden tümör mikroçevresindeki anormal vasküler oluşumun durdurulması ve tümöral gelişimin baskılanması hedeflenmiştir.

İlaç taşıma sistemleri için çok sayıda materyal kullanılmasına rağmen altın nanopartiküllerin özel bir yeri vardır. Altın toksik olmayan çekirdeği, yük ve hidrofobisite gibi yüzey özelliklerinin tek katmanda ayarlanabilmesi, birçok terapötik ajan ve biyomolekölü kararlı bir şekilde bağlayıp biyouyumlu kompleks yapılar oluşturabilmesi gibi özelliklerinden dolayı son zamanlarda öne çıkan ilaç ve gen taşıyıcısıdır. Bu nedenle çalışmada Semaforin 3F’nin hücresel hedeflere yönlendirilmesinde altın nanopartiküller kullanılmıştır.

Altın nanopartikül sentezi yaklaşık 20 nm boyutunda küresel ve tekil dağılımlı partiküllerin hazırlanmasına olanak sağlayacak şekilde optimize edilmiştir. Kolloidal stabilitenin artırılması için sentezlenen altın partiküller polietilen glikol heterobifonksiyonel polimer zincirleriyle modifiye edilmiştir. Modifiye edilen

partiküllerin boyut, şekil ve yüzey özellikleri geçirimli elektron mikroskopisi, dinamik ışık saçılımı, UV-Vis spektroskopi aracılığıyla karakterize edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında temel hücre tipi olarak HUVEC kullanılmıştır. Anjiyogenez oluşumunun başlatılması için uygun VEGF miktarı ve endotel hücre proliferasyonunu inhibe eden en etkin Semaforin 3F miktarı tespit edilmiştir. Ayrıca A549 hücre hattı kullanılarak Semaforin 3F'nin anti-tümöral etkisi gösterilmiştir. PEG modifiyeli altın nanopartiküller kovalent olarak Semaforin 3F ve Bovin Serum Albumin ile fonksiyonelleştirilip, TAMRA floresan boyayla etiketlenmiştir. Biokonjugasyonun başarıyla gerçekleştirildiği geçirimli elektron mikroskobu, dinamik ışık saçılımı, agaroz jel elektroforezi, UV-Vis ve floresans spektroskopi gibi teknikler kullanılarak doğrulanmıştır. Biyokonjugatların hücre içerisine alımı incelendiğinde reseptör ligand etkileşimi sonucunda biyokonjugatların başarılı bir şekilde hücre içerisinde lokalize olduğu görülmüştür. Hazırlanan biyokonjugatların ve Semaforin 3F'nin VEGF uyarımlı endotel hücre proliferasyonu üzerine etkileri MTT yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Semaforin 3F ile fonksiyonelleştirilen altın nanopartiküller sadece Semaforin 3F ile karşılaştırıldığında endotel hücre proliferasyonunu daha etkin bir şekilde azaltmıştır. PEG ile modifiye edilen altın nanopartiküller ve biyokonjugatlar önemli bir toksik etkiye yol açmamıştır.

Bu sonuçlar, VEGF blokajının yanında anti-tümöral etkisi olan Semaforin 3F'nin altın nanopartiküllerle taşınması halinde oluşturacağı terapötik etkinin geliştirilebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Altın Nanopartikül, Semaforin 3F, Biyokonjugasyon, Anjiyogenez, HUVEC, Hücresel Alım, Sitotoksikite, Yüzey modifikasyonu.

ABSTRACT

ATTACHMENT OF SEMAPHORIN 3F ONTO GOLD NANOPARTICLES ITS CHARACTERIZATION, INVESTIGATION OF ITS ANTI-PROLIFERATIVE EFFECT ON HUVEC AND A549 CELL LINES

GAMZE TAN

PhD, Department of General Biology

Supervisor: Prof. Dr. MEHMET ALİ ONUR

Co-supervisor: Prof. Dr. Wolfgang J. PARAK

August 2014, 141 pages

In this study, it is aimed to inhibit abnormal vascularization around tumor microenvironment and to suppress tumor growth using gold nanoparticles functionalized with anti-angiogenic and anti-tumoral Semaphorin 3F without damaging the normal cells.

While many materials are widely used for drug delivery systems, gold nanoparticles have a special place. Gold has recently become prominent as a drug and gene carrier due to its non-toxic core, its ability to form bio-compatible complex structures by binding various therapeutic agents and biomolecules in a stable way and since its surface features such as charge and hydrophobicity can be adjusted in monolayer. Thus, in this study, gold nanoparticles were used for directing the Semaphorin 3F molecules to cellular targets.

The synthesis process of gold nanoparticles was optimized to enable the preparation of 20 nm sized spherical and monodisperse particles. Gold nanoparticles were modified with polyethylene glycol heterobifunctional polymer chains to enhance colloidal stability. Modified particles then characterized in respect of size, shape and surface properties by Transmission Electron Microscopy, Dynamic Light Scattering

and UV-Vis Spectroscopy. HUVEC was used as the primary cell type in cell culture studies. It is determined the optimum amount of VEGF for the initiation of angiogenesis formation, and the amount of the most effectively Semaphorin 3F, which inhibit the endothelial cell proliferation. Also anti-tumoral effect of Sema 3F was also observed on A549 cell line. Polyethylene glycol-modified gold nanoparticles were covalently functionalized with Semaphorin 3F and Bovine Serum Albumin and then labeled with TAMRA florescent dye. The accomplishment of bioconjugation process was confirmed by multifaceted techniques including transmission electron microscopy, dynamic light scattering and UV-Vis and fluorescence spectroscopy and agarose gel electrophoresis. Cellular uptakes of bioconjugates were examined and they had been shown to be successfully localized in the cell as a result of receptor-ligand interaction. The effects of bioconjugates on VEGF-induced endothelial cell proliferation were evaluated comparatively by means of MTT method. Gold nanoparticles functionalized with Semaphorin 3F were observed to reduce endothelial cell proliferation more effectively compared to Semaphorin 3F only. PEG modified gold nanoparticles and bioconjugates did not cause any significant cytotoxicity.

This results shows therapeutic effect of Semaphorin 3F, which has anti-tumoral effect addition to its capable of VEGF blockage, can be improved in case of carrying it by Gold Nanoparticles.

Keywords: Gold Nanoparticle, Semaphorin 3F, Bioconjugation, Angiogenesis, HUVEC, Cellular uptake, Cytotoxicity, Surface modification.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın ortaya çıkmasında katkılarını esirgemeyen, her zaman aydınlatıcı ve yol gösterici olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. M. Ali ONUR'a,

Tez çalışmamda laboratuvarlarını bana açarak çalışmalarımı ve beni destekleyen, engin bilgisi, disiplinli çalışması ve yol göstericiliğiyle her zaman örnek alacağım, eş danışmanım sayın Prof. Dr. Wolfgang J. PARAK'a,

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve yol gösteren sayın Prof. Dr. Necdet SAĞLAM'a,

Çalışmalarımda bilimsel görüş ve önerilerini benimle paylaşan sayın Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL'e,

Almanya'da desteklerini esirgemeyen, bilimsel çalışmaların yanında arkadaşlıklarıyla da tüm Biophotonik grubu üyelerine,

Yurt dışı doktora sırası araştırma burs programı ile büyük deneyimler edinmemi sağlayan ve çalışmalarımı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK),

Öğrenim sürem boyunca katıldığım tüm etkinlikleri destekleyen H.Ü ÖYP Koordinatörlüğü'ne,

Her zaman yanımda olan ve beni destekleyen, bugüne kadar vermiş oldukları emek ve tükenmeyen sevgilerinden dolayı sevgili ANNEM'e ve BABAM'a

sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER	xii
ŞEKİLLER	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Vaskülogenez ve Anjiyogenez	6
2.1.1. Tümör Anjiyogenezi	7
2.1.2. Anti-Anjiyogenik Tedavi Yaklaşımı	10
2.2. VEGF ve Reseptörleri	11
2.3. Semaforin Protein Ailesi ve Reseptörleri	16
2.4. Semaforin 3F	18
2.5. Semaforin 3F, Pleksin ve Nöropilin'nin Anjiyogenez ve Tümöral gelişim üzerindeki Rollerini	20
2.6. Nanoteknoloji ve Nanotıp	22
2.7. Metal Nanopartiküller	24
2.8. Altın Nanopartiküller ve Biyolojik Uygulamaları	25
2.8.1. Tarihsel Perspektif	26
2.8.2. Neden Altın Nanopartiküller	28
2.8.3. AuNP Sentezi	33
2.8.4. AuNP'lerin Yüzey Modifikasyonu	40
2.8.4.1. Koloidal Stabilitenin Korunması	41
2.8.4.2. Fonksiyonelleştirme	43
2.8.4.2.1. Adsorbsiyon	43
2.8.4.2.2. Kovalent Bağlanma	44
2.8.5. Biyotıp Uygulama Alanları	46
2.8.5.1. Kanser Tedavisi	46
2.8.5.2. Görüntüleme ve Algılama Uygulamaları	47
2.8.5.3. İlaç Taşıma Uygulamaları	49
3. MATERYAL VE METOD	51
3.1. AuNP'lerin Sentezlenmesi ve PEG ile modifiye edilmesi	51
3.1.1. AuNP'lerin Sentezlenmesi	51

3.1.2. AuNP'lerin PEG ile stabilizasyonu	52
3.2. AuNP@PEG'lerin BSA ve Sema 3F ile Biyofonksiyonelleştirilmesi ve TAMRA ile İşaretlenmesi	53
3.3. AuNP'ler ve Biyokonjugatların Karakterizasyonu	54
3.4. AuNP'lerin Stabilitesi.....	55
3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	56
3.5.1. Endotel Hücrelerinin Pasajlanması	56
3.5.2. A549 Hücrelerinin Pasajlanması.....	56
3.6. AuNP@PEG ve Biyokonjugatların Sitotoksitesinin Gözlemlenmesi	56
3.7. VEGF ₁₆₅ ile Uyarılmış Endotel Hücre Modelinde Sema 3F ve Biyokonjugatların Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	57
3.8. İstatistiksel Analizler	59
3.9. Hücresel Alımın Değerlendirilmesi	60
3.10. SDS-PAGE Jel Elektroforezi	61
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	65
4.1. AuNPs ve AuNPs@PEG Karakterizasyonu	65
4.2. AuNP'lerin Proteinler ile Fonksiyonelleştirilmesi	73
4.2.1. AuNP'lerin BSA ile Fonksiyonelleştirilmesi ve Karakterizasyonu	73
4.2.2. AuNP'lerin Sema 3F ile Fonksiyonelleştirilmesi ve Karakterizasyonu.....	78
4.3. AuNP'lerin Stabilitesi.....	89
4.4. AuNP'lerin Sitotoksitesisi	92
4.5. Hücre Kültürü	95
4.5.1. Hücresel Alımın Değerlendirilmesi.....	95
4.5.2. Hücre Proliferasyonu	100
4.5.2.1. Uygun Anjiyogenez Modelinin Oluşturulması	100
4.5.2.2. Sema 3F'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	103
4.5.2.3. Click-EdU ile Sema 3F'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	107
4.5.2.4. Sema 3F ile konjuge edilen AuNP'lerin etkisinin değerlendirilmesi	111
4.5.2.5. Fonksiyonelleştirilmiş AuNP'lerin sitotoksitesinin değerlendirilmesi.....	114
4.6. SDS-PAGE Jel Elektroforezi	117
4.7. Çalışmanın Önemi	118
5. SONUÇLAR	119
KAYNAKLAR	121
EKLER.....	142
ÖZGEÇMİŞ	145

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Ayırıcı Jel içeriği.....	61
Çizelge 3.2. Yoğunlaştırıcı Jel içeriği.....	62
Çizelge 3.3. Yükleme solüsyon içeriği	62
Çizelge 3.4. Elektrot solüsyonu içeriği	63
Çizelge 3.5. Gümüş boyama yöntemi işlem basamakları	63
Çizelge 4.1. AuNP@PEG'lerin DLS sonuçları	68
Çizelge 4.2. BSA ile fonksiyonelleştirilen AuNP'lerin ζ -potansiyeli sonuçları	75
Çizelge 4.3. BSA ve Sema 3F fonksiyonelleştirilen AuNP'lerin UV-Vis sonuçları	79
Çizelge 4.4. AuNP'lerin fizikokimyasal özelliklerinin özeti.....	85
Çizelge 4.5. AuNP@PEG stabilite sonucu	89

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Yıllara göre kanser insidans ve mortalite tahmini.....	4
Şekil 2.2. Dünya kanser istatistiklerinde Türkiye'nin yeri	4
Şekil 2.3. Dünyada en yaygın görülen kanser tipleri için insidans ve mortalite değerleri.....	5
Şekil 2.4. Anjiyogenezi tetikleyen ve önleyen faktörler	8
Şekil 2.5. Tümöral anjiyogenez süreci	8
Şekil 2.6. İnsan VEGF-A proteininin gen yapısı.....	13
Şekil 2.7. VEGF sinyalizasyon kompleksleri	15
Şekil 2.8. Semaforin ailesi üyeleri ve yapıları	16
Şekil 2.9. Semaforin reseptörleri olan Nöropilin ile Pleksinin sınıfları ve yapıları	17
Şekil 2.10. VEGF ve sınıf 3 Semaforin rekabeti.....	19
Şekil 2.11. Farklı Semaforin üyelerinin kanser gelişimi üzerine etkisi	21
Şekil 2.12. Sema 3F'nin tümör inhibisyonundaki rolüne ilişkin teorik model	22
Şekil 2.13. Metalik nanopartiküller ve kullanım alanları	24
Şekil 2.14. Lycurgus'un kadehi	26
Şekil 2.15. AuNP'lerin artan partikül boyutu ve uzunluk oranı özelliklerine verdiği kolorimetrik yanıtın TEM görüntüleriyle ilişkili olarak verilmesi	28
Şekil 2.16. Metalleri çevreleyen elektron bulutunun gelen ışığın atomik çekirdek tarafından absorbe edilmesini engellemesi.....	29
Şekil 2.17. Altın nanoçubuktaki foto fiziksel işlemler.....	30
Şekil 2.18. AuNP'nin çok çeşitli moleküler yapılarla konjugasyonu	31
Şekil 2.19. AuNP'nin taşıdığı terapötik ajanları; düşük pH, glutasyon (GSH) ya da ışıkla uyarılarak serbest bırakması	32
Şekil 2.20. Sitrat stabiliteli AuNP'lerin sulu çözeltilerde sentezi	34
Şekil 2.21. Faz transfer yöntemi ile altın nanopartikül sentezi	35
Şekil 2.22. Au plakanın lazer darbeleriyle aşındırılması yoluyla partikül sentezi	36
Şekil 2.23. Her bir büyüme aşamasından sonra boyutu giderek artan AuNP'lerin TEM görüntüsü.....	40
Şekil 2.24. Sterik stabilizasyon mekanizması	42
Şekil 2.25. Karboksil ve amin uçlu AuNP'lerin sırasıyla EDC ve tiyol aracılı olarak biyomoleküllere bağlanması	45
Şekil 3.1. Tohum büyütme yöntemi aşamaları.....	51
Şekil 3.2. AuNP sentez şeması	52
Şekil 3.3. PEGlenmiş AuNP'lerin ultrafiltrasyon yöntemiyle yıkanması	53

Şekil 3.4. AuNP'lerin BSA ve Sema 3F ile fonksiyonelleştirilmesi	53
Şekil 3.5. Biyokonjugatların hücre içine alımı	60
Şekil 3.6. Mini-Protean döküm standı ve çerçevelerin montajı	61
Şekil 3.7. SDS-Page jel elektroforezi ve boyama	64
Şekil 4.1. Kolloidal AuNP'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları.....	65
Şekil 4.2. AuNP@sitrat'ın yoğunluk, hacim ve sayı olarak DLS sonuçları	66
Şekil 4.3. AuNPs@PEG'in yoğunluk, hacim ve sayı olarak DLS sonuçları.....	67
Şekil 4.4. AuNPs@sitrat ve AuNP@PEG Zeta potansiyeli	68
Şekil 4.5. AuNPs@sitrat'ın TEM görüntüsü	70
Şekil 4.6. AuNP@sitrat'ın TEM görüntüleri ve boyut dağılımı	71
Şekil 4.7. AuNP@PEG'lerin TEM görüntüleri ve boyut dağılımı	72
Şekil 4.8. Kolloidal AuNP biyokonjugatlarının UV-Vis absorpsiyon spektrumu	73
Şekil 4.9. AuNP@PEG-T, AuNPs@PEG-T&BSA ve AuNPs@PEG-T&BSA*'nın ζ-potansiyeli.....	75
Şekil 4.10. PEG ile modifiye edilen AuNP'ler ve BSA ile biofonksiyonelleştirilen AuNP'lerin jel görüntüsü	76
Şekil 4.11. Biyokonjugatların floresans spektrumları	77
Şekil 4.12. Kolloidal AuNP'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumu.....	78
Şekil 4.13. AuNP@PEG-T&BSA'nın TEM görüntüleri ve boyut dağılımı	80
Şekil 4.14. AuNPs@PEG-T&Sema 3F'nin TEM görüntüleri ve boyut dağılımı	81
Şekil 4.15. AuNPs@PEG-T sayıca boyut dağılımı ve ζ-potansiyeli	82
Şekil 4.16. AuNPs@PEG-T&BSA'nın sayıca boyut dağılımı ve ζ-potansiyeli.....	83
Şekil 4.17. AuNPs@PEG-T&Sema 3F sayıca boyut dağılımı ve ζ-potansiyeli	83
Şekil 4.18. AuNPs, AuNPs@PEG ve biyokonjugatların boyut dağılımı ve ζ-potansiyeli sonuçları	86
Şekil 4.19. PEG ile modifiye edilen AuNP'ler ve biyokonjugatların jel görüntüsü.....	86
Şekil 4.20. Kolloidal AuNP'lerin floresans spektrumları	87
Şekil 4.21. AuNPs@PEG.....	89
Şekil 4.22. AuNPs@PEG serumlu besiyeri içerisinde	89
Şekil 4.23. AuNPs@PEG serumsuz besiyeri içerisinde.....	90
Şekil 4.24. A549 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda AuNPs@PEG uygulanmasını takiben 1. günün sonunda elde edilen sitotoksosite değerleri.....	92
Şekil 4.25. HUVEC hücrelerine farklı konsantrasyonlarda AuNPs@PEG uygulanması takiben 1., 2. ve 3. günün sonunda elde edilen sitotoksosite değerleri	93
Şekil 4.26. AuNPs@PEG-T konjugatlarının A549 hücreleri ile etkileşiminden 24 saat sonraki hücresel alım görüntüsü.....	95

Şekil 4.27. AuNPs@PEG-T&BSA konjugatlarının HUVEC ile etkileşiminden 24 saat sonraki hücresel alım görüntüsü.....	95
Şekil 4.28. AuNPs@PEG-T&Sema 3F konjugatlarının HUVEC ile etkileşiminden 24 saat sonraki hücresel alım görüntüsü	96
Şekil 4.29. AuNPs@PEG-T&Sema 3F konjugatlarının HUVEC ile etkileşiminden 24 saat sonraki hücresel alım görüntüsü-2	96
Şekil 4.30. AuNPs@PEG-T&Sema 3F konjugatlarının HUVEC ile etkileşiminden 24 saat sonraki hücresel alım görüntüsü-3	97
Şekil 4.31. Fonksiyonelleştirilen AuNP'lerin hücresel alımının karşılaştırılması.....	97
Şekil 4.32. AuNP'ler aracılığıyla hücre içi taşıma	99
Şekil 4.33. VEGF ₁₆₅ konsantrasyonuna bağlı endotel hücre (HUVEC) proliferasyon grafiği.....	100
Şekil 4.34. VEGF ₁₆₅ 'in (0-16 ng/mL) endotel hücre (HUVEC) proliferasyonu üzerindeki etkisinin zamana bağlı grafiği.	101
Şekil 4.35. Sema 3F'nin (0-240 ng/mL) A549 hücreleri üzerindeki etkisi.....	103
Şekil 4.36. VEGF uyarımı sonrası uygulanan Sema 3F'nin (0,1-240 ng/mL) endotel hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi.....	104
Şekil 4.37. EdU testi	108
Şekil 4.38. EdU yöntemi sonucunda görüntülenen hücrelerin fotoğrafı	109
Şekil 4.39. HUVEC üzerinde gerçekleştirilen EdU yöntemi sonuçları	109
Şekil 4.40. A549 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen EdU yöntemi sonuçları	110
Şekil 4.41. Biyofonksiyonelleştirilmiş nanopartiküllerin endotel hücre (HUVEC) proliferasyonu üzerindeki etkisi.....	111
Şekil 4.42. Biyokonjugatların endotel hücre (HUVEC) canlılığı üzerindeki etkisinin grafiği.....	114
Şekil 4.43. BSA ve Sema 3F'nin SDS-PAGE jel görüntüsü	117

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	alfa
β	beta
μ	mikro
λ	absorbans
nm	nanometre
ng	nanogram
nM	nanomolar
gr	gram
mL	mililitre
kDa	kilodalton
ζ	zeta

Kısaltmalar

AuNP(s)	Altın Nanopartiküller
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotel Büyüme Faktörü)
HIF	Hypoxia-Inducible Factor (Hipoksi ile İndüklenen Faktör)
NO	Nitrik Oksit
PIGF	Placental Growth Factor (Plasental Büyüme Faktörü)
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor (Temel Fibroblast Büyüme Faktörü)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alfa (Tümör nekroz faktör alfa)
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
TGF- α	Transforming Growth Factor alfa (Dönüştürücü Büyüme Faktörü alfa)
TGF- β	Transforming Growth Factor beta (Dönüştürücü Büyüme Faktörü beta)
MMP	Matrix Metalloproteinase (Matriks Metalloproteinaz)

PDGF	Platelet-derived Growth Factor (Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü)
CTGF	Connective tissue growth factor (Bağ Dokusu Büyüme Faktörü)
HGF	Hepatocyte growth factor (Hepatosit Büyüme Faktörü)
COX-2	Cyclo-Oxygenase 2 (Siklo-oksijenaz 2)
CA-9	Carbonic Anhydrase 9 (Karbonik Anhidraz)
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
TEM	Geçirimli Eelektron Mikroskobu
DFM	Karanlık Alan Mikroskobu
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NP	Nanopartikül

1. GİRİŞ

Yeni damarların oluşumu olarak adlandırılan anjiyogenez tümör büyümesinde anahtar bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar anjiyogenez olmadan tümöral hücre topluluklarının oksijen ve gerekli besinlerin yetersizliği sebebiyle en fazla 2-3 mm çapa veya 0,5 mm³ hacme kadar büyüyebildiğini göstermiştir [1, 2].

Tümöral bir oluşumdan salgılanan anjiyogenez uyarıcı sitokinler çevre endotel hücrelerini uyararak damar oluşumunu başlatır. Anjiyogenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı ise Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörüdür (VEGF) [3]. Günümüzde anti-anjiyogenik tedavilerin esasını da VEGF inhibisyonu oluşturmaktadır. VEGF blokajına dayalı olarak geliştirilen tedavi yöntemleriyle primer tümör hücrelerindeki damar oluşumu inhibe edilip tümöral dokunun sınırlanması sağlanırken genellikle mevcut tümörlü dokuya müdahale edilememektedir.

Nanoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak tasarlanan nanopartikül (NP) esaslı ilaç taşıma sistemleri sayesinde kanser terapötiklerinin katı tümörlere hedeflenmesi, retiküloendotelyal sistem (RES) yoluyla fagositotik atılımlardan kaçış yeteneği artırılarak terapötik etkisinin artması sağlanmaktadır [4-6] . Teorik koşullar altında bu tür taşıma sistemleri genellikle tümör çevresindeki kan damarlarından içeri sızarak pasif hedefleme yoluyla tümör mikroçevresinde birikir [7, 8]. Bunun yanında nanoterapötikler tümör hedefleme liganlarını içerecek şekilde fonksiyonelleştirilerek, aktif hedefleme yoluyla tümör hücrelerine bağlanıp, NP'leri katı tümör içerisine aktif bir şekilde sabitleyebilir. Hedefli partikül taşıyıcı sistemlerin kanser ilaçlarını sadece tümöral bölge içerisine bırakması anti-kanser ajanların sağlıklı organlarda birikmesini de azaltır. Sonuç olarak, bu taşıyıcı sistemler kanser tedavilerinin güvenilirliğini ve bağlı etkisini artırıp böylece terapötik indeksinin artmasına hizmet eder. Bu açıdan bakıldığında, kanser tedavisinde konvansiyonel tedavilere göre nanoteknolojik yaklaşımlar üstünlük göstermektedir.

Son zamanlarda kanser biyolojisinde yaşanan gelişmeler ve yapılan araştırmalar Semaforin (Sema) ailesinden özellikle sınıf 3 Semaforinlerin (Sema 3) VEGF uyarımlı anjiyogenez ve tümör büyümesinin kontrolünde rol oynadığını göstermiştir [9]. Sema'lar ile etkileştirilen hücrelerde hücre-substrat adezyonunun inhibisyonu ve

hücre göçü kadar apoptoz uyarımı gibi çok çeşitli etkiler gözlenmiştir [10]. Sema 3'ler arasında özellikle Sema 3F'nin akciğer kanserinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Yapılan ilk ekspresyon çalışmalarında Sema 3F mRNA seviyesi kanser hücre hatlarının çoğunda azalmıştır. Hasta örneklerinde Sema 3F seviyesi sıklıkla azalmış, hücre içi lokalizasyonu plazma membranından sitoplazmaya kaymıştır [11]. Ayrıca, *in vivo* akciğer kanser modelinde, Sema 3F'nin integrin ve MAPK sinyalleşme aktivasyonunu bozucu etkileri sayesinde anti-tümöral etkilerinin olduğu anlaşılmıştır [12].

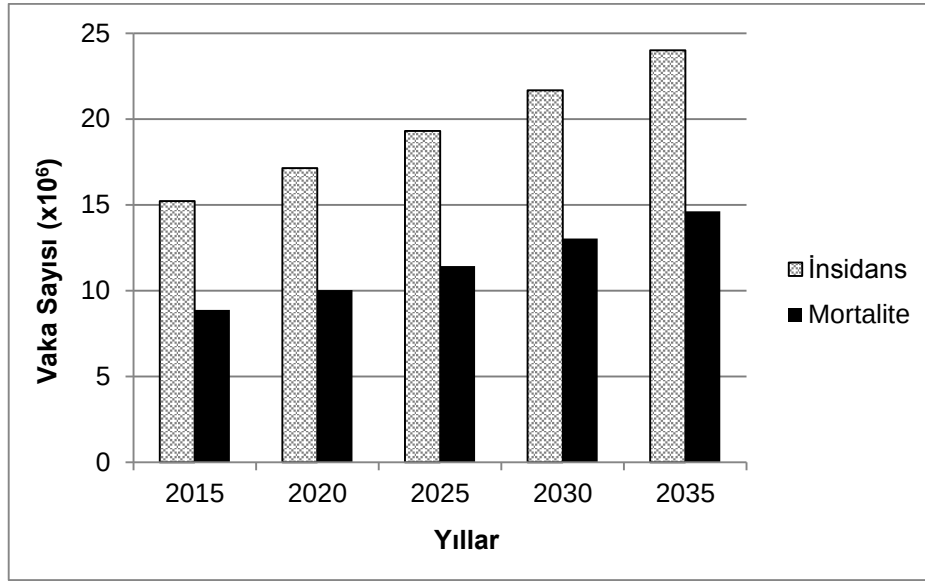
Sema 3F'nin anjiyogeneizde önemli bir rol oynayan nöropilinlere (NRP1 ve NRP2) bağlanırken VEGF ile rekabet ettiği düşünülmektedir. Bu nedenle Sema 3F reseptörleri olan NRP-Pleksin (PLXN) ile kompleks oluşturduğunda diğer moleküler yolları da çalıştırarak VEGF₁₆₅'in reseptörüne bağlanmasını engelleyebilir ve bu şekilde endotel hücre proliferasyonunu azaltabilir [13].

Bu çalışmada, anjiyogenezin engellenmesi için taşıyıcı olarak seçilen AuNP'lerin Sema 3F ile fonksiyonelleştirilmesi sonucunda VEGF aktivitesinin engellenmesine dayalı bir yaklaşım benimsenmiştir. Literatürde hem Sema 3F hem de AuNP'ler ile kanser üzerine çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen AuNP'ler ile fonksiyonelleştirilen Sema 3F'nin anjiyogenezi daha etkin bir şekilde engellenmesi mevcut çalışmanın özgün yanını oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

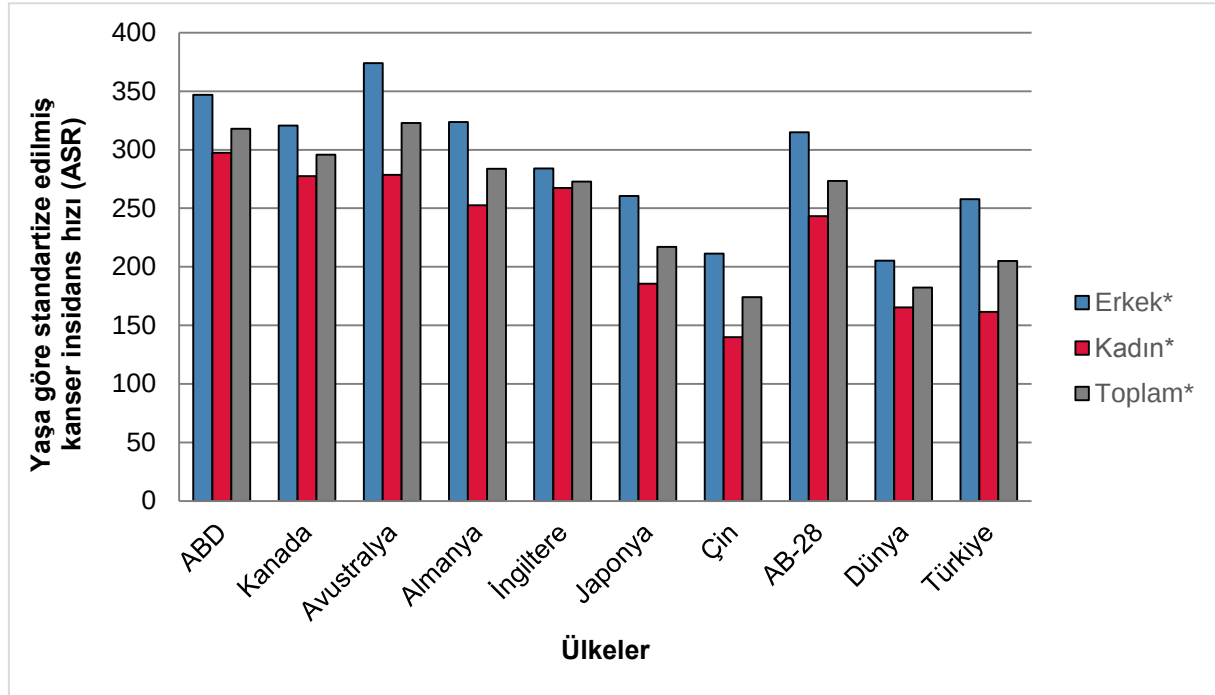
Günümüzde ciddi hastalıkların başında gelen kanser ABD Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) kanser terimleri sözlüğüne göre, normal olmayan hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesi ve çevre dokuları istila etmesiyle oluşan hastalıklar için kullanılan bir terim olup, hücresel ve çevresel kontrolden kaçan genetik ve epigenetik değişikliklerin ilerleyici birikimi sonucunda ortaya çıkan karmaşık bir hastalıktır [14]. Malign tümör ya da neoplazm olarak da ifade edilen kanserin en önemli özelliği abnormal hücrelerin olağan sınırların ötesinde büyümesi ve hızlı çoğalması sonucunda metastaza uğramasıdır. Kanser hücrelerinin bulunduğu yerden vücudun diğer doku ve organlarına doğru yayılması anlamına gelen metastaz, kansere bağlı ölümlerin temel nedenidir.

GLOBOCAN, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) desteği ile Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (IARC) tarafından 184 ülkede ulusal çerçevede temel kanser tiplerinin insidans, mortalite, prevalans değerlerine ilişkin istatistiki bilgiler ve tahminler elde etmek amacıyla yürütülen bir araştırma projesidir. GLOBOCAN verilerine göre 2012 yılında dünya genelinde deri dışında kalan toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Kanser artış hızının devam etmesi durumunda, dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya da bağlı olarak 2035 yılında toplam 24 milyon yeni kanser vakası ve bu vakalara bağlı ölüm sayısının 14,6 milyon olacağı tahmin edilmektedir (Şekil 2.1). IARC tarafından yayınlanan küresel kanser istatistiklerine göre 1975 yılında 5,9 milyon [15], 2002 yılında 10,9 milyon [16], 2008 yılında 12,7 milyon [17] ve 2012 yılında 14,1 milyon yeni kanser vakası görülmüştür. Yıllara göre vaka sayısındaki artış dikkate alındığında artan insidans eğilimiyle 2035 yılı için yapılan kanser tahminlerinin önceki yıllarda yapılanlar ile paralellik gösterdiği görülmektedir.



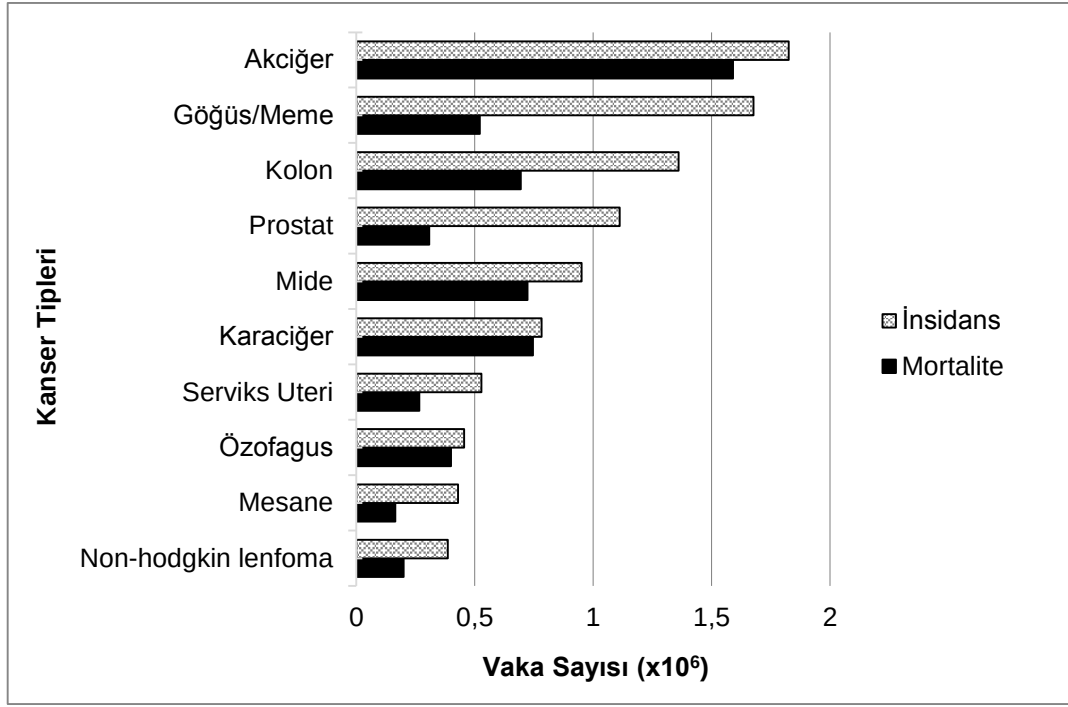
Şekil 2.1. Yıllara göre kanser insidans ve mortalite tahmini (GLOBOCAN 2012)

GLOBOCAN 2012 dünya kanser istatistiğine göre deri dışında kalan kanser türleri yaşa göre standardize edilmiş insidans hızları açısından değerlendirildiğinde Türkiye diğer gelişmiş ülkelerden daha iyi durumda olsa da halen Dünya ortalamasının üstünde bir kanser yayılım hızına sahiptir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Dünya kanser istatistiğinde Türkiye'nin yeri (GLOBOCAN 2012). *Deri dışında kalan kanserlerin yaşa göre standardize insidans hızları (100.000 kişide)

Her iki cinse göre farklılık göstermekle birlikte genel olarak Dünya’da en sık görülen kanser tipleri Şekil 2.3 ‘te gösterilmektedir. GLOBOCAN 2012 yılı verilerine göre, erkeklerde en sık görülen 5 kanser tipi sırasıyla akciğer, prostat, kolon, mide ve karaciğer iken kadınlarda meme, kolon, akciğer, serviks uteri ve mide en sık görülen kanser tipleridir.



Şekil 2.3. Dünyada en yaygın görülen kanser tipleri için insidans ve mortalite değerleri (GLOBOCAN, 2012)

Akciğer kanseri deri hariç tüm kanser vakalarının %13’ünü ve kansere bağlı ölümlerin %19,4’ünü oluşturmaktadır. Her yıl dünya genelinde yaklaşık 1.8 milyon akciğer kanseri vakasından 1.6 milyonunun ölümle sonuçlanmasında akciğer kanserinin ciddi bir hastalık ve en ölümcül kanser tipi olduğunu göstermektedir. Kısacası, hastalık yükü, öldürücülüğü ve insidans artış eğilimi ile “Akciğer Kanseri” önemli bir sağlık problemidir.

Anjiyogenez, solid tümörlerin büyüme ve yayılmasında önemli bir adımdır ve kansere bağlı ölümlerin %85’inden fazlasının nedenidir [18]. Son yıllardaki çalışmalar anti-anjiyogenik tedavinin tümör kaynaklı oluşan damarları azaltıp, geride kalan vasküler yapıları ve tümör mikroçevresinin işlevlerini normalize edebildiğini

göstermiştir. Aslında anti-anjiyogenik tedaviler, 40 yıl önce kanser tedavisi için yeni bir hedef olarak önerilmiştir. 1971'de Judah Folkman tarafından ileri sürülen orjinal hipotezden bu yana anjiyogeneze aracılık eden faktörler, bu faktörlerin hücrel hedefleri ve sinyalleşme yolları, sitokin ve reseptör inhibitörlerinin çoğu tespit edilmiştir [19]. Son yıllarda büyük ölçüde ilerleyen nanoteknoloji sayesinde anti-anjiyogenik tedavi, kanser için daha da umut verici bir yaklaşım haline gelmiştir [20]. Görüntüleme, algılama, ilaç taşıma ve hedefleme gibi biyomedikal uygulama alanlarında kullanılacak gelişmiş ve multi-fonksiyonel NP'lerin tasarım ve üretim çalışmaları halen sürmekte ve bu alandaki gelişmeler anti-anjiyogenik tedavilerin etkinliğinin artırılması için yeni fırsatlar sunmaktadır. Bununla birlikte, kanser tedavileri için terapötik özellikli hibrit NP'lerin geliştirilmesindeki en büyük zorluklardan birisi de kanser hücrelerince hücrel alıma olanak tanıyacak ligandların keşfedilmesidir [21].

2.1. Vaskülogenez ve Anjiyogenez

Normal bir dokunun fonksiyonlarını sürdürebilmesi, kan damarlarından yeterli düzeyde oksijen ve besin temin edebilmesine bağlıdır. Kan ve lenfatik vasküler sistem, akışkanların ve çeşitli sinyal moleküllerinin sirkülasyonunu sağlayarak, her organa ve dokuya nüfuz edip, hücrelere oksijen ve besin sağlar [22]. Vasküler sistem aynı zamanda uzak organ ve dokular arasında temel iletişim sistemi olarak da görev yapar.

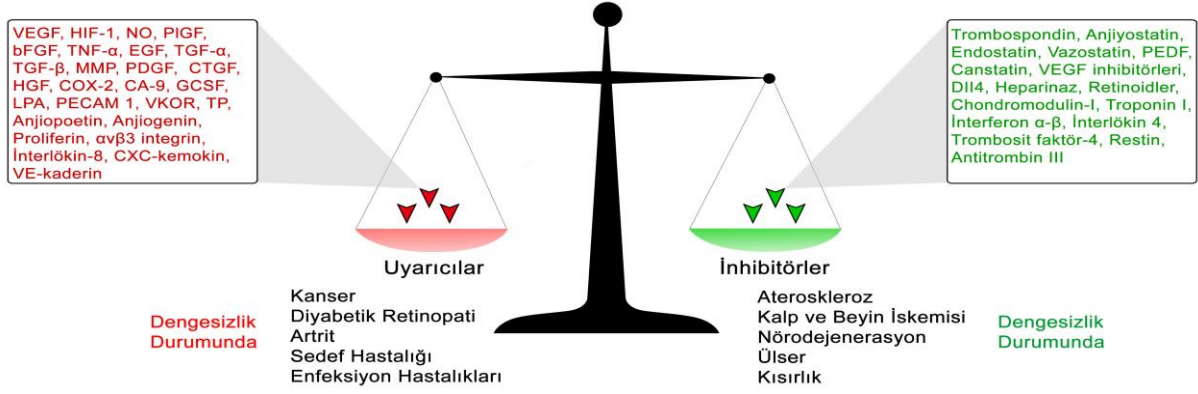
Gelişim süreci boyunca kan damarları temel olarak iki yolla oluşmaktadır; vaskülogenez ve anjiyogenez. Gelişimin erken safhasında (fare embriyo modelinde yaklaşık 7.gün) ekstraembriyonik endoderme bitişik mezoderimde Yolk kesesi üzerinde mezankimal hücrelerin merkezde toplanmasıyla kan adacıkları oluşur [23]. Pluripotent embriyonik öncü hücrelerden köken alan hemanjiyoblast hücreleri, kan adacıklarında hematopoetik hücrelere ve anjiyoblastlara farklılaşır. Vaskülogenezde, vasküler öncü hücreler olan anjiyoblastlar vaskülarizasyon bölgelerine göç ederek endotel hücrelere farklılaşır. Endotel hücreler çoğalıp birleşerek öncül damar yapıları olan primer kapiller pleksusu oluşturur. Kapiller pleksustan yeni damar yapıları filizlenir ve dallanır [24, 25]. Anjiyogenez ise mural hücrelerdeki filizlenmeler ve bu filizlenmelerin stabilizasyonu ile ilgilidir. Anjiyogenezde kollateral gelişim, arteriyel

ağlar arasında kollateral köprüleri oluşturacak şekilde var olan damarların genişleyerek büyümesi şeklinde seyreder [24]. Özetle, vaskülogenez endotel progenitör hücrelerden primer damarların oluşumu; anjiyogenez ise mevcut primer damarlardan dallanma sonucu yeni damar oluşması sürecidir [26]. Vaskülogenez, ağırlıklı olarak embriyonik gelişim sırasında görülürken anjiyogenez embriyonik gelişimin yanı sıra yetişkinlerde de görülür. Neovaskülarizasyon olarak da bilinen anjiyogenez, vücutta fizyolojik olarak yara iyileşmesi, embriyogenez, menstrüel siklus vb. durumlarda söz konusudur [27, 28].

2.1.1. Tümör Anjiyogenezi

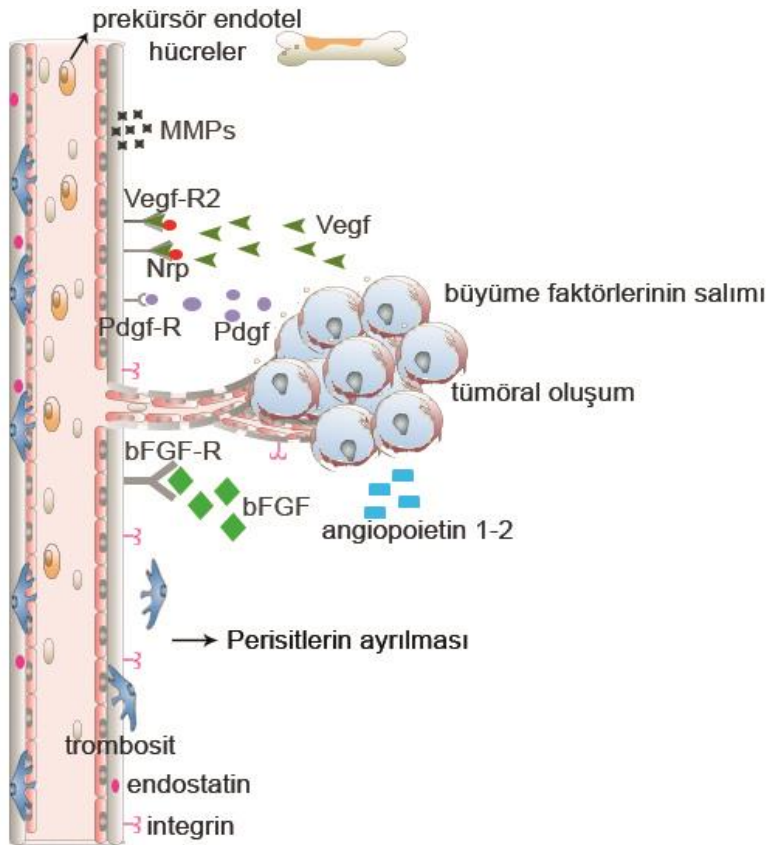
Kanser hastalarında tedavinin yetersiz olmasının en büyük nedeni tümör invazyonu ve metastazdır. Metastaz, primer tümörün en erken oluşum evresinden itibaren başlar ve zaman içinde tümör büyümesine paralel olarak gelişir. Artan tümöral hücre proliferasyonu ve bunun sonucunda tümörlü dokuda meydana gelen oksijen ve glikoz ihtiyacı anjiyogenez oluşumunu tetikler [29-35]. Yapılan çalışmalar, anjiyogenez olmadan tümöral hücre topluluklarının en fazla 2-3 mm çapa veya 0,5 mm³ hacme kadar büyüebildiğini göstermiştir. Avasküler tümör dokuları bu büyüklüğe kadar difüzyon ile beslenebilirken bu büyüklükten sonra kan damarları ile perfüzyona ihtiyaç duymaktadır [36]. Bu nedenle anjiyogenez oluşumu tümörlerin büyümesi ve yayılması için çok önemlidir.

Anjiyogenez, büyüme faktörleri ve pro-anjiyogenik sitokinler gibi uyarıcı faktörler ile inhibe edici faktörler tarafından sıkı bir denetim altındadır (Şekil 2.4). Anjiyogenik uyarıcılar ve inhibitörler arasındaki dengesizlikler kanser, artrit, diyabetik retinopati, sedef hastalığı, obezite, astım, ateroskleroz, enfeksiyon hastalıkları, kalp ve beyin iskemisi, nörodejenerasyon, hipertansiyon, pre-eklampsia, solunum sıkıntısı, osteoporoz ve diğer birçok hastalık gibi çeşitli patolojiler ile sonuçlanabilir [27].



Şekil 2.4. Anjiyogenezi tetikleyen ve önleyen faktörler

Tümöral oluşumlarda anjiyogenezi dengesi uyarıcılar lehine bozulur. Anjiyogenezi süreci öncesinde, artan oksijen ihtiyacına bağlı olarak tümöral dokular platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerini salgılar. Bu moleküllerin salınması ve endotelial hücre yüzeyindeki reseptörlere tutunmasının ardından endotelial gelişim ya da oluşum başlar (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Tümöral anjiyogenezi süreci [37]

Anjiyogenez oluşum evreleri genel itibariyle aşağıdaki şekilde gelişmektedir [23].

- Mevcut damarların genişlemesi, vasküler geirgenliğıın artması ve ekstrasellüler matriksin (ECM) yıkılması.
- Büyüme faktörlerinin etkisiyle endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu.
- Endotel hücrelerinin şeritler halinde uzanması ve lümen oluşumu (Kapiller tüp formasyonu)
- Vasküler endotelyumun yerel ihtiyaçlarını karşılamak için farklılaşması.
- Yeniden modellenen damarların arter ya da ven formasyonu oluşturacak şekilde düzenlenmesi ve kompleks, işlevsel damar ağıının oluşumu.

Kanser tanı ve tedavisinde anti-anjiyogenik hedefli tedavi yöntemlerini geliştirmek ve terapötik ajanlar tasarlamak için normal dokular ile kanserli dokular arasındaki farkı anlamak çok önemlidir. Tümör anjiyogenezi sonucunda oluşan vasküler ağı yapısı organizasyon, yapı ve işlev olarak benzerlerinden önemli ölçüde farklılık gösterir [38]. Normal hücre ve dokularda damar diziliş ve yayılışından farklı olarak tümörlü dokularda kan damarları elastik ve vasküler arter- arteriol- kapiller- postkapiller, venül- ven gibi hiyerarşik bir düzende oluşmak yerine düzensiz aralıklar ve yapısal olarak da heterojen bir dağılım gösterir [29]. Plazma ve plazma proteinlerine karşı yüksek geçirgenlikte olan bu damarlar, daha az perisit içerip, aktif olarak bölünen endotel hücrelerinden meydana gelmektedir. Tümör stromasının diğeri bileşenleri de normalden farklıdır. Bu farklılıklar; plazma proteinleri bakımından zengin interstisyel sıvı miktarında artış, normalde yetişkin stromasında bulunmayan fibrin, tenaskin ve fibronektinin fetal formu gibi yapısal proteinler; anormal proteoglikan; değışken sayıda inflamatuvar hücreler vb. gibidir. Ayrıca bu hücreler yüzeylerinde pek çok büyüme faktörü reseptörleri taşır [29]. Normal dokuların damar çeperlerinde 9 nm sıklığıında sürekli gözenekler ve seyrek olarak 50 nm'lik gözenekler bulunur [39]. Bununla beraber tümörlü dokular yaklaşık 100 nm'lik gözenekleri olan düzensiz kapiller duvarlara sahiptir. Ayrıca bu süresiz kapiller duvarlar bazal laminaya sahip değıldir. Tümörlü dokular yabancı maddeleri uzaklaştırmak için lenfatik sistemden yoksundur [40]. Bu nedenle bir kez tümörlü dokuya penetre olan maddeler oradan kolay kolay uzaklaştırılmaz.

2.1.2. Anti-Anjiyogenik Tedavi Yaklaşımı

Anti-anjiyogenik tedavi yaklaşımında tümör gelişimini ve metastazı baskılamak amacıyla tümöral bölgedeki vasküler gelişimin durdurulması hedeflenir. Kanserle karşı anti-anjiyogenik tedavideki araştırmaların başlangıç noktası 1971 yılında Folkman'ın öne sürdüğü yaratıcı hipoteze dayanır. Folkman, tümöral gelişim için tümör vaskülarizasyonunun önemini vurgulayarak, bir tümörün giderek artan kan akışı kesilirse, tümörün büyümesinin durdurulabileceğini hatta yok edilebileceğini ileri sürmüştür [41].

Onkoloji'nin en etkin alanlarından biri olan tümör anjiyogenezi, mevcut damarların yan ve uç kısmından filizlenen yeni damarların kombinasyonu ile olduğu kadar periendotelial hücreli mevcut damarların boyuna bölünmesi ya da prekapiller damar, arteriyol ve kapillerin dallara ayrılmasıyla karakterize edilir [42]. Patolojik anjiyogeneze karşı genel olarak iki tip anti-anjiyogenik tedavi yöntemi benimsenmektedir [43]. Bunlardan ilki, endotel hücre proliferasyonunun, migrasyonunun ve farklılaşmasının engellenmesi yoluyla tümör uyarımlı neovaskülarizasyonu inhibe eden anti-anjiyogenik ajanların kullanılmasıdır. İkincisi ise tümör iskemi ve yoğun hemorajik nekroza yol açacak şekilde mevcut kan damarlarının hızlı ve seçici tıkanıklığına neden olan anti-vasküler ajanların kullanımıdır. Bu yöntem henüz klinik öncesi aşamada gelişimini sürdürmekte olmasına karşın, *in vivo* koşullarda katı tümörlü sıçanlara uygulanan anti-vasküler hedefli terapötikler karakteristik bir nekroza yol açmıştır [44].

Patolojik anjiyogeneze başta kanser olmak üzere kollajen doku hastalıkları, retinopati ve psöriasis gibi hastalıklarda sıklıkla rastlanan bir durumdur. Bu nedenle kan damarlarının nasıl oluştuğunun anlaşılması ve bu süreçteki temel mekanizmaların açığa çıkarılması, başta kanser olmak üzere anjiyogeneze bağımlı birçok patolojik durum için terapötik seçenekler sağlayıp, bu hastalıklar sonucu ortaya çıkan mortalite ve morbidite oranını düşürecektir. Anjiyogeneze rol alarak bu süreci inhibe edici veya uyarıcı etkisi bulunan moleküllerin kısa bir süre önce bulunmuş olması, bu moleküllerin terapötik uygulamalarda kullanılması konusunda ilgiyi arttırmakla birlikte,

bu konuda temel araştırmalardaki yetersizlikten dolayı kliniğe yönelik uygulamaların halen başlangıç aşamasında olduğu görülmektedir.

2.2. VEGF ve Reseptörleri

Anjiyogenik moleküller içinde en önemli olanı, vasküler sızıntılara yol açtığı için başlarda vasküler geçirgenlik faktörü [45] olarak tanımlanan fakat daha sonra endotel hücreleri üzerinde mitojenik etkisinin olduğunun anlaşılmasıyla VEGF adını alan gen ailesidir [46]. Aslında bu durum biraz alışılmışın dışındadır;      VEGF diğer büyüme faktörlerinin aksine hem vasküler geçirgenliği hem de endotel hücre proliferasyonunu arttıran bir büyüme faktörüdür. Yaklaşık olarak 40-45 kDa moleküler ağırlığa sahip olan VEGF, homodimerik glikoprotein yapısındaki heparin bağlayan bir büyüme faktörü olup, 6p21.3 gen bölgesinde lokalize olmaktadır [47]. VEGF, sistein düğümlü PDGF ailesine mensuptur [48]. Hücre dışına salgılanan glikoproteinlerden olan VEGF ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasental Büyüme Faktörü (PIGF) alt sınıflarından oluşmaktadır.

VEGF-B kalp hariç çoğu dokuda zayıf anjiyogenik özellik göstermektedir [49, 50]. Kalp, iskelet kası ve pankreasta fazlaca bulunup, parakrin benzeri davranarak hücre dışı matriks degradasyonu, hücre adezyonu ve g    gibi endotel hücre fonksiyonlarını düzenler [51]. VEGF B aynı zamanda oküler nörodejeneratif hastalıklar ve darbeye bağlı nöron hasarı durumlarında apoptozu inhibe edici özelliği nedeniyle nöronlar üzerinde koruyucu bir rol üstlenir [52]. Ayrıca VEGF-B 'nin  evre dokuların enerji isteğine bağlı olarak kandan endotel hücreleri vasıtasıyla uzun zincirli yağ asitlerinin alınması suretiyle yağ asidi birikiminde rol oynadığı belirlenmiştir [53]. Bununla birlikte tümör gelişimde ve kan damarlarının oluşumundaki rolü yeterince anlaşılamamıştır [54, 55].

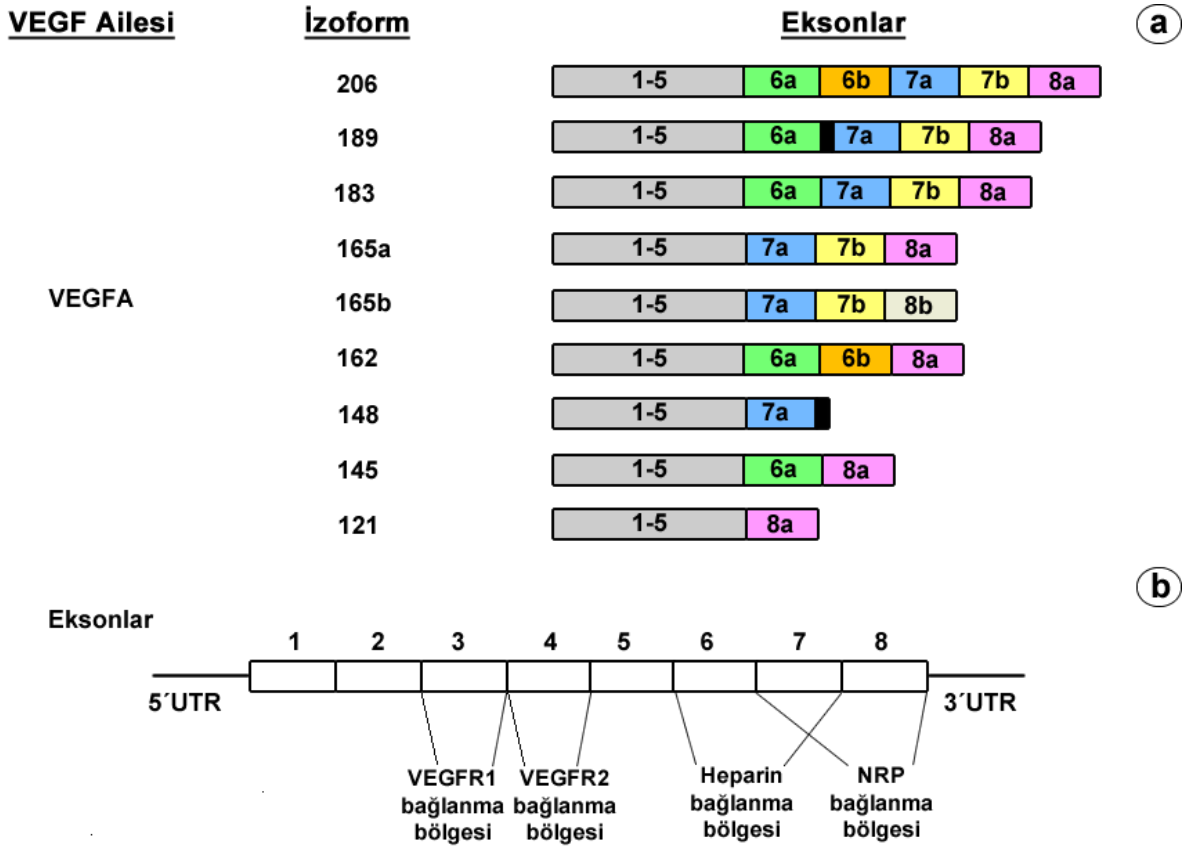
VEGF-C ve VEGF-D lenfatik endotelyal hücreler için mitojenik faktör olarak etki etmektedir. Tirozin kinaz reseptörleri vasıtasıyla lenfatik endotel hücrelerin hayatta kalımını arttırmaktadır [56-58]. Ayrıca VEGF-C mevcut lenf damarlarında hiperplaziyi uyarmaktadır [55]. VEGF-E ise yapısal olarak VEGF-A'ya benzeyen viral homologlardır. Bu VEGF türü insanlarda görülmez. PIGF, VEGF-A'ya bağlı endotel hücre çoğalmasını indüklerken tek başına zayıf mitojenik etki göstermektedir [59].

VEGF-C ve VEGF-D spesifik olarak lenfanjiyogeneze katılırken, VEGF-A anjiyogeneze rol almaktadır [55]. VEGF'ler arasında en çok bilinen ve anjiyogeneze ile olan güçlü ilişkisi nedeniyle anti-anjiyogenik tedavilerin çoğuna hedef olan VEGF-A yara iyileşmesi, embriyogeneze, kan basıncının sürdürülmesi gibi önemli fizyolojik süreçler kadar kanser gibi anjiyogeneze bağlı çeşitli patolojilerle de ilişkilendirilmektedir [60]. Bu nedenle VEGF denildiğinde akla ilk olarak VEGF-A gelmektedir. Kan damarlarının iç tabakasında sıralanan endotel hücrelerinin proliferasyonu, hayatta kalımı, migrasyonu ve geçirgenliğini arttıran VEGF-A önemli bir pro-anjiyogenik sinyal molekülüdür [61]. Ayrıca VEGF'ler arasında hipoksi durumunda transkript edilen ve anjiyogeneze temel uyarıcı faktörlerden olan HIF- α ile upregüle olan tek VEGF üyesidir.

VEGF-A'nın insanlarda tanımlanan ve VEGF₁₂₁'den VEGF₂₀₆'a değişen 9 farklı izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar sırasıyla; VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF_{165a}, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆'dır. VEGF izoformları VEGF geninin 7 intronla ayrılan 8 eksonunun alternatif değişimleri (alternatif kesim) ve buna bağlı olarak aminoasit sayısında oluşan farklılıkların bir sonucudur [59, 62]. En çok bilinen izoformlar VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆'dır.

VEGF-A izoformları, içerdiği aminoasit sayısı kadar heparine bağlanma özelliğiyle buna bağlı çözünabilirlik ve difüze olma durumları açısından da farklılık göstermektedir. 1-5 eksonları tarafından kodlanan aminoasitler tüm izoformlarda korunurken, alternatif değişimler ekson 6, 7 ve 8' de oluşmaktadır [63] (Şekil 2.6a). VEGF'in VEGFR'lere bağlanma bölgelerinin ekson 2-5'te kodlandığı bildirilse de [60] spesifik olarak VEGFR1 (Flt-1) bağlanma bölgesi ekson 3, VEGFR2 (Flk-1/KDR) bağlanma bölgesi ise ekson 4'te kodlanmaktadır [63, 64]. Ekson 6 ve 7 reseptöre bağlanımı ve çözünürlüğü etkileyen iki heparin-bağlanma bölgesini kodlamaktadır. Bilindiği gibi VEGF'ler heparin bağlayıcı bölge ile hücre dışı matrikse bağlanır [59]. Bu eksonlardan özellikle ekson 6'yı kodlayan VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₉ VEGF₂₀₆ gibi izoformlar hücre yüzeyine sıkıca bağlanmıştır. Heparin bağlanma bölgeleri açısından yetersiz ya da bu bölgelerden yoksun olan bu izoformlar (VEGF₁₂₁ ve kısmen VEGF₁₆₅) bazal membranda yer alan heparin ya da heparan sülfat proteoglikanlara

bağlanmadığı için kan damarlarına diffüze olabilmektedir [55, 65]. Bununla birlikte, sadece ekson 6'dan yoksun olan VEGF₁₆₅ orta derecede, ekson 6 ve 7'den yoksun olan VEGF₁₂₁ yüksek derece diffüze olmaktadır [66]. Ayrıca VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅ çözünebilir izoformlardır. Dolayısıyla bu VEGF-A izoformları daha fazla tümör oluşturu ve anjiyogenik özelliklidir.



Şekil 2.6. İnsan VEGF-A proteininin gen yapısı. a.) VEGF izoformlarının ekson yapısının şematik gösterimi. b.) VEGF-A proteininin heparin ve reseptörlere bağlanma bölgeleri

VEGF₁₆₅ izoformu aslında bir geçiş bölgesindedir. Hem çözünüp, diffüze olabilen hem de heparine ve ekstrasellüler matrikse (ECM) bağlanabilen izoform'dur. Biyolojik aktivitesi VEGF₁₂₁'e göre daha yüksektir. Çalışmalar, anjiyogeneizde ana rolü oynayan izoformun VEGF₁₆₅ olduğunu göstermektedir [60].

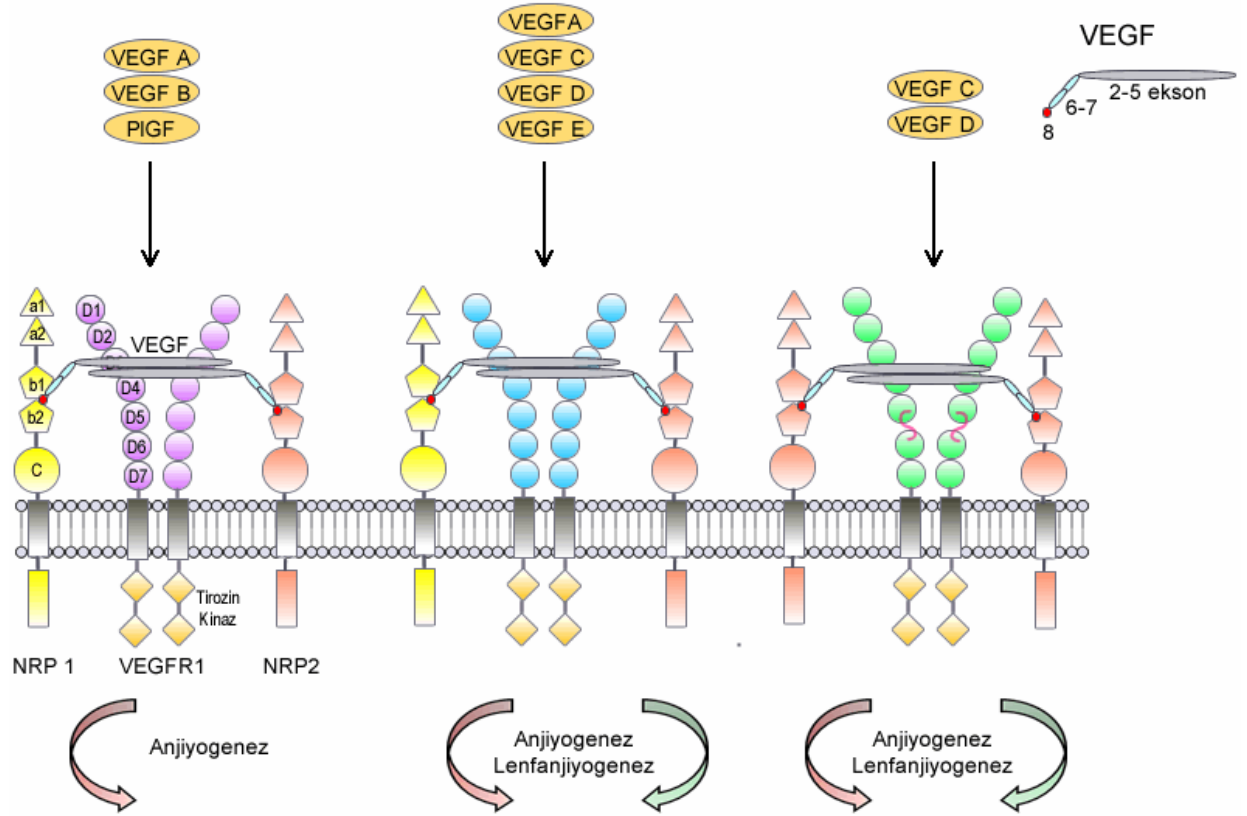
Vasküler endotel hücrelerine yüksek afinite gösteren VEGF'ler, endotel hücre yüzeyindeki VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 (Flt-4) olmak üzere üç tane tirozin kinaz ve

iki tane nöropilin (NRP1 ve NRP2) reseptörüne bağlanarak etkisini gösterir. Ayrıca, heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG'ler) heparin bağlayıcı VEGF'lerin VEGFR2 ve NRP yardımcı reseptörleri ile sinyalleşmesini düzenler [67]. VEGFR'lerin ortak özelliği, yedi tane ekstrasellüler IgG (immünoglobulin üst ailesi) bölgesi, bir tane transmembran bölgesi ve kinaz ekleme bölgesiyle bölünmüş tirozin kinaz bölgesine sahip olmalarıdır. Kısaca, VEGFR'ler IgG benzeri ekstrasellüler bölgeye sahip olup, tirozin kinaz aktivitesi gösterirler [68].

180 kDa'lık transmembran proteini olan VEGFR1 VEGF-A, VEGF-B ve PlGF'nin tirozin kinaz reseptörüdür. 200-230 kDa molekül ağırlığına sahip VEGFR2 VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E reseptörüdür. 170-195 kDa molekül ağırlığında glikozile bir protein olan VEGFR3 VEGF-C ve VEGF-D'nin reseptörüdür (Şekil 2.7). VEGFR1 ve VEGFR2 başlıca vasküler endotel hücreleri üzerinde bulunurken VEGFR3'ün çoğunlukla lenfatik endotel hücrelerinin üzerinde bulunması VEGFR1 ve VEGFR2'nin kan damarlarının, VEGFR3'ün ise lenf damarlarının oluşumunda rol oynadığını göstermektedir. VEGFR1, VEGF'e daha yüksek afinite gösterse de, VEGF uyarımı sonrası VEGFR2'ye göre daha düşük tirozin kinaz fosforilasyon aktivitesi göstermektedir [69].

Yaklaşık 120-140 kDa ağırlığındaki Nöropilinler (NRP) VEGF için tirozin kinaz olmayan yardımcı bir transmembran reseptörüdür. NRP'ler üç ekstrasellüler bölge (a1a2, b1b2 ve c), bir transmembran bölge ve bir intrasellüler bölge olmak üzere 5 farklı bölgeden oluşan hücre membranını kateden tekli transmembran glikoprotein yapısındadır [70]. a1a2 bölgesi tipik olarak Sema 3'ler ile bağlanırken, b1b2 bölgeleri VEGF ailesinin üyelerine bağlanmaktadır [71]. Başlangıçta NRP'lerin VEGF-A'nın ekson 7'de kodlanan bölgesine bağlandığı bildirilmiş, fakat daha sonra NRP bağlanımının tüm proanjiyogenik VEGF-A izoformalarında bulunan ve ekson-8'de kodlanan bölgede gerçekleştiği raporlanmıştır. Yapılan son çalışmalar, VEGF'de ekson 8 tarafından kodlanan C ucundaki Arjinin'in NRP'ye yüksek afiniteyle bağlanımı için son derece gerekli olduğunu ortaya koymakla birlikte, ekson 7'de bulunan heparin bağlanma bölgesinin de NRP1-b1 bölgesiyle kompleks oluşturarak NRP bağlanımına fiziksel olarak katkı sağladığını göstermiştir [72]. NRP'ler VEGFR1, VEGFR2 ve VEGFR3 reseptörlerine bağlanarak VEGF sinyallerinin dönüşümünü

sağlar. Ayrıca VEGF'nin VEGFR2'ye bağlanma etkisini de arttırmaktadır [73]. Bununla birlikte, VEGFA ailesi NRP2'ye nazaran NRP1'e daha yüksek bir afinite gösterir. NRP1 VEGF-A₁₆₅, VEGF-B, VEGF-E ve PlGF ile bağlanırken; NRP2 VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₄₅, VEGF-C ve PlGF ile bağlanmaktadır [74]. NRP'lerin VEGFR'lerle olan ilişkisine gelince NRP1'in VEGFR1 ve VEGFR2 [75, 76], NRP2'nin ise VEGFR1 ile kompleks oluşturduğu bilinirken, son çalışmalar NRP2'nin aynı zamanda VEGFR2 ve VEGFR3 ile etkileşim kurarak endotel hücrelerinin hayatta kalımını ve hücre migrasyonunu arttırdığını göstermiştir [77].



Şekil 2.7. VEGF sinyalizasyon kompleksleri

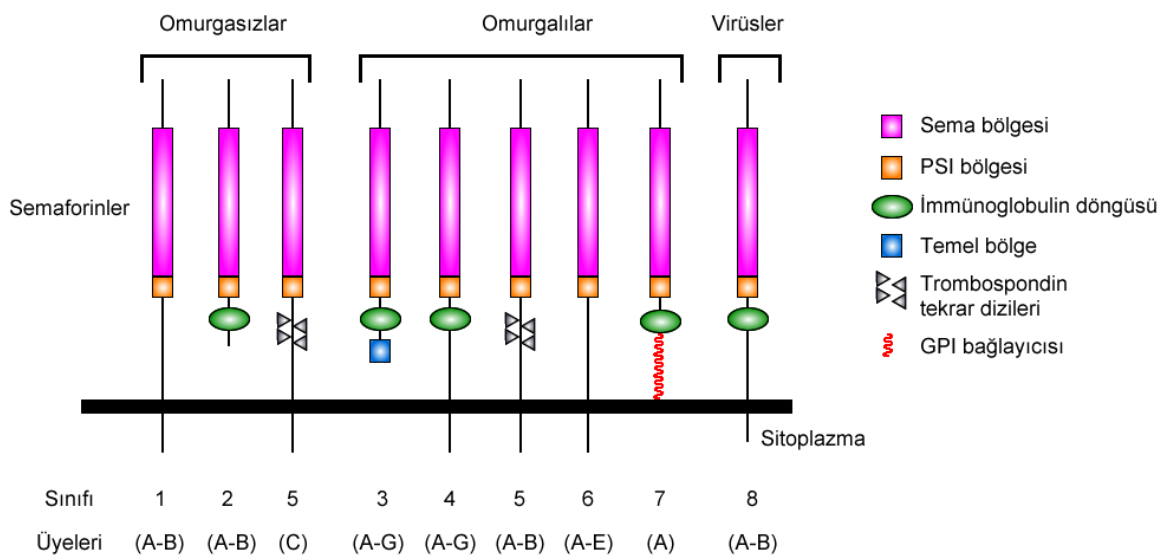
Vaskülogenez, anjiyogenez ve endotel hücre gelişiminde aktif bir büyüme faktörü olan VEGF, endotel spesifik mitojenik faktör olarak hareket ederek hücre proliferasyonunu uyarır, hücre migrasyonunu kolaylaştırır, apoptozu inhibe eder ve kan damarlarının geçirgenliğini artırır. VEGF ayrıca kan damarlarının oluşumuna yol açan diğer birçok büyüme faktörünün üretimini ve aktivitesini indükler. Bununla birlikte, kan damarı oluşum, bakım ve geçirgenliğinin VEGF sinyalleri ile düzenlenmesi aynı zamanda terapötik müdahaleler için potansiyel bir hedef de

sağlamaktadır. Bu nedenle günümüzde, tümör anjiyogenezinin sınırlandırılmasındaki en oturmuş yaklaşım VEGF sinyal yollarının blokajıdır.

2.3. Semaforin Protein Ailesi ve Reseptörleri

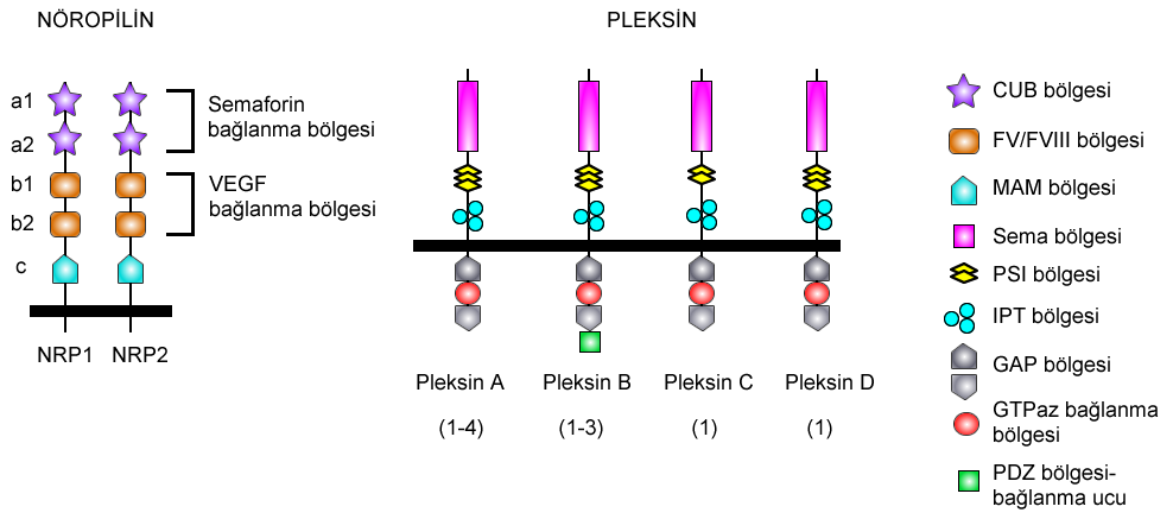
Sema'lar, nöron yönlendirme aracı olduğu aksonal büyüme konilerini hücresel iskelet F-aktinlerinin depolimerasyonu ile yıkması ve aksonlara uyguladığı geri-itme hareketi ile ortaya çıkmıştır. Bu aynı zamanda kollapsin olarak da adlandırılmasına neden olmuştur [78]. Başlangıçta sadece sinir sisteminin oluşumunda akson yönelimi ve büyüme konilerinin yıkımında rol oynadığı belirlense de [79, 80] Sema'lar sinir sistemi dışında da oldukça yaygın olarak eksprese edilmektedir. Son zamanlarda Sema gen ailesinin kalp ve iskelet gelişimi [81], hücre migrasyonu [82], vasküler endotel hücre hareketliliğinin kontrolü ve kan damarlarının dallanma morfogenezi [83], tümör gelişimi ve metastaz [84, 85], apoptoz başlatımı [86], immün yanıtı ve immünomodülasyon [87-89] süreçlerinde rol aldığı anlaşılmıştır.

Sema'lar hem salgılanan hem de membrana bağlı üyelerden oluşan yaklaşık 30'dan fazla üyeye sahip oldukça geniş bir gen ailesidir. Bu genler yapılarına göre 8 sınıfa ayrılır. Sınıf 1-2 omurgasızlarda, sınıf 3-7 omurgalılarda ve son olarak V olarak adlandırılan sınıf 8 virüslerde bulunmaktadır. Sınıf 5 Sema'lar hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda görülmektedir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Semaforin ailesi üyeleri ve yapıları

Tüm Sema'lar yaklaşık 500 aminoasitten oluşan ve sistein açısından zengin bir ekstrasellüler bölge olan Sema bölgesine ve PSI (Pleksin-Sema-Integrin) olarak adlandırılan sistein bakımından zengin bir protein bağlanma bölgesine sahiptir [90-92]. Sema bölgesi α -integrinlerin yapısına benzer 7 uçlu bir β pervane deseni oluşturur. Bu bölge reseptörlere spesifik olarak bağlanma sağlayan ve sinyalleşme için gerekli olan bir bölgedir. Sınıf 1, 4, 5, 6 ve 7 Sema'lar membrana bağlı (transmembran ya da glikozil fosfatidilinositol (GPI) aracılığıyla membrana bağlı) iken sınıf 2, 3 ve 8 salgılanan Sema'lardır. Ayrıca çözünen proteinleri oluşturmak üzere membrana bağlı bazı Sema'lar proteolitik olarak ikiye ayrılmakta, bu durum daha fazla çeşitlilik yaratmaktadır. Omurgalılarda salgılanan tek Sema sınıfı olma özelliğini taşıyan Sema 3'ler reseptöre bağlanması için gerekli olan temel bölge olarak da adlandırılan C terminal bölgesiyle ayırt edilir. Omurgalı Sema sınıflarından membrana bağlı sınıf 4-7'ler immünoglobulin benzeri bölgeler (sınıf 4), trombospondin tekrar dizileri (sınıf 5) ya da Glikofosfatidilinositol (GPI) (sınıf 7) bağlayıcısıyla birbirlerinden ayırt edilir [93].



Şekil 2.9. Semaforin reseptörleri olan Nöröpilin ile Pleksinin sınıfları ve yapıları

Sema'lara karşı yüksek afinite gösteren iki reseptör sınıfı vardır; Pleksin (PLXN) ve NRP. İnsanlarda PLXN'ler A, B, C ve D olmak üzere 4 alt sınıfa ayrılmıştır. Omurgalılarda tüm alt sınıflar eksprese olurken, omurgasızlarda özellikle de sinir dokuda eksprese edilen yalnızca iki PLXN geni vardır [94]. PLXN Sema'lar gibi PSI ve ekstrasellüler Sema bölgelerine sahiptir. Sınıf 4-7 Sema'ların çoğu PLXN'e doğrudan bağlanmakta ve PLXN aracılı sinyal dönüşümünü aktive etmektedir.

NRP'ler sadece omurgalılarda eksprese edilmektedir. Tek açıklı transmembran glikoprotein olan NRP'ler, a1/a2 olarak adlandırılan iki ekstrasellüler tamamlayıcı bileşen (CUB bölgesi), b1/b2 (FV/FVIII) koagülasyon faktörü ve son olarak C bölgesi olarak adlandırılan meprin benzeri MAM alanına sahiptir [94-96] (Şekil 2.9). NRP1 ve NRP2 başlangıçta Sema 3'lerin alt ailesine ait akson yönlendirme faktörleri için nöronal hücre yüzey reseptörleri olarak tanımlanmıştır. Daha sonra NRP'lerin spesifik heparin bağlayıcı VEGF formlarıyla kompleks oluşturduğu ve endotel hücrelerinde yaygın olarak eksprese edildiği bulunmuştur. Bu bulgular NRP'nin anjiyogenez modülasyonunda görevli olduğu fikrini güçlendirmiştir. NRP'ler VEGFR2 ve VEGFR3 tirozin kinaz reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla sinyal dönüşümünü kolaylaştırması sayesinde VEGF ailesi üyeleri için ko-reseptör olarak işlev görmektedir. Ek olarak NRP'ler bFGF, PlGF-2 ve HGF gibi heparin bağlayıcı diğer faktörlerle de etkileşime girer. VEGF ailesi üyeleriyle NRP'ler arasındaki etkileşim onların vasküler oluşum ve tümör gelişimi üzerindeki potansiyel rolüne işaret etmektedir. Diğer tip Sema'lardan farklı olarak Sema 3 (Sema 3E hariç) doğrudan NRP'lere (NRP1 ve NRP2) bağlanır. Sema 3 ve NRP'nin kompleks oluşturması sinyal tirozin kinaz aktivitesiyle ilişkili sitoplazmik bölgesinde bir transmembran reseptörü olan PLXN'lerin (Pleksin A1-4) doğrudan aktivasyonu ile sonuçlanır. Özetle Sema 3, sinyal dönüşümü için NRP'ler ve PLXN reseptör ailesi üyeleriyle kompleks oluşturmaktadır. Sema 3 için NRP'ler ligand bağlanım bileşenleri, PLXN'ler ise sinyal dönüştürücü bileşen olarak görev yapmaktadır.

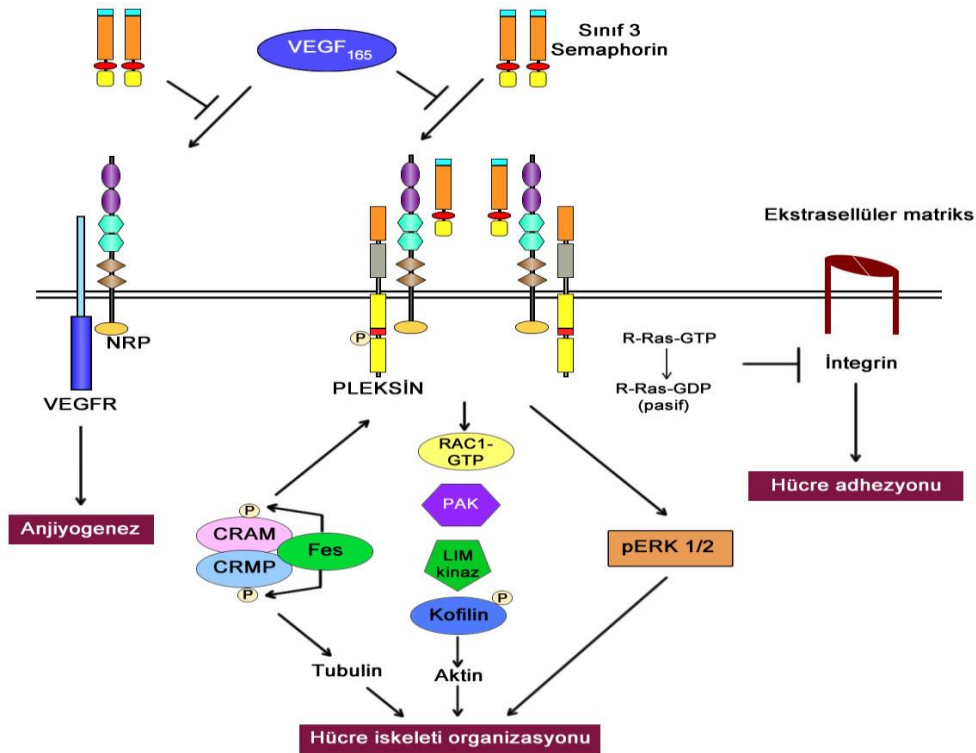
2.4. Semaforin 3F

Omurgalılarda salgılanan tek Sema sınıfı olan Sema 3'lerin 7 üyesi (A-G) vardır. Molekül ağırlığı 88 kDa olan Sema 3F, 16 sistein uzantılı 500 aminoasit dizisinden oluşan ve integrin moleküllerinde bulunan yapıya benzer 7 uçlu bir β pervane formu oluşturan Sema bölgesi [90], sistein açısından zengin PSI (Pleksin-Sema-Integrin) bölgesi, immünoglobulin benzeri bölge ve C-terminal temel bölgesinden oluşmaktadır. Sema 3F çoğunlukla küçük hücreli akciğer kanseri vakalarında silinen 3p21.3 kromozom bölgesinde kodlanır [97, 98].

Sema 3F sinir sisteminin gelişiminde özellikle dorsal spinal kord'da yoğun olarak eksprese edilir. Yetişkinlerde de çoğu dokuda sentezlenir. Sema 3F etkisini NRP'lere

(NRP1 ya da NRP2) bağlanarak gösterir. Ayrıca PLXN reseptör ailesi Sema 3F sinyalleşmesinde önemli rol oynar. Çünkü NRP'lerin intrasellüler bölgeleri kısa olduğu için hücre içinde Sema sinyalizasyonu yeterli etkiyi yaratamaz. Bunun için NRP'ler PLXN'lerle birleşir. NRP/PLXN holoreseptörleri sinyal iletim bileşeni gibi çalışır. Kısacası PLXN'ler Sema 3F-NRP birleşimine katılarak bu birleşimden doğan etkinin hücre içinde sinyalizasyon yaratmasına yardımcı olur. Sinyal yollarının analizi Sema 3F'nin daha ziyade NRP2 ve PLXN A1 ile kompleks oluşturduğunu göstermiştir [99]. NRP2 Sema 3F'ye bağlandığında PLXN A1 ve A2, NRP2 ile kompleks oluşturur [100]. Ayrıca fare embriyonik sinir sistemi gelişiminde NRP2 sinyallerine PLXN A3'ün aracılık ettiği de belirlenmiştir [101].

Sema 3F'nin kanser sürecindeki rolü daha çok VEGF ile olan ilişkisine dayalıdır. Sema 3'lerden özellikle Sema 3F VEGF indüklü anjiyogenez ve tümör büyümesinin kontrolünde rol oynamaktadır [9]. Bu rol aynı zamanda VEGF için de tirozin kinaz olmayan bir transmembran reseptörü olan ve VEGF sinyalleşmesi ve anjiyogenezde önemli bir rol oynayan NRP'lere (NRP1 ve NRP2) bağlanmasıyla ortaya çıkmaktadır [102]. Çünkü Sema 3F ve VEGF₁₆₅ NRP'lere bağlanmak için bir rekabet halindedir.



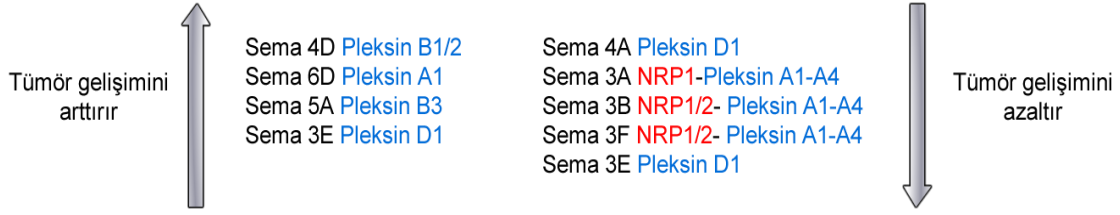
Şekil 2.10. VEGF ve Sınıf 3 Semaforin rekabeti [103]

Kanserli dokularda Sema 3F seviyesinin azaldığı ve hücrel lokalizasyonunun plazma membranından sitoplazmaya kaydığı gözlenmektedir. Küçük hücre dışı akciğer kanserinde düşük Sema 3F seviyesi ilerlemiş hastalık seviyesiyle çok yakından ilişkilidir. Sonuç olarak VEGF₁₆₅/Sema 3F/NRP yolunun deregülasyonu kanser patogenezinin teşhisinde oldukça önemlidir (Şekil 2.10).

2.5. Semaforin 3F, Pleksin ve Nöropilin'nin Anjiyogenez ve Tümöral gelişim üzerindeki Roller

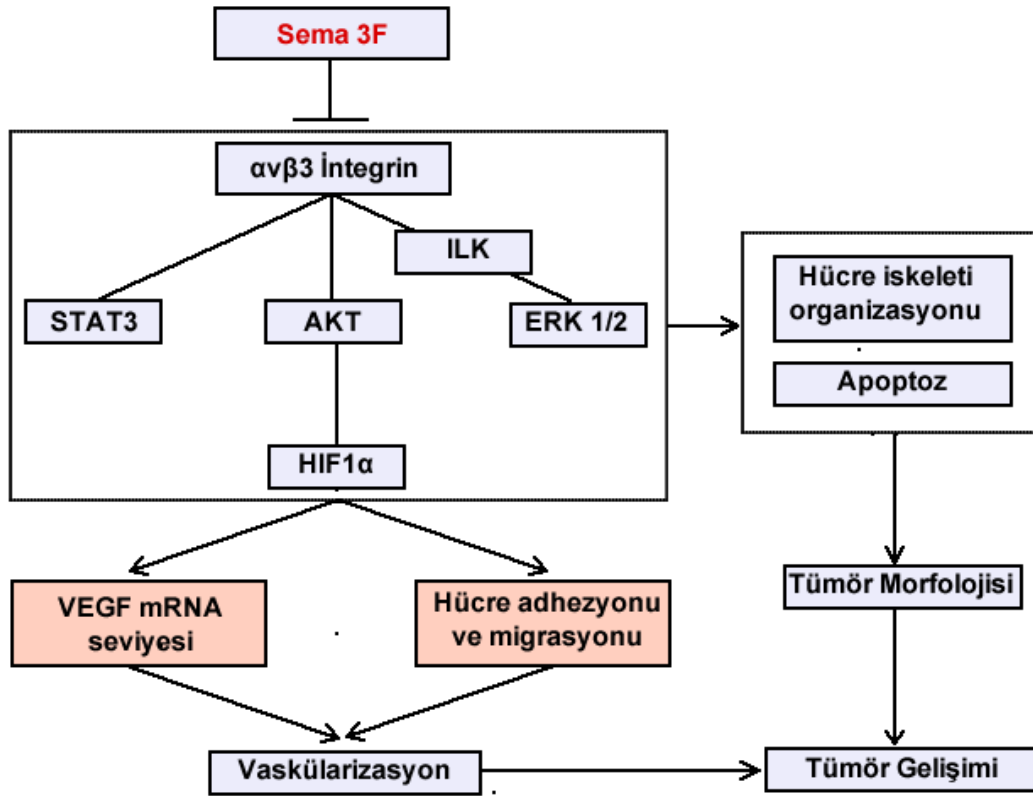
İster doğrudan olsun isterse NRP aracılığıyla PLXN-Sema aktivasyonu çok çeşitli biyolojik yanıtlar oluşturmaktadır. Sema'lar üzerine yapılan araştırmalardan en bilineni sinir sistemi gelişiminde özellikle Sema 3A'nın aktin hücre iskeleti organizasyonunda ve hücre adezyonunda yerel değişiklikler meydana getirerek aksonal büyüme konilerinin geri itmesi üzerinedir [93]. Bununla birlikte özellikle son yıllarda Sema'ların etkisinin yalnızca sinir sistemiyle sınırlı olmadığı ve NRP-PLXN eksprese eden çok çeşitli hücre tiplerinin Sema'ların sinyalleşmesinden farklı şekilde etkilendiği anlaşılmıştır. Sinir ucu hücreleri, T-hücreleri ve dendritik hücreler gibi immün hücreleri, nöroendokrin hücreleri, kemik iliği, mezotelyal, endotel ve kemik iliği stromal hücreleri, akciğer epitel hücreleri bu hücrelerden sadece birkaçıdır [93].

Sema'lar doğrudan kanser hücrelerinin davranışını ya da dolaylı olarak anjiyogenez ve tümör mikroçevresindeki diğer hücre tiplerinin (enflamatuvar hücreler ve fibroblastlar gibi) işlevlerini etkilemek suretiyle tümör gelişimini kontrol etmektedir [104]. Günümüzde Sema'ların reseptörleri, sinyal dönüşümleri ve fonksiyonel rolleri üzerine temel araştırmalar yapıldıkça vasküler gelişim, anjiyogenez ve kanser hücreleri üzerindeki etkileri daha belirgin hale gelmektedir [105]. Önemli bir şekilde farklı Sema'lar oluşturdıkları reseptör kompleksleri ve sinyal dönüşümlerine bağlı olarak tümör gelişimini arttırabilir ya da azaltabilir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Farklı Semaforin üyelerinin kanser gelişimi üzerine etkisi

Sema'ların tümör anjiyogenezinin kontrolündeki potansiyel rolüne ait ilk kanıt akciğer kanserinde Sema 3F'nin kromozal bölgesi olan 3p21.3 geninin yok olmasıyla elde edilmiştir [84, 97]. Bu genin ilerleyen kanser safhalarında yok olması Sema 3F'nin tümör baskılayıcı olarak tanımlanmasının başlıca nedenidir. Sema 3F akciğer kanser hücreleri kaynaklı ksenograft kanser modelinde tümöral oluşumu inhibe etmiştir [12, 106]. Ayrıca Sema 3F eksprese eden tümör hücrelerinin mikroçevresinde vaskülarizasyonun azaldığı ve tümör boyutunun küçüldüğü gözlenmiştir [13]. Sema'ların vasküler gelişimi etkilemesinin hücresel ve moleküler temelleri incelendiğinde bu proteinlerin integrin aktivasyonunu inhibe ederek ekstrasellüler hücre adezyonu ve migrasyonunu engellemek suretiyle vasküler morfogenezini kontrol ettiği bulunmuştur [83]. Sema 3A ile etkileşiminden sonra komşu endotel hücrelerin ekstrasellüler matrikse adezyonunun bozulduğu ve ardından yıkıma uğradığı, benzeri şekilde Sema 3F'nin de endotel hücreleri geri ittiği gözlenmiştir. Ek olarak, Sema 3A ve 3F'nin çeşitli hücre tiplerinde integrin aktivasyonunu ve ekstrasellüler matriks adezyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [106-109]. Bunun aksine Arg-Gly-Asp dizilim desenine sahip Sema 3C'nin endotel hücre migrasyonunu ve adezyonunu arttırdığı raporlanmıştır [110]. Integrin aktivasyonunun inhibisyonu ile tutarlı olarak, Sema 3F transfekte edilen H157 akciğer kanseri hücrelerinde $\beta 3$ integrin aktivasyonunun azaldığı, fibronektin ve vitronektine adezyonun azaldığı bulunmuştur [106]. Ek olarak Sema 3F transfeksiyonunun ardından ERK 1/2, AKT ve STAT3 aktivasyonun kaybolduğu, HIF1a translasyonunun inhibisyonu ve VEGF_{165A} mRNA ekspresyonunda düşüş görülmüştür [106] (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Sema 3F'nin tümör inhibisyonundaki rolüne ilişkin teorik model [106]

Sema sinyalleşmesini yöneten mekanizmalar halen tam olarak açıklığa kavuşturulamamakla birlikte, çalışmalar bu dinamik sinyalleşmenin spesifik reseptörlerin oligomerizasyonu ve farklı moleküler yolların down regülasyonuna bağlı olduğuna işaret etmektedir. Sonuç olarak Sema sinyalleşmelerinin bozulması hücre hareketliliği ve invazyonu üzerinde etkilere sahiptir. Bu durum özellikle tümör anjiyogenezi ve tümör gelişiminde oldukça önemlidir. Tümör anjiyogenezi, invazyonu ve metastazının düzenlenmesindeki rolleri Sema sinyal yollarını hedefleyerek kanserin engellenmesini amaçlayan çok çeşitli çalışmaları da beraberinde getirmiştir.

2.6. Nanoteknoloji ve Nanotıp

Maddeyi atomik ve/veya moleküler seviyede kontrol etme bilimi olan nanoteknoloji, 100 nm'nin altında işlevsel malzeme ve cihazların geliştirilmesiyle ilgilenmektedir. Bugün nanoteknoloji sayesinde çevre kirliliğinin kontrolü, temiz su kaynakları ve enerji rezervlerine erişim, nano devre teknolojileriyle daha yüksek kapasiteli ve daha hızlı çalışan bilgisayarlar, su ve leke tutmayan kumaşlar, kanser başta olmak üzere birçok hastalığın hücresel ve moleküler seviyede tanı ve tedavisi gibi birçok alanda

yeni atılımlar yapılmaktadır. Gelişen nanoteknolojiler her alanda olduğu gibi biyoloji, tıp ve farmakoloji alanlarında da büyük beklentiler yaratmaktadır. Nanoteknolojideki gelişmelerin tıp alanına uygulanmasıyla ortaya çıkan bir disiplin olan nanotıp, nano ölçek seviyesinde biyoyumluluk gösteren yapılar tasarlamayı, böylece terapötik ajanların hastalıklı dokulara ve hatta hücrelere ulaşmasını hedeflemektedir.

Hücredeki bir aminoasit molekülü büyüklüğünün yaklaşık olarak 1 nm, DNA molekül zinciri çapının 2 nm, hücre zarı kalınlığının 6-10 nm, hücre organellerinden ribozomun boyutunun 15-20 nm ve çekirdek zarı gözeneklerinin 30 nm olduğunu düşünürsek dünya üzerindeki varlığını sürdüren her organizma, canlılığını farklı boyutlarda nanoyapılar bulundurmasına ve bu yapılarla nano boyutta gerçekleştirdiği etkileşime borçludur [111]. Bu açıdan bakıldığında her hücre aslında nano boyutta işlevini sürdüren biyolojik bir sistemdir. Nano ölçekli yapılar küçük boyutları (insan hücresinden 100-10000 kat küçük) ve nispeten artan yüzey alanı/hacim oranı sayesinde hücre yüzeyindeki ve içindeki biyomoleküllerle (enzim, reseptör, DNA vb.) kolayca etkileşim kurup, terapötik ajanların hastalıklı dokulara ve hatta hücrelere kadar ulaşmasını sağlayabilir. Bilindiği gibi konvansiyonel ilaç taşıma yöntemlerinin düşük biyoyumluluk ve toksisite gibi olumsuzlukları vardır. Bu durum ilaçların tedavi edici etkisini ciddi şekilde azaltmaktadır [112]. Ayrıca mikron boyutundaki konvansiyonel taşıma sistemlerinde hedefleme kapiller yatakların fiziksel özellikleri ile sınırlanmaktadır. Supramoleküler yapı ya da kompozitten oluşabilen nano ölçekli sistemler ilaç moleküllerini çevreleyerek tedavi edici ajanları doğrudan hastalıklı bölgeye götürebilmekte, bu sayede vücuttaki toksisite seviyesi en aza indirgenebilmektedir [113]. Bununla birlikte platform olarak kullanılacak nanomalzemenin hastalıklı bölgelere hedeflenebilmesi için bu malzemelerin biyodolaşım ve farmakokinetik özellikleri ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılıyorsa taşıdığı ilaç moleküllerinin salım yeri ve zamanı çok önemlidir. Bunun yanında söz konusu malzemelerin düşük toksik etki göstermesi ve vücuttan kolay uzaklaştırılması beklenmektedir.

2.7. Metal Nanopartiküller

Metalik NP'ler yüzyılı aşkın bir süredir bilim adamlarının ilgisini çekmekte ve şu an malzeme bilimi, elektronik, tıp, kozmetik ve çevre bilimlerinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Metalik nanopartiküller ve kullanım alanları

Nanoboyuttaki partiküller bağıl hacimlerine bağlı olarak oldukça geniş yüzey alanına sahiptir. Bu yüzey/hacim oranı nanomateryalleri diğer malzemelerden daha reaktif yapmaktadır. Metrenin milyarda biri ($1/1.000.000.000$) boyutlarına inen bu maddeler makrodünyanın klasik Newton fiziğinden sıyrılıp, kuantum mekaniksel etkisi altına girmekte ve yeni boyutlarına ek olarak olağandışı birtakım fiziksel (renk, erime noktası vb.) ve kimyasal özellikler kazanmaktadır [114]. Örneğin normalde inert karakterli olan altının, nanoboyutta reaktif olması gibi. Bunun sonucu olarak, nanoboyutta ortaya çıkan bu yeni özelliklerin gelecekteki potansiyel uygulamalarına yönelik araştırma çalışmaları da hemen hemen her alanda hız kazanmıştır. Bugün nanopartiküller antikör, ligand ve ilaç moleküllerine bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplarla eşleşmekte ve manyetik ayırışım ve hedef analit konsantrasyonunu belirleme, hedefli ilaç ve gen taşıma, tanılama ve görüntüleme dahil birçok biyomedikal uygulamada kullanılmaktadır. Elektron taşıma ve iletim özelliği sayesinde yarı iletken devre teknolojilerinde kullanılıp, elektronik entegrelerin minyatürleşmesine katkı sağlamaktadır. Bu partiküllerin kullanılması ile güzellik

kremleri, diş fırçaları ve macunları, sabunlar ve güneş koruyucu gibi ürünler üretilmektedir. Ayrıca yüzeyinde bakteri barındırmayan beyaz eşyalar ve gıda saklama kaplarından, yaraların çabuk kapanmasını sağlayan yara bandlarına ve koku yapmayan çoraplara kadar bugün birçok sektörde bu partiküller ile üretilmiş anti-bakteriyel ve anti-fungal nanoürünlere rastlanmaktadır. Endüstriyel kaplayıcı yüzeylerde kullanılan partiküller ağaç, plastik ve tekstil ürünlerini UV ışınlarının verdiği zarardan korumaktadır. Ayrıca havadaki uçucu organik kirleticilerin yıkılması, yer altı suları ve kuyuların karbon tetraklorür, arsenik ve diğer zararlı maddelerden arındırılmasında bu metalik NP'lerden yararlanılmaktadır.

Sonuç olarak, çapı 2-100 nm boyutunda değişen NP'lerin bir diğer ifadeyle nano kristallerin üretimi, modifikasyonu ve işlevselliğiyle ilgilenen nanopartikülasyon teknolojisi nanoteknolojinin hızla gelişen en önemli alt alanlarındanıdır. Bununla birlikte nano materyallerin insan sağlığı üzerine etkileri, canlı sistemlerle olan etkileşimleri araştırılması ve üzerinde durulması gereken önemli konular olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.8. Altın Nanopartiküller ve Biyolojik Uygulamaları

Terapötik amaçla kullanılacak nanoyapılar vasıtasıyla başarılı bir biyotıp uygulaması gerçekleştirmenin ön şartı kullanılacak olan nanomalzemenin hastalıklı bölgelere hedeflenebilmesi, toksik etki göstermemesi ya da bunun kabul edilebilir bir seviyede kalması, *in vivo* ortamda non-spesifik birikime yol açmaması ve vücut dışına kolayca atılabilesidir.

Altın toksik olmayan çekirdeği, yük ve hidrofobisite gibi yüzey özelliklerinin tek katmanda ayarlanabilmesi, birçok terapötik ajan ve biyomolekölü kararlı bir şekilde bağlayıp biyoyumlu kompleks yapılar oluşturabilmesi gibi özelliklerinden dolayı son zamanlarda öne çıkan ilaç ve gen taşıyıcısıdır. Ayrıca yakın kızıl ötesi bölgede, yüzey plazmon rezonans absorpsiyonu ve saçılımıyla AuNP'ler *in vivo* ve *in vitro* görüntüleme için etkili problemlerdir. AuNP'lerin optik enerjiyi hızlı bir şekilde ısı enerjisine çevirmeleri özellikle invazif dokuların fototermal tedaviyle yok edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu bölümde AuNP'lerin biyomedikal uygulamalarda yüksek seçicilik, belirlilik ve hassasiyet gösteren nanobiyomateryallerin tasarımı için uygun

fiziksel, kimyasal, mekanik, optik ve elektronik özelliklerine değinilerek, bu özelliğe bağlı biyomedikal uygulama alanlarının üzerinde durulacaktır.

2.8.1. Tarihsel Perspektif

AuNP'lerin, dekoratif amaçlı renkli camlar elde etmek için kullanıldığı eski roma dönemine kadar uzanan zengin bir geçmişi vardır [115]. AuNP'ler görünür bölgede ışığı güçlü bir şekilde absorbe eder ve saçar. Ayrıca boyut, şekil ve yoğunluk özelliğine göre ışığa farklı kolorimetrik yanıtlar verir. Aslında AuNP'lerin görünür bölgede gerçekleşen bu özellikleri antik dönemde fark edilmiş ve bu partiküller camları, vazoları, kadehleri ve süs eşyalarını renklendirmiştir. Şüphesiz M.Ö. 5-4. yy arasında üretilen Lycurgus'un kadehi bunun en ünlü örneğidir. Antik dönem cam ustalarının şaheserlerinden biri olan bu kadehi (16.5 cm yüksekliğinde ve 13.2 cm ağız açıklığı) bu kadar ünlü yapan ise eşsiz optik özelliğidir. Bu kap cam ustaları tarafından cam erişine katılan AuNP'ler sayesinde ışığı yansıtma ve geçirmesine göre renk değiştirebilmektedir. Işık kaynağı kadehin dışında olduğunda kadehin rengi yeşil, içinde olduğunda kırmızı renkte görülmektedir.



Şekil 2.14. Lycurgus'un kadehi. Yansıtılan (a) ve geçirilen (b) ışık (İngiliz Müzesi, Londra İngiltere)

Krisoterapi olarak adlandırılan altın tuzlarının tıp alanında kullanımı antik çağlara dayanmaktadır. Eski Mısır, Hindistan ve Çin'de çiçek, cilt yaraları, frengi, kızamık gibi

hastalıkların tedavisinde altın kullanılmıştır [116]. Kırmızı renkli kolloidal altın antik hint sağlık sistemi olan Ayurveda tıbbında Swarna Bhasma (Sawarna: altın, Bhasma: kil) adı altında gençleştirme ve yeniden canlandırma ilacı olarak kullanılmıştır [117]. Batı dünyasında altın'ın gerginlik ya da asabiyet durumundan şikayet eden insanlar için sakinleştirici bir madde olarak kullanıldığı uzun bir geçmişi vardır. Altın 16. yy'da epilepsi hastalığının tedavisi için önerilmiştir [118]. 17 yy 'da İngiliz botanikçi Nicholas Culpepper altın tuzlarını içeren içecekleri depresyon, bayılma, yüksek ateş ve epilepsi gibi yaşam enerjisinin azalmasından kaynaklanan hastalıkların tedavisinde kullanmıştır. 19. yy'ın başında frengi tedavisi için tercih edilen bir ilaç olmuştur.

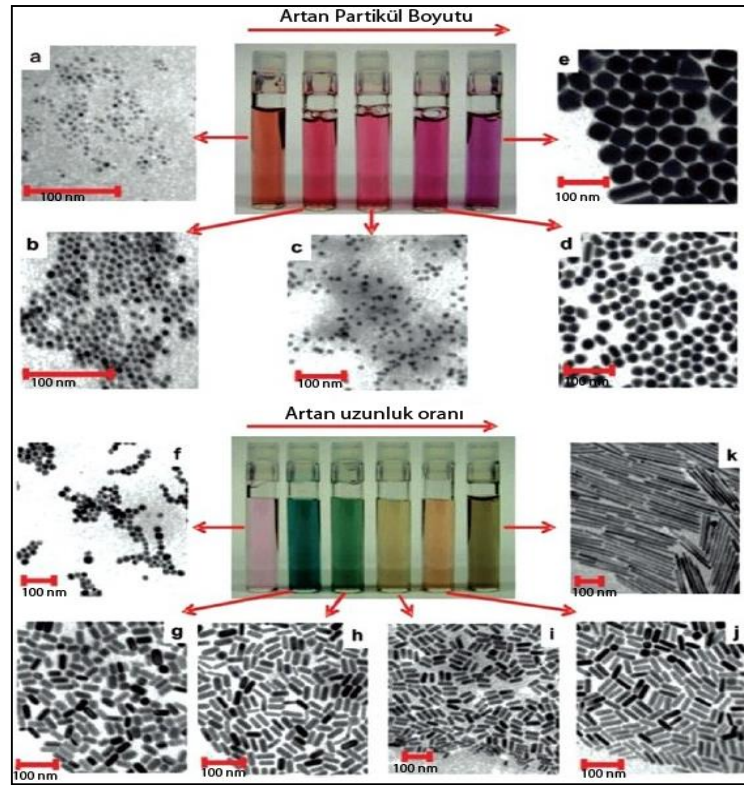
Karbon ve altın bağları içeren organoaltın bileşikleri juvenil artrit, palindromik romatizma ve diskoid lupus eritematoz gibi romatizma hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır [119]. Sodyum orotiyomalat ve orotiyoglikoz intramüsküler enjeksiyon yoluyla romatoid artrit tedavisinde kullanılan ve suda çözünebilen yaygın iki altın tiyatıdır [36]. Fakat bu bileşenler kanda fazla sirküle olmayıp, böbrek, karaciğer ve dalak gibi organlarda birikip, nefrotoksisite başta olmak üzere ağız ülseri, deri reaksiyonları, kan akış düzensizlikleri gibi yan etkilere yol açmaktadır. Bu durum ilaçların terapötik etkisini ciddi anlamda azaltmaktadır. 1985 yılında toksisite ve düşük farmakokinetik etkiler nedeniyle fosfin ligandlarıyla işlevselleştirilerek daha liyofilik hale gelen altın bileşenleri (Auranofin ilacı) kanda daha uzun süre tutulup, yan etkileri azaltılmıştır [120].

Altın içeren anti-tümör ilaçlar kanser tedavisinde de kullanılmaktadır. Kansere karşı altın içeren sisplatin ilacının anti-tümöral etkisi büyük bir ilgi uyandırmıştır. Çünkü +III oksidasyon durumunda altın, platin ile izoelektroniktir ve bu durum benzer kare düzlemsel kompleksler oluşturmaya olanak sağlamaktadır. Ayrıca Au (I) ve Au (III) içeren anti-tümör komplekslerin etkisinin arttığına yönelik bulgular mevcuttur. Altın içeren antiarterit ajanların immüno-modülatör etkileri de son zamanlarda bu ilaçların kanser üzerine etkisinin araştırılmasına sebep olmuştur [121]. Örn. Auranofin'in, HeLa ve P388 hücreleri üzerine inhibisyon etkisi [36]. Romatoid artrit için altın ile tedavi edilen hastalarda diğer hastalara göre malignite oranının daha düşük olduğunun raporlanması bu kanıyı güçlendirmiştir [122]. Altın'ın tıptaki kullanımına bir örnek de günümüzde kalp hastalıklarının kontrol edilmesinde kullanılan kalp pili ve

stentler, orta kulak ve diş hastalıklarının tedavisinde kullanılan altın kaplı implantlardır. Ayrıca yakın zamanda çeşitli organoaltın kompleksleri, antitümör, antimikrobiyal, anti sıtma ve anti-HIV aktiviteleriyle umut verici ajanlar olarak ortaya çıkmıştır [123].

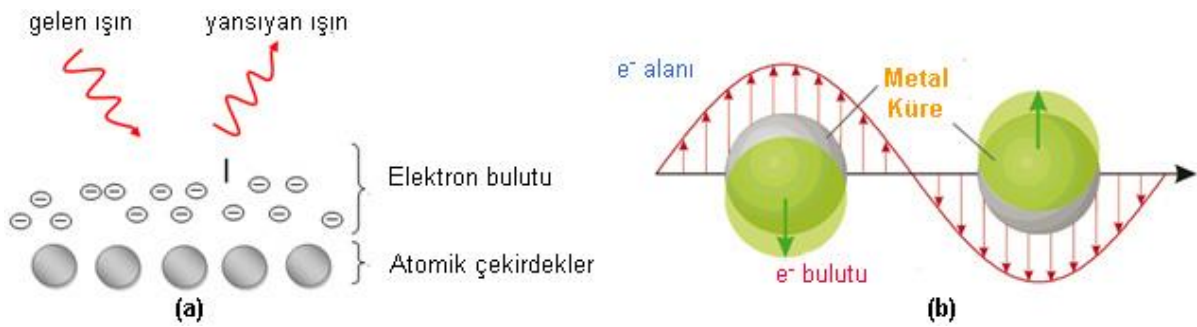
2.8.2. Neden Altın Nanopartiküller

AuNP görünür bölgede ışığı güçlü olarak absorbe eder ve saçar. Ayrıca boyut, şekil ve yoğunluk özelliğine göre ışığa farklı kolorimetrik yanıtlar verir. AuNP'lerin bu özelliğinden nano ölçekte yararlanılmaktadır. Başta biyosensör ve görüntüleme uygulamaları olmak üzere AuNP elektronik ve optik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Şekil 2.15' te AuNP'lerin büyüklüğüne göre saçtıkları ışınların renkleri görülmektedir. AuNP'lerin bu optik özelliğinin temelinde yatan olgu ise sahip oldukları plazmon rezonans özelliğidir.



Şekil 2.15. AuNP'lerin artan partikül boyutu (üst panel [a-e] altın nanoküreler) ve uzunluk oranı (alt panel [f-k] altın nanoçubuk) özelliklerine verdiği kolorimetrik yanıtın TEM görüntüleriyle ilişkili olarak verilmesi. a-e: çap boyutu 4-40 nm arasında değişen AuNP'ler f-j: uzunluk oranı 1,3-5 nm'ye kadar değişen altın nano çubuklar k: uzunluk oranı 20 nm olan nanoçubuk ya da nanotel. Bütün TEM görüntülerinde ölçek 100 nm'dir [124].

Tüm metaller gibi altın atomlarının elektronları da çekirdeğine direk bağlanmak yerine etrafında bir elektron bulutu oluşturur (Şekil 2.16a). Bu durum metallerin neden iyi bir iletken olduğunu gösterir. Çekirdeğin etrafını saran elektron bulutu yükleri kolayca transfer eder. Bu aynı zamanda metallerin neden bu kadar parlak görüldüğünü de açıklar. Gelen ışınlar metallerin çekirdeğine ulaşmadan elektron bulutu tarafından absorbe edilir ve saçılır. Atomik çekirdekler elektron bulutu tarafından engellendiği için fotonları absorbe etmez. Sonuç olarak, metallerin parlaklığı tekrardan gözümüze yansıyan fotonların yoğunluğuyla ilişkilidir. Bununla birlikte bir foton metal atomlarının etrafını saran elektron bulutuna çarptığında madde yüzeyinde birtakım fiziksel (termal ve optik) değişimlere yol açar. Işık partiküle çarptığında yansıyarak geri döner. Bu esnada belli bir dalga boyunda gelen ışığın bir kısmı partikül tarafından emilir ve taşıdığı enerjiden dolayı elektron bulutunun titreşmesine neden olur. Elektron bulutunun titreşimi “plazmon” olarak adlandırılır. Aslında plazmon metallerde bir elektromanyetik dalga ile elektron iletimi arasındaki etkileşimden kaynaklanan optik bir olgudur. Rezonans ise bilindiği gibi bir sistemde meydana gelen titreşimlerin bazı frekans değerlerinde daha yüksek bir genlik ile salınmasıdır. İşte altın atomlarının yüzeyindeki elektronların fotonlarla çarpışması sonucu oluşan titreşim, tıpkı telli bir çalgıdaki oluşan titreşimin tel boyunca harmonik olarak yayıldığı gibi yayılır.

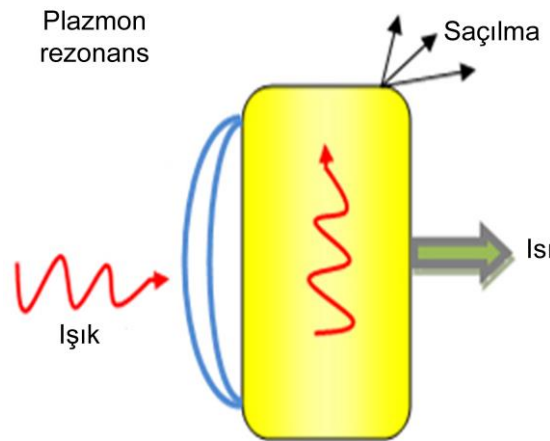


Şekil 2.16. Metalleri çevreleyen elektron bulutunun gelen ışığın atomik çekirdek tarafından absorbe edilmesini engellemesi (a). Elektron bulutundaki elektronlara çarpan ışınların titreşim oluşturması (b).

Bir metal rezonant dalga boyundaki bir ışını absorbe ettiğinde ortaya çıkan enerji elektron bulutunun titreşmesine neden olur (Şekil 2.16b). Plazmon rezonans işlemi genellikle bir materyalin yüzeyinde meydana geldiği için bu olay yüzey plazmon

rezonansı (SPR) olarak adlandırılır. Plazmon adı ise elektron bulutunun titreşimlerinden ileri gelmektedir [125]. Plazmon rezonans metaller için kızılötesi ışınım bölgesinde görülürken; AuNP için bu durum ışığın görünür (gözümüzle görebildiğimiz aralık) ve/veya yakın kızılötesi bölgesinde de gerçekleşir. AuNP ışığın görünür bölgesindeki plazmon rezonansından dolayı ışınları çok iyi emer veya saçar. Boyut, şekil ve dielektrik çevresine bağlı olan bu optik yeteneği, AuNP'lerin görüntüleme ve algılama problemleri olarak kullanıldığı uygulamalara imkan sağlar [126-129]. Ayrıca çok sayıda bağlanma kimyasıyla uyumlu olması ve zamanla oksidasyona uğramaması bakımından altın SPR esaslı sensör uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir.

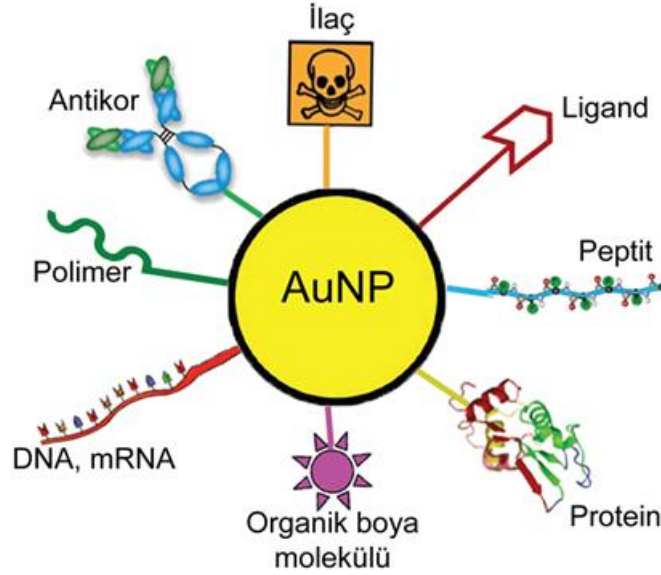
AuNP ayrıca optik enerjiyi ışınal olmayan elektron relaksasyon dinamikleri yoluyla ısıya çevirir (Şekil 2.17) [130]. Bu durum kendisine yoğun fototermal özellikler kazandırır. AuNP'lerin optik ışınım altında oluşturduğu bu hızlı bölgesel ısınma etkisi özellikle kanser tedavisinde hastalıklı dokunun doğrudan yok edilmesinde, cerrahiye karşı bir alternatif oluşturur [131]. Altın nanoçubuk, nanoküre, nanokabuk ve nanokafes gibi yapılar kanser hücrelerinin fototermal olarak yok edilmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır [132].



Şekil 2.17. Altın nanoçubuktaki foto fiziksel işlemler [130].

AuNP'lerin sahip olduğu bu eşsiz optik ve termal özelliklerinin yanında *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda tercih edilmesinin bir başka sebebi de biyolojik yapılarla yüksek uyum göstermesidir. Çünkü altın soy metal olup, altın çekirdeği non-toksik özellik

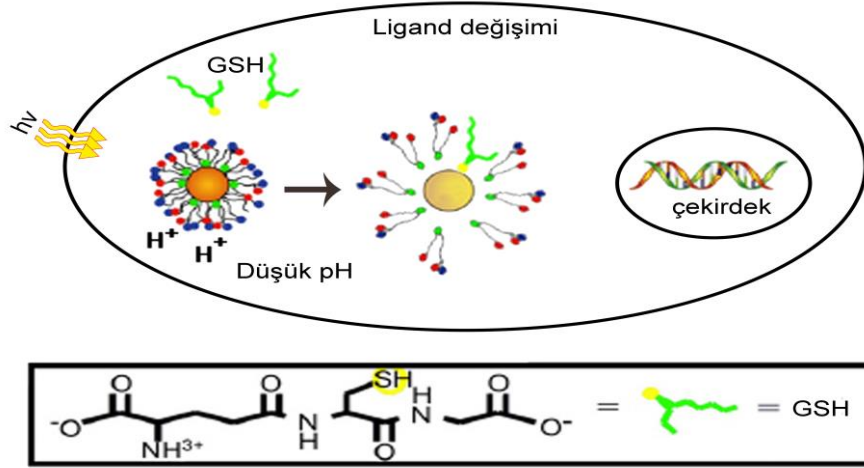
göstermektedir [133]. Altın asidik ortamdan kolay kolay etkilenmeyip [134] demir, gümüş gibi metallerin aksine oksidasyona uğramaz [135]. Hücre içine yönlendirildiğinde sentez işleminde kullanılan kaplama ajanına bağlı olarak düşük sitotoksik etki göstermesi sayesinde sağlam hücrelere zarar vermez [133, 136, 137].



Şekil 2.18. AuNP'nin çok çeşitli moleküler yapılarla konjugasyonu [132]

Makro dünyadan farklı olarak nanoboyutlarda altın yüksek yüzey reaktivitesine sahiptir. AuNP'ler elektrostatik ya da kimyasal etkileşim yoluyla anti-kanser ajanlar başta olmak üzere birçok ilaç, ligand ve terapötik etki gösteren biyomoleküle kolaylıkla bağlanabilmektedir (Şekil 2.18). Ayrıca AuNP'nin tiyol (-SH), fosfin (-PH) ve amin (-NH) gruplarına karşı yüksek afinitesi sayesinde çeşitli ligand ve biyomolekülleri (DNA, mRNA, peptit, protein, antikor vs.) kovalent olarak kendisine kolaylıkla bağlayarak hücresel ve hücrealtı (çekirdeksel hedefleme; gen taşınması ve antisens terapi) uygulamalarda yüksek seçicilik sağlamaktadır.

Hedefli AuNP'ler taşıdıkları terapötik yükleri hücre içi etkileşimle (pH, glutasyon) ya da dışarıdan verilen uyarımlarla (ışınım) hedef doku ve hücrelere bırakabilmektedir [138-140] (Şekil 2.19). Ayrıca yüzey modifikasyonu sayesinde AuNP'lerin oluşturduğu biyomoleküler yapıların *in vivo* farmakokinetik, biyodağılım ve sirkülasyon süresi yükselmektedir [141].



Şekil 2.19. AuNP'nin taşıdığı terapötik ajanları; düşük pH, glutasyon (GSH) ya da ışımaya uyarılarak serbest bırakması [142].

NP yüzeyine iliştirilen ligandlar, membran reseptörleriyle etkileşip NP'lerin hücre zarından geçerek sitoplazmaya yönelmesini sağlar. Bu yüzden, NP yüzeyindeki ligand sayısı, NP'lerin hücre zarından geçişinde çok önemlidir. Ortalama ~110 ile 4800 altın atomu içerecek şekilde çekirdek çapı 1.5-5.2 nm aralığında değişen AuNP'lere tek katmanda 53-520 alkantiyolat zinciri iliştirilmiştir [143]. Diğer bir çalışmada 2 nm çapındaki AuNP yüzeyine 70 çift paklitaksel antikanser ilaç molekülü bağlanmıştır [144]. Nanoboyutlarda artan yüzey alanı ve hedefli taşıma sayesinde AuNP'ler düşük ilaç dozlarında bile üzerine iliştirilen ilaç moleküllerine bağlı olarak yüksek konsantrasyonlar oluşturabilmektedir.

AuNP'ler nispeten kolay üretilmekte, şekil, boyut ve yüzey özellikleri kontrol edilebilmektedir. Ayrıca, ek hiçbir kaplama ajanı gerektirmeden yüzey yük ve hidrofobisite gibi yüzey özellikleri ayarlanabilmektedir [145]. 2-150 nm arası boyutlarda çubuk, küre, kabuk vs. gibi şekillerde sentezlenen partiküller, optik mikroskop altında başka hiçbir boyar madde olmadan görüntülenmektedir. 20 nm'nin üzerinde olan partiküller ise doğrudan faz farkı yani Diferansiyel İnterferans Kontrast (Differential Interference Contrast-DIC) mikroskobu ile görüntülenebilmektedir [146]. Karanlık saha mikrokopisinde (Dark Field Microscopy-DFM) AuNP'lerden yayılan tek bir ışın optik mikroskop ile algılanabilmektedir. Bu sayede 20-30 nm'den büyük partiküller doğrudan görüntülenebilir. Görünür ışık ile kullanılabilmelerinin yanı sıra

AuNP'ler X-ışını ve elektron dalgaları ile görüntüleme işlemlerinde de kullanılır. Yüksek moleköl ağırlığı sayesinde kontrast farkı oluşturarak geçirimli elektron mikroskobunda (TEM) görüntüleme yapılmasına da olanak sağlar. Bilindiği gibi floresans, metale çarpan ışığın daha yüksek bir dalga boyunda geri yansması durumudur. Kararlı sinyal şiddetleri, AuNP'lerin floresans özeliğini kaybetmemesinde önemli rol oynar.

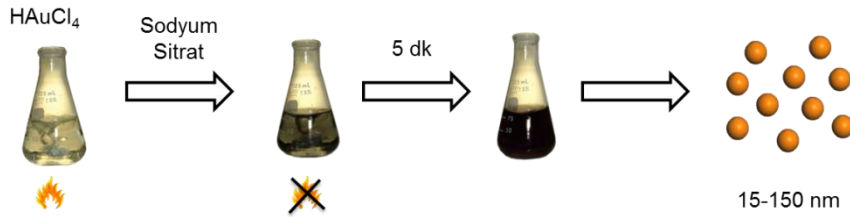
Kısaca AuNP'ler; nispeten kolay hazırlanan, güçlü ışık absorpsiyonu ve saçılımı olan, ışık kararlılığına sahip, toksik etkisi olmayan, antikorlara ya da proteinlere kolay bağlanabilme ve buna ek olarak ayarlanabilir optik özellikleriyle hipertermi için de umut verici araçlardır.

2.8.3. AuNP Sentezi

AuNP sentezinin modern çağı, koloidal altın solüsyonlarının altın kütlesinden farklı özelliklere sahip olduğunu ilk olarak gözlemleyen Micheal Faraday'ın 150 yıl önce yaptığı çalışmalarla başlar. Küresel ve küresel formda olmayan AuNP sentezi için güvenilir ve yüksek verimli metotlar ise geçen yarım asırda geliştirilmiştir [118]. Günümüze kadar ulaşan tüm yöntemlerdeki ortak vurgu ise boyut kontrollü tekil dağılımlı partiküllerin üretilmesidir.

Birkaç nanometreden birkaç yüz nanometre ölçek aralığına kadar AuNP sentezinin sulu çözeltilerde olduğu kadar organik çözücülerde de gerçekleştiği bilinmektedir. Tipik sentez mekanizması ise değişik koşullar altında $AuCl_3$ türevi altın tuzlarının indirgeme ajanı ilavesiyle birlikte indirgenmesi ve Au atomlarının çekirdeklenerek partiköl formasyonu göstermesidir. Bu yaklaşımda ayrıca AuNP yüzeyine adsorbe olan ya da kimyasal olarak bu yüzeye bağlanan bir sürfaktan ajan gereklidir. Stabilizatör olarak da adlandırılan bu yüzey etken madde genellikle yüklü bir moleküldür. Yüzeylerini kaplayan bu ajan sayesinde aynı yükte yüklenen NP'ler birbirlerini iterler ve bu sayede kümeleşmeleri engellenen partiküller koloidal olarak stabilitelerini korurlar. AuNP'ler ayrıca lazer ışımasıyla yüzey aşındırma ve sonoliz yöntemleri ile de sentezlenmektedir. AuNP üretim yöntemlerindeki farklılıklar ise indirgen/stabilizatör ajanlar, reaktif ekleme sırası, fiziksel parametreler (konsantrasyon, ısı ve karıştırma hızı) ve sonuçta ortaya çıkan partiköl boyutundan kaynaklanmaktadır [147].

Sitrat sentezleme işleminde en yaygın kullanılan indirgen ajanlardan biri olup, sitrat varlığında hemen hemen aynı tip ve boyutta AuNP'ler üretilebilmektedir. "Turkevich" metodu olarak adlandırılan bu metotta hidrojen tetrakloroaurat III (HAuCl_4) tuzu sodyum sitrat ile indirgenir [148, 149] (Şekil 2.20). Sitrat sadece altın tuzunu indirgeyip çekirdeklenmesini tetiklemekle kalmayıp, partikül yüzeyine tutunarak partiküllerin negatif yüklenmesini ve böylece koloidal stabilizasyonu sağlar. Dolayısıyla bu sentez sürecinde sitrat hem anyonik stabilizatör hem de indirgeme ajanı olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde altın/sitrat oranının kontrol edilmesiyle boyutu 15-150 nm arasında değişen partiküller üretilebilmektedir. Farklı kolloid solüsyon renkleri partikül boyutuna göre açık şarap renginden (daha küçük) mor'a doğru (daha büyük) değişkenlik gösterir. Daha da büyük partiküller ise sarı ışık saçır. Genel olarak ortama daha az sitrat verildiğinde daha büyük NP'ler elde edilir. Bu metodun en büyük sınırlılığı ise çözücü olarak su kullanma zorunluluğu ve tekil dağılımlı partikül veriminin düşük olmasıdır.

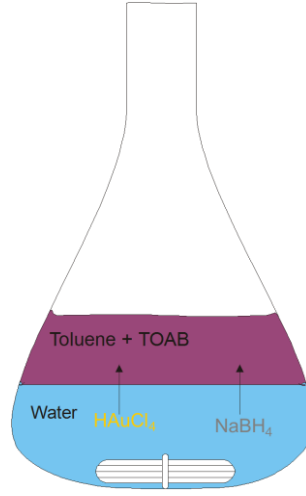


Şekil 2.20. Sitrat stabiliteli AuNP'lerin sulu çözeltilerde sentezi

AuNP sentezi için izlenen bir diğer yöntem ise çözücü olarak organik bileşiklerin kullanıldığı faz transfer yöntemidir. Organik çözücülerde gerçekleşen sentez basamağında indirgeme ajanı, stabilizatör ajandan farklı bir maddedir. Sulu çözeltilerde gerçekleştirilen sentez işlemi sonucunda genellikle küresel formda AuNP sentezlenirken, faz transfer yöntemi ile gerçekleştirilen sentez işleminde küre, çubuk ya da kabuk gibi farklı geometrilere sahip AuNP sentezlenebilmektedir [150, 151].

Faz transfer yöntemlerinden en bilineni Brust yöntemidir. Brust yöntemi 1857 yılında Faraday tarafından kullanılan iki fazlı yöntemden esinlenerek HAuCl_4 'ün tiyol

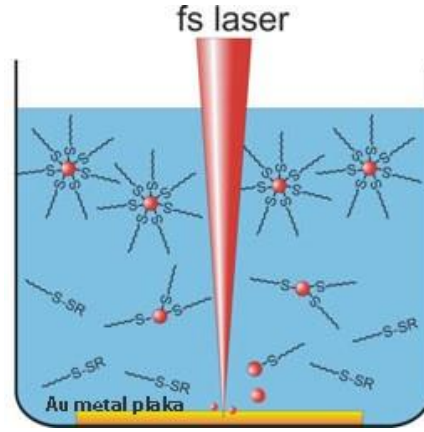
kaplama ajanı varlığında sodyum borhidrür (NaBH_4) ile bifazik olarak indirgenmesidir [152, 153] (Şekil 2.21).



Şekil 2.21. Faz transfer yöntemi ile AuNP sentezi

Bir başka yöntemde toluen organik çözücüsüne eklenen tetraoktilamonyum bromür (TOAB), kloroaurik asit (HAuCl_4) ile etkileştirilir. Daha sonra ortama ilave edilen sodyum borhidrür Au^{+3} iyonlarını Au^0 'ya indirgeyip Au atomlarının çekirdeklenmesini ve nano kristal formasyonu oluşturmasını sağlar. Bu sentez yönteminde sodyum borohidrür hem antikoagülan hem de indirgeyici ajandır. TOAB ise hem faz transfer katalizörü hem de stabilize edici ajandır. Bununla birlikte TOAB AuNP'ye güçlü bir şekilde bağlanamamaktadır. Bu yüzden kolloidal solüsyon hazırlandıktan 1-2 hafta sonra AuNP'ler kademeli olarak kümeleşip, çökmektedir. Bunu önlemek için sentez sırasında ortama güçlü bir bağlayıcı ilave edilmektedir. Tiyol AuNP yüzeyine kovalent bir şekilde bağlanarak yüksek stabilizasyon oluşturmaktadır. Bu sayede tiyol/altın oranı kontrol edilerek çekirdek çapı 1,5-5 nm arasında değişen NP'ler üretilabilmektedir.

AuNP sentezi için diğer bir yöntem olan lazer aşındırma yönteminde kolloidal AuNP solüsyonu içerisindeki katı bir altın plaka hedefinin lazer ışımaya maruz bırakılması sonucunda oluşmaktadır [154-156] (Şekil 2.22). Tamamen fiziksel olan bu yöntem diğer kimyasal temelli yöntemlere karşı bir alternatif oluşturmaktadır.



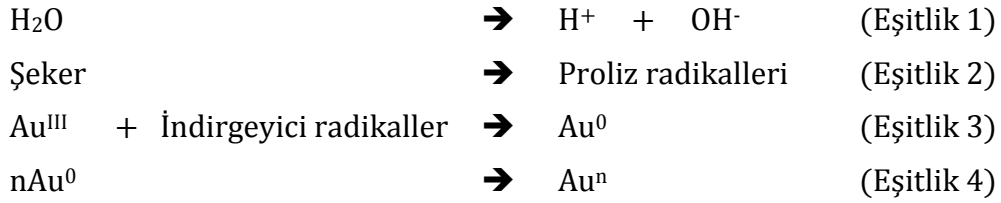
Şekil 2.22. Au plakanın lazer darbeleriyle aşındırılması yoluyla partikül sentezi [157].

Metal plakadan kopartılmak suretiyle elde edilen AuNP boyutu ve sıvı içerisindeki dağılımı lazer darbe şiddeti, lazer frekansı, ablasyon nokta büyüklüğü, ışıma süresi ve tarama hızına bağlıdır [158]. Kolloidal çözeltinin stabilitesinin korunması ve ayrıca partiküllerin biyo-işlevselliği için solüsyona farklı ligandlar ya da biyomoleküller eklenebilir. Bu yöntemle elde edilen partiküllerin boyutu bu parametrelere göre 1,5-150 nm arasında değişkenlik gösterebilmekle birlikte şekil ve boyut yönünden monodispers partikül üretiminin güçlüğü en büyük sınırlıklardandır.

Son yıllarda ultrason, metalik NP'lerin sentezinde önemli bir araç haline gelmiştir. Sıvıların ultrasonik ışınlanmaya tutulmasının akustik kavitasyon kaynaklı çeşitli fiziksel ve kimyasal etkilere yol açtığı ve uç koşullar altında kimyasal reaksiyonları yönlendirmek için eşsiz bir yol sunduğu bilinmektedir [159]. Sonokimyasal yöntem olarak da bilinen bu yöntemin avantajı tehlikesiz olması, reaksiyon hız oranı ve çok küçük metal NP'lerin üretimine olanak sağlamasıdır. Ne yazık ki sonokimyasal yöntemle hazırlanan metal NP'ler çok farklı şekil ve boyut özelliğine sahiptir. Bu problemlerin üstesinden gelmek için NP'lerin boyut ve şekil özelliğini kontrol altına almak adına sonokimyasal süreçte sürfektanlar ve buna eşlik eden alkoller kullanılmaktadır.

Yakın zamanda olumsuz çevresel etkileri minimize eden yeşil kimyanın gelişimi birlikte malzeme bilimde nano yapıların biyo-sentezi oldukça ilgi çekmiştir [160]. DNA, virüs ve şeker gibi birçok biyomateriyal bugün soy metal nano yapılar, oksitler, sülfürler ve metal alaşımlarının üretimi için biyolojik şablon gibi kullanılmaktadır [161].

Bu gelişmelere paralel olarak ultrason ve biyolojik yönlendirici ajan kombinasyonu ile AuNP sentezi ile ilgili yeni bir sonokimyasal yöntem geliştirilmiştir [161]. Ultrasona dayalı bu süreçte α -D-glikoz içeren HAuCl_4 'ün sulu çözeltisi ultrason ışımaya tutulması sonucunda altın nanokemerleri sentezlenmektedir. Bu süreçteki sentez prosedürü aşağıda özetlenmektedir.



α -D-glikoz'un su molekülleri kaynaklı hidrojen ve hidroksil radikalleri (Eşitlik 1), yığın su ve çöken boşluklar arasındaki ara yüzey bölgesinde glikozun doğrudan ayrışmasından doğan proliz radikalleri (Eşitlik 2) gibi primer radikallerle reaksiyonundan oluşan iki indirgeyici radikal, AuCl_4 'ün indirgenmesinde (Eşitlik 3) ve bunu takiben partiküllerin büyümesinde (Eşitlik 4) etkilidir. Bu süreç neticesinde büyüklüğü 30-50 nm'den birkaç μm 'ye değişen nano şeritlerden oluşan bir morfoloji elde edilmektedir. Bu şeritler çok esnektir ve 90° daha büyük açılarla bükülebilmektedir. Ayrıca glikoz, siklodekstrin (glikoz oligomer) ile yer değiştirdiğinde sadece küresel AuNPs elde edilmektedir. Bu durum partiküllerin bir şerit morfolojisine doğru yönlendirilmesinde glikozun gerekli bir bileşen olduğunu göstermektedir.

AuNP üretimi için bir diğer sentez yaklaşımı "Tohum büyütme (seed growth)" yaklaşımıdır. Tipik olarak bu yöntem tek fazda sentezlenen prekürsör AuNP'lerin kontrollü ve aşamalı bir şekilde büyütülmesi esasına dayanmaktadır [162, 163]. Günümüzde Au atomlarının çekirdeklenmesinin ve büyütülmesinin tekrarlı süreçlerle yapılması esasına dayanan tohumlama aracılı sentez stratejilerinin AuNP'lerin boyut ve şekil özelliklerinin tamamiyle kontrol edilmesi için çok etkili bir yöntem olduğu düşünülmektedir [162, 164]. Bilindiği gibi AuNP sentezi için en yaygın metot olan Turkevich/Frens yönteminde sıvı Tetrakloroaurikaurat (HAuCl_4) sulu ortamda tek seferde indirgenerek sitrat stabiliteli AuNP'ler elde edilmektedir. Bununla birlikte bu yöntemle elde edilen AuNP'ler boyut ve şekil yönünden polidispers yani düzensiz dağıldıkları için bu yöntemle üretilen partiküllerin üretim kalitesi oldukça düşük olmaktadır. Eş dağılımlı olmayan boyut sorununun yanında bu yöntemde 40-50 nm

apından büyük nanopartikül üretme sorunu halen büyük bir zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır [165]. Günümüzde klasik Turkevich/Frens reaksiyonuna dayalı olarak AuNP prekürsörlerinin (<15 nm) istenmeyen çekirdeklenmeler olmaksızın kontrollü olarak büyütülerek, daha büyük boyutlu sitrat stabilizeli partiküllerin elde edilebileceği üzerine halen çalışılmaktadır.

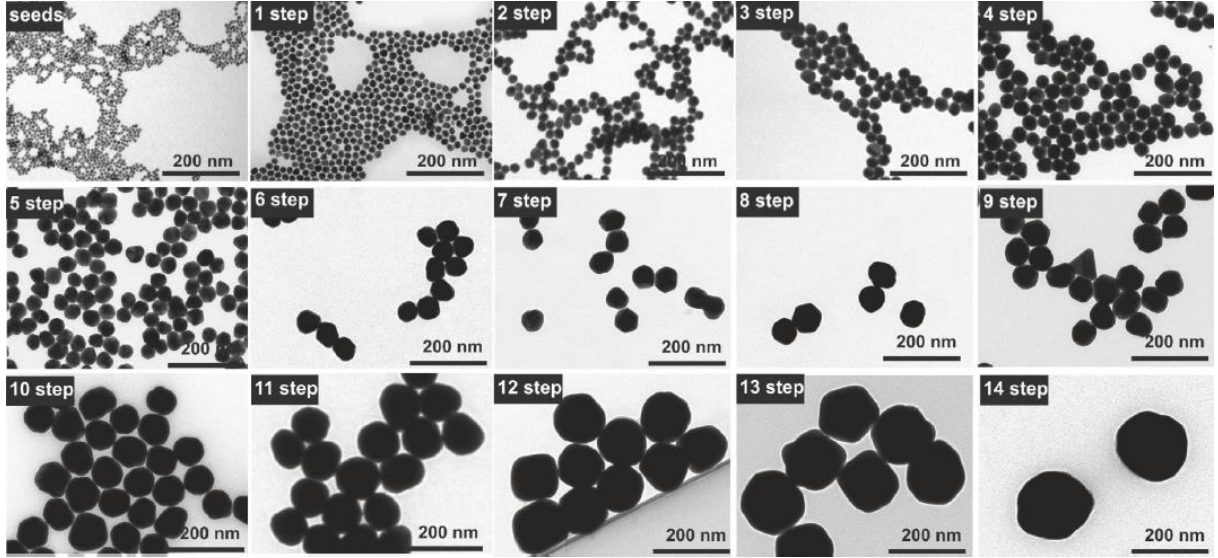
Bu yöntemin öncülerinden olan Natan ve ark. sodyum sitrat [165] ya da hidroksilamin [166, 167] gibi hafif indirgen ajanlar kullanarak AuNP tohumlarının büyütülmesiyle 100 nm çapının üzerinde AuNP'ler elde etmiştir. Elde edilen NP'ler Au⁺³' n sitrat indirgenmesiyle (Turkevich/Frens yöntemi) elde edilen NP'lerle karşılaştırıldığında fiziksel özellikleri iyileştirilmiş olsa da sentez sürecinde çubuk şekilli NP'ler ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada daha sonra indirgeyici ajan olarak askorbik asit ve katyonik sürfaktan olarak setil trimetil amonyum bromür (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide-CTAB) kullanılarak 180 nm'nin üzerinde partiküller geliştirilmiştir [168, 169]. CTAB temelli bu yöntem her ne kadar AuNP morfolojisinin kontrol edilmesine olanak sağlasa da CTAB moleküllerinin AuNP'nin yüzeyine güçlü bir şekilde tutunması, ilerleyen süreçlerde AuNP'lerin işlevselleştirilmesinde CTAB-tiyol yer değiştirme reaksiyonlarıyla zorluklar yaratmıştır [170].

Perrault ve Chan [162], Au^I iyonlarını seçici olarak Au⁰'a indirgeyen ve orta düzey indirgeyici ajan olan hidrokinon (C₆H₄(OH)₂) bileşenini kullanarak altın tohumlarının varlığında altın klorür solüsyonunu seçici olarak indirgeyerek, sırasıyla ~50, 75, 100, 125 ve 175 nm çapında partiküller üretmiştir. Ortamda sodyum sitrat gibi bir stabilizatörün varlığı partikül büyümesi kontrolüne olanak sağlamaktadır. Bu yöntemde daha az sayıda tohum kullanarak, kontrollü bir biçimde daha büyük boyutta partiküller elde etmek mümkündür. Ayrıca sentez sürecinde kullanılan sitrat konsantrasyonu (0.40-0.75  M) düşük düzeydeyken özellikle daha büyük boyutlu partiküllerin üretimi esnasında monodispersite ve kolloidal stabilitenin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Klasik sitrat stabilizeli yöntemle karşılaştırıldığında tohum büyütme yönteminin daha monodispers sonuçlar verdiği bulunmuştur [162]. Hidrokinon yöntemi bir anlamda Frens ve Turevich tarafından ileri sürülen sitrat indirgeme yöntemini tamamlamaktadır. Sitrat indirgeme yöntemiyle üretilen

partiküllerin boyutu ideal olarak 12-50 nm arasında değişkenlik gösterirken, tohum büyütme yöntemiyle en az 30-250 nm boyutunda partiküller üretilmektedir.

Tohum büyütme yoluyla AuNP sentezine yönelik bir diğer yaklaşım ise Bastus yöntemidir. Bu yöntemde uygun koşullar sağlandığında 180 nm civarına kadar iyi bir boyut dağılımı sergileyen tekdüze partiküller elde etmek mümkündür [163]. Dahası işlemler hızlı gerçekleşip, partikül stabilizasyonu sağlandığı için üretilen partiküller ligand değişimi için son derece uygundur. Tek düze partiküllerin üretilmesi için Au tuzuna eklenen sodyum sitrat miktarı, solüsyonun pH'sı ve tohum büyütme sürecinde kullanılan partikül konsantrasyonu çok önemlidir. Tohum konsantrasyonunun çok düşük olmaması önemlidir, çünkü bu duruma bağlı olarak istenmeyen çekirdeklenmeler oluşmakta bu da partiküllerin tekdüze şekil ve boyut dağılımına zarar vermektedir. Bastus yönteminin esasını sodyum sitrat tarafından Au^{+3} 'nin yüzey katalizli indirgenmesi yoluyla önceden sentezlenen AuNP'lerin büyütülmesi ve homojen büyüme süreçleri esnasında istenmeyen çekirdeklenmelerin önlenmesi oluşturmaktadır. Bu yöntemin başarısı reaksiyon koşullarının (sıcaklık, pH seviyesin ve tohum konsantrasyonu) ayarlanmasıyla büyüme sürecinin kinetik kontrolüne dayanmaktadır. Bu süreç birçok açıdan oldukça önemli sonuçlar üretmektedir; (i) yüksek tekil dağılımlı partikül üretimi, (ii) daha küçük partiküllerden önceden belirlenen boyutta daha büyük partiküller üretilmesine olanak sağlaması, (iii) boyut dağılımı daha dar fakat partikül konsantrasyonu yüksek solüsyonların hazırlanmasına olanak tanınması böylece biyolojik ve biyomedikal kullanım için daha umut verici olması. Bastus yönteminde prekürsör AuNP tohumları Turkevich/Frens yöntemine benzer fakat çözücü sırası farklı olacak şekilde sulu ortamda kaynayan sodyum sitrat solüsyonuna $HAuCl_4$ ilavesiyle üretilir. $HAuCl_4$ eklemenden önce sodyum sitratın kaynama süresi değiştirilerek, tohum boyutunun ayarlanması mümkündür. Daha sonra 30 nm'ye kadar NP üretim sürecinde AuNP tohumları kullanılarak tekrarlayan adımlarda bu tohumların üzerine sıcaklık ve konsantrasyon kontrollü şekilde sırasıyla önce sodyum sitrat, daha sonra $HAuCl_4$ eklenerek partikül boyutu büyütülür. Yaklaşık 14-15 tekrar sonunda partikül boyutu kademeli olarak artar. 30 nm'den daha büyük NP (180 nm'ye kadar) elde etmek için ise tohum olarak kullanılacak AuNP'lerin üzerine önce $HAuCl_4$ ve daha sonra saf su ve sodyum sitrat eklenir. Bu işlemlere istenilen partikül boyutu elde edilene kadar tekrarlanır. Tohum büyütme sürecindeki

her bir tekrar sonucu tohum üzerine eklenen altın tuzu konsantrasyonuna göre NP'lerin boyutu artırılıp, azaltılabilir (Şekil 2.23). Genel anlamda tohum üzerine eklenen daha az miktar Au tuzu, daha büyük AuNP'lerle sonuçlanmaktadır. Çünkü optimum düzeyden daha yüksek HAuCl_4 tuzu, tohumların yüzeyini sarmak yerine istenmeyen çekirdeklenmeler ile çok küçük boyutta partiküllerin ortaya çıkmasına neden olabilir [163].



Şekil 2.23. Her bir büyüme aşamasından sonra boyutu giderek artan AuNP'lerin TEM görüntüsü [163]

2.8.4. AuNP'lerin Yüzey Modifikasyonu

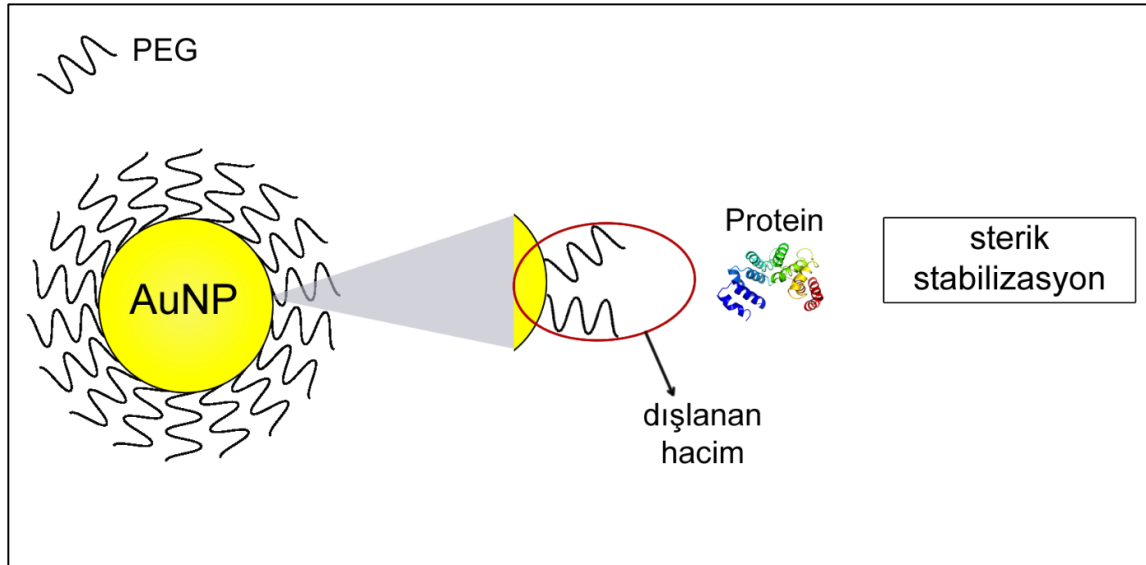
Yüzey modifikasyonu NP'lerin çevreyle etkileşiminin ne şekilde gerçekleşeceğini belirleyen bir işlemdir. Bu nedenle hücrel etkileşime giren çoğu inorganik NP biyoyumluluk, moleküler tanıma bölgesi ile biyolojik hedef arasında güçlü afinite, taşıma kapasitesi artışı, yüksek koloidal stabilite, daha uzun sirkülasyon süresi, optik belirlilik ve daha düşük algılama hassasiyeti gibi birtakım gerekleri karşılamak üzere kimyasal ve biyolojik modifikasyona uğramak zorundadır [171]. AuNP'lerin yüzey modifikasyonu, sentez süreci ve sonrasında koloidal stabilitenin korunması ve kullanım alanına bağlı olarak sentez sonrası fonksiyonelleştirilmesi olmak üzere iki başlık altında incelenebilir.

2.8.4.1. Kolloidal Stabilitenin Korunması

Altın yüzeyinin nanoboyutta oldukça reaktif olması AuNP'lerin kümeleşme sorununu da beraberinde getirmektedir. Ayrıca ortam ya da çözücü madde, zaman, pH ve sıcaklık gibi etmenler de partiküllerin kümeleşip, çökmesine neden olmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için altın iyonlarının partikül yüzeyine tutunarak çapraz bağlanma ve elektrostatik yük değişimi aracılığıyla kümeleşmeyi engelleyen stabilizatör bir ajanın varlığında indirgenmesi veya sentez sonrası NP yüzeyinin pasifleştirilmesi gibi yaklaşımlar kullanılmaktadır [172]. Sentez sürecine dahil olan stabilizatör ajanlar indirgenme sürecinde altın atomlarının yüzeyine adsorbe olmak ya da kimyasal olarak bağlanmak suretiyle hem partikül boyutunun istenilen düzeyde kalmasını sağlamak hem de partiküllerin sentez sonrası kümeleşmesi ve çökmesine engel olmak için kullanılmaktadır. Kolloidal stabilitenin sağlanması için partiküller arası bir itme kuvvetinin oluşturulması gerekmektedir. Bu kuvvet teorik olarak yüzeydeki elektrostatik itme, sterik dışlama ya da bir hidrasyon tabakasıyla gerçekleştirilebilir. AuNP yüzeyinin kaplanması için en yaygın olarak kullanılan stabilizatör/pasifleştirici ajanlar sitrat, tiyol, karboksilat, pridin, fosfin, amin, polimer (Poli-vinil alkol (PVA), Polivinil pirolidon (PVP), Polietilen glikol (PEG) vb.) ve polisakkarit (dekstran, heparin, kitosan vb.) gruplarıdır. Sulu çözeltide gerçekleştirilen sentez işleminde yaygın olarak kullanılan sitrat hem altın tuzunun indirgenmesinde indirgen ajan hem de sonrasında yüzey aktif madde gibi partiküllerin etrafını sarıp, negatif yükü sayesinde partiküller arasında elektrostatik itme gücü oluşturarak kolloidal kararlılığı sağlayan bir stabilizatör gibi kullanılmaktadır.

Altın yüzeylere olan doğal ilgisi nedeniyle tiyol grupları altın-sülfür bağları (-SH) ile NP'lere güçlü bir şekilde bağlanarak kararlı nanoyapılar oluşturur. Çoğunlukla organik çözücüde gerçekleşen sentez işleminde yüzey aktif madde olarak kullanılan tiyoller yer değiştirme tepkimeleri sayesinde faz (sulu-organik) geçişlerinde ve AuNP'lerin fonksiyonelleştirilmesinde kolaylık sağlar. Tiyol gibi anyonik karboksilat gruplar, güçlü elektrostatik stabilizasyonu sayesinde özellikle de küçük boyutlu AuNP'lerin stabilizasyonu için kullanılmaktadır. Sulu sentez reaksiyonlarında kullanılan stabilizatörlerden olan PVA, PVP ve PEG gibi polimer grupları NP'lerin uzun süre stabil kalmasını sağlar. Özellikle de bir ligand olarak da kullanılan PEG sterik etkiden dolayı birbirlerini iterek AuNP'lerin kolloidal kararlılığın uzun süreli olmasını sağlar.

Sterik stabilizasyon esasen hacim dışlama ve hacim sınırlama olmak üzere iki olguya dayalı önemli bir faktördür. PEG ile kaplı bir yüzeye bir protein yaklaştığında iki süreç düşünülebilir. Hacim sınırlaması teorisine göre protein polimer tabakasını geçemez ve bu hacim sıkıştırılmayla azaltılır. Bu durum proteinin reddedilmesine yol açar ve entropik stabilizasyon olarak adlandırılır [173]. Hacim sınırlamanın aksine, entalpinin katkısı ihmal edilirse, hacim dışlama teorisine göre protein polimer tabakası ile temas kurar ve içerisine girebilir. Kısacası protein adsorpsiyonunu engelleyen serbest entalpi artışı ile sonuçlanır. Yüzey yoğunluğundaki bir artış, yani yüzey başına bağlı PEG sayısı, proteinin direncini artırır. Bu, PEG zincirlerinin gerilmesine bağlı polimer fırçası oluşumundan kaynaklanmaktadır ve sterik itilme maksimize edilir.



Şekil 2.24. Sterik stabilizasyon mekanizması

PEG moleküllerinin sıkıştırılması sonucunda oluşan entropi kaybından dolayı sterik stabilizasyonun sağlanması Şekil 2.24'te görülmektedir.

PEG'ler suda çözünebilen, toksik ve immunojenik olmayan ve biyoadeziv polimerlerle birlikte kullanıldığında adeziv özelliği arttıran polimerlerdir. PEG ile oluşturulan taşıyıcı sistemin yüzeyine proteinin yapışması engellenir ve böylece taşıyıcının mononükleer fagositik sistem (MPS) tarafından tanınmasını önler. Dolayısıyla PEG içeren taşıyıcı sistemler sistemik sirkülasyonda daha uzun zaman kalarak ilacı salabilirler [174]. PEG immun sistemden kaçabilme özelliğinden dolayı yaygın olarak kaplama ajanı ya da kimyasal olarak partiküllere bağlanmak için kullanılmaktadır [175]. PEG ligandları

sayesinde son derece kararlı, suda çözünebilir, pH ve iyonik güç değişimlerine dayanıklı partiküller elde etmek mümkündür [176].

Son zamanlarda yeşil sentez yöntemi olarak da adlandırılan yüksek biyo-uyumluluk gösteren polisakkaritlerin yüzey aktif madde olarak kullanıldığı gliko-AuNP'ler üretilmektedir. Genellikle sulu sentez reaksiyonlarında Au tuzlarının indirgenmesinden sonra gerçekleştirilen bu stratejide stabilizatör ajan olarak dekstran ve kitosan gibi polisakkaritler kullanılmaktadır.

2.8.4.2. Fonksiyonelleştirme

AuNP'ler iletim bandında bulunan altı serbest elektron sayesinde çok çeşitli fonksiyonel kimyasal gruplarla ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$) ve organik bileşenlerle (hidrokarbon ya da PEG) modifiye edilmektedir. Kullanım alanına bağlı partiküller aktif kimyasal gruplar üzerinden ya da elektrostatik etkileşimler yoluyla oligonükleotit, peptit, protein ve antikor gibi biyomoleküllerle kompleks oluşturarak daha yüksek işlevsellik sergileyebilir. Ayrıca görüntüleme uygulamalarında yüksek belirlilik sağlamak üzere floresan gibi organik boya moleküllerini kararlı bir şekilde bağlayabilir.

2.8.4.2.1. Adsorbsiyon

Biyolojik moleküllerin elektrostatik etkileşimler yoluyla AuNP yüzeyine tutunmasıdır. Fizikokimyasal koşullar altında pozitif ya da negatif yüklü biyomoleküller (nükleik asitler, proteinler) yüzey yüküne bağlı olarak AuNP'lere tutunabilir. Ayrıca özel fonksiyonel gruplar ($-\text{SH}$) aracılığıyla biyomoleküllerin doğrudan AuNP'lere bağlanması da mümkündür. Örneğin sitozin'in amin uçlarındaki tiyol grupları peptit ve proteinlerin, tiyol grubu ile sonlanan DNA oligonükleotitlerin spesifik olmayan etkileşimler yoluyla AuNP yüzeyine bağlanması gibi.

İyonik etkileşimler yoluyla oluşturulan AuNP biyoçiftleri ortam şartlarındaki değişime oldukça hassastır. Özellikle pH ve tuz konsantrasyonundaki değişim biyokonjugasyonların stabilitesini etkileyebilir [177]. Ayrıca, biyomoleküllerin NP yüzeyine doğrudan adsorbsiyonu nispeten zayıf ve spesifik olmayan bir birleşme

olduğu için sınırlı bir kullanım alanına sahiptir. Çünkü spesifik olmayan bir etkileşimden doğan sinyaller belirlenmek istenen özelliğin ölçülmesini engelleyebilir [177].

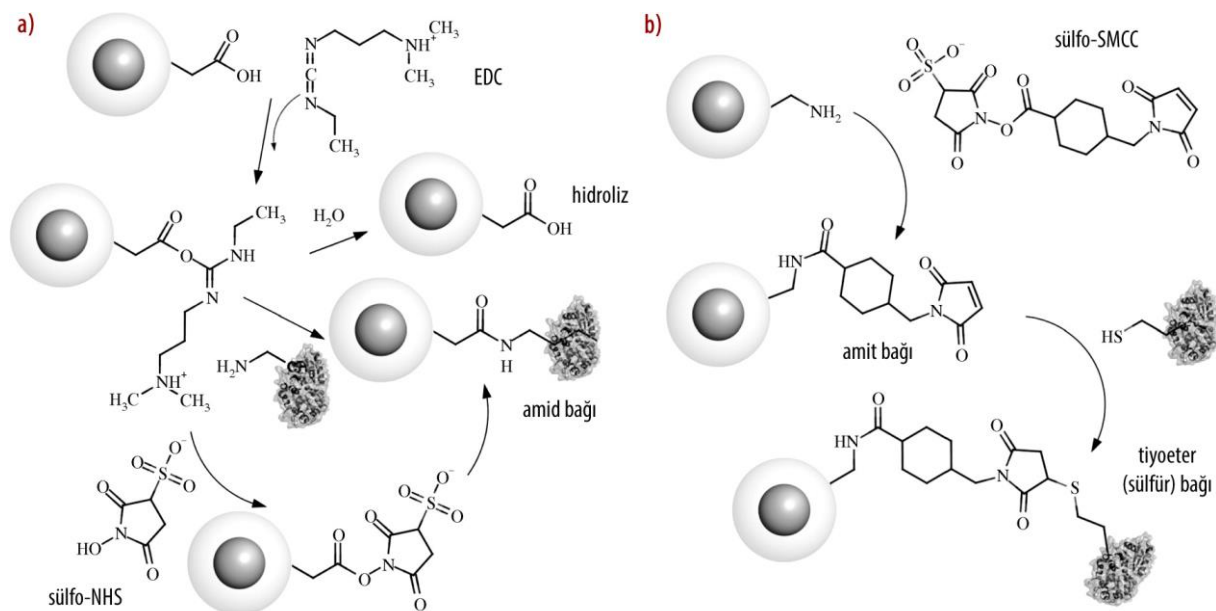
2.8.4.2.2. Kovalent Bağlanma

Biyomoleküllerin spesifik olarak AuNP'e bağlanması, bu şekilde daha kararlı biyokonjugasyonların elde edilmesini sağlar. Kovalent bağlanma, farklı eşleşme stratejileri aracılığıyla AuNP'lerin yüzeyindeki karboksil, amin ya da tiyol grupları aracılığıyla biyomoleküllere bağlanmasını kapsar.

Amin uçları karboksil gruplarıyla reaksiyona girip, çapraz bağlayıcı moleküller aracılığıyla (genellikle karbodiimit) sıfır uzunluklu amid bağlarını oluşturur. Suda çözünen bir karbodiimit olan EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit) bu yöntemde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle söz konusu strateji EDC kimyası olarak da adlandırılmaktadır. EDC konjugasyon stratejisiyle çok çeşitli protein, enzim ve antikorlar, aminle fonksiyonelleştirilen nükleik asitler karboksil uçlu AuNP'lere kovalent olarak bağlanabilir.

EDC stratejisinde partikül üzerindeki karboksil gruplarıyla etkilşerek aktifleştirilmiş karboksil grubu olarak adlandırılan kararsız bir ara ürün oluşturur. Bu ara grup hidrolize olabileceği gibi kararlı bir amit bağıyla doğrudan biyomolekül üzerindeki primer amin grubuyla reaksiyona girebilir. Bu aşamda isteğe bağlı olarak n-hidroksisüksinimid (NHS) ya da sülfon-NHS gibi aktif ester bileşenleri reaksiyona dahil edilebilir. NHS ya da sülfon-NHS, EDC bağlanma reaksiyonlarının etkinliğini arttırmak, ara suksinimit ester formasyonu aracılığıyla stabilizasyonu sağlamak ya da karboksilleri amin-reaktif Sülfon-NHS esterlerine dönüştürmek için kullanılmaktadır. Hem NHS hem de sülfon-NHS hem suda hem de organik çözücüler içinde çözünebilir moleküller olmasına rağmen NHS ile aktive edilmiş partiküllere modifiye edilen karboksilat moleküllerinin suda çözünürlüğü azalırken, yüklü sülfonat grubu nedeniyle sülfon-NHS ile aktivasyon karboksilatın suda çözünürlüğünü arttırmaktadır. Bu stratejinin farklı bir durumu da primer aminlerin partikül yüzeyinde olması durumunda süksinimid ester ile aktive edilmiş PEG bileşikler kullanılmak suretiyle partikül

Karboksil grubundan farklı olarak primer amin gruplu partiküller seçici olarak biyomoleküllerle konjuge edilebilir. Bu stratejide reaksiyon, maleimit ve iyodoasetamit gibi aracı aktif bileşenlerin varlığında hızlıca başlatılır. En yaygın olarak kullanılan bağlayıcı molekül sülfo- sukkinimidil 4-(N-maleimidometil) siklohekzan 1-karboksilatır (sülfo-SMCC). Sülfo-SMCC bir ucunda sülfo-NHS grubu diğer ucunda ise tiyol gruplarına karşı oldukça reaktif olan maleimit içeren heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıdır (Şekil 2.25). Bu reaksiyon zincirinden yararlanarak amin-işlevli AuNP'ler tiyol modifiyeli peptit, DNA, sistein üzerinden proteinlerle konjuge olabilir.



AuNP'lerin biyokonjugasyonu için diğer bir yaygın yaklaşım "Click" kimyasıdır. Bu yöntemde azit ve terminal asetilenik gruplar arasında Bakır (I) katalizli 1,2,3-triazol formasyonu kullanılarak fonksiyonelleştirilen AuNP'ler ve enzimlerin kovalent olarak birbirlerine bağlanması sağlanır [179]. Güvenirlilik, özgülük ve hem organik hem de

sulu reaksiyon sistemlerine uyumluluk Click kimyasının ön plana çıkan özellikleridir. Bu yöntemin en büyük sınırlılığı ise azit ve alkin fonksiyonlu biyoaktif moleküllerin hazırlanmasının özel bir hazırlık gerektirmesidir.

2.8.5. Biyotıp Uygulama Alanları

2.8.5.1. Kanser Tedavisi

Çoğu kanser türünde en yaygın tedavi yöntemleri cerrahi olarak tümörün çıkarılması, kemoterapi ve radyoterapidir. Cerrahi yöntemin uygulanması tümörün ulaşılabilir bölgede olmasını zorunlu kılmaktadır. Kemoterapide kullanılan anti-kanser ilaçlar kanser hücrelerinin yanında sağlıklı hücrelere de zarar vermekte, ayrıca bulantı, kusma, saç dökülmesi gibi önemli yan etkilere yol açmaktadır. Radyoterapi ise ışıma rotasındaki sağlıklı dokular için oldukça invaziftir. AuNP'ler, ilaç spesifitesi ve noninvazif tedavilerin etkinliğinin artırılmasında ve yan etki profillerinin iyileştirilmesinde kullanılmaktadır.

Kanser hücreleri üzerindeki biyoışaretçileri seçici olarak hedefleyen ve boya gibi güçlü foto absorblayıcı maddeleri taşıyan AuNP'ler sayesinde bu hücrelerin belirliliği artmakta ve hipertermi aracılığıyla sağlıklı komşu dokulara zarar vermeksizin kanser dokularının yok edilmesini sağlayacak şekilde lazer dozu düşürülebilmektedir [180]. Çoğu katı tümör hücresinde hücre membranının dış yüzüne lokalize olan Epidermal Büyüme Faktörü reseptörünün (EGFR) aşırı ekspresyonu söz konusudur. El-Sayed ve ark. [181] EGFR'ye karşı "anti-EGFR" olarak adlandırılan antikorları 35 nm çapındaki AuNP'lere bağlayarak hazırladıkları biyokonjugatlarla kanser hücrelerini seçici olarak hedeflemiştir. İki oral skuamöz karsinoma (HSC313 ve HOC3 Klon 8) ve tümörjenik olmayan keratinosit epitel hücre hatlarının (HaCaT9) kullanıldığı çalışmada SPR absorbans ölçümleri ve ışık saçılım görüntülerine göre AuNP biyokonjugatları kanser hücrelerinin yüzeyine yaklaşık 6-7 kat yüksek afinite ile bağlanmıştır. Ayrıca sadece AuNP'lerle yapılan testlerde inkübasyon sonrası hiçbir hücre tipi için AuNP'lerin spesifik dağılım göstermediği ve kümeleşme eğilimi olduğu görülürken, AuNP biyokonjugatlarının kanser hücrelerinin yüzeyinde ve içinde yoğunlaştığı ve her üç hücre tipinde de kümeleşme eğilimi olmadığı gözlenmiştir. Araştırmacılar daha sonraki çalışmasında anti-EGFR-AuNP'lerle inkübasyon sonrası, aynı hücreler 514 nm'lik dalga boyundaki görünür argon iyon lazer ışığına

maruz bırakılmıştır [180]. AuNP'lerin kullanılmasıyla uygun lazer ışıması altında sağlıklı hücrelere zarar vermeden tümör hücreleri yok edilmiştir. Kanser hücrelerinin anti-EGFR/AuNP ile seçici etiketlenmesi sayesinde iyi huylu hücrelerle (57 W/cm^2) karşılaştırıldığında malign hücreleri yok etmek için gerekli lazer enerji ($19\text{-}25 \text{ w/cm}^2$) seviyesi yarıdan aza indirilmiştir. NP'lerin yokluğunda, Anti-EGFR/AuNP konjugasyonlarıyla kanser hücrelerinin öldürülmesi için gerekli enerji seviyesinin 4 kat (76 w/cm^2) fazla verilmesine rağmen hiçbir hücre tipinde fototermal hasar gözlenmemiştir. Bütün bu sonuçlar ışığında, düşük güçlerde CW lazer ışıması altında AuNP'lerin yeni tip seçici fototermal ajan olarak öne çıktığı görülmektedir.

2.8.5.2. Görüntüleme ve Algılama Uygulamaları

AuNP'ler floresan özelliği olmamasına rağmen, SPR sayesinde optik uyarım altında kolorimetrik kontrast sağlayabilir [182]. Ayrıca boyut, şekil, kümelenme ve dielektrik çevresine bağlı optik özellikleri, AuNP'lerin görüntüleme ve algılama problemleri olarak kullanıldığı uygulamalara imkan sağlayıp, birçok hazır testin esasını oluşturmaktadır [126-129].

Karakteristik özellikleri olan güçlü ışık absorpsiyonu ve saçılımına ek olarak, yüksek elektron yoğunluğu, kararlı ışık şiddeti ve ikincil elektronları saçma yeteneği AuNP'lerin mikroskopi (SEM, Fe-SEM vb.), fotometri ve akış sitometrisi gibi çok çeşitli tekniklerle görselleştirilmesi ve algılanmasını kolaylaştırmaktadır [183]. Günümüzde birçok sensör tipi ışık absorpsiyonu, saçılımı, floresans, yansıma oranı, Raman saçılımı ve kırılma indisi vs. olmak üzere altın ya da AuNP'lerin optik özelliklerini kullanmaktadır [183]. Boyutu 20 nm'nin üzerinde olan AuNP'ler herhangi bir boyar madde olmaksızın doğrudan DIC modlarında optik mikroskoplarda görüntülenmektedir [146]. UV ya da yakın kızılötesi ışınların yanı sıra, AuNP'ler X-ışınları ve elektron dalgaları ile görüntüleme işlemlerinde de kullanılmaktadır [184]. Yüksek molekül ağırlıkları sayesinde yüksek kontrast sağlayarak TEM'de görüntüleme yapılmasına da olanak sağlamaktadır [185]. Saçıkları ışık yoğunluğunun fazla olması nedeniyle boyutu 20-30 ile 150 nm arasında olan AuNP'lerin yerleri DFM gibi konvansiyonel optik mikroskoplarla tek tek görüntülenebilir. Buna ek olarak fototermal ve fotoakustik görüntüleme, optik koherens tomografi (optical coherence tomography-OCT), iki-foton fotoluminesans

(two-photon photoluminescence-TPPL) mikroskopi, elektron mikroskopi gibi görüntüleme teknikleriyle birlikte kullanılmaktadır [183].

Optik uyarım altında (genellikle lazer) ışığın NP'ler tarafından absorbe edilmesi NP çevresinde termal genişlemeye yol açar. Bu bölgesel ısı artışı fototermal ve fotoakustik görüntüleme olmak üzere biyo-görüntüleme uygulamalarında iki şekilde kullanılmaktadır. Isıl değişimin NP'lerin etrafındaki sıvı çevrelerinde meydana getirdiği yoğunluk dalgalanmalarının neden olduğu kırılma indisi değişimleri gibi optik parametreler DIC'e benzer hassas interferans yöntemiyle algılanabilir. Bu metal NP'lerin optik etiketler olarak kullanılmasına olanak tanır [186]. Fotoakustik ya da optoakustik görüntüme ise NP'etrafındaki sıvının ısı nedeniyle genişmesi olayını kullanır. Işık absorbanı nedeniyle yerel ısı akışı, NP çevreleyen sıvının genişlemesine yol açar ve bu da bir mikrofon aracılığıyla algılanabilecek bir ses dalgasının yaratılmasına olanak tanır [187, 188]. Örnek çeşitliği, tahribatsız analiz ve görüntüleme, derinlik analizi (< 7 cm), yüksek belirlilik ve hassasiyet, saydam olmayan maddelerin analizi, fotoakustik tekniğin en önemli avantajlarındandır. Fotoakustik teknik, sadece birkaç milimetre derinliğe penetre olabilen optik koherens, tomografi ya da konfokal mikroskopi gibi diğer optik görüntüleme tekniklerinden çok daha derine inebilen (Lazer akı zamanı 20 mJ/cm^2 'ye çıkarılırsa teorik olarak 7 cm'ye kadar) bir görüntüleme tekniğidir [189].

Görüntüleme uygulamalarında ise NP'lerin hedef bölgeye yönlendirilmesi ve burada birikmesi sağlanır. Böylece hedef bölgenin görselleştirilmesi ve gözlenmesi için gerekli kontrast sağlanmış olur. Görüntülemede dış çevrede meydana gelen değişiklikleri ölçmek adına NP'lerin özelliğinin değişmesi gerekmez. Biyolojik uygulamalarında NP'ler analit moleküllerinin varlığının tespit edilmesi ve analit konsantrasyonunun belirlenmesi adına veri sağlanmasında kullanılmaktadır. Görüntüleme uygulamalarının aksine algılama uygulamalarında NP'ler aktif haberci olarak kullanılmaktadır. Örneğin analitin varlığının altın'ın optik özelliğindeki değişim ile belirlenmesi. AuNP'lerin kendilerine özgü SPR frekans değerine (500-550 nm), yüksek molar sönüm katsayıları ve enerji bant genişliği sayesinde floresan söndürücü özelliklerine, karakteristik SERS spektrumuna, immünohistokimyasal boyanmasına,

enzim esaslı elektrokimyasal analize dayalı birçok algılama yaklaşımı bulunmaktadır [190, 191].

AuNP'ler hücresel ve moleküler görüntüleme ve algılamada kontrast ajan ve sensör olarak uzun süredir kullanılmakta, hücresel ve hücre altı seviyede biyolojik süreçlerin izlenmesi, ölçülmesi ve karakterize edilmesine olanak sağlamaktadır. Uyarım altında foto-bozunur olmaması, aktivitesini etkilemeksizin hedef biyomoleküllere güçlüce bağlanması ve çevresinden kolayca ayırt edilmesi AuNP'lerin biyo-görüntüleme ve algılama uygulamalarında kullanılmasının başlıca nedenidir.

2.8.5.3. İlaç Taşıma Uygulamaları

İlaç taşıma sistemleri olarak kullanılan nanotaşıyıcılar taşıdıkları terapötik yükten bağımsız olarak çözünürlük, *in vivo* stabilite, farmakokinetik ve biyolojik dağılım gibi özellikleri geliştirmek suretiyle ilaçların terapötik etkisini arttırabilir [192]. Bu taşıyıcılar terapötik ajanların hedefe özel olarak taşınması için platform görevi görmektedir [193]. Terapötik ajanların hedeflenerek taşınması ve hastalıklı bölgede spesifik birikimi terapötik etki gücünü yükseltip, ilaç dozlarının azaltılmasını mümkün kılmaktadır. Bu durum kovansiyonel olarak sistemik dolaşımda uzun süreli kalması için dozaja bağlı bir şekilde uygulanan ilaçlarının yol açtığı yan etkilerin azaltılması için kullanılabilir. Bununla birlikte, hedefe özel taşımanın yanında fizyolojik koşullar altında terapötik ajanların salındığı yer ve zaman terapötik etkiyi belirleyen önemli faktörlerdendir [194].

AuNP'ler ayarlanabilir yüzey işlevselliği sayesinde baştan anti-kanser ilaçlar olmak üzere birçok küçük ilaç molekülü ve terapötik etkiye sahip biyomakromolekülerin (DNA ve RNA gibi nükleik asit, peptit, protein vb.) taşınmasında kullanılmaktadır [145]. AuNP'ler taşıdıkları terapötik yükleri ortama bağlı olarak (pH [138], redoks mikroçevresi [139] ya da harici uyarımlarla (ışınma[140], sıcaklık[195]) hedef doku ve hücrelere bırakabilir. AuNP'ler hidrofobik ilaçların (paklitaksel, sisplatin, doksorubisin vb.) kapsüllenmesinde ve RES'ten kaçırılmasında kullanılmaktadır [196] AuNP'ler sitostatikler dışında antiparazitler, antienflamatuar ilaçların, pilokarpin ve insülin taşıyıcısı, aşı ve enzimlerin yardımcısı olarak da kullanılmaktadır [197]. Bazı antienflamatuarların NP'lere verilmesi durumunda etkinin 10 kat daha fazla olduğu

belirlenmiştir [198]. Bilhassa insülin taşıyan NP’lerde oral yoldan plazma glikoz seviyesinin indirgendiği gösterilmiştir [199].

Hücre içerisine hedefleme, önemi giderek artan bir araştırma alanıdır. AuNP’ler kullanılarak doku ve organ seviyesinin çok ötesinde hücresel ve hücre altı bölümlere (çekirdek [146], mitokondri [200], golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum [201]) hedefleme yapılabilmektedir. Hücre içerisinde ise genetik bilgilerin ve transkripsiyon mekanizmalarının bulunduğu çekirdek son zamanlarda üzerinde çok çalışılan hedefleme bölgesidir. AuNP’ler boyut özelliği ve yüzey modifikasyonuna bağlı olarak hücresel alım kadar RNA interferans, gen transfeksiyonu, anti-viral aktivite, anti-sens gen regülasyonu gibi çekirdeksel translokasyon uygulamalarına olanak sağlamaktadır [115]. Hastalık fenotipinin tanılanması, potansiyel ilaç adaylarının belirlenmesi ve hastalığın antisens terapi gibi yeni metotlarla tedavisi, canlı hücrelerin çekirdeğine nanomateryallerin etkili olarak taşınması ile büyük ilerleme göstermiştir.

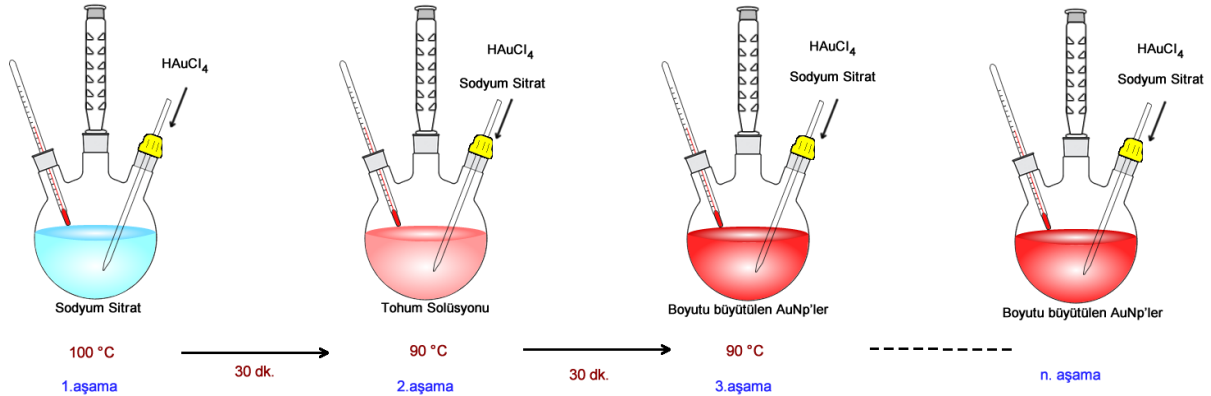
3. MATERYAL VE METOD

3.1. AuNP'lerin Sentezlenmesi ve PEG ile modifiye edilmesi

3.1.1. AuNP'lerin Sentezlenmesi

Çalışmada AuNP'lerin sentezlenmesinde Bastus yöntemi kullanıldı [163]. 20 nm boyutundaki AuNP'lerin eldesi sulu ortamda gerçekleştirildi. AuNP'lerin sentezinden önce kullanılacak tüm cam malzemeler yıkama sürecinden geçirildi. Bu amaçla kullanılacak tüm cam malzemeler önce distile su ile yıkanıp, etanol ile temizlendi. Daha sonra kral suyu olarak bilinen çözelti (3:1 oranında %37 HCl ve %65 HNO₃) ile yıkandı. Bu işlem iki kez tekrar edilip, sonunda tüm cam malzemeler distile su ile temizlendikten sonra 60 C° ta 15 dakika boyunca kurumaya bırakıldı.

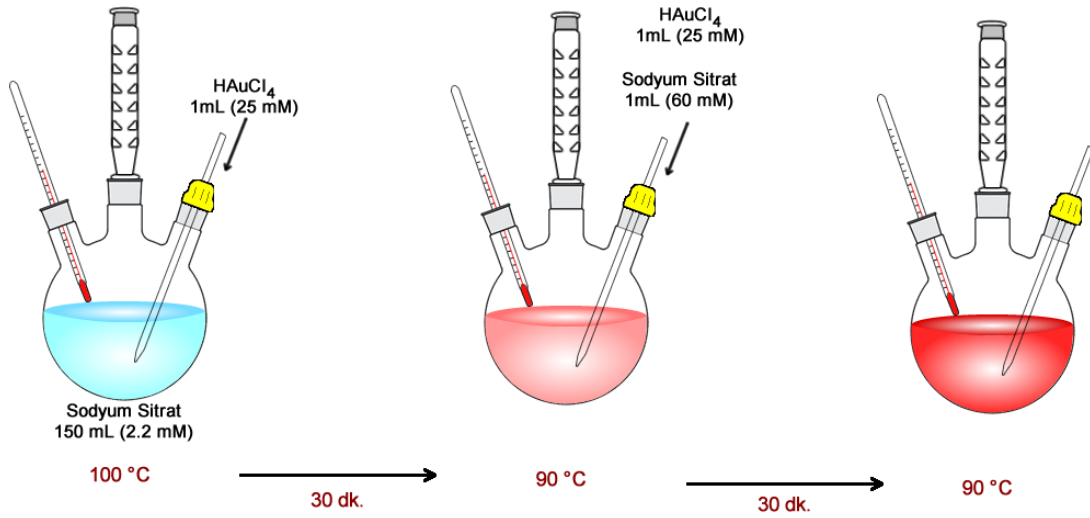
Tohum büyütme yöntemiyle AuNP sentezi genel bir tohum üretim aşamasıyla başlayan ve istenilen sayıda büyüme çevrimi ile değişen boyutlarda AuNP örnekleri hazırlanmasına olanak tanıyan bir yöntemdir. Tohum büyütme ile AuNP sentezi'nin aşamaları Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Tohum büyütme yöntemi aşamaları

Bu çalışmada 20 nm çapındaki hidrofilik sitrat stabilizeli AuNP'ler Bastus ve ark. [163] tarafından geliştirilen tohum büyüme yöntemi kullanılarak sentezlendi. AuNP'lerin sentezi için hidrojen tetrakloroaurat (III) hidrat (HAuCl₄xH₂O) ve sodyum sitrat dihidrat (Na₃C₆H₅O₇ 2H₂O) kimyasalları kullanıldı. AuNP'lerin tüm sentez aşamalarında 18.2 MΩcm⁻¹'den daha büyük bir dirence sahip saf su kullanıldı.

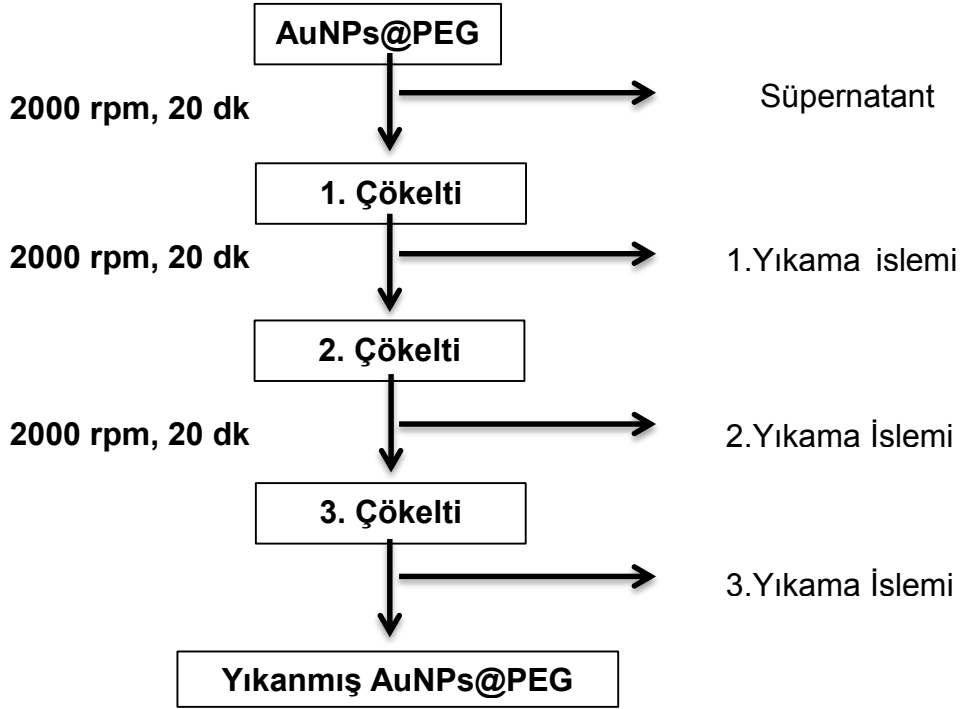
AuNP sentezlenirken 250 mL'lik balon jodede 2.2 mM'lık 150 mL trisodyum sitrat dihidrat çözeltisi manyetik karıştırıcıyla karıştırılarak 100°C'a kadar ısıtıldı. Bu işlemin sonunda 25 mM $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Çözelti 100°C'de karıştırılmaya devam edildi. Çözeltinin rengi kırmızıya döndükten sonra sıcaklık 90°C'a düşürülüp, sonraki 30 dakika boyunca sürekli olarak karıştırıldı. Son olarak sırasıyla 60 mM'lık 1 mL sodyum sitrat ve 25 mM'lık HAuCl_4 ilave edildi. Çözeltinin sıcaklığı 30 dakika sonra oda sıcaklığına düşürüldü (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. AuNP sentez şeması

3.1.2. AuNP'lerin PEG ile stabilizasyonu

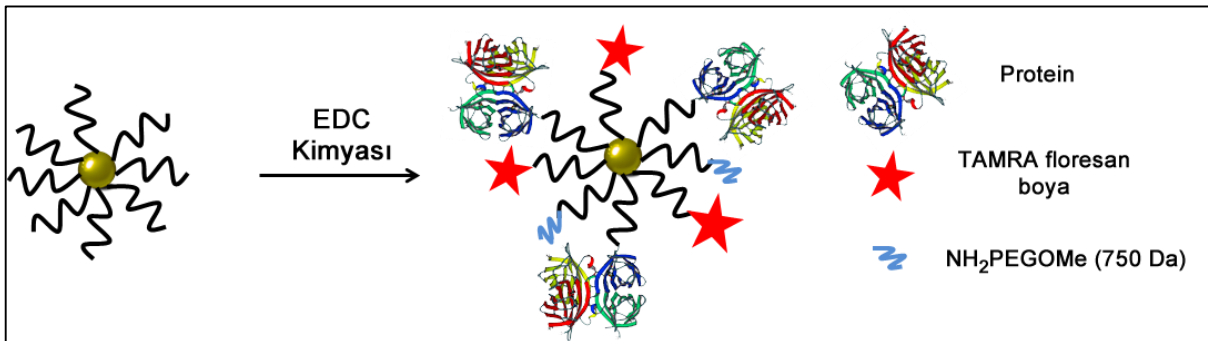
Partiküller bir ucu tiyol grubu diğer ucu ise karboksil ile sonlandırılmış heterofonksiyonel α -Merkapto- ω -karboksi PEG zincirleriyle modifiye edildi. Bunun için NP solüsyonu partikül başına 100.000 zincir olacak şekilde PEG ile inkübe edildi. Bu kaplama sürecini hızlandırmak için 1 M sodyum hidroksit (NaOH) aracılığıyla pH 12'ye çıkarıldı. Kaplama süreci sonunda PEG ile stabilizasyonu sağlanmış AuNP'lerin (AuNPs@PEG) yıkanması için ultrafiltrasyon yöntemi kullanıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. PEGlenmiş AuNP'lerin ultrafiltrasyon yöntemiyle yıkanması

3.2. AuNP@PEG'lerin BSA ve Sema 3F ile Biyofonksiyonelleştirilmesi ve TAMRA ile İşaretlenmesi

AuNP-tiyol(PEG)karboksil partikülleri kırmızı renkli tetramethylrhodamine-5-carboxamide cadaverine (5-TAMRA cadaverine; absorpsiyon/emisyon = 545/576 nm) floresans boya ve protein ile fonksiyonelleştirildi ve pozitif kontrol grubunu oluşturmak amacıyla BSA model protein olarak kullanıldı. Aktivasyon sürecinde Sema 3F ve BSA kullanıldı. Biyofonksiyonelleştirme sürecinde AuNP@PEG'lere BSA ve Sema 3F'nin bağlanması için standart NHS/EDC birleştirme kimyası kullanıldı [178].



Şekil 3.4. AuNP'lerin BSA ve Sema 3F ile fonksiyonelleştirilmesi

Bu yöntemde NP'lerin yüzeyinde bulunan karboksilik grup EDC ile MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) solüsyonu içerisinde pH 6'da aktive edildi ve PD-10 tuz giderici kolon kullanılarak büyüklükçe ayırma kromatografisiyle (SEC) temizlendi. İlk olarak hedef proteinler olan BSA ve Sema 3F ardından da TAMRA eklendi. 15 dakika bekleme süresinden sonra altın-altın ya da altın-protein etkileşimlerini maskeleyesi ve çökelmeyi önlemesi amacıyla pasifleştirilmiş bloke edici ajan (MeO-PEG-NH₂; 750 Da) ilave edildi. Oda sıcaklığında 1 saat bekleyen örnekler +4°C'de ve karanlık bir ortamda bir gece bekletildi. Süre sonunda biyofonksiyonelleştirilen NP'lerdeki ligand fazlalığı 14000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek (süpernatantta floresans spektrometreyle hiçbir boya molekülü tespit edilmeyinceye kadar) uzaklaştırıldı ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere steril edilerek hazır hale getirildi.

3.3. AuNP'ler ve Biyokonjugatların Karakterizasyonu

Temizlenen AuNP@PEG'ler, AuNP@sitrat ve partikül-protein biyokonjugasyonları TEM, UV-Vis ve Floresans spektroskopisi, DLS, ζ -potansiyeli ve jel elektroforezi gibi teknikler ile karakterize edildi.

AuNP'lerin (AuNP@sitrat, AuNP@PEG ve biyokonjugatlar) metalik çekirdeğinin şekil ve boyut dağılımını incelemek için TEM görüntülerinden yararlanıldı. Sitrat stabilizeli AuNP'ler (AuNP@sitrat) ve AuNP@PEG'lerin TEM görüntülenmesi 300 kV (JEM 3010 JEOL model) ve 120 kV'de (FEI marka Tecnai G² Spirit Biotwin model, CTEM) geçirimli elektron mikroskobu ile gerçekleştirildi. Biyokonjugatlar (AuNPs@PEG-T, AuNPs@PEG-T&BSA, AuNPs@PEG-T&Sema 3F) 120 kV'de görüntülendi. Karakterizasyonu yapılması istenilen örnekler karbon kaplı bakır ızgara üzerine damlatılarak kurutuldu ve TEM analizi yapıldı. Her örnek için en az üç TEM görüntüsü alındı. AuNP'lerin boyut dağılımı elde edilen TEM görüntülerinin Image J programında analiz edilmesiyle belirlendi ve boyut dağılım histogramı yapıldı.

AuNP'lerin ve biyokonjugatların şekil, boyut ve yüzey özelliklerine bağlı optik ve elektromanyetik karakteristikleri hakkında bilgi edinmek için UV-Vis ve floresan spektroskopisi kullanıldı. UV-Vis spektrum ölçümü, 190 ile 1100 nm dalgaboyu aralığında tek kullanımlı küvet içinde ölçüldü.

Biyokonjugatların yüzey (AuNPs@PEG-T, AuNPs@PEG-T&BSA ve AuNPs@PEG-T&Sema 3F) floresans spektrum ölçümü siyah kuartz küvet kullanılarak gerçekleştirildi.

AuNP'lerin (AuNP@sitrat, AuNP@PEG ve biyokonjugatlar) hidrodinamik çapı ve net yükünü karakterize etmek için yapılan çalışmalarda, AuNP'ler saf su veya tampon içinde koloidal duruma getirilerek Zetasizer Nano Series ZS (Malvern Instruments, UK) ile ölçüldü. Hidrodinamik çap ölçümlerinde tek kullanımlık küvetler (Malvern Instruments, UK), ζ -potansiyel ölçümlerinde tek kullanımlık kapiler hücreler kullanıldı. Ölçümler üçer tekrarlı yapıldı.

Agaroz jel elektroforezi ise biyokonjugasyon sonrası AuNP'lerin dış yüzeyinden kaynaklanan boyut ve yüzey yükü değişimlerine bağlı elektroforetik hareketliliğini belirlemek için kullanıldı [202, 203]. Tüm deneylerde yatay bir agaroz jel sistemi kullanıldı. Bunun için 150 mL'lik Tris-borat-EDTA tamponu içine %1 olacak şekilde agaroz ilave edildi. 90 °C'a ayarlanmış mikrodalga fırında karıştırılarak homojenize edildi. Daha sonra sıvı agaroz jel döküm aparatı içinde sabitlenmiş bir jel tepsisi içerisine döküldü. Tarak dişleri ortadaki yuvaya yerleştirildi ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Süre sonunda gliserol ile karıştırılan AuNP@PEG ve biyokonjugatlar kuyulara dolduruldu. Güvenlik kapağı yerleştirilerek örnekler 100 V/cm (sabit akım) 30 dakika ve 1 saat yürütüldü. Jellerin dijital görüntüleri Canon Power Shot A480 ile alındı.

3.4. AuNP'lerin Stabilitesi

AuNP'lerin kümeleşme durumlarını belirlemek için DLS kullanıldı. Küresel AuNP'lerin stabilitesini göstermek için AuNP@PEG'ler serumlu ve serumsuz besiyeri içinde 37 °C'de karakterize edildi. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.5.1. Endotel Hücrelerinin Pasajlanması

Çalışmada kullanılmak üzere insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) kültür kabının yüzeyini tamamen kaplayarak yaygın hale geldikten sonra, tripsinizasyon yöntemi ile pasajlandı. Besiyeri uzaklaştırılarak kültür kabının yüzeyi HEPES tamponuyla yıkandı. Yıkama işlemi sonunda kültür kabının yüzeyini kapatacak miktarda tripsin ortama eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması için 37 °C'de 5 dakika süreyle beklendi. Tripsin'i bloklamak, hücre membranının zayıflaması ve parçalanmasını engellemek için tripsin inhibitörü ilave edildi ve besiyeri ile toplanarak santrifüj tüpünde 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler hemositometre yöntemi ile sayıldıktan sonra belirlenen sayıda (5×10^3 hücre/mL) hücre yeterli miktarda besiyeri ile birlikte yeni kültür kabına yerleştirildi. Tüm çalışmalarda ikinci pasajdan sonraki HUVEC'ler kullanıldı.

3.5.2. A549 Hücrelerinin Pasajlanması

A549 hücreleri kültür kabının yüzeyini tamamen kaplayarak yaygın hale geldikten sonra, tripsinizasyon yöntemi ile pasajlandı. Bu amaçla besiyeri uzaklaştırılarak kültür kabının yüzeyi PBS tamponuyla yıkandı. Yıkama işlemi sonunda kültür kabının yüzeyini kapatacak miktarda tripsin ortama eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması için 37 °C'de 5 dakika süreyle beklendi. Tripsin'i bloklamak, hücre membranının zayıflaması ve parçalanmasını engellemek için besiyeri ile toplanarak santrifüj tüpünde 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler hemositometre yöntemi ile sayıldıktan sonra belirlenen sayıda hücre yeterli miktarda besiyeri ile birlikte yeni kültür kabına yerleştirildi.

3.6. AuNP@PEG ve Biyokonjugatların Sitotoksitesinin Gözlemlenmesi

AuNPs@PEG'lerin A549'da 24 saat ve HUVEC'te 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonraki sitotoksik etkisi MTT yöntemi kullanılarak değerlendirilirken AuNPs@PEG-T, AuNPs@PEG-T&BSA ve AuNPs@PEG-T&Sema 3F biyokonjugatlarının ise HUVEC'te 24 saat sonraki sitotoksik etkisi değerlendirildi.

Steril hale getirilmiş AuNP@PEG'lerin hücre kültüründe besiyeri içinde farklı konsantrasyonları hazırlandı. Bu amaçla 96 kuyucuklu kültür kabı kullanıldı. Her bir kuyucuğa 5000 hücre/mL olacak şekilde hücreler ekildi. Hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılıp hücreler farklı konsantrasyonlarda (0.2 nM, 0.4 nM, 0.6 nM, 0.8 nM ve 1 nM) AuNP@PEG içeren besiyeri ile 37 °C'de %5 CO₂ koşulunda A549 için 24 saat; HUVEC için 24 saat, 48 saat ve 72 saat boyunca inkübe edildi. Biyokonjugatların sitotoksik etkisini değerlendirilmesi için üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılan HUVEC'ler farklı konsantrasyonlardaki (0.2 nM, 0.4 nM, 0.8 nM ve 1 nM) biyokonjugatlar ile inkübe edildi.

Besi ortamında NP içermeyen grup kontrol grubu olarak kullanıldı. Biyokonjugatlar için protein ile bağlı olmayan sadece TAMRA ile işaretlenen grup kontrol NPs olarak adlandırıldı. İnkübasyon süresinin ardından tüm kuyucuklardaki kültür ortamı uzaklaştırılarak MTT testi için 100 µL besiyeri içerisinde çözülmüş 10 µL MTT solüsyonu her bir kuyucuğa ilave edildi. 96 kuyucuklu kültür kabı 4 saat 37 °C %5 CO₂ koşulunda inkübe edilerek 100 µL çözündürme çözeltisi her bir kuyucuğa eklendi ve örneklerin ölçümleri 570 nm'de yapıldı.

3.7. VEGF₁₆₅ ile Uyarılmış Endotel Hücre Modelinde Sema 3F ve Biyokonjugatların Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

Anjiyogenez modeli oluşturmak için VEGF₁₆₅ ile uyarılan HUVEC kullanıldı. Öncelikle farklı konsantrasyonlarda (0,1-60 ng/mL) VEGF₁₆₅ uygulanıp MTT yöntemi aracılığıyla gerekli olan VEGF₁₆₅ miktar aralığı tespit edildi. Belirlenen miktar VEGF₁₆₅ uygulanıp 24 saat inkübe edilen hücreler ile farklı konsantrasyonlarda (0,1-240 ng/mL) Sema 3F ve hazırlanan biyokonjugatların farklı miktarları etkileştirilerek hücre proliferasyonu üzerine etkisi MTT yöntemi ile değerlendirildi. Ayrıca Sema 3F'nin farklı konsantrasyonlarının 24 saat sonra hücre proliferasyonu üzerine etkisi A549 kullanılarak değerlendirilip hücre proliferasyonunu inhibe eden en etkin Sema 3F miktarı tespit edildi. Besi ortamında VEGF₁₆₅, NP ya da Sema 3F içermeyen grup kontrol grubu olarak kullanıldı. Biyokonjugatlar için yapılan çalışmada protein ile bağlı olmayan sadece TAMRA ile etiketlenen grup kontrol NPs olarak adlandırıldı.

MTT yöntemi için 96 kuyucuklu kültür kabı kullanıldı. Tüm çalışmalarda 5000 hücre/mL hücre ekilerek 37°C %5 CO₂ koşulunda 24 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırıldı. HUVEC üzerinde anjiyogenez oluşumunu başlatmak için yapılan çalışmalarda VEGF₁₆₅'nin farklı konsantrasyonunu içeren besiyeri ilave edilerek 24 saat ve 48 saat 37 °C 5 % CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Sema 3F'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için bu aşamada 12 ng/mL VEGF ile uyarılmış HUVEC ve A549 için Sema 3F'nin farklı konsantrasyonlarını içeren besiyeri ilave edilerek 24 saat %5 CO₂'li 37 °C'de inkübe edildi. AuNPs@PEG-T, AuNPs@PEG-T&BSA ve AuNPs@PEG-T&Sema 3F biyokonjugatları ve Sema 3F ile gerçekleştirilen çalışmada 12 ng/mL VEGF₁₆₅ ile uyarılan HUVEC üzerine farklı miktarda (50 ng/mL ve 100 ng/mL protein içeren AuNPs@PEG) Sema 3F ve BSA ile konjuge edilen AuNP'leri içeren yeni besiyeri ilave edilerek 24 saat %5 CO₂'li 37 °C'de inkübe edildi.

Tüm çalışmalar için inkübasyon periyodu ardından VEGF₁₆₅, Sema 3F ya da biyokonjugatları içeren kültür ortamı uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonra MTT yöntemi kuallnılarak 100 µL besiyeri içerisinde çözülmüş 10 µL MTT solüsyonu her bir kuyucuğa ilave edildi. 96 kuyucuklu plaka 4 saat %5 CO₂'li 37 °C'de inkübe edildi. 100 µL çözdürme çözeltisi her bir kuyucuğa eklenerek örneklerin ölçümleri 570 nm'de yapıldı.

Ayrıca MTT yöntemi ile belirlenemeyen DNA sentezine dayalı ve morfolojik olarak da mikroskop görüntüsü alınabilecek bir yöntem olan Click EdU yöntemi kullanılarak Sema 3F'lerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi değerlendirildi. Bu amaçla Click-iT® EdU Alexa Fluor 488 görüntüleme çalışmasında her bir kuyucuğa 5000 hücre/mL olacak şekilde hücreler ekilerek 24 saat 37 °C'de %5 CO₂ altında inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra HUVEC üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılıp 10 ng/mL VEGF₁₆₅ içeren besiyeri ilave edildi ve 24 saat 37 °C'de %5 CO₂ altında inkübe edildi.

Click-iT® EdU Alexa Fluor 488 görüntüleme çalışmasında, EdU çalışma solüsyonu 20 µM olacak şekilde ve Sema 3F'nin farklı konsantrasyonları besiyeri içinde hazırlandı. 2X EdU çalışma solüsyonu öncelikle oda sıcaklığına gelene kadar

beklendi. Her kuyucuk içerisine 100 µL alışma solüsyonu ve 100 µL besiyeri içinde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki Sema 3F'ler ilave edildi. Hücreler 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ altında inkübe edildi.

Hücrelerin sabitlenmesi ve permeabilizasyonu:

İnkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırıldı. PBS içerisinde hazırlanan %3.7 paraformaldehitten her kuyucuğa 200 µL ilave edilerek tüm yüzeyi kaplamasına dikkat edildi ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Fiksatif özeltisi uzaklaştırıldı ve hücreler 200 µL %3 BSA ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa PBS içerisinde hazırlanan 100 µL %0.5 Triton® X-100 ilave edilerek 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Permeabilizasyon solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler iki defa 200 µL %3 BSA ile yıkandı. İstenilen miktarda kokteyl çözeltisi hazırlanarak tüm kuyucuklara 200 µL ilave edildi ve 30 dakika oda sıcaklığında, ışıktan korunarak bekletildi. Reaksiyon kokteyl çözeltisi uzaklaştırıldı ve her kuyucuk 200 µL %3 BSA ve 200 µL PBS ile olmak üzere yıkandı.

DNA boyama:

Hoechst boyası PBS içerisinde 1:2000 oranında seyreltildi. Her kuyucuğa 200 µL Hoechst ilave edildi ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bekletilip Hoechst uzaklaştırdıktan sonra iki defa PBS ile yıkandı. Uygun miktarda Sema 3F kullanılarak meydana gelen hücre proliferasyonundaki inhibisyonunun gözlenmesi için, bölünen ve bölünmeyen hücrelerin görüntüleri Click-IT® EdU yöntemi kullanılarak 20X büyütme kullanılarak mikroskop görüntüleri elde edildi. Daha sonra çekirdeği yeşil renkli olarak boyanan, bölünebilen hücreler ve çekirdeği mavi renkli olarak görünen, bölünmemiş hücreler sayılarak analiz edildi.

3.8. İstatistiksel Analizler

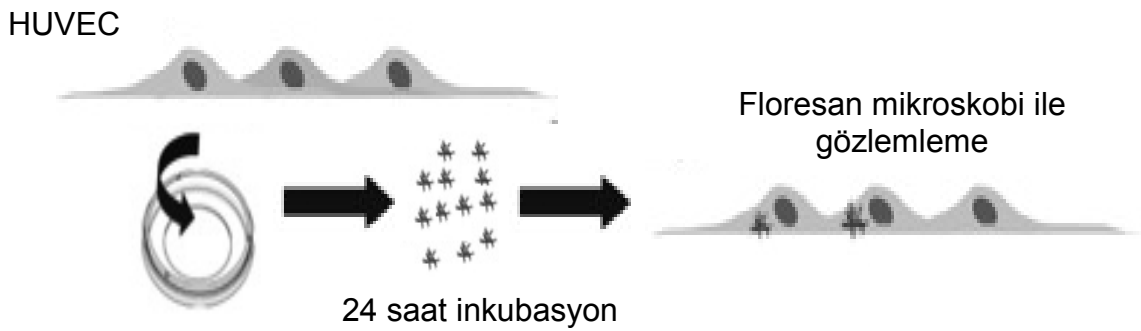
Analizler için IBM SPSS Statistics 21.0 paket programı kullanıldı. Deneyler üç ya da dört tekrarlı olarak gerçekleştirildi. VEGF₁₆₅, Sema 3F, AuNP@PEG ve AuNP@PEG-T, AuNP@PEG-T&BSA ve AuNP@PEG-T-Sema 3F biyokonjugatlarının hücre proliferasyon ve sitotoksisite değerleri kontrol grubuna göre bağıl olarak belirlendi (Eşitlik 5).

$$MTT \text{ değeri} = \frac{\text{Test grubuna ait optik değer} - \text{Boş kuyucuğa ait optik değer}}{\text{Kontrol grubuna ait optik değer} - \text{Boş kuyucuğa ait optik değer}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 5})$$

Veriler tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) kullanılarak analiz edildi. ANOVA sonrası analizlere Tukey HSD ya da Games-Howell post-hoc testleri ile devam edildi. Test gruplarının konsantrasyona bağlı etkisinin test edildiği durumlarda veriler iki yönlü ANOVA kullanılarak analiz edildi. Tüm analizler için istatistiksel anlamlılık sınırı 0.05 olarak belirlendi.

3.9. Hücresel Alımın Değerlendirilmesi

Hazırlanan AuNP'lerin yüzeyine iliştilen ligandların hücresel alım üzerindeki etkisini incelemek amacıyla biyokonjugasyon sonrasında AuNPs@PEG floresans işaretleyici TAMRA ile etiketlendi. AuNPs@PEG-T, AuNPs@PEG-T&BSA, AuNPs@PEG-T&Sema 3F hücresel alımları Inverted Floresan Mikroskobu (Zeiss, Axiovert 200M Widefield) altında incelendi. Hücresel alım çalışmalarında A549 ve HUVEC kullanıldı. NP'lerin konsantrasyonu 10 nM olacak şekilde dilüe edilip, 37°C'de %5 CO₂ altında AuNPs@PEG-T A549 hücreleriyle; AuNPs@PEG-T&BSA ve AuNPs@PEG-T &Sema 3F HUVEC ile 24 saat inkübe edildi. AuNPs@PEG-T, AuNPs@PEG-T&BSA ve AuNPs@PEG-T&Sema 3F'nin hücresel alım çalışmasının performansı değerlendirildi.

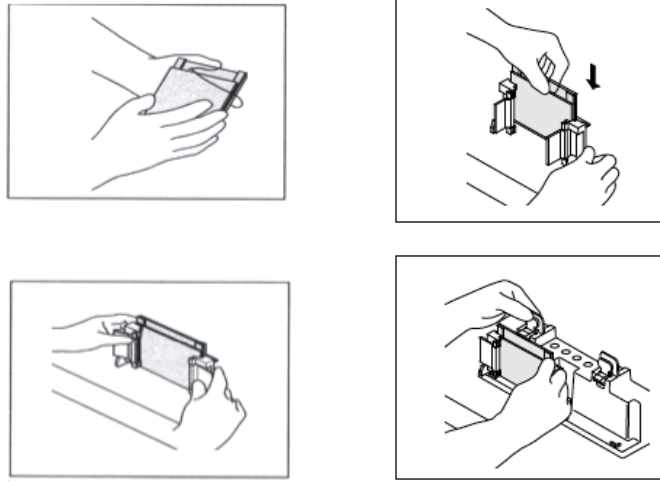


Şekil 3.5. Biyokonjugatların hücre içine alımı

3.10. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

SDS-Page jel elektroforezi sonrasında BSA'nın ve Sema 3F'nin moleküler ağırlığının saptanması için ön boyamasız ve ön boyamalı olmak üzere iki adet SDS-Page standardı kullanıldı. Deneyler 5 tekrarlı olarak yapıldı.

Cam tabakalar önce %70 etanol, sonra saf su ile temizlenerek oda sıcaklığında kurutuldu. Cam plakalar arasına 0.75 mm kalınlığında spacer adı verilen boşluk oluşturucular konuldu ve plakalar dik bir vaziyette plaka tutucuya yerleştirildi. Plaka tutucusu içerisine kilitlenen jelsiz cam plaka sistemi jellerin döküleceği tutucu üzerine dikkatle oturtuldu (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Mini-Protean döküm standı ve çerçevelerin montajı

Jel'in Hazırlanması: Dikey jel, proteinlerin stoklandığı yoğunlaştırıcı jel ve daha sonra da proteinlerin ayrıştırıldığı ayırıcı jel kısımlarından meydana gelecek şekilde hazırlandı. 50 mL'lik tüp içerisinde önce ayırım yapılacak jel tabakası hazırlandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Ayırıcı jel (%8) içeriği

Malzeme	Miktar (mL)
1.5 M Tris.HCl, pH 8.8	2.5
Distile su	4.7
%10 SDS	0.1
%30 Akrilamid/bis	2.7
APS	0.05
TEMED	0.005

1 mL'lik otomatik pipet aracılığı ile jel karışımı cam plakalar arasına yukarıdan 2 cm boşluk bırakacak şekilde döküldü. Jelin üst kısmının düz olması ve hava kabarcığının kaybolması için jel daha polimerize olmadan üzerine isopropanol ilave edilerek 45-60 dakika oda sıcaklığında polimerize olması için bırakıldı. Jelin polimerize olduğundan emin olduktan sonra üzerindeki isopropanol tabakası kurutma kâğıdına emdirilerek uzaklaştırıldı. Jelin üzeri dikkatli bir şekilde distile su ile yıkandı. Jel yapımında ikinci adım olan yoğunlaştırıcı jel yapımına geçildi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Yoğunlaştırıcı jel (%4) içeriği

Malzeme	Miktar (mL)
0.5 M Tris.HCl, pH6.8	1.25
Distile su	3.05
%10 SDS	0.05
%30 Akrilamid/bis	0.65
APS	0.025
TEMED	0.005

50 mL'lik deney tüpü içerisinde hazırlanan karışım yukarıda hazırlanan ayırım jeli üzerine içeriye hava kabarcığı sıkışmamasına özen göstererek yavaşça kasete dökülerek kuyucukları oluşturmak için jel tarakları dikkatlice jelin üzerine takıldı. Jelin polimerleşmesi için en az 45-60 dakika beklendi.

Protein Örneklerin Hazırlanması: Her numune ve standart yükleme solüsyonu %5 oranında β -merkaptoetanol ile karıştırıldı. Standart 1:200 oranında yükleme solüsyonu içerisinde seyreltildi (Çizelge 3.3). Ön boyamalı standart ise seyreltilmeden direk olarak 10 μ L jel içerisindeki kuyucuğa doldurularak kullanıldı. Daha sonra numuneler ve standart 95 °C'de 5 dakika kaynatıldıktan sonra soğuyana kadar bekletilerek proteinlerin denatürasyonu yapıldı.

Çizelge 3.3. Yükleme solüsyonu içeriği

Malzeme	Miktar (mL)
0.5 M Tris. HCl, pH6.8	2.5
Distile su	7.1
%10 SDS	4
Gliserol	5
0.5% Bromofenol mavisi	0.4

Jelin Yürütülmesi: Cam tabakalar içerisinde polimerize olmuş jel tank içerisine özenle yerleştirildi. Jeli ihtiva eden tank yaklaşık 3 cm yüksekliğe kadar 700 mL elektrot solüsyonu ile dolduruldu (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Elektrot solüsyonu

Malzeme	Miktar (gr)
Trizma®base	3.03
Glisin	14.4
SDS	1

Toplam hacim 1L olacak şekilde ultra saf su içerisinde çözdürüldü. BSA ve Sema 3F 200 V'de 45 dakika yürütüldü.

Jelin Görünür Hale Getirilmesi / Gümüş Boyama Yöntemi: Elektroforez işlemi sonrası jeller gümüş boyama yöntemine göre boyandı. Protein elektroforezi bittikten sonra jel sistem üzerinden çıkartıldı. Bu işlem çok dikkatli bir biçimde jeli kırmadan ve zarar vermeden yapıldı. Bunun için cam tabakalar su altında jelden ayrıştırıldı.

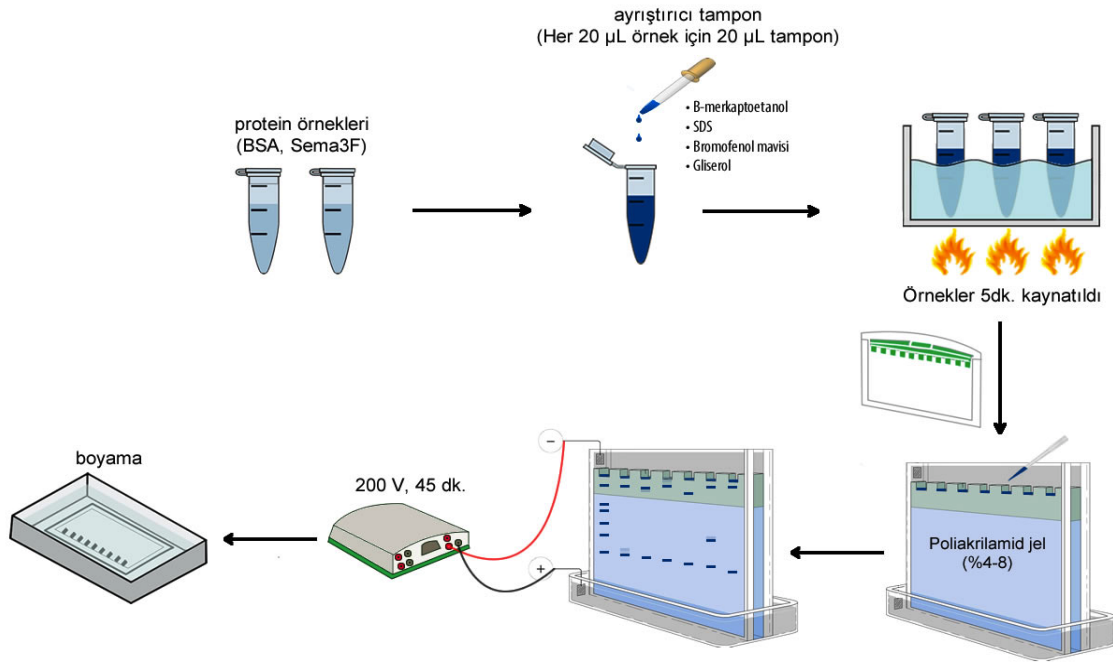
Gümüş boyama Heukeshoven ve Dernick [204, 205] yöntemine göre gerçekleştirildi (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Gümüş boyama işlem basamakları

Adım	Solüsyon	Süre
A	Sabitleştirici solüsyon	30 dk
B	Sabitleştirici solüsyon	15 dk
C	Distile su	3 x 5 dk
D	Hassaslaştırılmış solüsyon	1 dk
E	Distile su	3 x 30 sn
F	Boyama solüsyonu	30 dk
G	Distile su	2 x 20 sn
H	Geliştirici solüsyon	30 dk (bant oluşumu görülene kadar)
I	Durdurucu solüsyon*	10 dk
J	Durdurucu solüsyon	10 dk

*Reaksiyonun gelişimini durdurmak için direk olarak durdurucu solüsyon ilave edilmelidir.

PAGE jelleri, ilk 30 dakika için sabitleyici (fiksator) solüsyonu (%50 etanol,%10 asetik asit) içinde sabitlendi. Daha sonra 15 dakika diğer sabitleyici solüsyon (%5 etanol, %1 asetik asit) içerisinde bekletildi. Fiksasyon işleminden sonra 5 dakika boyunca 3 defa distile su ile yıkandı. Jel daha sonra 1 dakika boyunca %0.02 sodyum tiyosülfat (0.2 g/L) ile duyarlı hale getirildikten sonra 30 saniye boyunca 3 defa distile su ile yıkandı ve gümüş solüsyonu (AgNO_3 , 2g/L; formaldehit %37, 750 $\mu\text{L/L}$) ile 30 dakika inkübe edildi. Geliştirme solüsyonu öncesinde, jel 20 saniye için distile su ile iki kez yıkandı. Bantlar geliştirme çözeltisi ile geliştirildi (Na_2CO_3 , 60 g/L; formaldehit 0.5 mL/L, 20 mL/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L). Bantlar açık bir şekilde görününce gelişimi durdurma solüsyonu (%15 asetik asit) kullanılarak durduruldu. Jel daha sonra, kurumadan önce, %10 gliserol ile yıkandı.

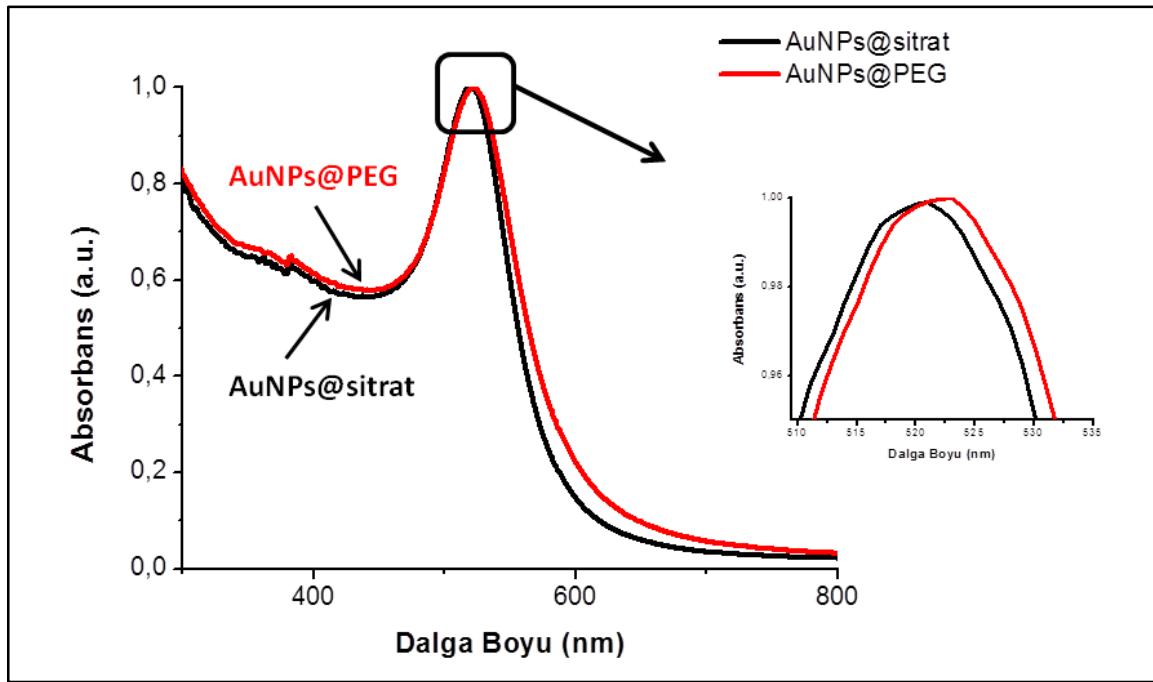


Şekil 3.7. SDS-Page jel elektroforezi ve boyama

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. AuNPs ve AuNPs@PEG Karakterizasyonu

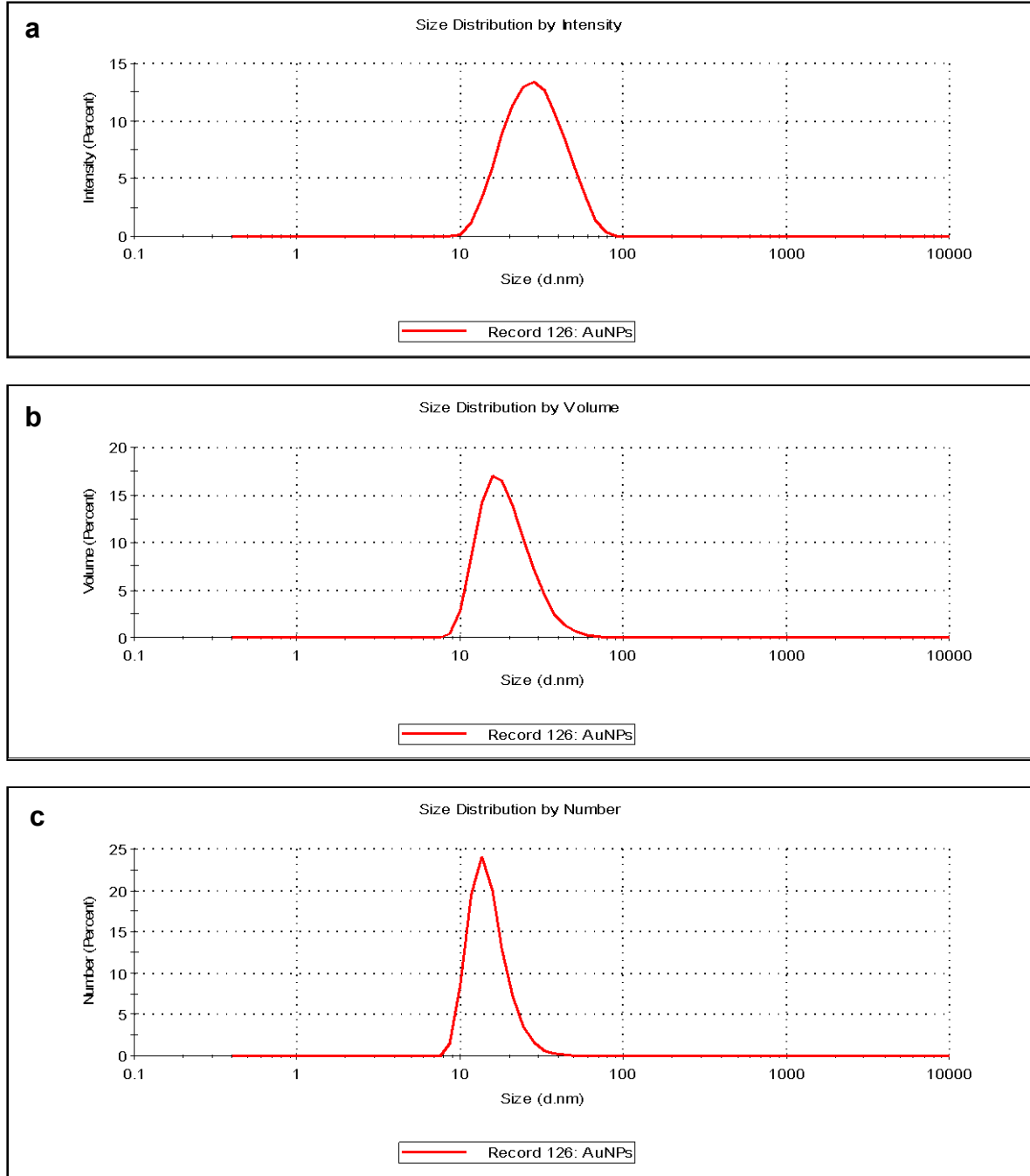
Bu çalışmada sitrat stabilizeli AuNP'lerin (AuNPs@sitrat) sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Materyal metot bölümünde belirtildiği gibi yaklaşık 20 nm çapında küresel AuNP'ler dar bir boyut dağılımında hazırlandı. Sentezlenen partiküllerin boyut, şekil ve yüzey yükü özellikleri TEM, DLS ve UV-Vis spektroskopi ile karakterize edildi.



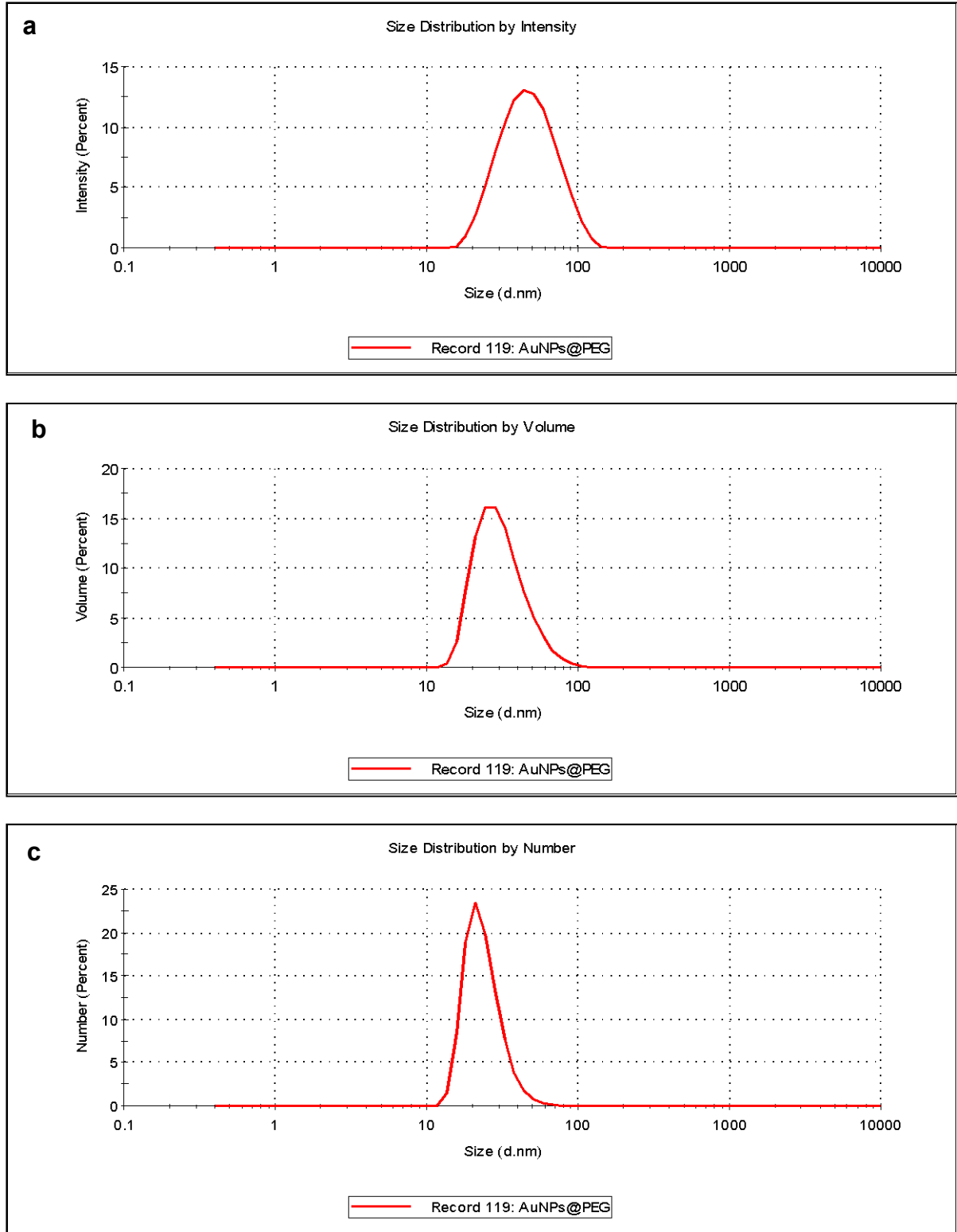
Şekil 4.1. Kolloidal AuNP'lerin UV–Vis absorpsiyon spektrumları. Sitrat ile stabilize AuNP'ler (siyah çizgi), PEGlenmiş AuNP'ler (kırmızı çizgi)

Çalışmanın ilk kısmında gerçekleştirilen UV-Vis spektroskopi sonucu AuNP'lerin 300 ve 800 nm arasındaki dalga boylarını içeren absorpsiyon eğrisi Şekil 4.1'de gösterilmektedir. 20 nm'lik AuNP'ler 520 nm dalgaboyunda yüzey plazmon rezonansa ulaşmış, maksimum absorpsiyon değerini göstermektedir. Bu durum nano-boyutlu malzemelerin, temelde elektronların iletim bandı uyarımından kaynaklanan optik özelliğinin bir sonucudur. HS-PEG-COOH ile stabilize olan diğer bir deyişle PEGlenmiş AuNP'lerin (AuNPs@PEG) UV-Vis absorpsiyon spektroskopi sonucu incelendiğinde AuNP@PEG'lerin plazmon absorpsiyon tepe noktasının 520 nm'den 522 nm'ye kaydığı gözlenmiştir. Bu kayma, AuNP ile HS-PEG-COOH arasında

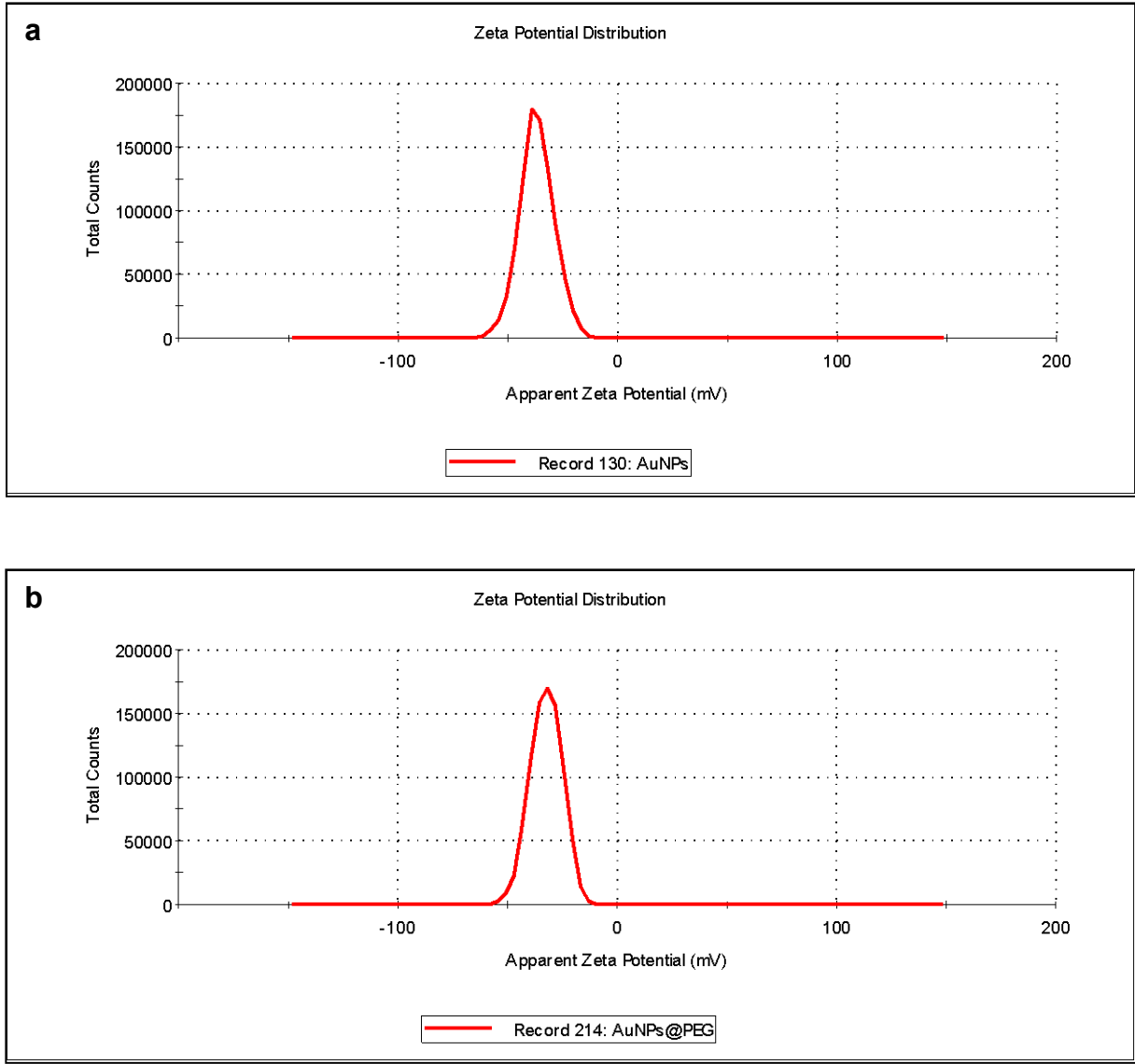
oluşan kararlı Au-S kovalent bağlarının AuNP'lerin dielektrik çevresini değiştirmesinin bir sonucudur [206]. AuNP'lerin partikül çapı arttıkça plazmon dalga boyunda artış ve absorbans tepe noktasında kayma görülür. UV absorbans eğrisi NP'lerin boyutunun yanında şekilleri hakkında da bilgi verebilmektedir. Küresel AuNP'lerin ise sadece radyal yönde olmak üzere tek bir plazmon dalga boyu verdiği görülmektedir.



Şekil 4.2. AuNP@sitrin'in yoğunluk (a) hacim (b) ve sayı (c) olarak DLS sonuçları



Şekil 4.3. AuNPs@PEG'in yoğunluk (a), hacim (b) ve sayı (c) olarak DLS sonuçları



Şekil 4.4. AuNPs@sitrat (a) ve AuNP@PEG (b) Zeta potansiyeli (ζ -potansiyeli)

Çizelge 4.1. AuNP@PEG'lerin DLS sonuçları

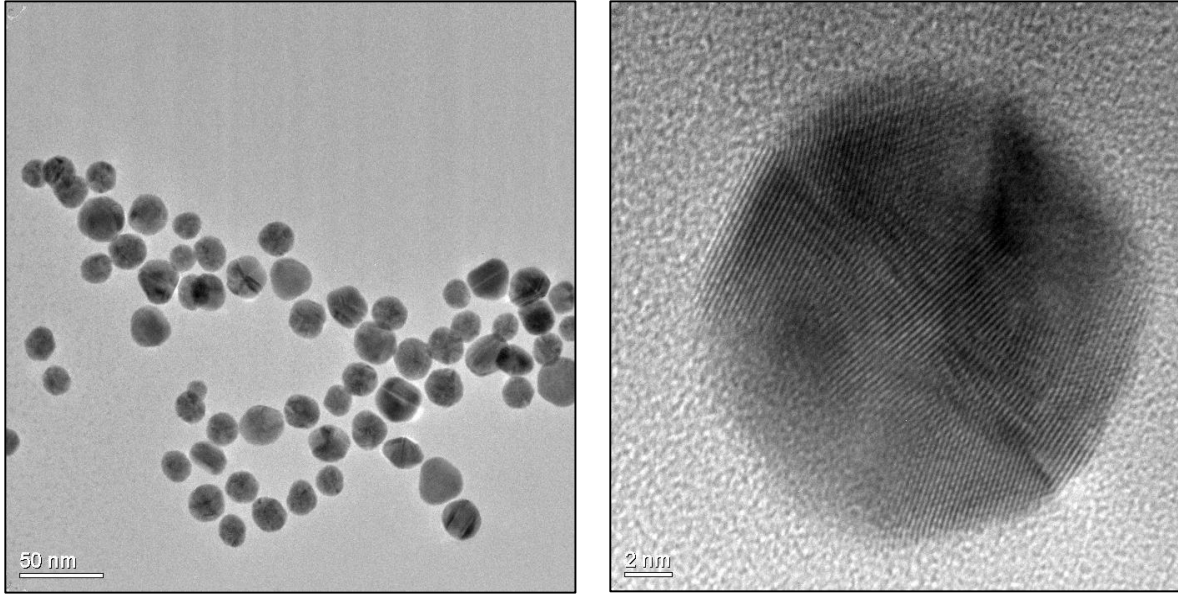
	Z-Ortalama [nm]	Pdl	Sayı	Yoğunluk	Hacim	ζ -potansiyeli [mV]
AuNP	24.99	0.183	15.22	30.52	19.87	-38.3
AuNPs@ PEG	39	0.240	23.93	50.09	32.07	-32.4

Yüzey yükünü belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda AuNPs@sitrat'ların yüzey yükü -38.3 mV ve AuNPs@PEG'lerin ise -32.4 mV olarak belirlendi (Şekil 4.4). Bu sonuçlar altın yüzeyinin negatif sitrat iyonları ile kaplandığını ve sentezlenen NP süspansiyonunun kararlı olduğunu göstermektedir. Çünkü ζ -potansiyelinin büyüklüğü,

sistemin stabilitesinin belirlenmesi için de kullanılır. Partiküller yüzey yükünün büyüklüğüne göre değil kayma düzlemindeki ζ -potansiyeline göre elektrostatik olarak etkileşir. Tüm partiküller yüksek negatif ya da pozitif ζ -potansiyeline sahipse (< -30 mV ya da $> +30$ mV), birbirlerini iteceklerdir ve dağılımın stabilitesini sağlayacaklardır. Eğer partiküller düşük ζ -potansiyel değerine sahipse partiküllerin bir araya gelmesini engelleyecek yeterli güç olmadığından kümelenme olacaktır [207, 208]. Dolayısıyla yüksek ζ -potansiyeli, yüklü partiküller nedeniyle partikül agregasyonunu önlemektedir. Elde edilen sonuçlara göre yüksek negatif ζ -potansiyeline sahip NP'lerin stabil olduğu anlaşılmaktadır.

NP'lerin boyut analizi için Zetasizer cihazı kullanarak ortalama ϕ ap ve boy dağılımını veren grafik ve bu grafiğe ait veriler Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te görülmektedir. NP'lerin ortalama boyutu AuNPs@sitrat için 25 nm, AuNP@PEG için 39 nm; polidispersitesi ise sırasıyla 0.188 ve 0.240 olarak bulundu. Polidispersitesi 0.08 ve 0.7 aralığında olduğundan NP'lerin tekil dağılımlı oldukları görülmektedir.

DLS, örnek içerisinde Brownian hareketinin etkisiyle örneğin dağılımındaki değişikliğin ışık yoğunluğunda yarattığı dalgayı ölçer ve bunu partikül boyutu değerine çevirir. Sonuçların partiküller için verdiği değer partiküllerin ortalama boyutunu ifade eder. DLS sonuçlarının verdiği bilgi ve grafik incelendiği zaman, dikkat edilmesi gereken önemli noktalar bulunmaktadır. Ölçüm sonucunda boyut dağılım grafiğinde, tepe noktası sayısı önem taşımaktadır. Tek bir tepe noktası görülmesi halinde, ölçüm sonuçlarının verdiği boy ortalaması partiküllerin gerçek boyutunu göstermektedir. Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te grafikler incelendiğinde AuNP'lerin boyutlarının gerçeği yansıttığı tek bir tepe noktası vermesi ile anlaşılmıştır. Boy dağılım grafiğinde birden fazla tepe noktası varsa, partiküller için verdiği boyut, sayı ve hacim oran tablosuna dikkat etmek gerekir. Bu tabloda hangi boyut daha fazla sayı veya hacim oranına sahip olursa, o boyut bu örneğin partikül boyutu olarak kabul edilir. Ancak Zetasizer'in verdiği partikül boyutları belli hata oranlarına da sahiptir. Dolayısıyla AuNP'lerin boyutlarının ve morfolojilerinin belirlenmesinde yüksek duyarlılığa sahip bir karakterizasyon yöntemi olan TEM kullanılmıştır.



Şekil 4.5. AuNPs@sitrat'ın TEM görüntüsü

Partikül boyut dağılım histogramı dört adet TEM görüntüsünün Image J (NIH, U.S) programı ile analiz edilmesi sonucunda üretilmiştir. Bu sonuçlar Şekil 4.6 ve 4.7'de gösterilmektedir.

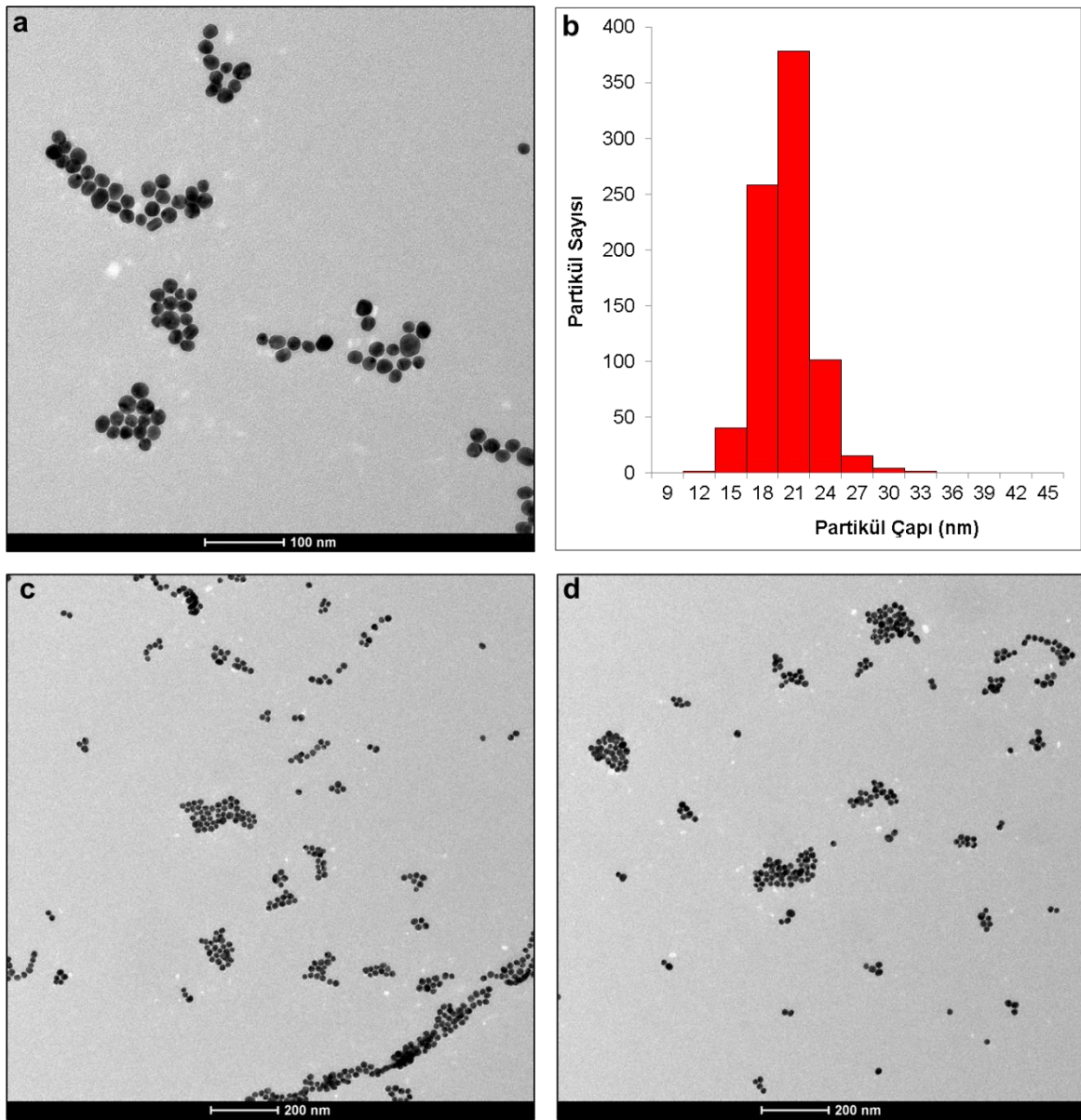
TEM görüntüleri analizi sonucunda AuNP@sitrat'ın şeklinin küresel formda olduğu, ortalama partikül boyutunun yaklaşık olarak 18.8 ± 2.4 nm ($n=798$) olmak üzere 12-30 nm aralığında değiştiği ve ortalama partikül küreselliğinin ise 0.90 ± 0.02 olduğu belirlendi.

AuNPs@PEG için yapılan TEM görüntüsü analizi sonucunda ise ortalama partikül boyutunun yaklaşık olarak 19.3 ± 2.1 nm ($n=582$) olmak üzere 15-25 nm aralığında değiştiği ve ortalama partikül küreselliğinin 0.89 ± 0.02 olduğu belirlendi.

Sonuçta buraya kadar tez kapsamında yapılan çalışmalarda, PEG'in sağladığı avantajlardan dolayı AuNP'ler sulu ortamda heterofonksiyonel HS-PEG-COOH ile kaplandı. PEGilasyon öncesi ve sonrası partiküllerin optik spektrumu (Şekil 4. 1) partiküllerin karakteristik plazmon tepe noktasını ve bu plazmon tepe noktası kolloidin stabil olduğunu göstermektedir. Polidispersite indeksine bakarak partiküllerin tekil dağılımlı olduğunun doğrulanması NP'lerin stabilitesinin korunduğunu

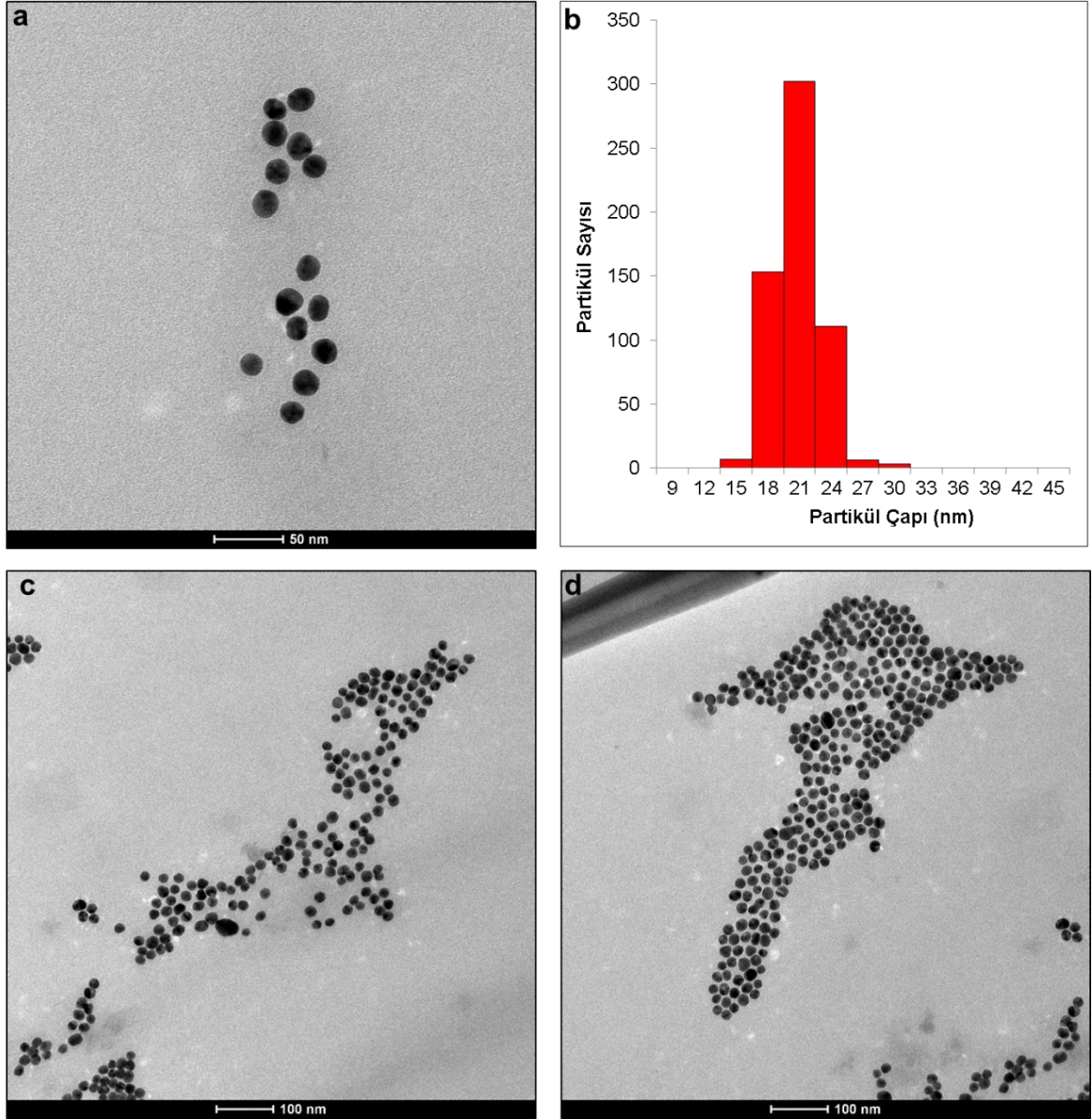
göstermektedir. Yapılacak hücre kültürü çalışmalarında AuNPs@PEG'lerin içinde bulunduğu fizyolojik ortam değişeceği için stabilitenin korunmuş olması çok önemlidir.

TEM fotoğraflarının analiz sonucuna göre AuNP@sitrat'ların 18.8 ± 2.4 nm boyut aralığında küresel formda olduğu, AuNPs@PEG'lerin ise 19.3 ± 2.1 nm olduğu saptanarak kaplamadan dolayı boyutunda yaklaşık 0.5 nm'lik bir artış olduğu görülmektedir. AuNP@PEG'lerin etrafında bulutsu bir tabakanın varlığı AuNP'lerin PEG ile kaplandığını TEM fotoğraflarında açık bir şekilde göstermektedir.



Şekil 4.6. AuNP@sitrat'ın TEM görüntüleri (a, c ve d) ve boyut dağılımı (b).

AuNP'lerin stabil ve tekil dağılımlı, homojen bir dağılım gösterdiği morfolojik olarak TEM görüntüleri aracılığıyla doğrulanmıştır. Ayrıca PEG ile modifiye edilen AuNP'lerin yüzeyi fonksiyonelleştirme için hazır hale gelmiştir. Tüm bu sonuçlar AuNP'lerin etkili bir biçimde kaplandığını ve biyoyumlu bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

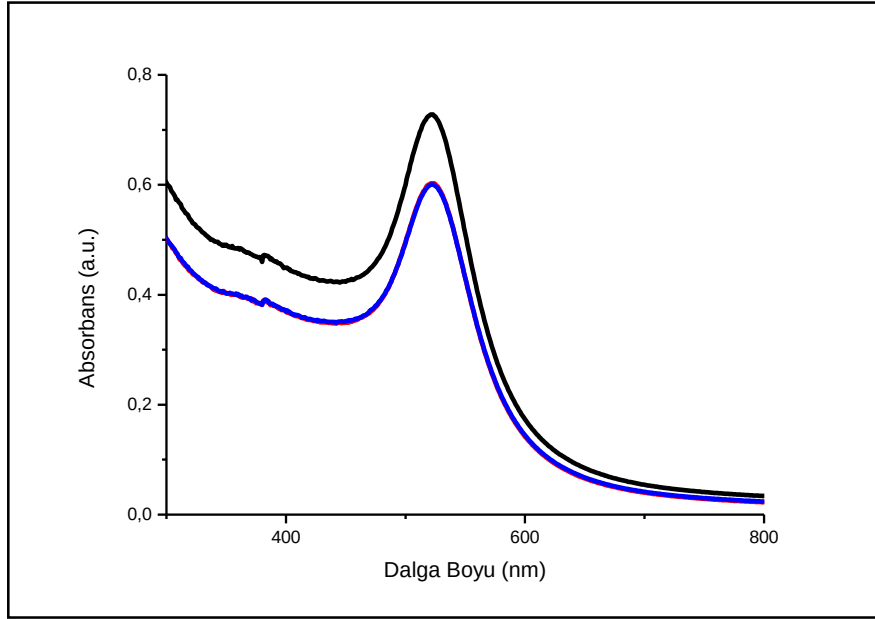


Şekil 4.7. AuNP@PEG'lerin TEM görüntüleri (a, c ve d) ve boyut dağılımı (b)

4.2. AuNP'lerin Proteinler ile Fonksiyonelleştirilmesi

4.2.1. AuNP'lerin BSA ile Fonksiyonelleştirilmesi ve Karakterizasyonu

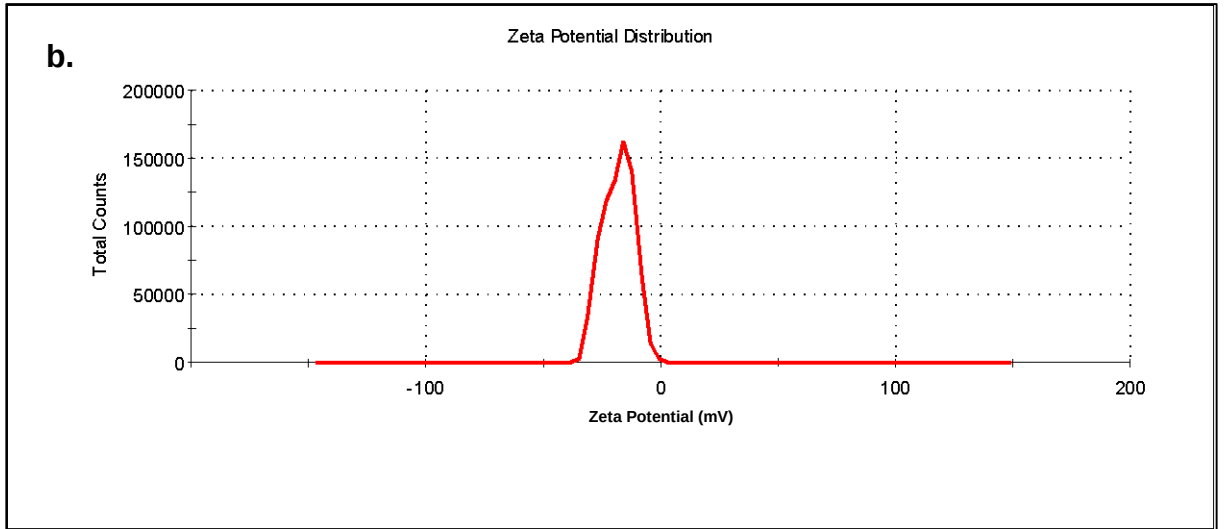
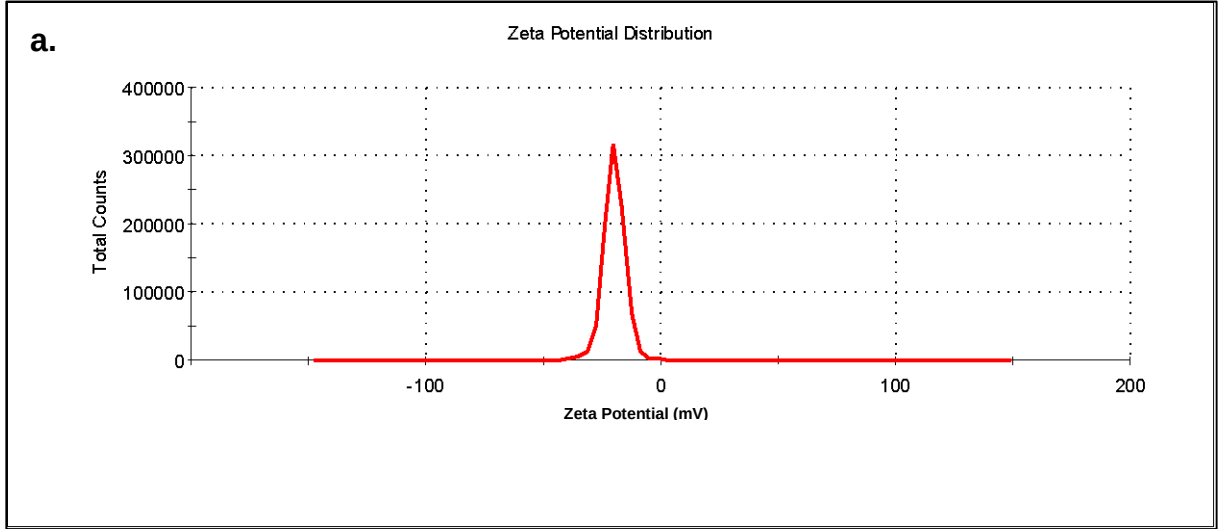
Biyofonksiyonelleştirme süreci sonunda fonksiyonelleştirmenin başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği TEM, DLS, jel elektroforezi, UV-Vis ve floresans spektroskopisi gibi karakterizasyon teknikleri kullanılarak doğrulanmıştır.

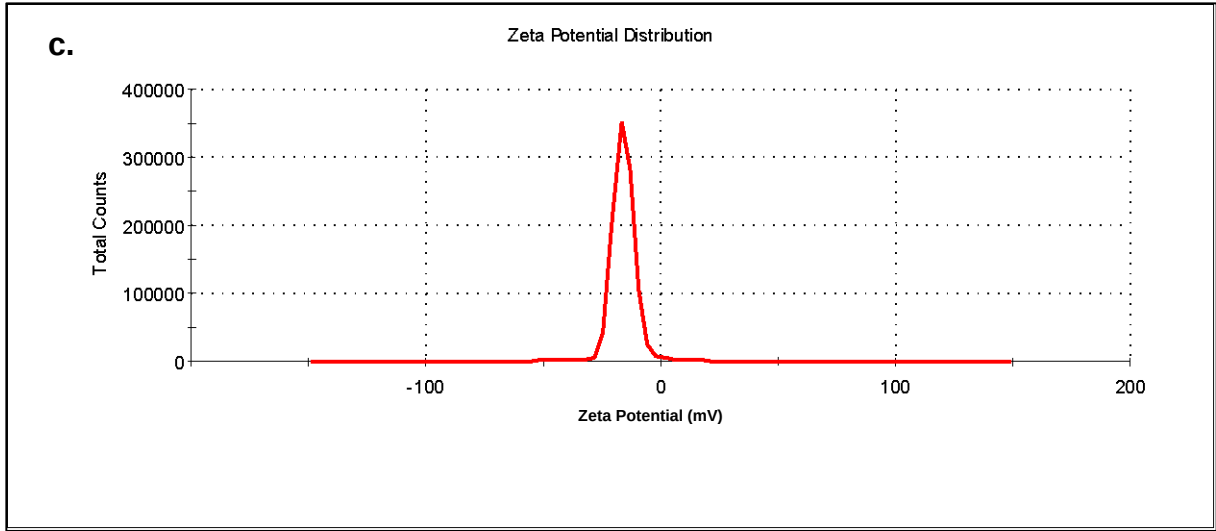


Şekil 4.8. Kolloidal AuNP biyokonjugatlarının UV-Vis absorpsiyon spektrumu. AuNPs@PEG-T (siyah çizgi), AuNPs@PEG-T&BSA (kırmızı çizgi), AuNPs@PEG-T&BSA* (mavi çizgi)

AuNP@PEG'ler kullanılarak gerçekleştirilen tüm biyofonksiyonelleştirme sürecinde sadece TAMRA floresans boya ile etiketlenen NP'ler (AuNPs@PEG-T) kontrol grubu olarak kullanılmıştır. EDC kimyası aracılığıyla 50 BSA/NP (AuNPs@PEG-T&BSA) ve 100 BSA/NP (AuNPs@PEG-T&BSA*) olacak şekilde BSA kovalent olarak bağlanmıştır (AuNPs@PEG-T&BSA). Şekil 4.8 biyokonjugatların UV-Vis absorpsiyon spektrum sonucunu göstermektedir. λ_{max} değeri kontrol, AuNPs@PEG-T&BSA ve AuNPs@PEG-T&BSA* için sırasıyla 522, 522 ve 523 nm olarak tespit edilmiştir. Absorpsiyon tepe noktasında hafif kayma gözlenmiştir. Tepe noktasındaki kaymalar parçacık yüzeyinde meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Bu durum yer değiştirme reaksiyonları esnasında sitrat kaplı NP'lerin yüzeyinde meydana gelen ligand değişimini gösterir. Bu sürecin sonunda ortaya çıkan ürünler farklı absorpsiyon

karakterine sahiptir. Absorbsiyon eğrileri incelendiğinde en büyük kayma AuNP@PEG ile sitrat stabilizeli olan AuNP'ler arasında gözlenmiştir (Şekil 4.1). Biyofonksiyonelleştirmeden sonra Şekil 4.8 ile gösterilen sonuçlarda kontrol grubu ile AuNPs@PEG-T&BSA* karşılaştırıldığında BSA* ile fonksiyonelleştirilen NP'lerin hafif kayma gösterdiği gözlenmiştir. Daha fazla bir kayma olmaması konjugasyonun iyonik olmadığı ya da herhangi bir şekilde çökelme olmadığının bir göstergesidir.





Şekil 4.9. AuNP@PEG-T (a), AuNPs@PEG-T&BSA (b) ve AuNPs@PEG-T&BSA*'nın (c) ζ -potansiyeli

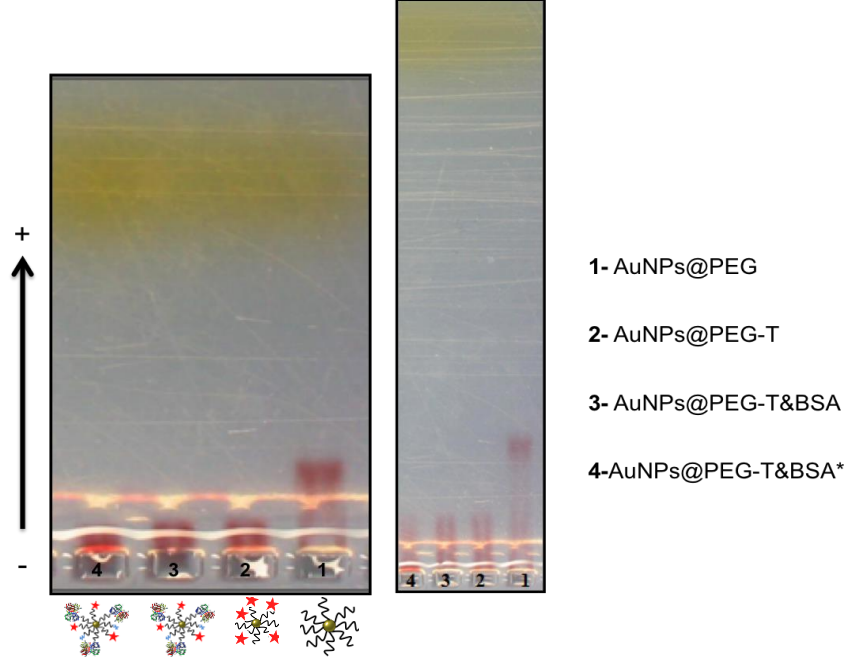
Biyokonjugatların yüzey yükü tayini için DLS kullanılmış ve ölçüm sonuçları Şekil 4.9'da verilmiştir. AuNPs@PEG için verilen sonuçlarda -32.4 mV olarak bulunan yüzey yükü AuNPs@PEG-T ile karşılaştırıldığında arasında -9 mV'lik bir fark olduğu gözlemlendi. BSA ile fonksiyonelleştirilen NP'lerin yüzey yükünün daha da arttığı ancak farklı miktarlarda BSA kullanılanlar arasında farkın -3 mV olduğu belirlendi. Yüzey yükündeki bu artışın BSA'nın EDC kimyasalı vasıtası ile kovalent bağlanma sonrası NP yüzeyinde meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. ζ -potansiyeli ve UV-Vis sonuçları Çizelge 4.2' de gösterilmiştir. Fonksiyonelleştirme sonrasında ζ -potansiyelindeki değişiklikler ve elde edilen veriler literatürle uyumludur [209].

Çizelge 4.2. BSA ile fonksiyonelleştirilen AuNP'lerin ζ -potansiyeli sonuçları

Örnek	ζ -potansiyeli [mV]	$\lambda_{\max}$ [nm]
AuNPs@PEG	-32.4	522 nm
AuNPs@PEG-T	-20.3	522 nm
AuNPs@PEG-T&BSA	-18.4	522 nm
AuNPs@PEG-T&BSA*	-15.8	523 nm

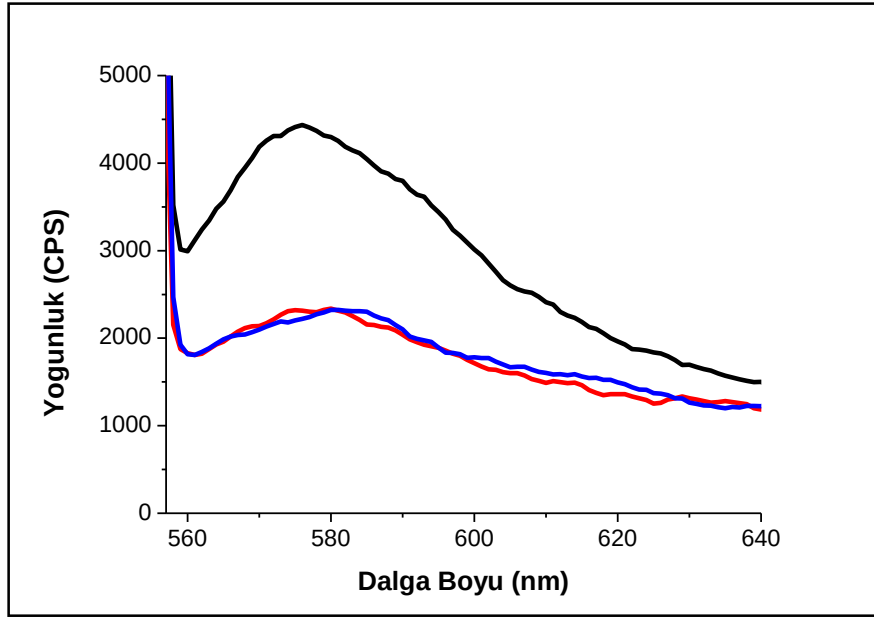
Ortaya çıkan kolloidler arasında net yük ve boyuttaki farklılıkları belirlemek ve EDC birleşme ürünlerini kalitatif olarak incelemek için agaroz jel elektroforezi kullanıldı [202, 203]. Şekil 4.10'de dört adet farklı örneğin biyofonksiyonelleştirme sonrasında

%1'lik hazırlanan agaroz jel içinde 30 dk. (soldaki) ve 60 dk. (sağdaki) için gerçekleştirilen jel elektroforezi fotoğrafı gösterilmiştir.



Şekil 4.10. PEG ile modifiye edilen AuNP'ler ve BSA ile fonksiyonelleştirilen AuNP'lerin jel görüntüsü

Agaroz jeller yatay olarak her iki yönde olabilir. Böylece hem pozitif hem negatif türler aynı anda görülebilir. Burada tüm AuNPs@PEG ve diğer biyokonjugatların negatif yönden pozitif yöne hareket ettiği gözlenmiştir. Agaroz jel elektroforezinde hareketlilik NP'lerin boyut ve yüzey yüzünden kaynaklanmaktadır. Hareketteki meydana gelen değişiklikler NP'lerin yük ve boyutundaki değişimlerden etkilenir. Şekil 4.10 jel elektroforezi görüntüsünde AuNPs@PEG'nin en hızlı olduğu, diğer biyokonjugatların ise AuNPs@PEG ile kıyaslandığında daha yavaş olduğu ve kendi aralarında fazla bir fark olmadığı gözlenmiştir. AuNPs@PEG ile karşılaştırıldığında fonksiyonelleştirilen NP'lerin gecikmesi önemli ölçüde fonksiyonelleştirme sürecinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin göstergesidir [210]. Jel elektroforezi daha önce DNA kaplı AuNP'leri ayırmak, L-Lizin'in bağlanma davranışlarını ve protein kaplı AuNP'leri araştırmak için nanoteknolojide kullanılmıştır.

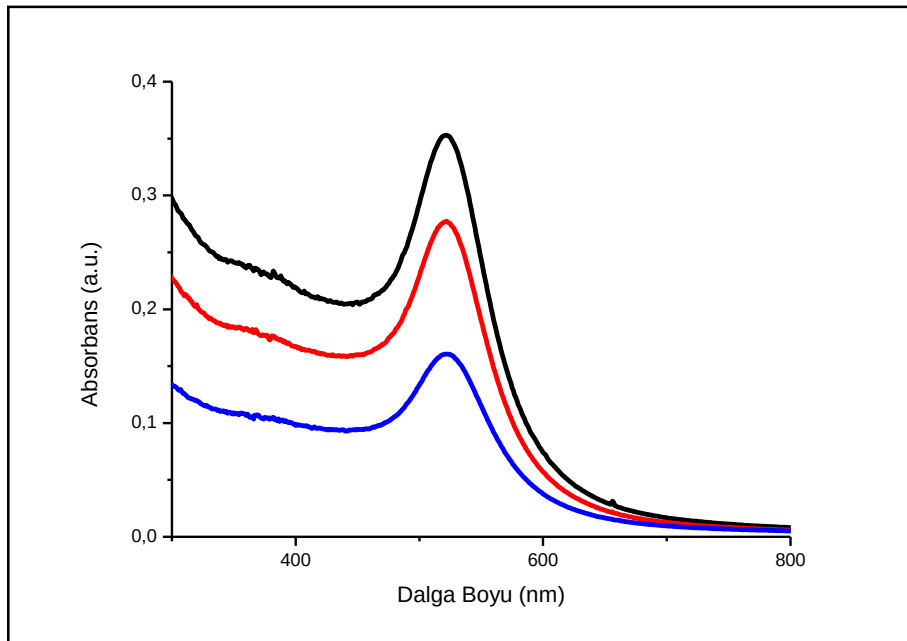


Şekil 4.11. Biyokonjugatların floresans spektrumları. AuNPs@PEG-T (siyah çizgi), AuNPs@PEG-T&BSA (kırmızı çizgi), AuNPs@PEG-T&BSA* (mavi çizgi)

Floresans ile etiketlenen bu NP biyokonjugatları floresans spektroskopi yardımıyla karakterize edilerek sonuçlar doğrulandı. Bu teknik aynı zamanda NP'lerin kantitatif analizinin yapılması içinde son derece uygun bir yöntemdir. Şekil 4.11 üç farklı örneğin floresans spektrum ölçüm sonuçlarını göstermektedir. AuNPs@PEG-T'nin floresans yoğunluğunun BSA ile fonksiyonelleştirilenlerden daha fazla olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar BSA ile fonksiyonelleştirilen biyokonjugatlarda floresans yoğunluğunun azalmasına neden olmuştur. AuNPs tarafından protein floresansının baskılanması daha önce rapor edilmiştir [211]. Bu veriler, Stern-Volmer denklemi kullanılarak analiz edilmiştir. Ligand bağlanması ya da konformasyonel geçiş yoluyla mikroçevredeki değişikliklerin anlamlı bir şekilde baskılanmış olması fonksiyonelleştirmenin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini bir başka teknik olan floresans spektroskopi sonuçlarıyla da doğrulamakta ve ortamının polaritesi, dolayısıyla genel protein yapısının konjugasyon sırasında değişmediğine işaret etmektedir.

4.2.2. AuNP'lerin Sema 3F ile Fonksiyonelleştirilmesi ve Karakterizasyonu

Bu bölümde Sema 3F ile konjuge edilen AuNP'ler hazırlandı. AuNP'ler bir ucu tiyol grubu diğer ucu ise karboksil ile sonlandırılmış heterofonksiyonel α -Merkapto- ω -karboksi PEG zincirleriyle modifiye edildi. AuNP@PEG floresans boya TAMRA ile etiketlenerek Sema 3F ile EDC bağlanma kimyası aracılığıyla heterobifonksiyonel PEG üzerindeki karboksilik asit grubundan yaralanılarak fonksiyonelleştirildi. Bu biyokonjugatlar UV-Vis absorban ve floresans spektrometresi, DLS, TEM ve jel elektroforezi kullanılarak karakterize edildi.



Şekil 4.12. Kolloidal AuNP'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumu. AuNPs@PEG-T (siyah çizgi), AuNPs@PEG-T&BSA (kırmızı çizgi), AuNPs@PEG-T&Sema 3F (mavi çizgi)

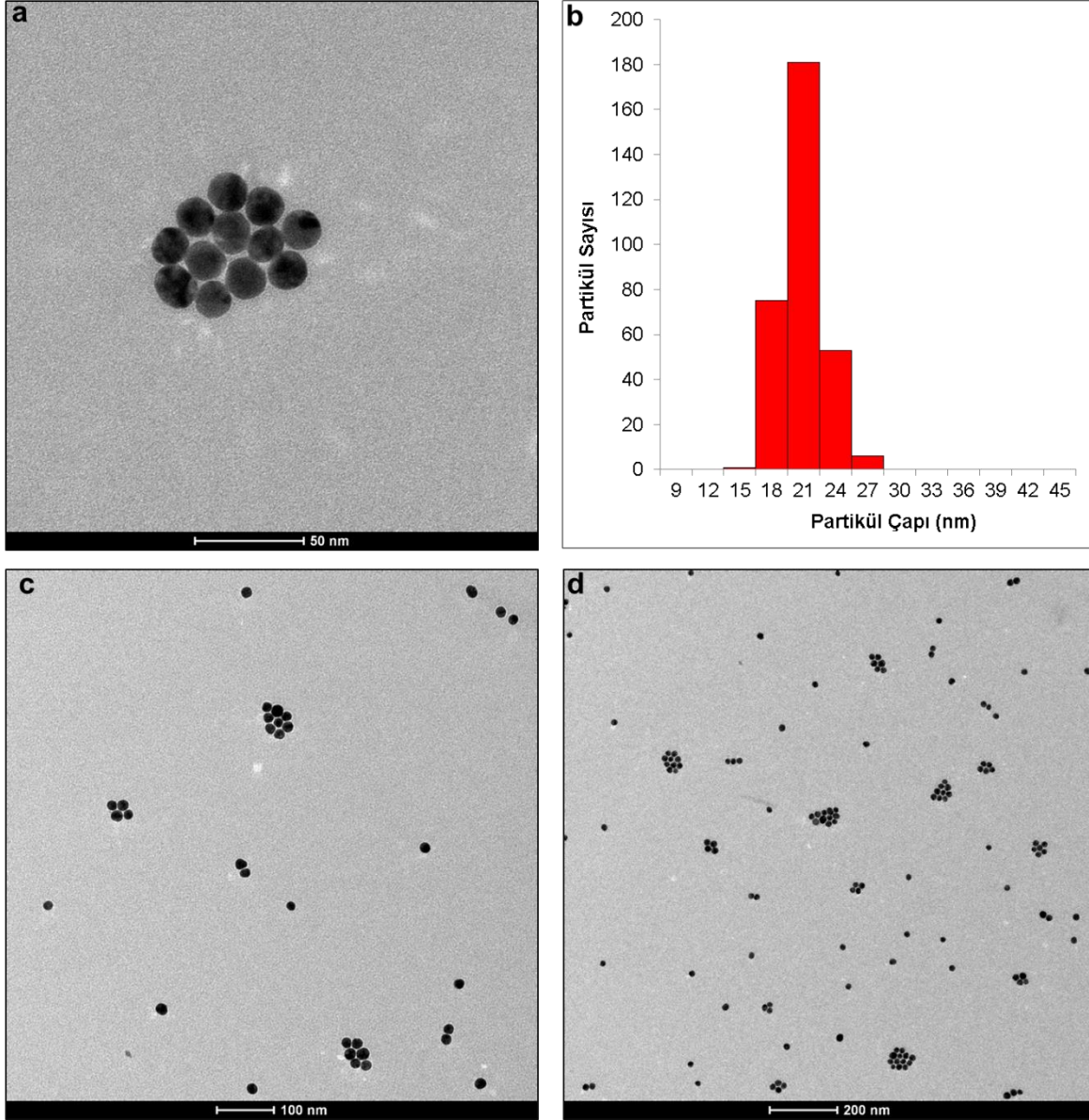
AuNPs@PEG kullanılarak gerçekleştirilen tüm biyofonksiyonelleştirme sürecinde sadece TAMRA floresans boya ile işaretlenen NP'ler (AuNPs@PEG-T) kontrol grubu olarak kullanıldı. EDC kimyası aracılığıyla BSA ve Sema 3F ile fonksiyonelleştirilen NP'lerin (AuNPs@PEG-T&BSA, AuNPs@PEG-T&Sema 3F) UV-Vis spektrumu ölçüldü. λ_{max} değeri tüm biyokonjugatlar için 522 nm olarak tespit edildi. Elde edilen grafik Şekil 4.12'de verildi.

AuNP'ler PEG ile stabilize olduğu için ligand kısımlarının direk NP yüzeyi ile etkileşime girdiği tüm biyokonjugatlar AuNP@PEG ile benzer plazmon dalga boyu göstermiştir. Böylece UV-Vis spektroskopi sonuçları iyonik etkileşimlerdeki gibi biyokonjugatlarda daha büyük bir tepe noktası kayması göstermeyerek tüm proteinlerin başarılı bir şekilde kovalent olarak NP'lere bağlandığını doğruladı. Tüm biyokonjugatlar aynı dalga boyunu göstermesine rağmen AuNPs@PEG-T&Sema 3F'nin tepe noktasının daha geniş, AuNPs@PEG-T'nin tepe noktasının ise daha dik ve sivri uca sahip olduğu şekil 4.12'de görülmektedir. Bu durum BSA ve Sema 3F'nin AuNPs@PEG'e sağlam bir şekilde kovalent olarak bağlandığını bir kez daha doğrulamaktadır. Bulunan bu sonuçlar literatür ile uyumludur.

Altın nanoyapıların süspanse olduğu çözeltiler boyut ve şekillerine bağlı olarak güçlü plasmon bandları göstermektedir [151]. Altın nanoyapıların protein, antikor, oligonükleitit gibi biyolojik reseptör molekülleri ile aktivasyonu sonucu dielektrik özelliğinin değişmesine bağlı olarak plasmon dalga boyu kaymasına neden olmaktadır. AuNP'lerin bu özelliğine dayanan birçok uygulama bulunmaktadır [212-214]. Örneğin; AuNP'lerin yüzeyindeki antikorun antijenle etkileşimi sonucu refraktif indeksi dolayısıyla plasmon spektrumundaki değişim araştırılmıştır [215]. Hedef molekül bağlandığı plasmon spektrumundaki dalga boyu kayması ya da belli bir dalga boyundaki absorpsiyon yoğunluğunun değişimi ile analiz edilmekte olup dalga boyu kaymasının incelenmesinin daha hassas olduğu rapor edilmiştir [216].

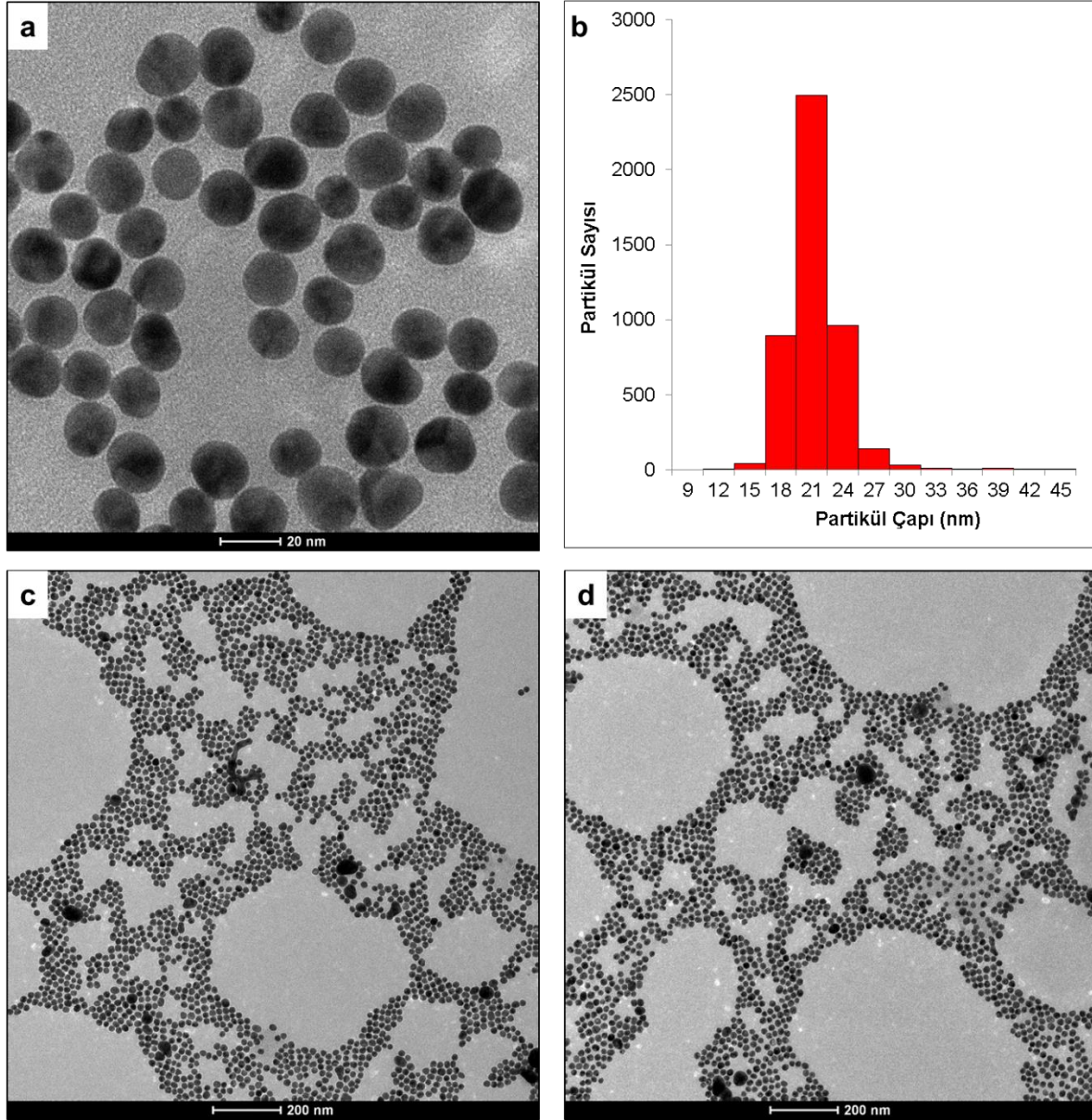
Çizelge 4.3. BSA ve Sema 3F ile fonksiyonelleştirilen AuNP'lerin UV-Vis sonuçları

Örnek	λ_{max}
AuNPs@PEG-T	522 nm
AuNPs@PEG-T&BSA	523 nm
AuNPs@PEG-T&Sema 3F	523 nm



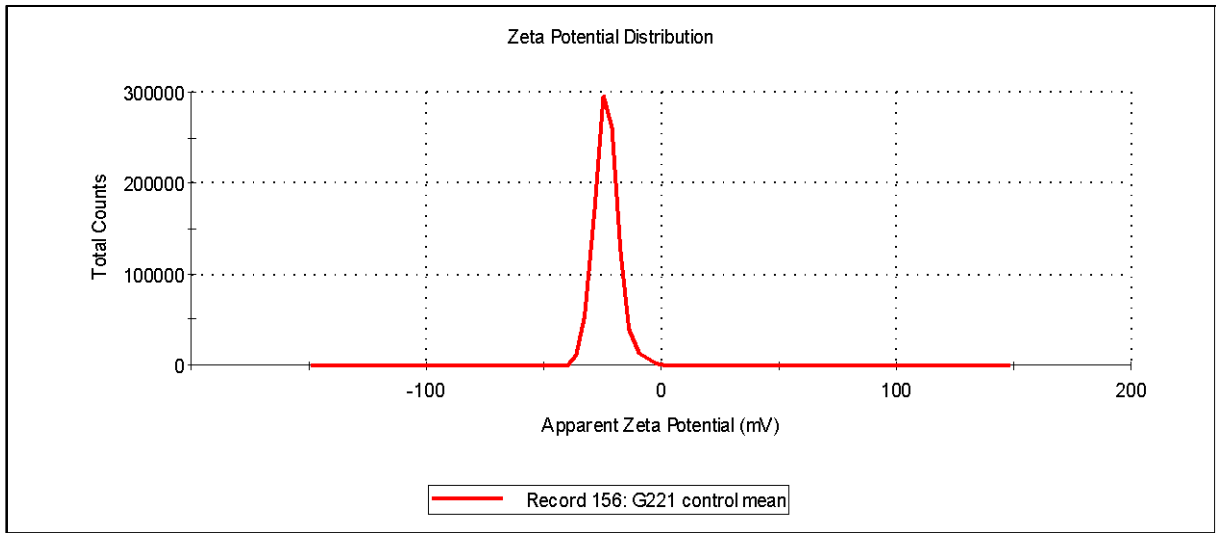
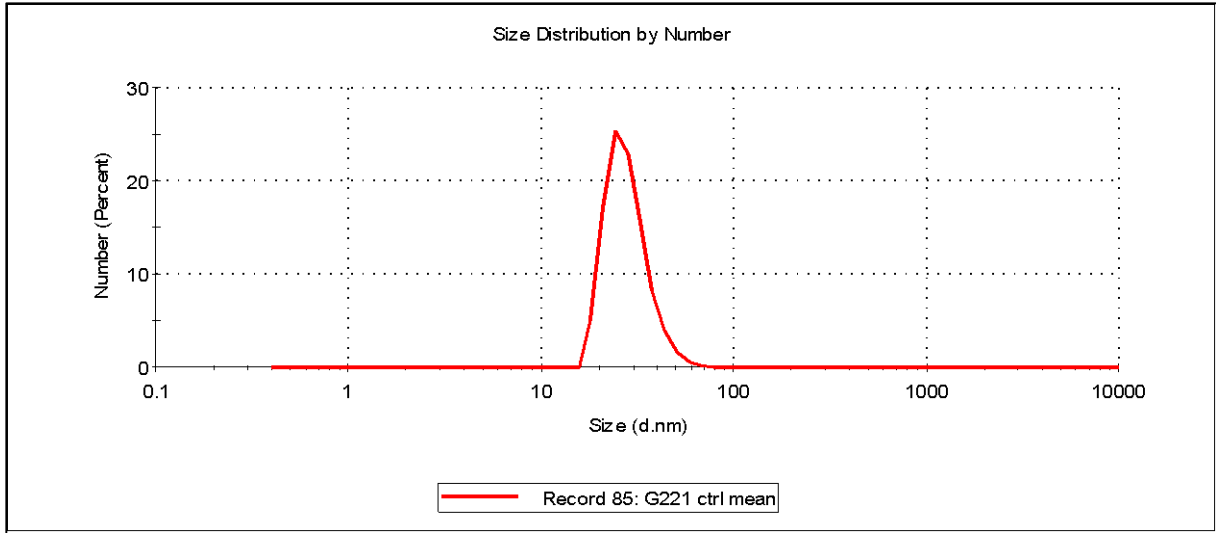
Şekil 4.13. AuNP@PEG-T&BSA'nın TEM görüntüleri (a, c ve d) ve boyut dağılımı(b).

AuNPs@PEG-T&BSA ve AuNPs@PEG-T&Sema 3F biyokonjugatları kullanılan tampon çözelti içerisinde stabildir ve hiçbir şekilde büyük topaklar oluşturmamıştır. Bu durum TEM görüntüleri ve boyut dağılım histogramında açıkça görülmektedir. Şekil 4.13'de AuNPs@PEG-T&BSA için üç adet TEM görüntüsünün analizi sonucunda ortalama partikül boyutunun yaklaşık olarak 19.4 ± 1.9 nm ($n=316$), ortalama partikül küreselliğinin ise 0.91 ± 0.03 olduğu belirlendi.

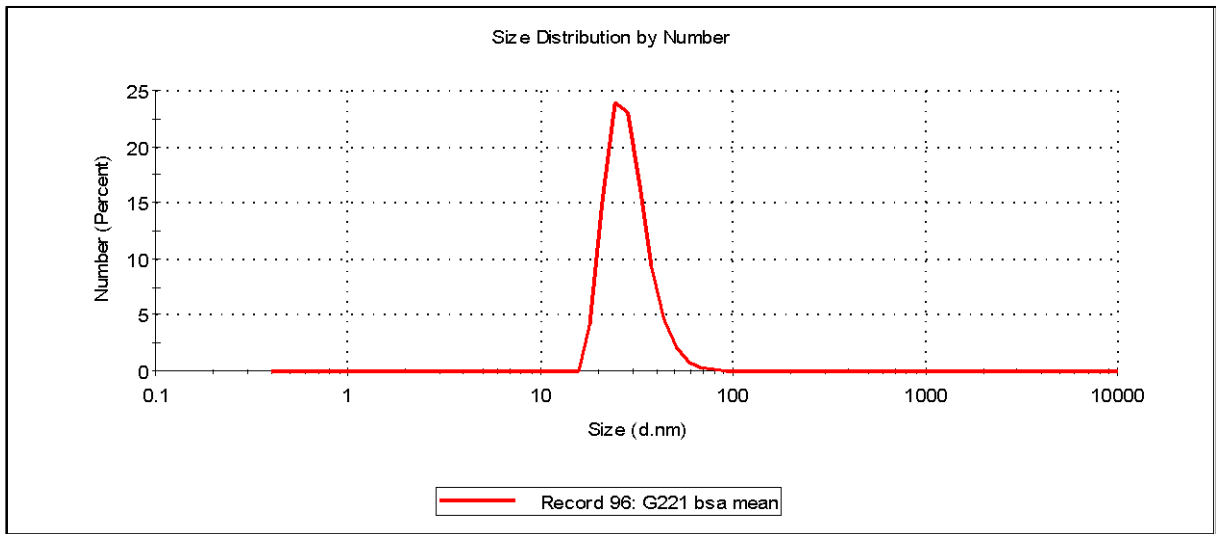


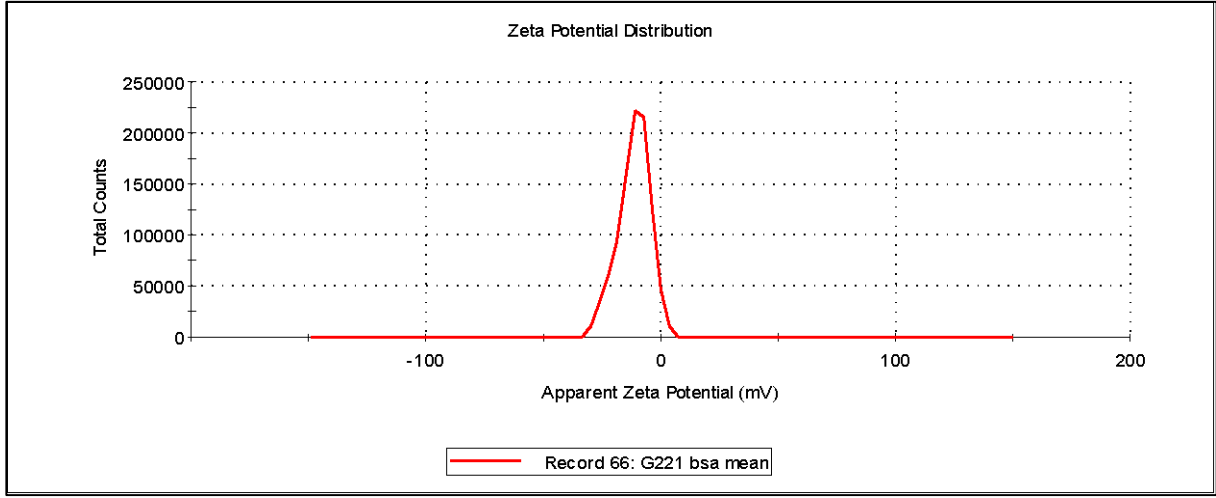
Şekil 4.14. AuNPs@PEG-T&Sema 3F'nin TEM görüntüleri (a, c ve d) ve boyut dağılımı (b).

Şekil 4.14'te AuNPs@PEG-T&Sema 3F için üç adet TEM görüntüsünün analizi sonucunda ortalama partikül boyutunun yaklaşık olarak 19.90 ± 2.8 nm ($n=4604$), ortalama partikül küreselliğinin ise 0.90 ± 0.03 olduğu belirlendi. Bu durum biyokonjugatların küresel formda olduğunu ve stabilitelelerinin bozulmadığını morfolojik olarak göstermektedir. Ayrıca, bu belirgin metalik çekirdeğin görüntüsü ligand değişimi ya da EDC birleşme yöntemlerinden biyokonjugatların etkilenmediğini göstermektedir.

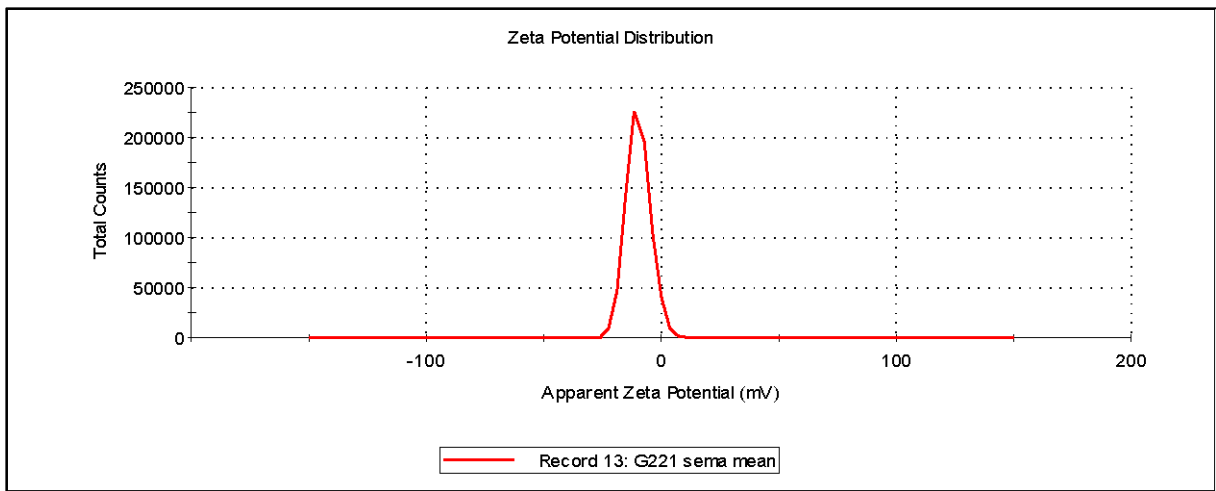
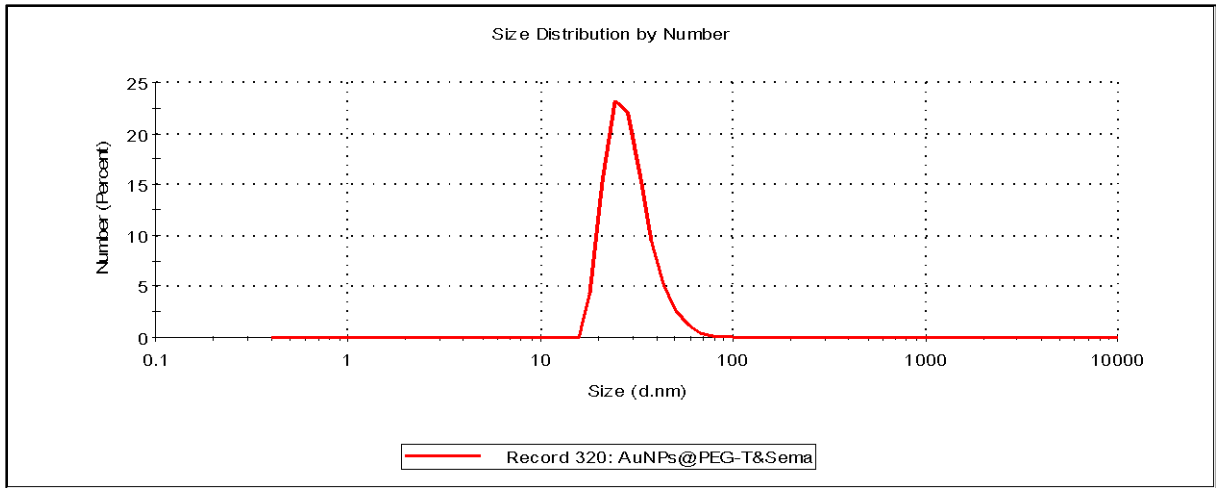


Şekil 4.15. AuNPs@PEG-T sayıca boyut dağılımı ve ζ -potansiyeli





Şekil 4.16. AuNPs@PEG-T&BSA'nın sayıca boyut dağılımı ve ζ -potansiyeli



Şekil 4.17. AuNPs@PEG-T&Sema 3F'nin sayıca boyut dağılımı ve ζ -potansiyeli

Genel anlamda UV-Vis ve TEM görüntüleri biyokonjugatların boyutları ve yüzey yükleri hakkında kesin bilgi vermediğinden yüzey yükleri ve hidrodinamik çapları gibi parametrelerin belirlenmesi için DLS ile ölçüm yapıldı.

Parçacıklar kendilerini saran çözücü moleküller sayesinde rastgele olan Brownian hareketini yapar. Partikülün boyutu büyüdükçe Brownian hareketi de yavaşlar. NP'nin yüzeyinde olan herhangi bir değişiklik difüzyon hızını etkiler ve dolayısıyla NP'nin boyutunu değiştirir. Küçük partiküller hızlı hareket eder ve lazerin önünde kısa sürede durur. Bunun için yoğunluğunda küçük dalgalanmalar olur.

Şekil 4.15-17'de biyokonjugatların sayı bölümüne ait DLS ölçüm sonuçları verilmiştir. Sayıya ait sonuçlara bakıldığında biyokonjugatların arasında daha az fark olması bu çözeltideki NP'lerin hemen hemen eşit sayıda olduğunu göstermektedir. Hidrodinamik çaplarında ise artış olduğu gözlemlendi. Hidrodinamik çapları AuNPs@PEG için 39 nm iken AuNPs@PEG-T 39.42 nm ve AuNPs@PEG-T&BSA için 42.81 nm, AuNPs@PEG-T&Sema 3F için 64.40 nm bulundu. BSA ve Sema 3F ile fonksiyonelleştirme muhtemelen sulu ortam içerisinde difüzyon hızını ve birleştirme reaksiyonu verimini etkilemektedir. NP'nin yüzeyindeki molekül tabakasının difüzyon hızını yavaşlatmasından dolayı hidrodinamik çap bu durumdan etkilenmiş ve arttığı gözlemlenmiştir. Sonuçta hidrodinamik çaptaki artışların literatür ile uyumlu olduğu görüldü [209].

NP'lerin yüzey yük yoğunluğu, ilaç verilmesi ve hücre alımı gibi birçok uygulamanın yanında biyokonjugasyon, fonksiyonelleştirme sürecinde de çok önemli bir rol oynamaktadır. ζ -potansiyeli, çözelti içinde parçacıkların elektrokinetik davranışlarını düzenleyen önemli bir parametredir. Bu parametre, bir dış elektrik alan içinde partiküllerin elektroforetik hareketliliğini belirler. Buna ilaveten partiküller arasındaki ya da bir partikül ve bir bağlayıcı yüzey arasındaki elektroforetik itme partikül çekimini ya da adezyonunu önleyici veya teşvik edici rol oynar. ζ -potansiyeli çıplak bir parçacık için partikülün asıl yüzeyini ifade ederken kapanmış partikül için sıvı ve kaplama arasındaki sınır bölgesi olarak tanımlanır.

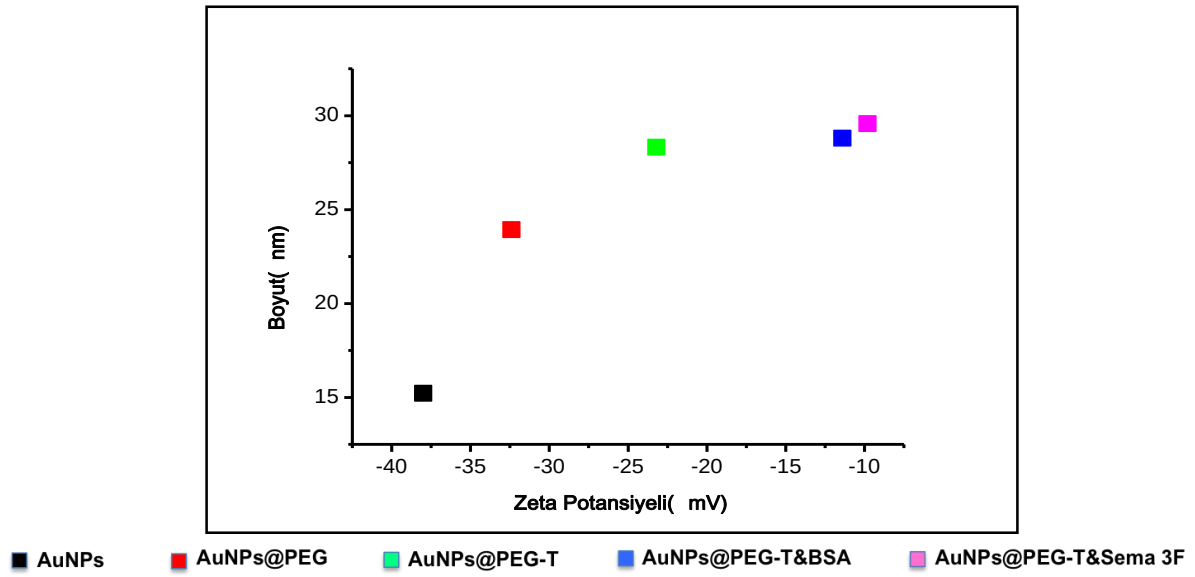
Şekil 4.15-17’de biyokonjugatlar için ζ -potansiyeli sonuçları verilmiştir. Çizelge 4.4’te AuNPs@PEG için verilen sonuçlarda -32.4 mV olarak bulunan yüzey yükü AuNPs@PEG-T ile karşılaştırıldığında arasında -9 mV’lik bir fark olduğu gözlemlendi. AuNPs@PEG-T&BSA’nın yüzey yükü -11.4 mV, AuNPs@PEG-T&Sema 3F’nin yüzey yükü -9.81 mV bulundu. Sonuçlara göre BSA ve Sema 3F ile fonksiyonelleştirilen NP’lerin yüzey yükünün arttığı görülmektedir. Yüzey yükündeki bu artışın BSA ve Sema 3F’nin EDC kimyasalı vasıtası ile kovalent bağlanma sonrası NP yüzeyinde meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Chen ve ark. [209] yapmış olduğu çalışmada Anti-Her2 antikoru ve ScFvEGFR ile fonksiyonelleştirilen manyetik demir oksit nanopartiküllerde de hidrodinamik çapın 23 nm’den 35 nm’ye, yüzey yükünün -9.7 mV’den -4.2 mV’ye çıktığını tespit etmiştir. Biyokonjugatlar için elde edilen yük ve hidrodinamik çap değişimi literatürdeki benzer çalışmalarla uygunluk göstermektedir [209].

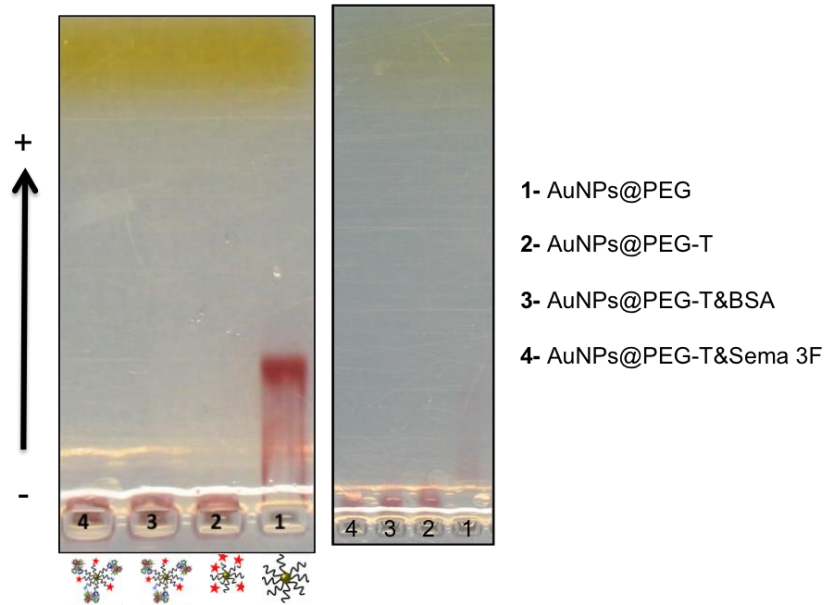
Çizelge 4.4. AuNP’lerin fizikokimyasal özelliklerinin özeti

	Metalik çekirdek [nm]	Hidrodinamik çap (Z-Ortalama) [nm]	Net Yük [mV]	Sayı [nm]
AuNPs@sitrat	18.8 ± 2.1	24.99	-38.3	15.23
AuNPs@PEG	19.3 ± 2.4	39	-32.4	23.93
AuNPs@PEG-T	-	39.42	-23.2	28.22
AuNPs@PEG-T&BSA	19.4 ± 1.9	42.81	-11.4	29.03
AuNPs@PEG-T&Sema 3F	19.9 ± 2.8	64.40	-9.81	29.57

Çizelge 4.4’te AuNPs@sitrat, AuNPs@PEG ve biyokonjugatların hidrodinamik çap değişimleri ile diğer fizikokimyasal özellikleri özetlenmiştir. Ayrıca boyut ve ζ -potansiyelindeki artış Şekil 4.18’de gösterilmektedir. Sonuçlara göre hidrodinamik çap ve ζ -potansiyelindeki artış literatür ile uyumludur [209].



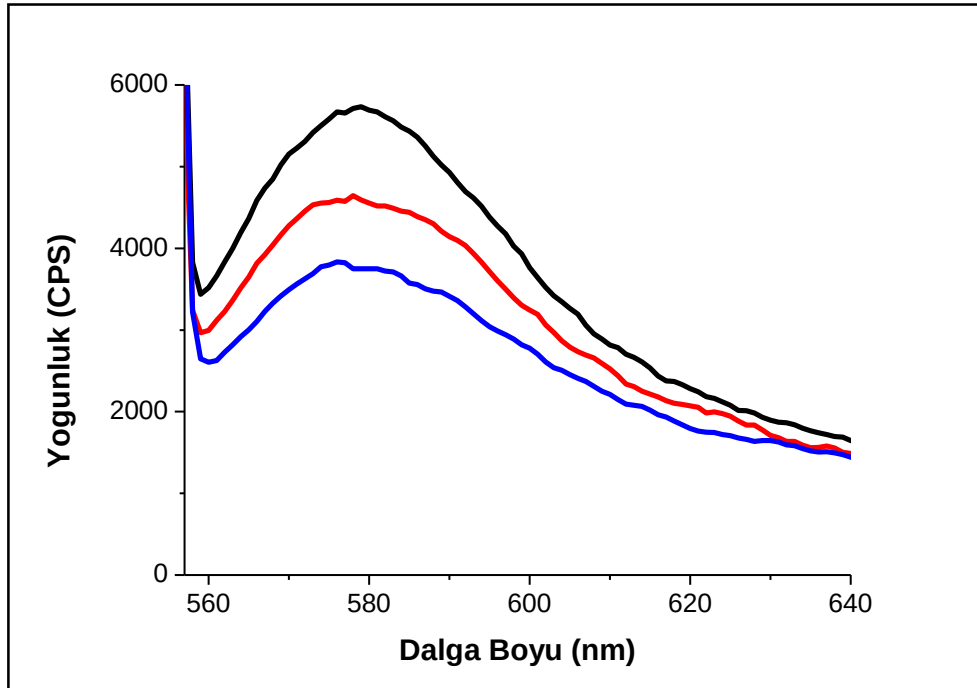
Şekil 4.18. AuNPs@sitrat, AuNPs@PEG ve biyokonjugatların boyut dağılımı ve ζ -potansiyeli sonuçları



Şekil 4.19. PEG ile modifiye edilen AuNP'ler ve biyokonjugatların jel görüntüsü

Ortaya çıkan kolloidler arasında net yük ve boyuttaki farklılıkları belirlemek ve EDC birleşme ürünlerini kalitatif olarak incelemek için jel elektorforezi kullanıldı [202, 203]. Şekil 4.19'da dört adet farklı örneğin biyofonksiyonelleştirilme sonrasında %1 agaroz jel içinde 30 dk. (soldaki) ve 60 dk. (sağdaki) için gerçekleştirilen jel elektorforezi fotoğrafı gösterilmiştir. Agaroz jeller yatay olarak her iki yönde olabilir. Böylece hem pozitif hem negatif türler aynı anda görülebilir. Burada AuNPs@PEG ve diğer tüm

biyokonjugatların negatif yönden pozitif yöne hareket ettiği gözlenmiştir. Agaroz jel elektroforezinde hareketlilik NP'lerin boyut ve yüzey yüzünden kaynaklanmaktadır. Hareketteki meydana gelen değişiklikler NP'lerin yük ve boyutundaki değişimlerden etkilenir. AuNPs@PEG'nin en hızlı olduğu, diğer biyokonjugatların ise AuNPs@PEG ile kıyaslandığında çok yavaş olduğu hatta ilerleyemediği ve kendi aralarında fazla bir fark olmadığı gözlenmiştir. AuNPs@PEG ile karşılaştırıldığında fonksiyonelleştirilen NP'lerin gecikmesi önemli ölçüde fonksiyonelleştirme sürecinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin bir göstergesidir. Jel elektroforezi uzun yıllardır farklı uzunluk ve konformasyondaki biyomolekülleri ayırmak için kullanılmaktadır. NP-DNA çiftlerini istenilen sitokiyometride saflaştırmak için kullanılabileceği 2001 yılında Alivisat ve ark. [217] tarafından gösterilmiştir. Kısa bir süre sonra ise proteinlerle bağlı NP'ler için kullanılmıştır [210].



Şekil 4.20. Kolloidal AuNP'lerin floresans spektrumları. AuNPs@PEG-T (siyah çizgi), AuNPs@PEG-T&BSA (kırmızı çizgi), AuNPs@PEG-T&Sema 3F (mavi çizgi)

Floresans spektrometre ile protein ve NP arasındaki etkileşim hakkında bilgi sağlanabilir [218]. Bu teknik aynı zamanda NP'lerin kantitatif analizinin yapılması içinde son derece uygun bir yöntemdir.

Pek çok florofofor madde altın yüzeylere yakın temasta bulunduğunda floresans özelliği bastırılmaktadır [211]. Floresans bastırma (sönümlleme) özelliğinin altında iki temel strateji yatmaktadır. Bu stratejilerden ilkinde göre belli bir analitin kantitatif tayini için AuNP'ler spesifik olarak bu analite bağlanarak ligandlar ile konjuge edilebilir. Daha sonra bu bağlanma bölgeleri analiz edilecek ligandların florofoforlar ile modifiye edilmiş türleri ile doyurulur ve AuNP'lere bağlanmış bu florofoforların floresans özelliği bastırılır.

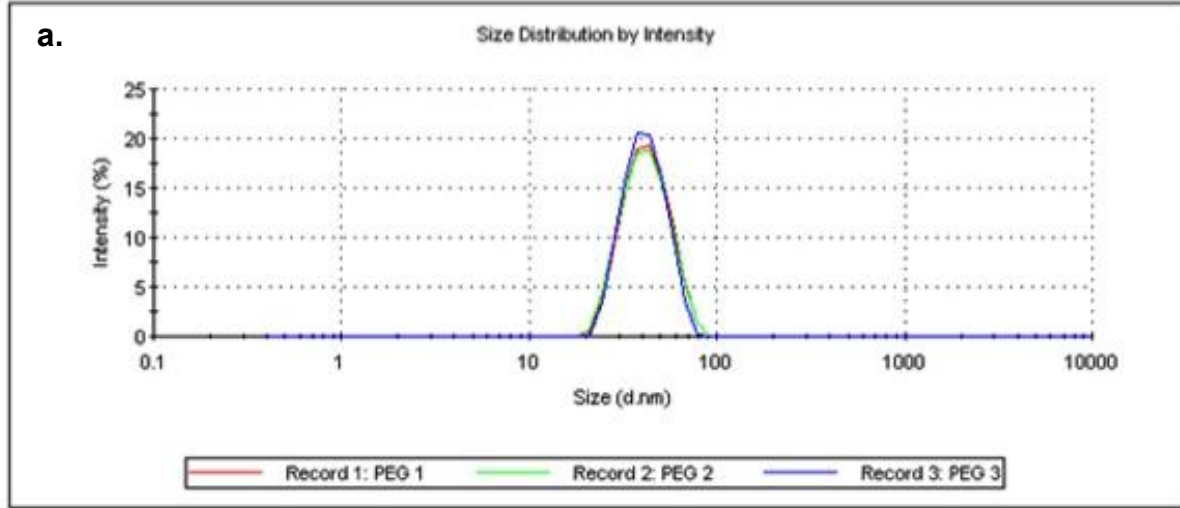
Floresans bastırma stratejilerinden ikincisi biraz daha farklıdır. Bu yaklaşımda hedef molekülün varlığında konformasyonu değişen bir "uzatıcı koldan" yararlanılır. Bu bağlayıcı uzatıcı kol üzerinden AuNP yüzeyine bağlanan florofofor madde herhangi bir analit olmadığı durumda AuNP yüzeyinden uzakta bulunduğu için floresans özellik gösterir; ancak hedef bir analit varlığında bu analit ile etkileşen uzatıcı kol konformasyonunu değiştirerek bağlı bulunduğu florofofor maddeyi AuNP yüzeyinin yakınlarına çeker ve floresans özellik bastırılmış olur.

Şekil 4.20'de üç farklı örneğin floresans spektrum ölçüm sonuçları gösterilmektedir. AuNPs@PEG-T'nin floresans yoğunluğunun BSA ve Sema 3F ile fonksiyonelleştirilenlerden daha fazla olduğu görülmektedir. Burada floresans bastırma özelliğinden dolayı floresans yoğunluğunun azaldığı gözlenmiş ve literatür ile uygun sonuçlar elde edilmiştir [211, 218]. Bu sonuçlar, biyomoleküllerin fonksiyonelleştirilmesi sonucunda AuNP boya hibridlerinin son derece hassas görüntüleme probu olarak kullanılabileceğini ve bunların mikroskop ya da spektroskopi gibi tekniklerle incelenebilmesine olanak sağladığını göstermiştir.

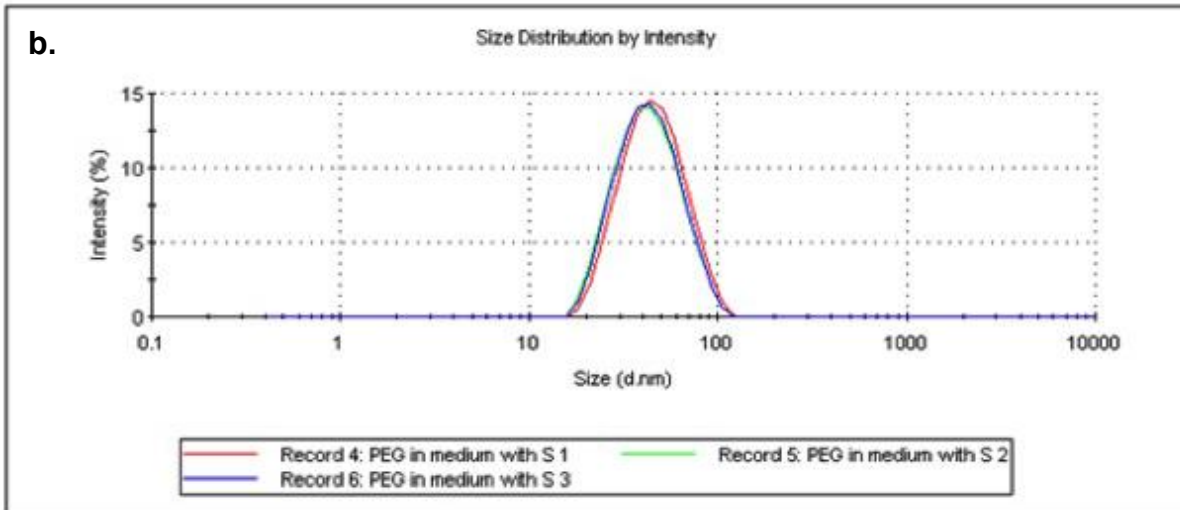
4.3. AuNP'lerin Stabilitesi

Çizelge 4.5. AuNPs@PEG stabilite sonucu

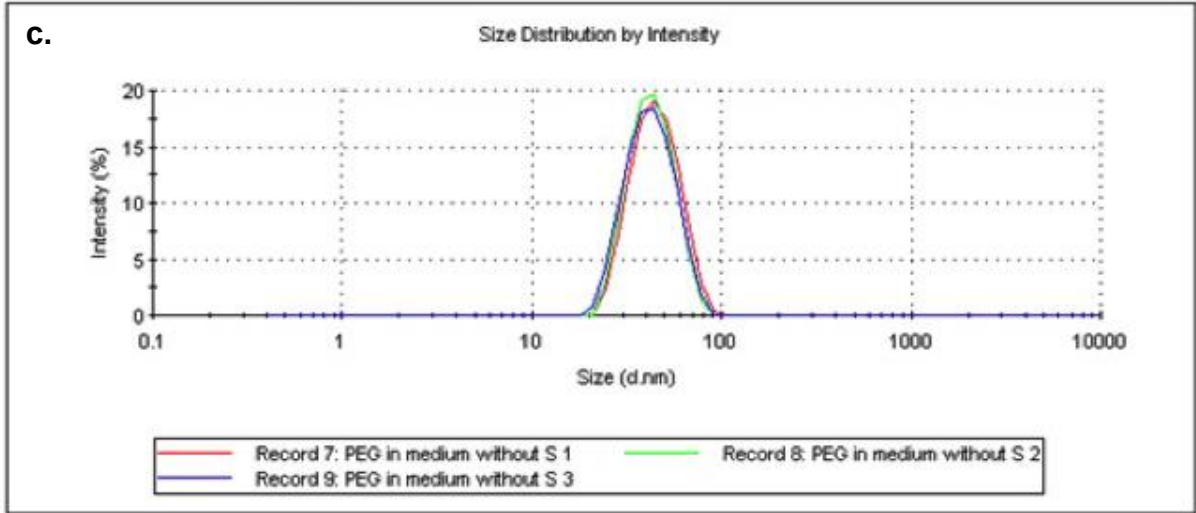
	AuNPs@PEG	Serumlu besiyeri	Serumsuz besiyeri
dh, nm	39.45±0.38	37.54±1.3	40.49±1.37



Şekil 4.21. AuNPs@PEG



Şekil 4.22. AuNPs@PEG serumlu besiyeri içerisinde



Şekil 4.23. AuNPs@PEG serumsuz besiyeri içerisinde

AuNP@PEG'lerin hücre kültürü ortamında (37°C'de) HUVEC hücreleri için kullanılan besiyeri içinde boyut dağılımı ölçülüp NP'ler karakterize edilerek stabil olduğu gösterildi. DLS ile yapılan 3 tekrarlı ölçüm sonuçları PEG'lenen AuNP'ler sulu ortam içindeyken 39.45 ± 0.38 nm, serumlu besiyerinde 37.54 ± 1.3 nm ve serumsuz besiyerinde 40.49 ± 1.37 nm olarak bulundu. AuNP'lerin PEG ile modifiye edildikten sonra fizyolojik koşullar altında da stabil olduğu gösterildi. Çökelmenin seviyesi besiyerinin bileşimine göre değişiklik göstermektedir. Besiyerinin bileşiminin (çift değerli iyonlar, serum) anlamlı etkisi gösterildi ve böylece kültür ortamında ve fizyolojik koşullar altında NP'lerin sitotoksitesinin değerlendirilmesi ve biyolojik sistemler ile NP'lerin etkileşiminin anlaşılması için NP'lerin karakterizasyonunun önemi gösterildi.

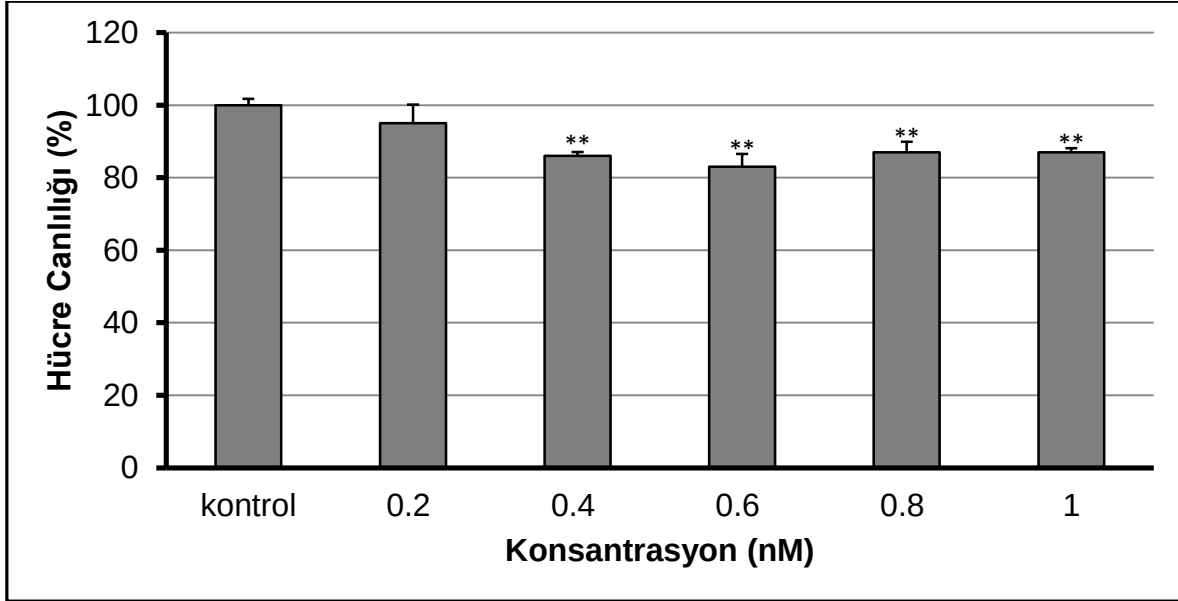
Birkaç nanometreden birkaç yüz nanometre ölçek aralığına kadar AuNP'lerin sentezinin sulu çözeltilerde olduğu kadar organik çözücülerde gerçekleştiği bilinmektedir. Tipik sentez mekanizması, AuCl_3 gibi Au tuzlarının, Au iyonlarının çekirdeklenmesine yol açarak partikül formasyonu göstermesini sağlayacak indirgeme ajanı ilavesiyle birlikte indirgenmesidir. Ayrıca, AuNP'lerin yüzeyine adsorbe olan ya da kimyasal olarak bu yüzeye bağlanan bir stabilizatör ajan gereklidir. Bu stabilizatör ajan genellikle yüklüdür; böylece eşit yüklü NP'ler birbirlerini iter ve bu sayede koloidal olarak stabiliteyi korur. Sulu çözeltilerde daha yaygın sentez yöntemi için, sitrik asit Au tuzunu ilk olarak indirgeyici görev yapar ve böylece

çekirdeklenmeyi tetikler ve ikinci olarak partikülün yüzeyine tutunmasını partiküllerin negatif yükü sayesinde koloidal stabilitenin oluşumunu sağlar [148, 219]. Benzer sentez fazları ayrıca organik çözücülerde gerçekleştirilebilir [153, 220]. Ancak bu durumda indirgeme ajanı stabilizatör ajandan farklıdır. Kısacası, Au yüzeyinin nanoboyutta oldukça reaktif olması AuNP'lerin kümeleşme sorununu da beraberinde getirmektedir. Ayrıca ortam ya da çözücü madde, zaman, pH ve sıcaklık gibi etmenler de partiküllerin kümeleşip, çökmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla fizyolojik bir ortamda NP'lerin karakteristik özelliğinin daha da iyi anlaşılması son derece önemlidir.

NP'lerin karakterizasyonunun önemli yanı *in vitro* ve *in vivo* ortamda benzeri koşullar altında ölçülebilmesidir. Önemli parametrelerden biri fizyolojik koşullar altında (örneğin plazma) NP'lerin çökme seviyesi ve stabilitesi ya da biyolojik uygulamalar (örneğin kültür besiyeri) için farklı besiyerindeki davranışlarının incelenmesidir. Çeşitli çalışmalarda [221-225] farklı besiyerindeki NP'lerin stabilitesi ciddi olarak iyon ve protein bileşimine bağlı olarak azaltılabilir; sonuç olarak NP karakteristiği ve fonksiyonelliği *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda bu durumdan etkilenir. Boyut, yük ve kimyasal özellikler gibi farklı parametrelerden dolayı verilen NP'lerin karakterizasyonunun kalitesinin, uygulanabilirliğinin ve farklı fizyolojik koşullar altında NP'lerin özelliğinin belirlenmesi çok önemlidir. Örneğin, suda ya da düşük iyonik kuvvetteki bir tamponda stabil NP'lerin fizyolojik ya da benzeri koşullar altında [221-225] büyük çökelti oluşturmadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Farklı çalışmalarda ilgili besiyerinde NP'lerin karakterizasyonunun bunların toksisitesinin değerlendirilmesi için gerekli olduğunu göstermiştir [226]. Tüm bu çalışmalar, verilen besiyeri içinde stabilite'nin NP'lerin yüzey özelliğinin bir kompleks bileşimi, besiyeri bileşimi ve NP'lerin konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, fizyolojik olarak uygun besiyerinde NP'lerin karakterizasyonu biyolojik sistemler ile etkileşiminin anlaşılması için çok önemlidir.

4.4. AuNP'lerin Sitotoksitesisi

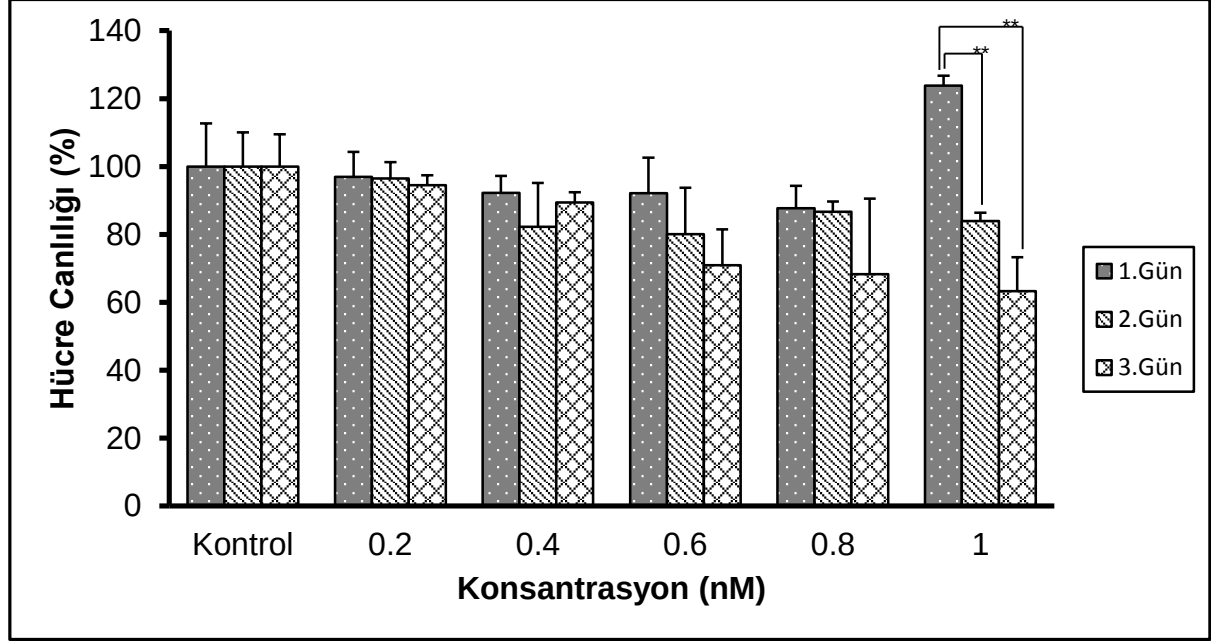
0 – 1 nM konsantrasyon aralığında AuNPs@PEG formülasyonlarının *in vitro* sitotoksitesilerinin değerlendirilmesi çalışmasından elde edilen hücre canlılığı değerleri (%) Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'de verilmiştir. Deneyler dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.24. A549 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda AuNPs@PEG uygulanmasını takiben 1. günün sonunda elde edilen sitotoksitesite değerleri (n=4, ** $p<.01$). Hata çubukları standart hatayı göstermektedir.

PEG ile modifiye edilen AuNP'lerin toksik etkisinin olup olmadığı 0.2 nM, 0.4 nM, 0.6 nM, 0.8 nM ve 1 nM olmak üzere beş farklı konsantrasyonun A549 hücre hattıyla etkileştirilmesinden 24 saat sonra yapılan MTT yöntemiyle belirlendi. MTT yönteminden elde edilen verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması için ANOVA kullanıldı. ANOVA sonucu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında AuNP@PEG ile etkileştirilen gruplarda hücre canlılığında anlamlı bir azalma görülmüştür ($F(5,18) = 7.137, p<.05$). Grup içi farklılıkları belirlemek üzere yapılan post-hoc testlerinin ardından hücre canlılığına ilişkin olarak 0.2 nM'den daha yüksek konsantrasyonlarda görülen düşüşün anlamlı olduğu görüldü ($p<.01$). Bununla birlikte hücre canlılığına ilişkin olarak deney gruplarının aritmetik ve standart sapma değerleriyle elde edilen MTT grafiği incelendiğinde AuNP@PEG kolloidlerinin tüm konsantrasyonlarında

kontrol gurubuna göre belirlenen bağıl canlılık oranının %80'nin altına düşmediği görülmektedir. Bu nedenle AuNP@PEG kolloidlerinin A549 üzerinde önemli bir sitotoksik etkiye yol açmadığı sonucuna varılmıştır [227].



Şekil 4.25. HUVEC hücrelerine farklı konsantrasyonlarda AuNPs@PEG uygulanması takiben 1., 2. ve 3. günün sonunda elde edilen sitotoksisite değerleri (n=4, **p<.01). Hata çubukları standart hatayı göstermektedir.

AuNP@PEG kolloidlerinin sitotoksik etkileri 0-1 nM arasında olmak üzere 5 farklı konsantrasyonun HUVEC ile etkileştirilmesinden 24, 48 ve 72 saat sonra yapılan MTT ölçümleriyle belirlendi. Grupların karşılaştırılması ANOVA testiyle yapıldı. MTT yöntemi sonuçlarına göre, AuNP@PEG'in hücre canlılığı üzerindeki etkisi konsantrasyona göre istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p>.05$). Bununla birlikte 1 nM konsantrasyon değerinde ilk 24 saat ile karşılaştırıldığında 48 saat ve 72 saat sonunda hücre proliferasyonu anlamlı bir düşüş göstermiştir ($p<.01$). Grafik incelendiğinde hücre canlılık oranlarının genellikle %80'in üzerinde olduğu görülmektedir. Yüksek konsantrasyonda NP kullanıldığında hücre canlılığı %80 altına düşüyorsa bunun sitotoksik olduğu düşünülebilir [227]. Bu sonuçlar, NP'lerin mitokondriyal solunuma zarar vermediğini göstermektedir. NP'lerin sitotoksisitesini değerlendirmek için standart protokoller olmamasına rağmen, MTT yöntemi tasarlanan NP'lerin biyouyumluluğunu değerlendirmek için bir ön test olarak

kullanılmaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında kullanılan AuNP'ler biyolojik uygulamalar için uygun adaylar olarak görünmektedir.

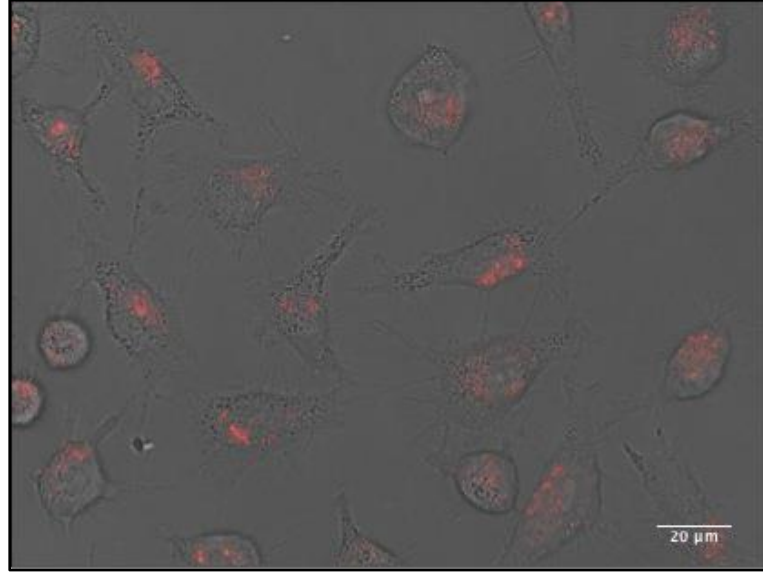
İlgili bir molekülde bulunan farklı işlevsel gruplar (tiyol, fosfin, amin, karboksi vb.) farklı NP@PEG türevlerinin elde edilmesinde kullanılabilir. Tiyol-PEG (SH-PEG) fizyolojik koşullarda AuNP'lerin stabilizasyonu için mükemmel bir adaydır ve kan dolaşımında uzun süreli sirkülasyona olanak tanır [228, 229]. Bununla birlikte bugüne kadar PEG kaplı AuNP'lerin *in vivo* ve *in vitro* toksitesi ve hücresel alımı üzerine çok sayıda rapor bulunmaktadır.

Takahashi ve ark. [228] HeLa hücreleriyle yaptığı çalışmada Au nanooçubuklar üzerindeki CTAB moleküllerinin PEG ile yer değiştirdiğinde NP'lerin toksisitesinin azaldığını ortaya çıkarmıştır. Shukla ve ark. 3.7 nm boyutundaki PEG kaplı NP'lerin HeLa hücrelerinin çekirdeğine girdiğini ve toksisiteye yol açmadığını raporlamıştır. Bununla birlikte 13 nm SH-PEG kaplı Au nanoküreleri fare dokusunda inflamasyon ve apoptozu uyarmıştır. PEG ile kaplanmış AuNP'lerin doku kinetiği, kanser birikimi ve biyolojik dağılımı boyuta bağlıdır; küçük NP'ler kan dolaşımında daha uzun süre kalır, doku infiltrasyon şansı daha büyük ve tümörlerde birikimi daha fazladır [206, 230, 231].

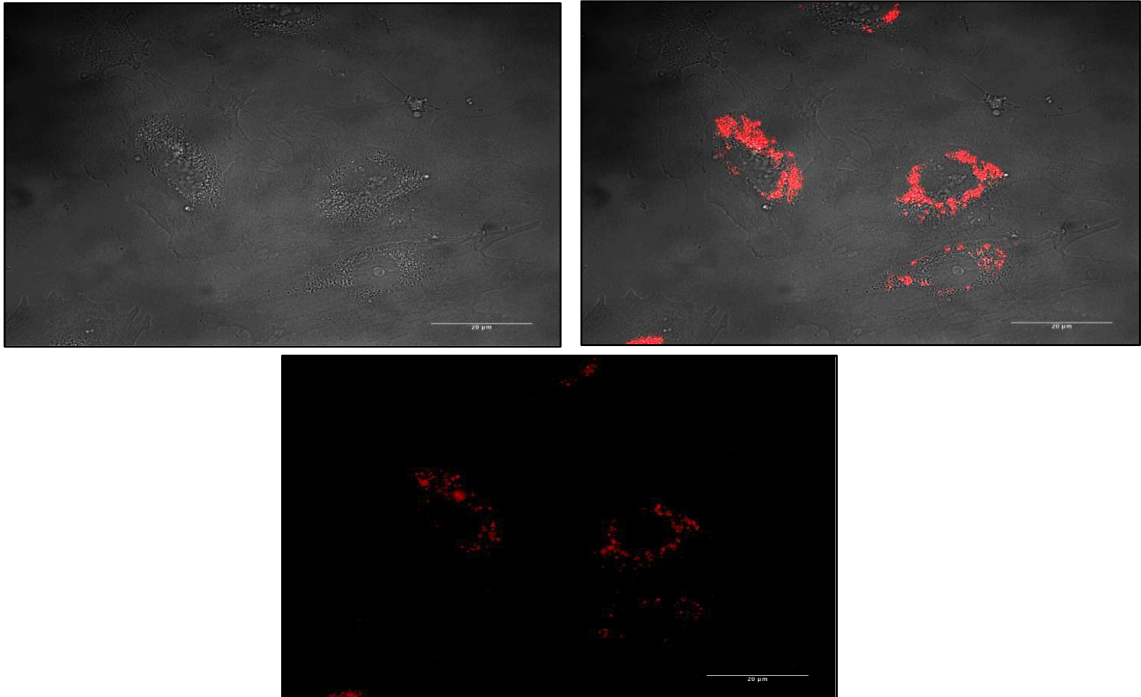
Vasküler patolojilerde önemli rollere sahip olan endotelyum tümör büyümesi, ateroskleroz ve enflamatuvar hastalıklar gibi çok sayıda hastalığın gelişiminde önemli fonksiyonlara sahiptir. Kanser hücreleri ile kıyaslandığında endotel hücreleri çok daha hassastır. Bu nedenle, NP'lerin sitotoksitesinin değerlendirilmesinde hem A549 epitel hücreleri hem de HUVEC endotel hücreleri kullanılarak hücre canlılığı üzerindeki etkilerine odaklanıldı. Sonuç olarak çok hassas olan endotel hücrelerinde bile hücre canlılığının %80'nin altına düşmediği ancak zamana bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir.

4.5. Hücre Kültürü

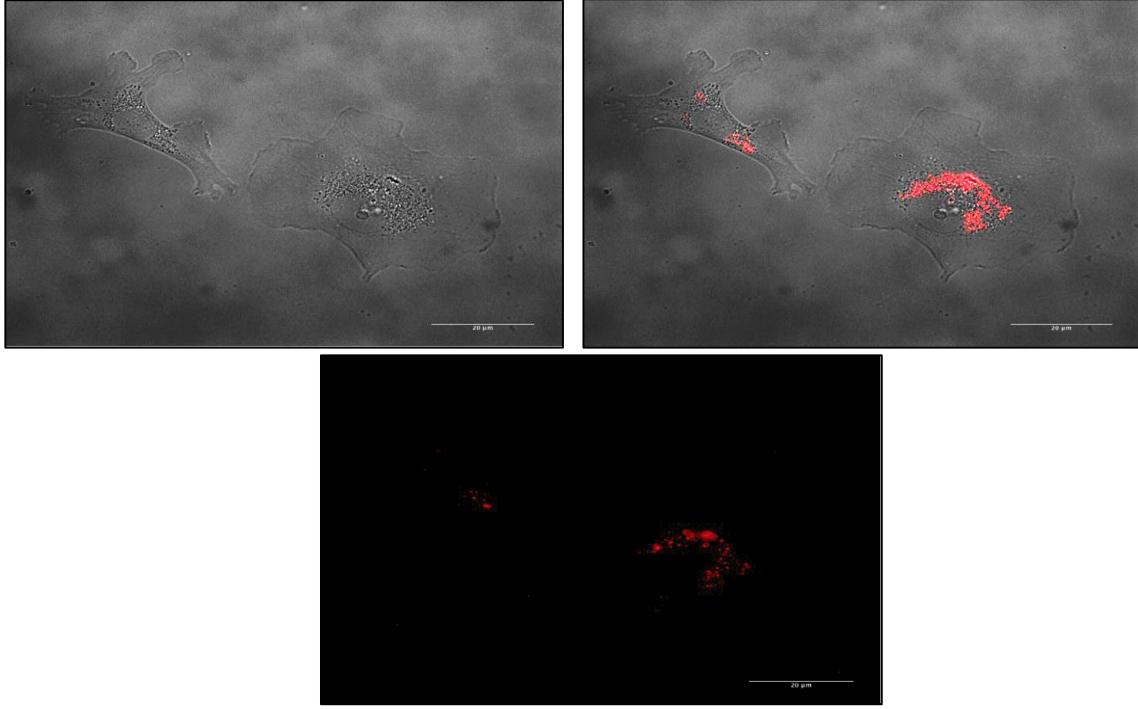
4.5.1. Hücresel Alımın Değerlendirilmesi



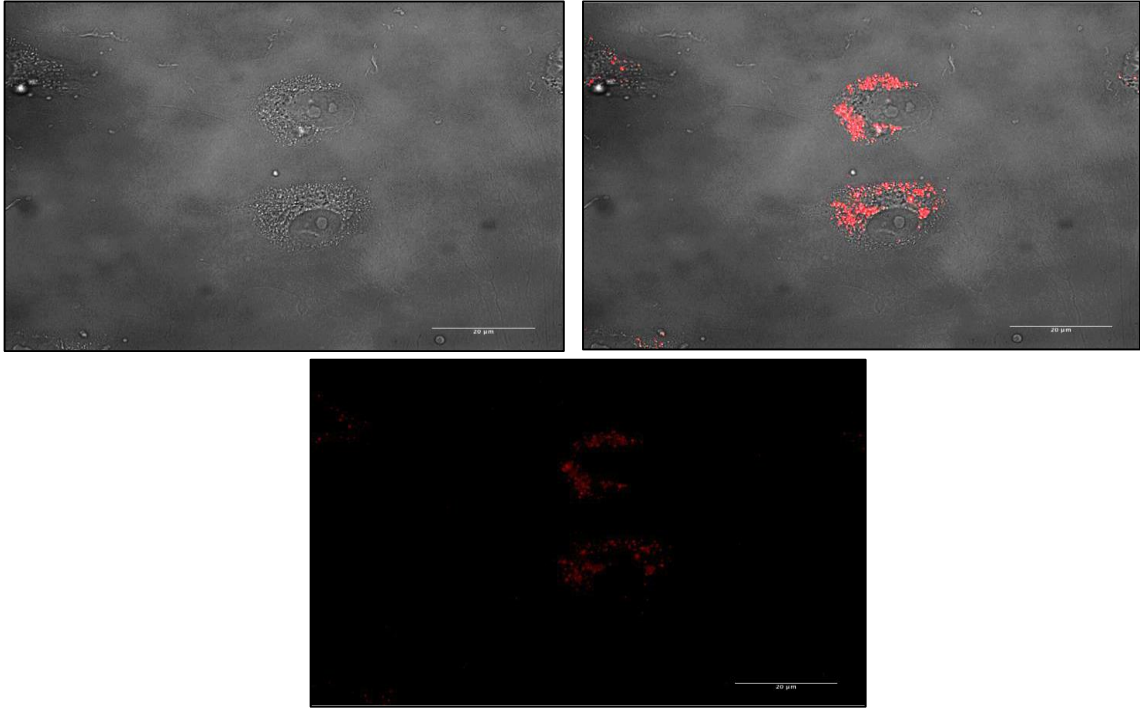
Şekil 4.26. AuNPs@PEG-T konjugatlarının A549 hücreleri ile etkileşiminden 24 saat sonraki hücresel alım görüntüsü (x 20)



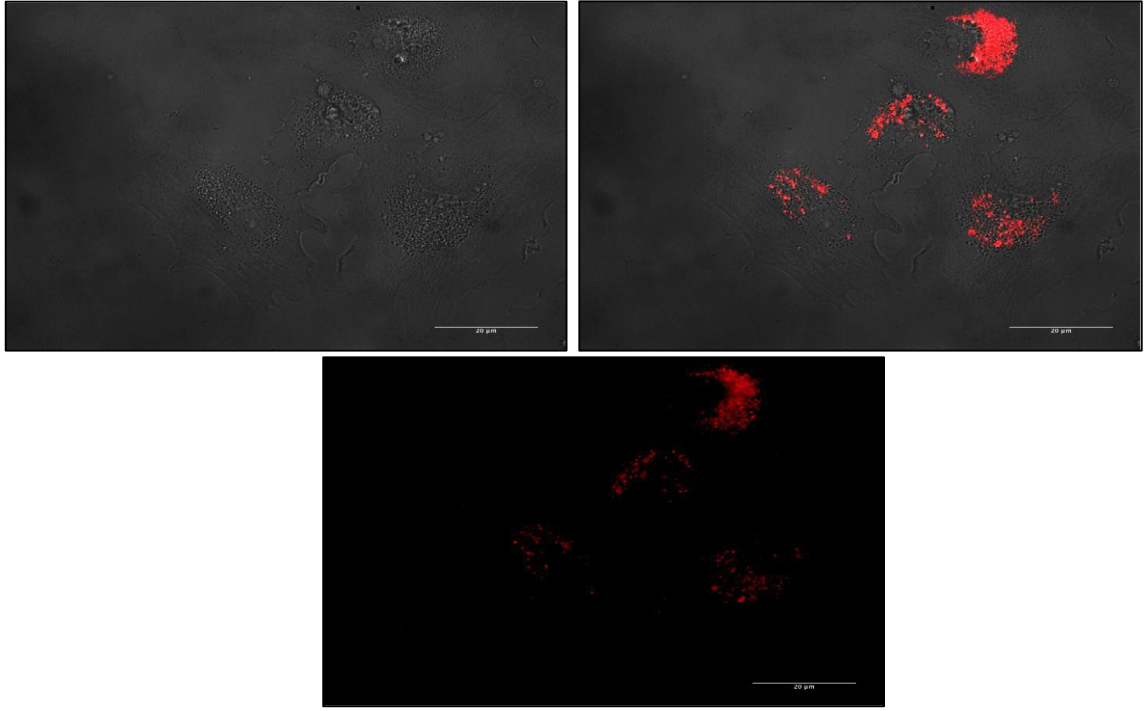
Şekil 4.27. AuNPs@PEG-T&BSA konjugatlarının HUVEC ile etkileşiminden 24 saat sonraki hücresel alım görüntüsü (x 20)



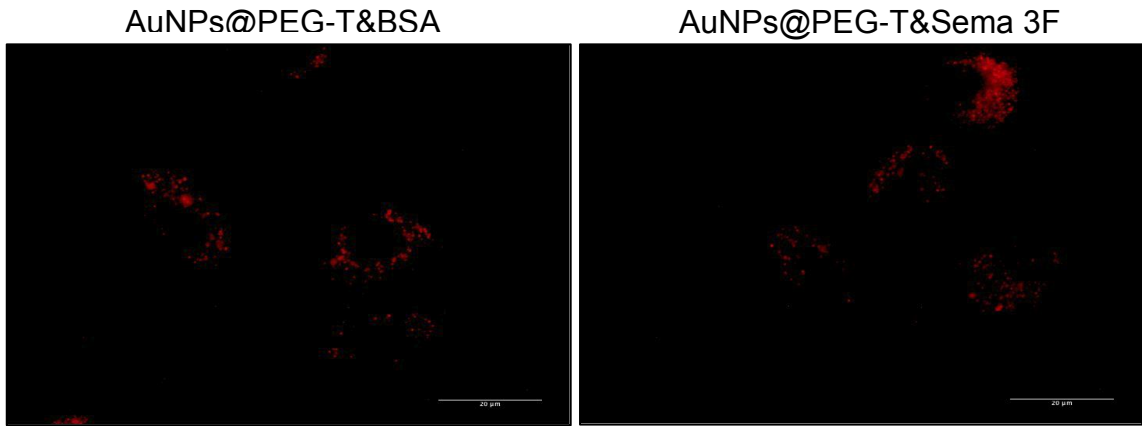
Şekil 4.28. AuNPs@PEG-T&Sema 3F konjugatlarının HUVEC ile etkileşiminden 24 saat sonraki hücresel alım görüntüsü (x 20)



Şekil 4.29. AuNPs@PEG-T&Sema 3F konjugatlarının HUVEC ile etkileşiminden 24 saat sonraki hücresel alım görüntüsü-2 (x 20)



Şekil 4.30. AuNPs@PEG-T&Sema 3F konjugatlarının HUVEC ile etkileşiminden 24 saat sonraki hücresel alım görüntüsü-3 (x 20)



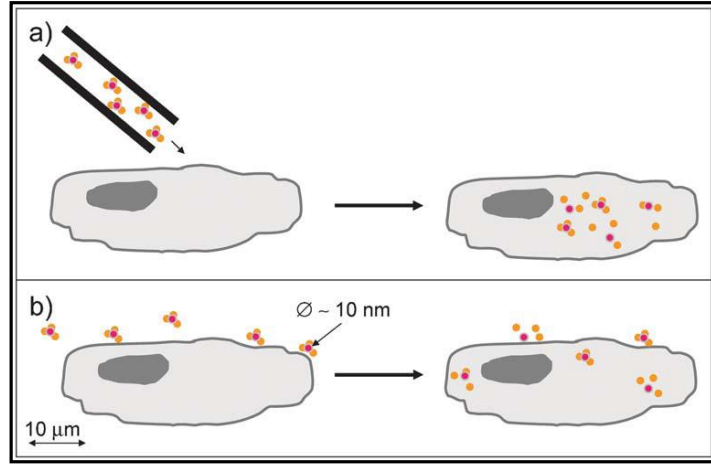
AuNPs@PEG-T&BSA

AuNPs@PEG-T&Sema 3F

Şekil 4.31. Fonksiyonelleştirilen AuNP'lerin hücresel alımının karşılaştırılması. Ölçek çubuğu 20 μm'dir.

AuNP'ler moleküllerin hücre içine taşınması için uzun zamandır kullanılmaktadır. Bu amaçla moleküller AuNP yüzeyinde adsorbe edilir ve biyokonjugasyon hücrelerin içine sunulur. Hücre içerisine giriş gen tabancasındaki gibi zorla ya da partikül alımı ile doğal olarak başarılabilir. Hücrelerin içerisinde moleküller salım mekanizmalarına bağlı olarak AuNP'lerden ayrılır.

Hücreler reseptör-ligand etkileşimi yoluyla spesifik olarak ya da spesifik olmayan etkileşimler yoluyla kolloidal NP'leri içine alır. Amaç AuNP yüzeyine adsorbe olan molekülleri hücre içerisine transfer etmektir (Şekil 4.32). Hücre içine spesifik alım için hücre membranı üzerindeki reseptörlere spesifitesi olan ligandlar (membrana bağlı transferin reseptörlerine bağlanan Transferrin [232, 233] gibi) AuNP'lerin yüzeyine konjuge edilir. Spesifik alım spesifik olmayan alımdan daha etkin olup, bu yolla ligand modifiyeli AuNP'ler bu ligandlar için ilgili reseptöre sahip olan hücrelerle çoğu zaman birleşirken diğer hücrelerle birleşmez. Bu duruma sağlıklı hücrelerde daha az bulunan fakat kanser hücrelerinin yüzeyinde fazlasıyla bulunan reseptörlere spesifitesi olan ligandlarla modifiye edilen partiküllerin kanser bölgesinde birikmesi örnek verilebilir [234]. Birleşmeden sonra NP'ler hücre içinde genellikle endozomal/lizozomal veziküler yapılarda saklanır [235]. Partikülleri veziküler yapılardan sitoplazmaya salmak amacıyla partikül yüzeyleri membranı parçalayıcı peptitlerle kaplanır ya da partiküller hücre membranı içinden doğrudan transfere olanak sağlayan peptitlerle modifiye edilir [236]. Bu yöntemle AuNP yüzeyine tutunan moleküllerin hücre içine taşınması mümkündür [140, 171]. Moleküllerin hücrelere partikül aracılı taşınması başlıca iki uygulama için kullanılmaktadır. İlki, gen terapisinde sonradan ilgili proteinin ekspresyonuna neden olacak DNA'nın hücre içine girişidir [237, 238]. İkincisi ise ilaç hedeflemede antikanser ilaçların spesifik olarak kanser dokusuna taşınmasında kullanılır [234]. Moleküllerin kolloidal partiküller üzerine adsorbe edilerek partikül aracılı ilaçların taşınması ve hücre içine transferi hücrelerin kendileri tarafından içselleştiremeyecekleri moleküllerin hücre içerisine taşınmasına olanak sağlar. Bu kolloidal NP'lerin hücrelerce alınması esasına dayanır. Ayrıca yüzeyi modifiye olan NP'ler bunları iletmek için hedef hücrelere spesifik alımı kolaylaştıran ligandlarla konjuge olur.



Şekil 4.32. AuNP'ler aracılığıyla hücre içi taşıma. Hücre içine taşınacak moleküller (turuncu renkli) AuNP (çekirdek kırmızı, stabilizatör katman gri) yüzeyine adsorbe olur. Hücre içindeki bu moleküller daha sonra NP yüzeyinden ayrılır. (a) Gen tabancası: gen tabancası olarak adlandırılan bir sistem kullanılarak hücrelerin içine bir kurşun gibi NP'lerin fırlatılmasıdır. (b) Hücrelerce NP'lerin alımı: NP'lerin spesifik ya da non-spesifik olarak hücrelere dahil olmasıdır. Alımın ardından partiküller hücre içindeki veziküler kompartmanlarda saklanır.

Feldheim ve ark. [146, 239] AuNP'leri, BSA örtüsüyle modifiye edip, değişik hücresel hedefleme peptitleriyle konjuge etmiştir. Hem reseptör aracılı endositoz hem de nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içeren peptitlerle modifiye olan AuNP'ler bu hücrelerin çekirdeğine girmiştir. Araştırmacılar daha sonra hem PEG hem de peptit modifiyeli AuNP'lerin hücrelere girebilme yeteneğini araştırmıştır. İlginç olarak, tek katman içindeki PEG molekülleri büyük olsa bile partiküller hücrelerce aktif olarak içselleştirilmiştir [240]. Bu çalışma çok fonksiyonlu konjugasyonların tasarımıda heyecan verici fırsatlara dikkati çekmiştir.

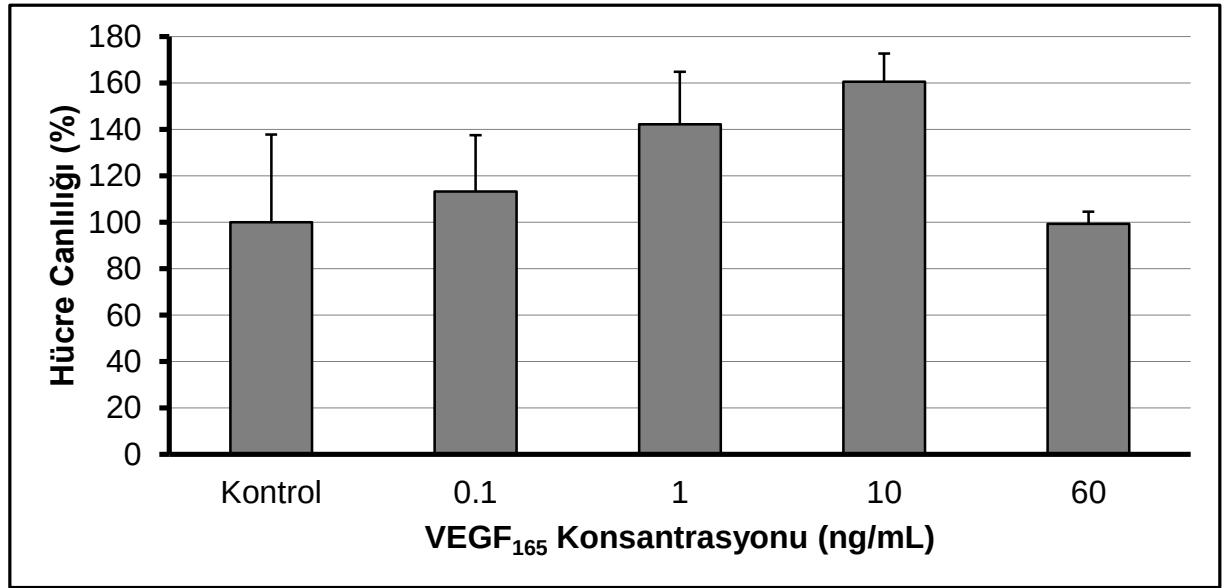
PEG ile modifiye edilen ve proteinler ile fonksiyonelleştirilen AuNP'lerin hücrelere girebilme yeteneği araştırılmıştır. AuNPs@PEG-T, AuNPs@PEG-T&BSA ve AuNPs@PEG-T&Sema 3F ile yapılan hücre içine alım sonuçlarının literatür ile uyumlu olduğu ve biyokonjugatların reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içine alındığı görülmektedir. Biyokonjugatların TAMRA ile etiketlenmesi bunların hücre içine alınmasının görüntülenmesine de olanak sağlamıştır. İlginç olarak Şekil 4. 31'de AuNPs@PEG-T&Sema 3F konjugatları AuNPs@PEG-T&BSA ile karşılaştırıldığında

hücrelerce daha aktif olarak içselleştirildiği görüldü. Tabii ki hücresel alım mekanizması muhtemelen farklı yüzey kimyaları, boyutları ve yükleri nedeniyle farklı altın nanokonjugasyon sınıfları için değişkenlik göstermektedir. Yer değiştirme reaksiyonları AuNP'lerin hücre tarafından içselleştirilme yeteneğinin düzenlenmesinde kullanılabilir [241, 242].

4.5.2. Hücre Proliferasyonu

4.5.2.1. Uygun Anjiyogenez Modelinin Oluşturulması

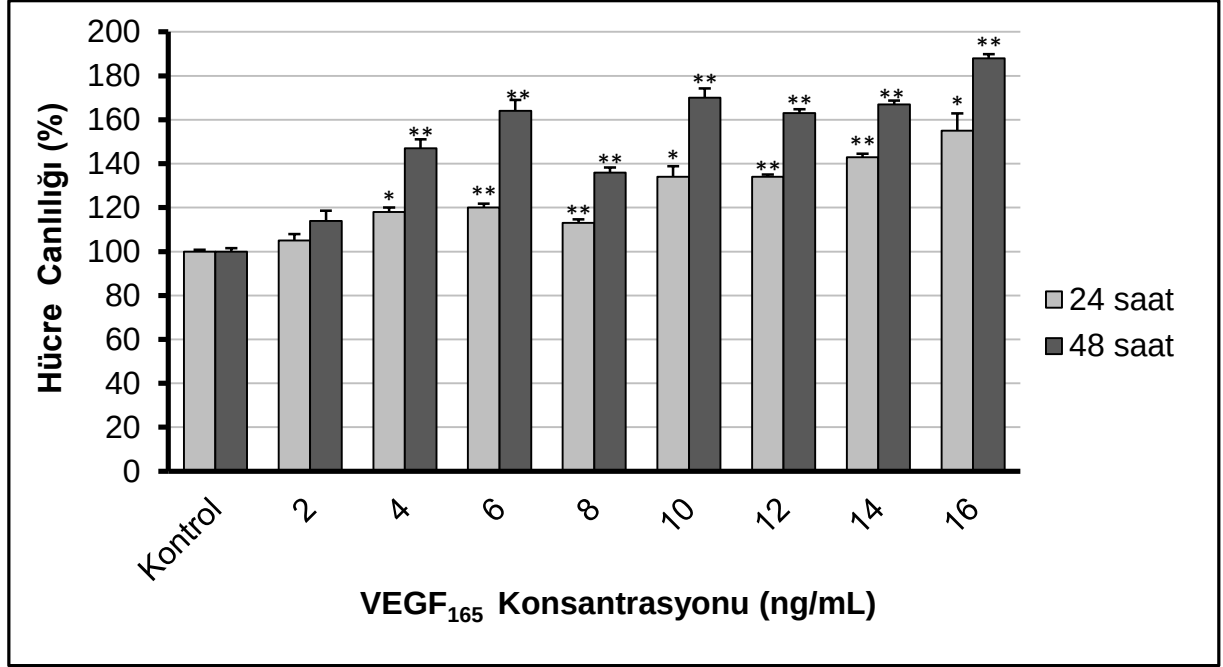
Proanjiyogenik faktörler arasında en öne çıkanı VEGF'tir. Çalışmada endotel hücre proliferasyonu uyarmak suretiyle uygun bir *in vitro* anjiyogenez modeli oluşturmak için gerekli VEGF konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla 0-60 ng/mL arası VEGF endotel hücreleriyle (HUVEC) 24 saat boyunca inkübe edilip, bu sürenin sonunda endotel hücre proliferasyon yüzdeleri incelenmiştir.



Şekil 4.33. VEGF₁₆₅ konsantrasyonuna bağlı endotel hücre proliferasyon grafiği (n=3). Hata çubukları standart hata ortalamasını temsil etmektedir.

ANOVA sonuçlarına göre VEGF konsantrasyonlarına bağlı hücre proliferasyonu değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($F_{(4,10)}=1,010$, $p>.05$). Bununla birlikte, aritmetik ve standart hata ortalamalarından yararlanılarak oluşturulan

histogram incelendiğinde 1-12 ng/mL değerinin endotel hücre proliferasyonunu uyarımı için en etkili değer aralığı olduğu görülmektedir.

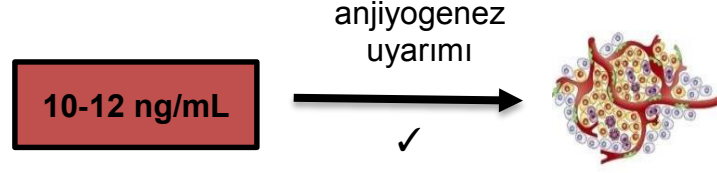


Şekil 4.34. VEGF₁₆₅'in (0-16 ng/mL) endotel hücre proliferasyonu (HUVEC) üzerindeki etkisinin zamana bağlı grafiği. Hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir (n=4, * $p<.05$, ** $p<.01$).



Anjiyogenez oluşumunu başlatmak için gerekli VEGF miktarını daha hassas bir şekilde tespit etmek için endotel hücreleri 0-16 ng/mL arası farklı konsantrasyonlardaki VEGF₁₆₅ ile 24 saat ve 48 saat süreyle inkübe edildi. İki ayrı zaman diliminden elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile analiz edildi. İlk 24 saat için VEGF konsantrasyonları arasında anlamlı bir farklılık bulundu ($F(8,27)=26,348$, $p<.05$). Buna göre 4 ng/mL ve üstü VEGF konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ($p<.05$). Benzer şekilde 48 saat sonunda elde edilen veriler arasındaki farklılık da anlamlıdır ($F(8,27)=73,887$, $p<.05$). Buna göre ilk 24 saat sonundaki sonuçlarla uyumlu olarak 4 ng/mL ve üstündeki VEGF konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu kontrol

grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ($p<.01$). Ek olarak, 16 ng/mL için hücre proliferasyonu diğer VEGF konsantrasyonlarından anlamlı olarak yüksektir ($p<.05$).



Bu istatistiksel sonuçlar ve proliferasyon grafiği ışığında anjiyogenez modeli oluşturmak için bir diğer ifadeyle endotel hücreleri (HUVEC) üzerinde vaskülarizasyon oluşması için gerekli VEGF₁₆₅ miktarının 10-16 ng/mL arası olması uygun görüldü. Tüm deneylerde, belirlenen bu VEGF miktarı kullanılarak yaratılan anjiyogenez modeli sonrası Sema 3F ve biyokonjugatlar farklı konsantrasyonlarda uygulandı.

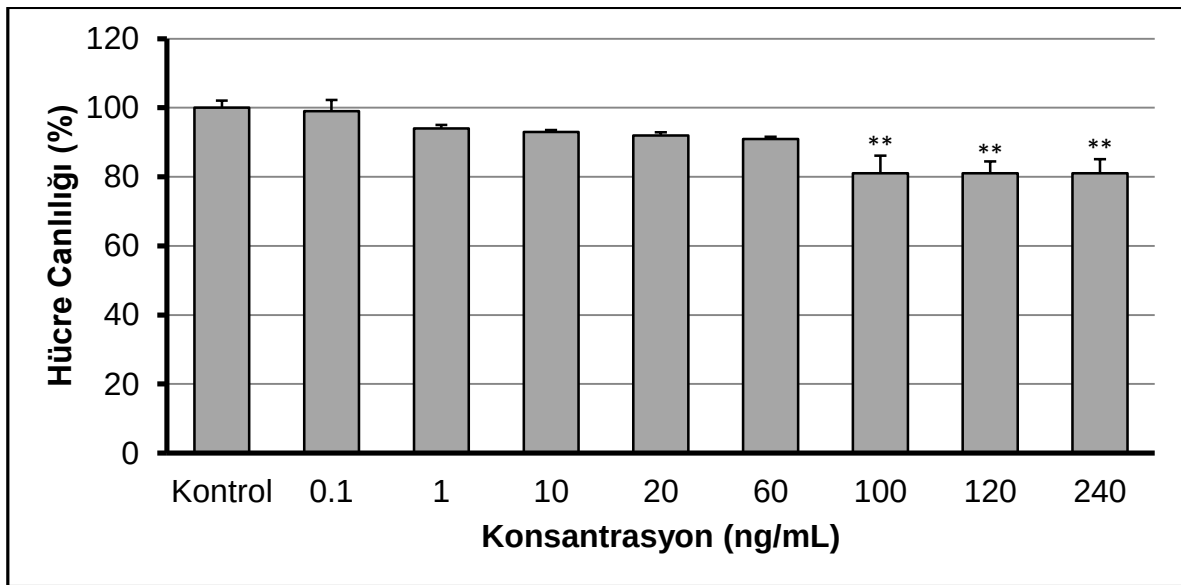
Anjiyogenez; çok sayıda proanjiyogenik ve antianjiyogenik moleküllerin düzenlediği oldukça kompleks ve dinamik bir süreçtir. Proanjiyogenik faktörler ile antianjiyogenik faktörler arasında normalde bulunan dengenin proanjiyogenik faktörler lehine değişmesi sonucu yeni damar oluşumu meydana gelir. Anjiyogenezin en potent uyarıcısı VEGF'dir [243-245]. VEGF'nin aşırı sentezi, hücre kültüründeki bazı hücrelerin başka hücrelere dönüşümüne sebep olur. VEGF'nin uyardığı endotel hücre reseptörleri sinyal iletimi sağlayan birkaç proteini fosforile eder. Bu da ikincil haberci sistemlerini uyarır, mesajın hücre içine iletilmesini sağlar. Heparan sülfat, önemli bir rol üstlenerek VEGF'nin reseptörüne bağlanmasına yardım eder, bu olayı düzenler.

Guo ve ark. [246] U87MG gliom hücrelerinde, PDGF-B overekspresyonun, hem VEGF ekspresyonu hem de oluşan tümör damarlarına perisitlerin katılımını anlamlı şekilde arttırdığını göstermiştir. Kondo ve ark. [247] ise insan kolon kanser hücre hattını VEGF121 cDNA'sı ile muamele ettiğinde, anjiyogenezi dolayısıyla tümör büyümesini ve yayılımını aktive ettiğini bildirmiştir.

Literatür incelendiğinde *in vitro* anjiyogenez uyarımı için yaygın olarak kullanılan yaklaşımın VEGF uyarımlı endotel hücre proliferasyonu olduğu görülmektedir. Asiatik asitin (AsA) anti-anjiyogenik özelliklerinin incelendiği çalışmada endotel hücre kültürü modelinde anjiyogenez oluşumunu başlatmak için 10 ng/mL VEGF HUVEC ve HBMEC (insan beyni mikrovasküler endotel hücreleri) olmak üzere farklı endotel hücre serileriyle etkileştirmiştir. Daha sonra üzerine farklı konsantrasyonlardaki AsA uygulanarak anjiyogenez üzerine inhibe edici etkisi gösterilmiştir [248].

4.5.2.2. Sema 3F'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

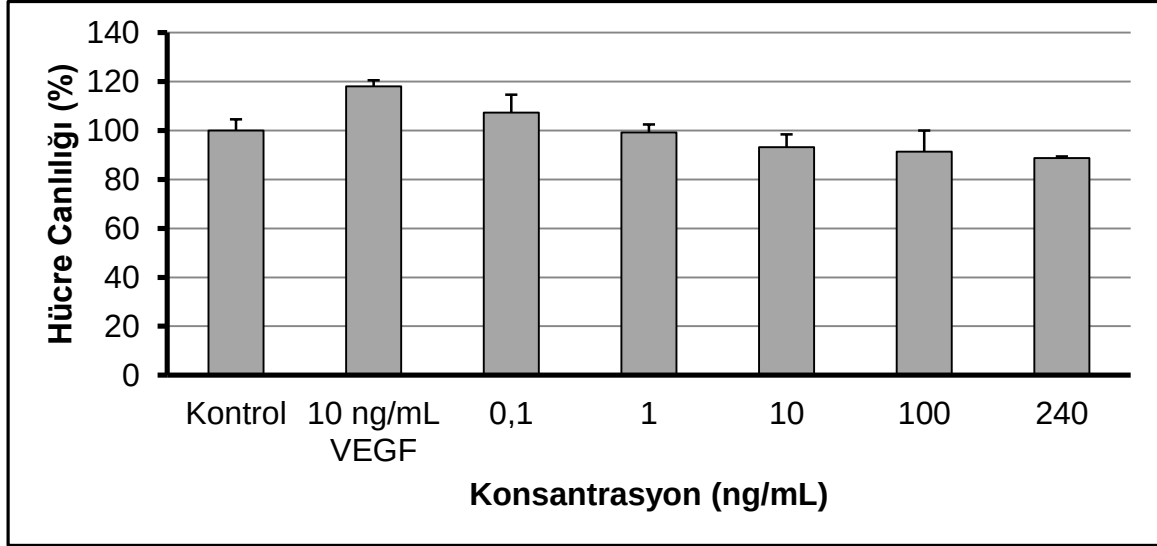
Sema 3F'nin tümör baskılayıcı etkisinin değerlendirilmesi için 0-240 ng/mL arası farklı konsantrasyonlarının A549 hücreleri üzerindeki etkisi incelendi (Şekil 4.35). Hücre proliferasyon grafiğine göre Sema 3F 1 ng/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda etkisini göstermeye başlamıştır. Ayrıca 100 ng/mL ve üzerindeki konsantrasyon değerlerinde Sema 3F A549 hücre proliferasyonunu inhibe edici etki göstermiştir. 100 ng/mL tümöral hücre proliferasyonun durdurulması için etkin değer olarak göze çarpmaktadır.



Şekil 4.35. Sema 3F'nin (0-240 ng/mL) A549 hücreleri üzerindeki etkisi. Hata çubukları istatistiksel standart hatayı göstermektedir (n=3, **p<.01).

ANOVA sonuçları incelendiğinde farklı Sema 3F konsantrasyonlarının hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir farklılık oluşturduğu görülmüştür ($F(8,18)=6,763$,

$p<.05$). Hücre proliferasyon grafiğindeki benzer şekilde 100 ng/mL ve üzeri konsantrasyonlar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında A549 hücre proliferasyonunu anlamlı olarak düşürmüştür ($p<.01$).



Şekil 4.36. VEGF uyarımı sonrası uygulanan Sema 3F'nin (0,1-240 ng/mL) endotel hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi. 10 ng/mL VEGF ile etkileştirilen HUVEC pozitif kontrol olarak alınmıştır. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir.

Sema 3F'nin 10 ng/mL VEGF ile uyarılan endotel hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi de incelendi (Şekil 4.36). MTT testlerinde yaşanan veri kayıplarından dolayı 100 ng/mL ve 240 ng/mL Sema 3F konsantrasyonları için ikişer; diğer gruplar için üçer sonuç elde edildi. Bundan dolayı 100 ng/mL ve 240 ng/mL konsantrasyonları için elde edilen sonuçlar istatistiksel veri analizinden çıkarıldı. Tek yönlü varyans analizi sonucunda gruplar arası farklılığın olmadığı görüldü ($F(4,10)=1,410$, $p>.05$). Bununla birlikte, hücre proliferasyon grafiği incelendiğinde 10 ng/mL VEGF'in kontrol grubuyla karşılaştırıldığında beklendiği gibi hücre proliferasyonunu arttırdığı, sırasıyla 10 ng/mL, 100 ng/mL ve 240 ng/mL Sema 3F'nin ise pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunu önemli ölçüde düşürdüğü görülmektedir.

Sema 3F birçok dokuda eksprese edilmektedir. Bununla birlikte birçok kanser türünde Sema 3F mRNA seviyesinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Ayrıca düşük Sema 3F oranı yüksek metastaz, düşük farklılaşma ve ilerlemiş hastalık

seviyesiyle ilişkilidir. Bu durum Sema 3F'yi terapötik bir araç olarak öne çıkarmaktadır. Literatür incelendiğinde farklı tümör tipleri için Sema 3F'nin anti-tümöral ve anti-anjiyogenik etkisi üzerine artan sayıda çalışma yapıldığı görülmektedir.

Nasarre ve ark. [249] ekzojen olarak Sema 3F (100 ng/mL) ile etkileştirilen MCF7 meme kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını göstermiştir. Wu ve ark. [250] tarafından gerçekleştirilen çalışmada kolon kanseri hücrelerinde (SW480) Sema 3F'nin overekspresyonu sonucunda hücre proliferasyonu, fibronektin adezyonu ve hücrelerin migrasyon kapasitesinde düşüş gözlenmesinin yanı sıra S-fazı hücre popülasyonu ve $\alpha V\beta 3$ integrin ekspresyonunda azalma görülmüştür. Aynı çalışmada Sema 3F overekspresyonu nude fareye ortotopikal olarak transplantasyon yapılan tümöröenezini küçültüp, karaciğer metastazını önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca Sema 3F'yi hedefleyen siRNA transfeksiyonu neticesinde *in vivo* tümör oluşumunda artış gözlenmiştir. Bielenberg ve ark. [107] ise *in vitro* koşullarda Sema 3F'nin insan metastatik melanom hücrelerinde F-aktin hücre iskeletini yıkıma uğratıp, endotel hücrelerini geri itmek suretiyle endotel ve tümöral hücre adezyonu ve migrasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Aynı çalışmada Sema 3F ksenograft fare melanom modelinde tümör mikroçevresindeki kan damarı invazyonunuda önlemiştir. Bu sayede tümör boyutu ve tümör çevresindeki damar sayısında önemli bir azalma görülmüştür. Sonuç olarak, Sema 3F tümör anjiyogenezi, tümör ilerlemesi ve metastazına karşı güçlü bir inhibitör etki göstermiştir. Melanom hücreleriyle (MM170 ve A375) gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ekzojen Sema 3F inkübasyonu ya da endojen Sema 3F overekspresyonunun melanom hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [251]. Futamura ve ark. [252] Sema3F mRNA seviyesinin ekzojen ve endojen p53 geniyle arttığını göstermiştir. Bu durum Sema 3F'nin p53 geni yönelimli anti-anjiyogenezde rol aldığı düşüncesini güçlendirmektedir. Çalışmada p53 geni susturulan kolorektal kanser hücreleri (LS174T) kaynaklı tümörler normal seviyede p53 bulunan tümörle karşılaştırıldığında tümör-damar oluşumunda dikkate değer bir artış olduğu görülmüştür. p53 geni susturulan tümörlerde (LS174T) ise Sema 3F ve NRP2 ekspresyon seviyesinin kontrol grubu tümörlerine göre daha düşük seviyede olduğu görülmüştür. Çalışmada Sema 3F'nin overekspresyonu H1299 akciğer kanser

hücrelerinin gelişimini *in vitro* ortamda baskılamıştır. Ayrıca fare üstünde oluşturulan *in vivo* tümör modelinde Sema 3F eksprese eden H1299 tümörlerinin boyutunun azaldığı ve kontrol olarak alınan tümörlerle karşılaştırıldığında etrafında daha az sayıda kan damarları olduğu gözlenmiştir.

Sema 3F, tümör hücreleri ve endotel hücre morfolojisi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Shimizu ve ark. [99] insan glioma ve HUVEC hücreleri üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada Sema 3F'nin hücre iskeleti yıkımını, stres liflerinin kaybını ve F-aktin depolimerizasyonunu uyararak hücre migrasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Sema 3F endotel hücre yıkımını da uyarmıştır. Çalışmada HUVEC hücrelerinde HEK293 hücrelerinden purifiye edilen ekzojen Sema3F'ye yanıt olarak önemli ve hızlı morfolojik değişimler görülmüştür. Etkileşimden 30 dk. sonra kontrol grubuyla karşılaştırıldığında stres fiberlerinin önemli ölçüde kaybolduğu gözlenmiştir. Farklı kombinasyonlarda Sema 3'ler reseptörü eksprese eden dört farklı tümörjenik hücre serileri (MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-468 ve MCF7) üzerine yapılan bir çalışmada anti-anjiyogenetik potansiyeli tümör tipine bağlı farklılık gösterse de Sema 3'ler (Sema 3C hariç) tümör ile ilişkili kan damarı konsantrasyonunu azaltmıştır [253]. Çalışmada Sema'ların tümör anjiyogenez inhibisyon kapasitesiyle anti-tümör aktiviteleri arasında düşük bir ilişki bulunmasına rağmen anti-tümörjenik etkinin tümör hücrelerince ekprese edilen Sema türüne özgü sinyal dönüştürücü reseptörlerle yüksek ilişkili olduğu belirlenmiştir. Kessler ve ark. [13] ise Sema 3F'nin VEGF₁₆₅ ya da bFGF uyarımlı HUVEC proliferasyonu ve sağkalımını inhibe ettiğini göstermiştir.

Literatür incelendiğinde Sema 3F üzerine yapılan araştırmalarda yaygın olan yaklaşımın gen transfeksiyonu yoluyla Sema 3F'nin mRNA overekspresyonu olduğu görülmektedir. Transfekte edilen hücreler tarafından ekspres edilen Sema 3F miktarının tespit edilmesindeki kısıtlamalar nedeniyle endojen Sema 3F'nin etkisinin doz bağımlı olarak incelenmesinde birtakım güçlükler bulunmaktadır. Bu nedenle mevcut çalışmada A549 hücre hattıyla etkileştirilen Sema 3F'nin konsantrasyon aralığı olabildiğince geniş tutulmaya çalışılmıştır ve 100 ng/mL üzerindeki değerlerin hücre proliferasyonu azalttığı görülmüştür.

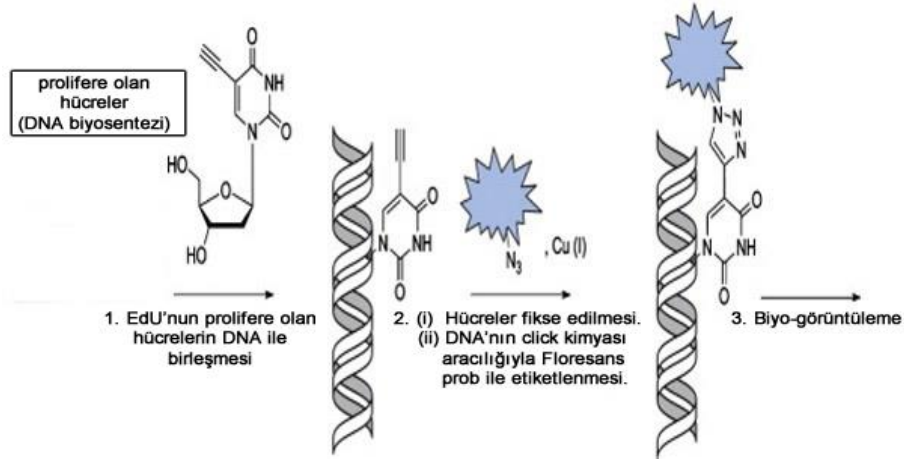
Özetle, Sema 3F'nin *in vitro* ve *in vivo* ortamda farklı tümör tipleri için tümör gelişimini baskılayıp, anti-metastatik etkiler sergilediği ayrıca endotel hücre adezyonu, migrasyonu ve proliferasyonunu inhibe ederek anti-anjiyogenetik etkiler gösterdiği literatürde sıkça raporlanmıştır [253]. Bir terapötik olarak Sema 3F'nin seçilmesi hem tümör hücrelerinin hem de tümör mikroçevresindeki endotel hücrelerinin hedeflenmesi açısından oldukça avantajlıdır.

4.5.2.3. Click-EdU ile Sema 3F'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Ekstrasellüler büyüme faktörlerindeki artış ve hücre-içi sinyal yollarındaki düzensizlikler hücre büyüme/proliferasyon döngüsünün bozulmasına ve artan gen ekspresyonu sonucu hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasına neden olmaktadır. Tümör gelişimi ve yayılması potansiyelinin tespiti açısından tümör hücre proliferasyonun belirlenmesi oldukça önemlidir. Söz konusu yöntemler aynı zamanda anti-kanser tedavi yaklaşımlarının etkinliğinin değerlendirilmesi adına da önemli geri bildirimler sağlamaktadır. Hücre proliferasyonu DNA sentezi (³H-Timidin birleşimi, BrdU, EdU vb.), metabolik aktivite (tripan mavisi, MTT, vb.) proliferasyon işaretçileri ve ATP içeriğinin ölçümüne dayalı yöntemler aracılığıyla farklı şekillerde ölçülmektedir [254, 255]. Metabolizma ve ATP ölçümüne dayalı yöntemler hücre proliferasyonu hakkında daha dolaylı yoldan bilgi verirken, bölünmede görev alan işaretleyiciler ve DNA sentezine dayalı yöntemler ise daha doğrudan bilgi vermektedir [254].

MTT proliferasyona uğrayan hücrelerin mitokondrilerinde artan dehidrogenaz enzim aktivitesine bağlı olarak tetrazolyum tuzlarının indirgenmesi ve kolorimetrik yanıt oluşturmaya dayalıdır. Bu yöntem hızlı, kolay ve ekonomik olduğundan hücre kültüründe canlılık/sitotoksikite/proliferasyon testi için yaygın olarak kullanılmaktadır [256, 257]. Yüksek belirlilik gösteren bir yöntem olan MTT'de radyoizotoplarının kullanılmaması yöntemin diğer bir üstün özelliğidir [257]. Bununla birlikte farklı koşullar (hücre sayısı ya da MTT konsantrasyonu, pH) MTT-formazan absorpsiyonunu etkileyebilmektedir [254, 258]. Ayrıca MTT indirgenme oranı hücre tiplerine göre önemli farklılıklar göstermekte, mitokondri dışındaki enzimler de tetrazolyum tuzlarını indirgeyebilmektedir. Bu nedenle çalışmada hücre

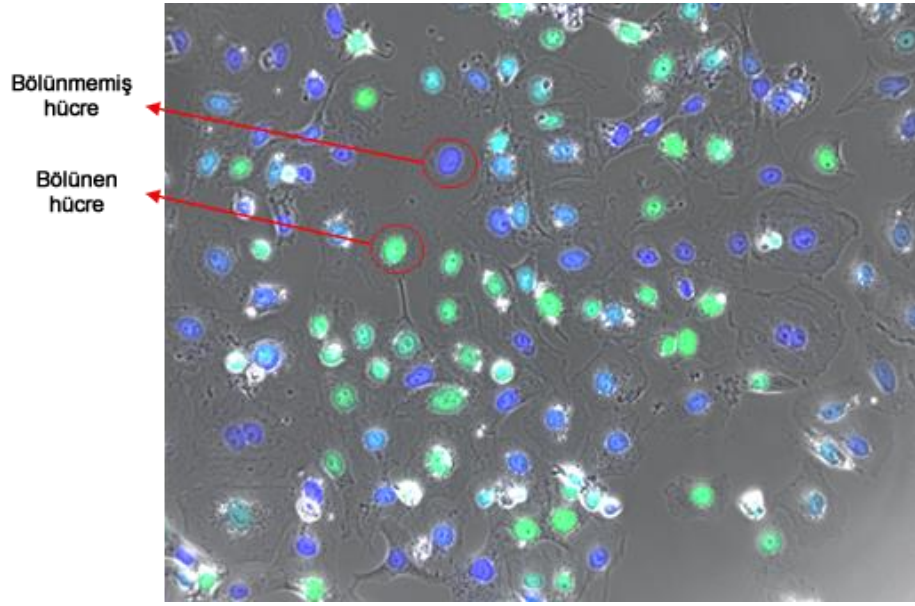
proliferasyonu üzerine etkilerin değerlendirilmesinde MTT yöntemine ek olarak EdU hücre proliferasyon yöntemide kullanıldı. Bu yöntem, metil grubuyla alkin grubunun yer değiştirdiği bir timidin nükleotid analogu olan 5-etinil-2'-deoksiuridinin (EdU) click kimyası olarak bilinen bir reaksiyonda alkin grubuna kovalent olarak bağlanan bir floresan azit kullanılarak algılanmasına olanak tanır [259] (Şekil 4.37). Hücre proliferasyonu timidin analoglarının aktif olarak biyosentezlenen DNA'ya katılımıyla izlenir. EdU yönteminde antikor temelli BrdU yönteminin aksine DNA denatüre edilmez. Böylece hücre proliferasyonu daha az adımda ve daha kısa zamanda tayin edilir.



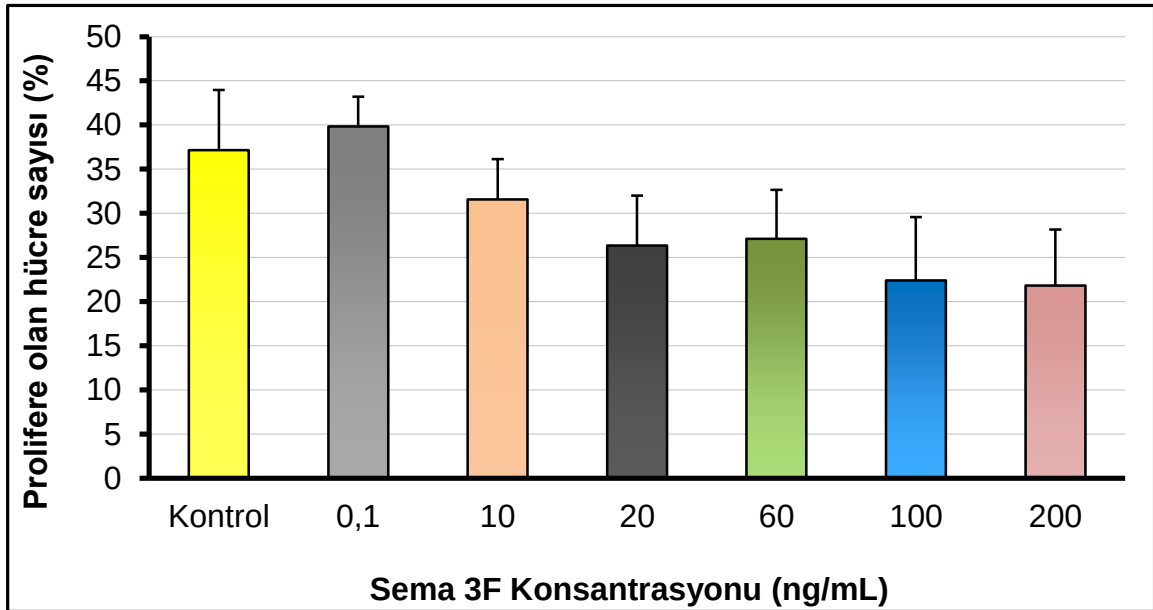
Şekil 4.37. EdU testi (Invitrogen™)

MTT'ye ek olarak Sema 3F'in farklı konsantrasyonlarının HUVEC ve A549 hücre proliferasyonu üzerine etkisi EdU hücre proliferasyon yöntemiyle de değerlendirildi. EdU yöntemi kullanılarak yapılan deneylerin sonucunda oluşan görüntü Şekil 4.38'de görülmektedir. Hücrelerin fotoğrafları çekildikten sonra bilgisayar yazılımıyla bölünen (prolifere olan) ve bölünmeyen (prolifere olmamış) hücreler sayılıp, proliferasyon sonuçları elde edildi. Hücre proliferasyon değeri Eşitlik 6'dan yararlanılarak elde edildi.

$$\text{Hücre Proliferasyonu (\%)} = \frac{\text{Prolifere olan hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 6})$$

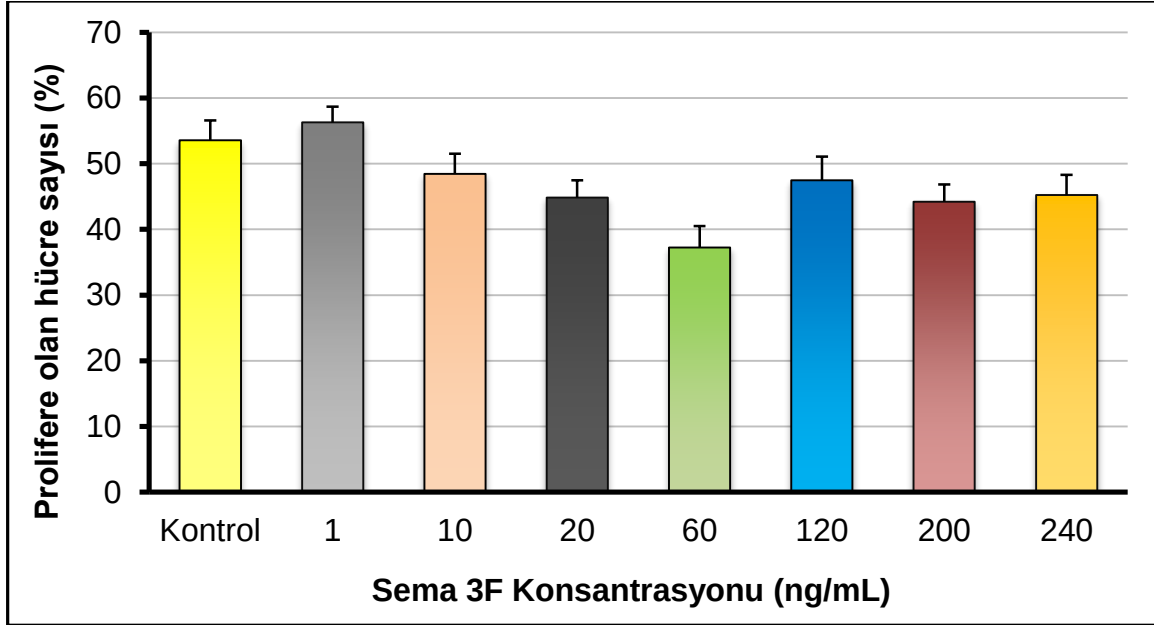


Şekil 4.38. EdU yöntemi sonucunda görüntülenen hücrelerin fotoğrafı. Buna göre bölünmemiş hücreler mavi renkli, prolifere olan hücreler yeşil renkli olarak görülmektedir (x20)



Şekil 4.39. HUVEC üzerinde gerçekleştirilen EdU yöntemi sonuçları. 0,1, 10, 20, 60, 100 ve 200 ng/mL konsantrasyonları için Sema 3F'nin HUVEC proliferasyonu üzerindeki etkileri değerlendirildi. Test öncesi tüm gruplar 12 ng/mL VEGF ile inkübe edildi. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir.

HUVEC kullanılarak yapılan testlerde EdU yöntemi uygulanmadan önce tüm hücreler 12 ng/mL VEGF₁₆₅ ile inkübe edildi. Buna göre HUVEC için 10 ng/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda Sema 3F hücre proliferasyonunu durdurmaya başlamıştır. Özellikle 100 ng/mL ve daha yüksek konsantrasyonlarda Sema 3F'nin hücre proliferasyonunu önemli ölçüde düşürdüğü görüldü. Bu sonuçlar MTT sonuçlarını desteklemektedir.



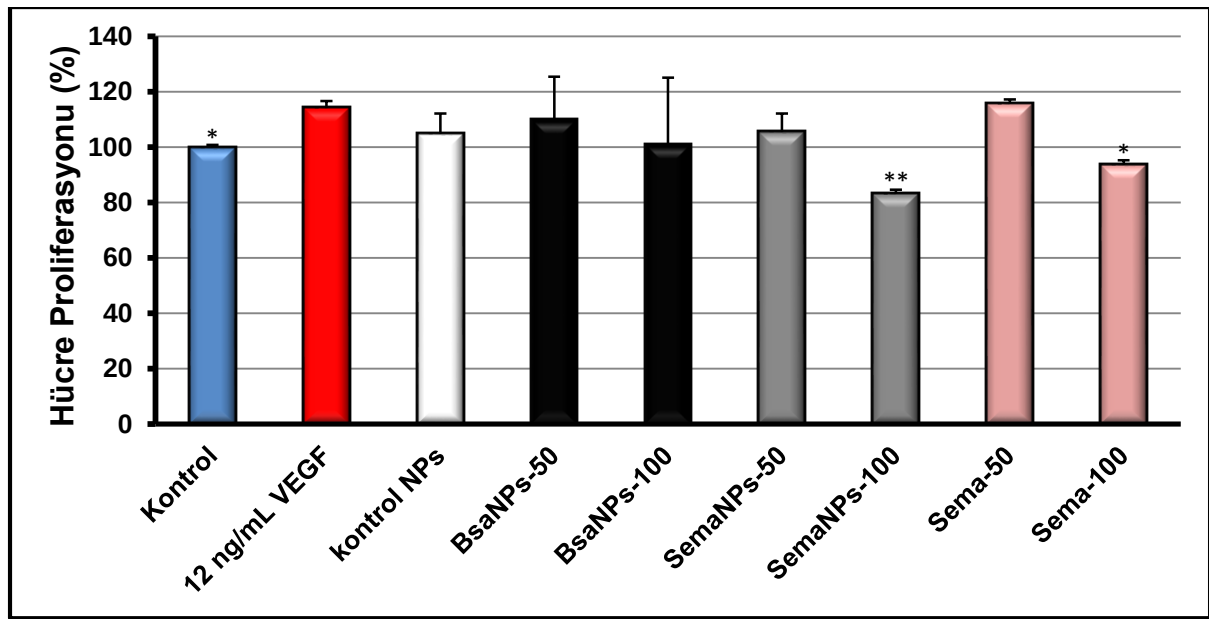
Şekil 4.40. A549 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen EdU yöntemi sonuçları. 1, 10, 20, 60, 120, 200 ve 240 ng/mL farklı konsantrasyonları için Sema 3F'nin A549 hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirildi. Hata çubukları standart hatayı göstermektedir.

A549 hücreleri için 1 ng/mL Sema 3F hücre proliferasyonunu etkilememiştir. Bu grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücrelerin proliferasyona devam ettiği görülmektedir. HUVEC ile yapılan testlerin sonuçlarına benzeri şekilde 10 ng/mL ve üstü konsantrasyonlardaki Sema 3F kontrol grubuna oranla hücre proliferasyonunu düşürmüştür. 60 ng/mL Sema 3F'nin hücre proliferasyonunun düşürülmesi için en etkili değer olduğu görüldü. Sonuç olarak, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Sema 3F'nin hem HUVEC hem de A549 hücre serileri kullanılarak yapılan testlerde hücre proliferasyonunu düşürdüğü görülmektedir. Sema 3F'nin VEGF₁₆₅ uyarımlı endotel hücre proliferasyonu üzerinde daha etkili sonuçlar verdiği görüldü. Bu durum VEGF₁₆₅ ile uyarılarak anjiyogenez sürecinin başlatılmasından sonra Sema 3F'nin

VEGF₁₆₅ uyarımlı endotel hücre proliferasyonu üzerinde daha etkili sonuçlar verdiğini göstermiştir.

4.5.2.4. Sema 3F ile konjuge edilen AuNP'lerin etkisinin değerlendirilmesi

Biyokonjugatların anjiyogenez üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlardaki AuNPs@PEG-T, AuNPs@PEG-T&BSA, AuNPs@PEG-T&Sema 3F konjugatlar ve Sema 3F'nin VEGF (12 ng/mL) uyarımlı endotel hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi incelendi (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. Biyofonksiyonelleştirilmiş nanopartiküllerin endotel hücre (HUVEC) proliferasyonu üzerindeki etkisi (n=3, * $p<.05$, ** $p<.01$). Kontrol grubu dışındaki tüm gruplar uygulama öncesi 12 ng/mL VEGF ile 24 saat inkübe edildi. Karşılaştırmalar 12 ng/mL VEGF'e göre yapıldı. Hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir.

Hücre proliferasyon yüzdelerine ilişkin grafik incelendiğinde AuNPs@PEG-T&Sema 3F'lerin sadece Sema 3F ile karşılaştırıldığında VEGF₁₆₅ uyarımlı endotel hücre proliferasyonunu daha da azalttığı görüldü. Ayrıca tümör anjiyogenezinin inhibisyonu için AuNPs@PEG-T&Sema 3F'de en etkili değerin ise 100 ng/mL Sema 3F ile fonksiyonelleştirilenlerin olduğu görüldü. ANOVA testi hücre proliferasyon değerlerindeki farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu gösterdi ($F(8,18)=3,036$, $p<.05$). Buna göre 12 ng/mL VEGF pre-inkübasyonu kontrol grubuyla

karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunu anlamlı olarak yükseltmiştir ($p<.05$). VEGF inkübasyonu sonrası verilen 100 ng/mL AuNPs@PEG-T&Sema 3F biyokonjugasyonu sadece 50 ng/mL ve 100 ng/mL Sema 3F verilenler ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunu anlamlı olarak düşürmüştür ($p<.05$). Sadece Sema 3F verilenlerde ise 100 ng/mL Sema 3F hücre proliferasyonunu 50 ng/mL Sema 3F ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşürmüştür ($p<.05$).

Günümüzde kanser tedavisinde genellikle cerrahi, radyasyon terapisi ve kemoterapi yöntemleri tek veya kombinasyon halinde uygulanmaktadır. Bu stratejiler sıklıkla tekrarlayıcı olmasından ve yan etkilerinden dolayı başarısız olmaktadır. Bu durumu değiştirmek için katı tümörlerin içerisinde kalan tümör hücrelerinin heterojen popülasyonunu yıkma yeteneğine sahip çok fonksiyonlu terapötiklerin kullanıldığı yeni kanser tedavileri geliştirilmelidir.

Bugün itibariyle yapılan birçok çalışma terapötik ajanların *in vitro* ve *in vivo* hedef bölgelere taşınmasında nanopartiküller aracılığıyla yapılan taşımanın terapötik ajanların tek başına verilmesinden daha etkili sonuçlar verdiğini göstermektedir [260-262]. Paciotti ve ark. [263] Tümör nekroz faktör-Polietilen glikol ile fonksiyonelleştirilmiş altın kolloidlerinin (cAu-PEG-TNF) kanser hücreleri üzerine etkisini araştırmak için *in vivo* çalışma gerçekleştirmiştir. TNF hem hedefleme hem de kanser hücrelerinin yok edilmesinde tedavi edici bir özelliğe sahiptir. cAu-PEG ile bağlanan TNF tümör kütlelerinin azaltılmasında sadece TNF'ye oranla daha etkili olmuştur. Ayrıca, intravenöz bir şekilde fareye enjekte edilen cAu-PEG-TNF biyokonjugatlarının karaciğer, dalak veya diğer sağlıklı hücrelere oranla MC-38 kolon karsinoma tümörlerinde daha geniş oranda toplandığını gözlenmiştir.

Bir başka *in vivo* çalışma, diyabetik Wistar sıçanlarda transmukozal yollardan verilen insulin bağlı AuNP'lerin sadece insulin ile karşılaştırıldığında kandaki glikoz seviyesini önemli ölçüde indirgediğini göstermiştir [199].

El-Sayed ve ark. [264] *in vitro* koşullarda gerçekleştirdiği çalışmada meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) programlı hücre yıkımın başlatılması amacıyla östrojen reseptörü Alfa'nın seçici olarak hedeflenmesi için Tamoksifen ile konjuge edilen AuNP'leri (TAM-PEG-SH-AuNP) sadece Tamoksifen ile karşılaştırıldığında ilaç etkinliği 2.7 kat artmıştır.

Dihidrofolat redüktazın stokiyometrik bir inhibitörü olan Metotreksat (MTX) konjugasyonlu AuNP'lerin sadece MTX'e oranla tümör hücrelerinde hızlı ve yüksek oranda biriktiği bildirilmiştir [265]. Ek olarak Lewis akciğer kanserli fare tümör modelinde anti-tümör etki göstermeyen MTX'e karşı AuNP'lerle birleştirilen eşit dozda MTX'in tümör gelişimini baskıladığı rapor edilmiştir.

Bugünlerde NP'ler ile biyolojik moleküllerin fonksiyonelleştirilmesi sonucu arttırılmış etkinlikten faydalanılarak *in vitro* koşullarda yapılan bir başka çalışmada platin bazlı bazı anti kanser ilaçları glutasyonun antioksidan özelliğinden faydalanarak kaplandığı AuNP'ler ile fonksiyonelleştirilip bu şekilde prostat kanseri hücrelerini spesifik olarak hedeflediğini ve hücresel alımı arttırdığını göstermiştir [266].

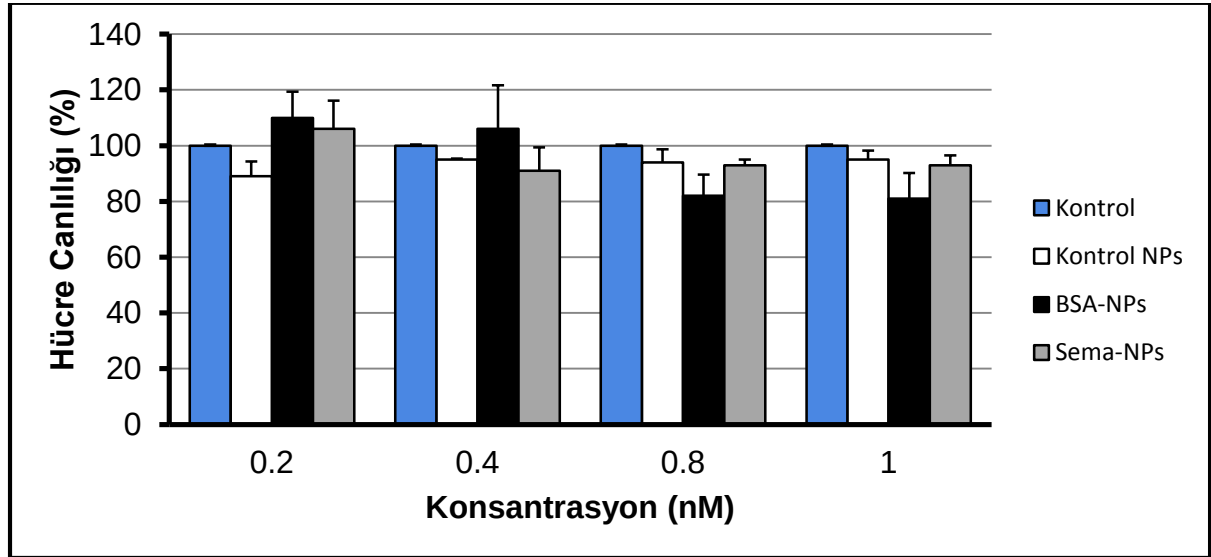
Proteinlerin canlı hücrelerin içerisine taşınması hücre membranının düşük geçirgenliğiyle sınırlanmaktadır. Enzimler tarafından sindirilme karşısında proteinlerin stabilitesinin korunması da ayrı bir zorluktur [267]. NP'lerin boyut ve yüzey karakteristikleri yönünden optimize edilebilmeleri terapötik ajanların hedefleme etkinliğinin arttırılması amacıyla kullanılabilir. Ayrıca yüzey alanı/boyut oranına bağlı olarak taşınan terapötik ajanların sayısının arttırılması ve konsantre bir terapötik etkinin oluşturulması mümkündür.

Ayrıca gelecekte farklı amaçlar doğrultusunda farklı moleküllerle (ilaç, boya, biyomolekül, işlevsel gruplar vb.) konjuge edilen NP'ler sayesinde çok fonksiyonlu NP'ler tasarlanıp, hedefleme, görüntülenme ve kontrollü salım özellikleri daha da geliştirilebilecektir.

Bu çalışmada, tümör anjiyogenez inhibisyonu için AuNP aracılığıyla gerçekleştirilen taşıma sayesinde Sema 3F'nin hedef bölgede birikimi sağlanmış ve bölgesel konsantrasyon artışıyla birlikte Sema 3F'nin terapötik etkisini arttırdığı gösterilmiştir. Böylece AuNPs@PEG-T&Sema 3F'ler endotel hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde engellemiştir. Sonuçlar literatür ile uyumludur. Ancak burada bir hedefleyici peptit ya da doza bağlı toksik etki gösterebilecek antikanser ilaç yerine ilk defa normal hücrelerden salınabilen ve bazı moleküler yolları çalıştıran, anti-anjiyogenik etkilere sahip Sema 3F gibi büyük bir biyolojik molekül AuNP@PEG ile konjuge edilmiş bu şekilde olası yan etkiler minimuma indirgenmek istenmiştir. Bu şekilde gelecekte yapılacak diğer çalışmalar ile kanser tedavisinde ilaç olarak kullanılabilir.

4.5.2.5. Fonksiyonelleştirilmiş AuNP'lerin sitotoksitesinin değerlendirilmesi

AuNPs@PEG-T (kontrol NPs), AuNPs@PEG-T&BSA ve AuNPs@PEG-T&Sema3F biyokonjugatlarının 0,2 nM, 0,4 nM, 0,8 nM ve 1 nM olmak üzere dört farklı konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisi kontrol grubuyla karşılaştırıldı (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. Biyokonjugatların endotel hücre (HUVEC) canlılığı üzerindeki etkisinin grafiği. Hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir (n=3).

Karşılaştırmalar için iki yönlü ANOVA kullanıldı. Buna göre kontrol, kontrol NPs, AuNPs@PEG-T&BSA ve AuNPs@PEG-T&Sema 3F gruplarının hücre canlılığı

üzerindeki etkisi anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($F(3,32)=0.748$, $p>.05$). Test grupları ve konsantrasyon etkileşiminin hücre canlılığı üzerindeki etkisi de istatistiksel olarak anlamlı değildir ($F(9,32)=1.547$, $p>.05$). Ek olarak, hücre canlılık grafiği incelendiğinde tüm test grupları için hücre canlılığının %80'nin üzerinde olduğu görülmektedir. Bu durum biyokonjugatların hücreler üzerinde toksik etkisi olmadığı görüşünü desteklemektedir.

Değişik boyut ve tipteki altın nanokonjugatlarının toksisitesi çok sayıda bağımsız araştırma grubu tarafından araştırılmaktadır. Bugüne kadar sonuçlar değişkenlik göstermesine rağmen, bu çalışmalardan önemli sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar arasında en çarpıcı olan sonuç, altın nanokonjugasyonlarının toksisitesi yüzey ligandlarının kimyasal bileşimine bağlıdır. Gerçekten sık sık yüzey gruplarının kendisi toksisiteye neden olabilmektedir. Örnek olarak, CTAB ile fonksiyonelleştirilen altın nanokonjugatlarının başlangıçta toksik olduğu düşünülse de sonradan partiküllerin ligand uzantılarını uzaklaştırmak amacıyla yıkanması sonucu toksisiteye yol açmadığı belirlenmiştir [133]. Bu alandaki diğer bir çalışma CTAB gibi ligandların toksisitesinin AuNP'ler ile kompleks oluşturduğunda nasıl azaldığını göstermiştir. Toksisitedeki düşüşün toksik ajanının hücresel yerleşiminin değişmesinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Rotello ve ark. [268] kimyasal fonksiyonelleştirmeyi ve nanokonjugatların yüzey ligand yükünün toksisiteyi nasıl etkilediğini göstermiştir. Ayrıca amin fonksiyonalliteli partiküllerin biraz toksik iken karboksilik asitle fonksiyonelleştirilen partiküllerin non-toksik olduğu tespit edilmiştir.

İlgi çekici son çalışmalar konjugatların boyutunda toksisiteyi belirlediğini göstermiştir. Pan ve ark. [269] bir fosfin paneli ile fonksiyonelleştirilmiş çapı 0.8-1.5 nm aralığında değişen AuNP'leri incelemiştir. Bu araştırmacılar, 1.4 nm çapındaki NP'lerin toksik olduğunu, fakat 100 kat daha yoğun konsantrasyonlu olsa bile 15 nm çapındaki partiküllerin toksik etki yaratmadığını bulmuştur. 1.4 nm çapındaki partiküllerin toksisitesinin nekrozdan kaynaklandığı kanıt olarak sunulmuş, bununla birlikte ne 1.2 nm ne de 1.8 nm çapındaki partiküllerin bu etkiyi göstermediği tespit edilmiştir.

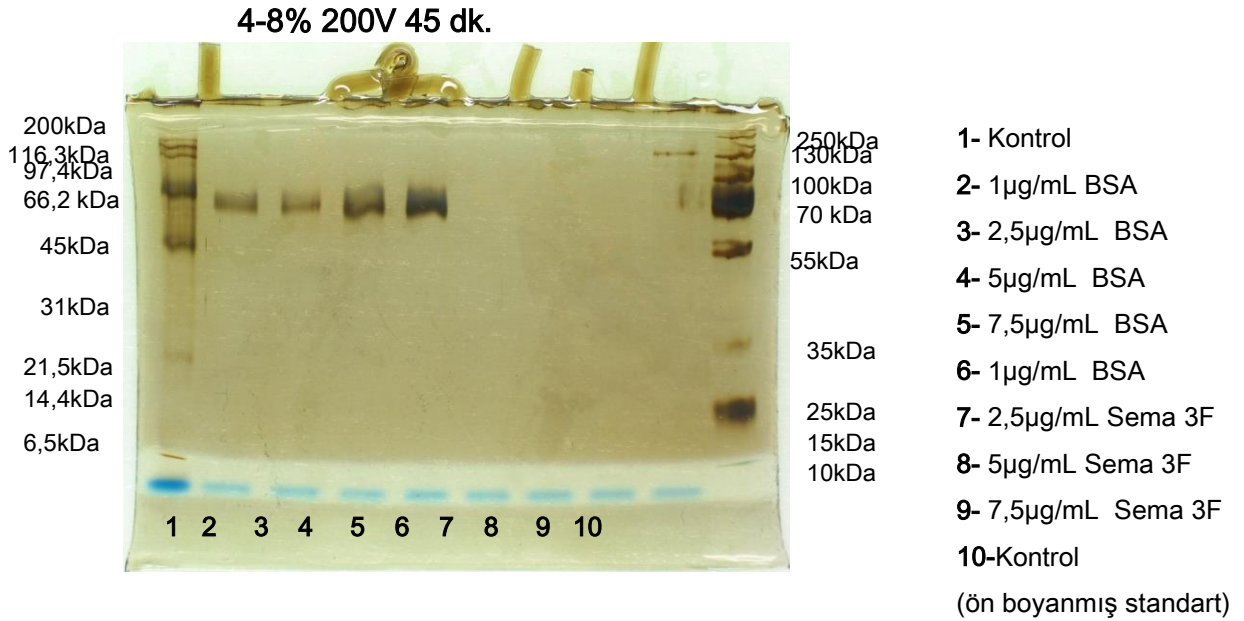
Kirchner ve ark. [270] AuNP'leri nötr bir polimer ile kaplamıştır. Bu tür sabit bir yüzey ligandı ile AuNP'lerin sitotoksik etkisinin çıplak AuNP'lere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir.

Yapılan bir başka hücre sitotoksikite çalışmasında AuNP'ler PEG ile modifiye edildikten sonra coumarin ile fonksiyonelleştirilmiştir. Sonuçta ne AuNP'lerin, AuNPs-PEG-OMe'nin ne de coumarin-PEGthiol ile fonksiyonelleştirilmiş AuNP'lerin aynı konsantrasyonlarda sitotoksik olmadığı belirlenmiştir [271].

Paciotti ve ark. [263] Tümör nekroz faktör (TNF) ile fonksiyonelleştirdiği AuNP'lerin sadece TNF'ye oranla daha anti-tümör etki gösterdiğini fakat farelerde çok az toksik etki gösterdiğini raporlamıştır.

Şekil 4.43'te gösterilen sonuçlarda tüm biyokonjugatların deneyde kullanılan konsantrasyonlarda sitotoksik olmadığı ve hücre canlılığının %80 üzerinde olduğu görülmektedir. Sonuçlar literatürle uyumludur. Genel olarak yapılan çalışmalar dikkate alınırsa AuNP'lerin sitotoksikitesi NP'nin boyutuna, şekline, yüzey modifikasyonu, yüzey ligandlarının kimyasal bileşenleri ve hücre tiplerine göre farklılık gösterebilir. *In vitro* ortamda gerçekleştirilen birçok sitotoksikite çalışmasında kanser hücreleri kullanılmasına rağmen bu çalışmada üzerinde çok fazla sayıda çalışma olmayan ve son derece hassas olan endotel hücreleri (HUVEC) ile çalışıldı. Hassas olan bu hücreler üzerinde biyokonjugatlar hücre canlılığını çok az etkilemiş, fakat hücre proliferasyonundaki düşüş etkisini arttırmıştır. Bu durum gelecekte nanotaşıyıcı sistemler kullanılarak birçok hastalığın tedavisinde başarılı şekilde biyokonjugatların kullanılabileceğine işaret etmektedir.

4.6. SDS-PAGE Jel Elektroforezi



Şekil 4.43. BSA ve Sema 3F'nin SDS-PAGE jel görüntüsü

%8'lik poliakrilamid jel elektroforezinde proteinler (BSA ve Sema 3F) yürütüldükten sonra gümüş boyama yapıldı ve bantlar belirlendi. SDS-PAGE ile elde edilen bantlar Şekil 4.43 görülmektedir. SDS-PAGE jelde görüldüğü gibi iki ayrı protein standardı kullanıldı. Bunlardan ön boyamalı olan standart SDS-PAGE jel elektroforezinde yürüme bittikten hemen sonrada renkli bantlar olarak belirdi. Diğer standart ise gümüş boyama sonunda belirlendi.

BSA'nın moleküler ağırlığı 66.2 kDa, Sema 3F'nin ise 116.3 kDa olduğu standartların verdiği değerlere bakarak belirlendi. Artan konsantrasyonlarda, BSA'nın bant yoğunluğunun tek zincirli şekilde konsantrasyona bağlı olarak arttığı gösterildi. Sema 3F için bant 7.5 µg/mL konsantrasyon değerinde net bir şekilde görüldü.

4.7. Çalışmanın Önemi

Yeni kan damarlarının gelişimi tümör gelişimi için çok kritik bir süreçtir. Dolayısıyla kanser tedavisinde anjiyogenez süreci yavaşlatılmak ya da durdurulmak istenir.

Literatürde kanser biyolojisi üzerine yalnızca Sema 3F'nin ya da sadece AuNP'lerin kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda kanser tedavisi için Sema 3F'nin hücre proliferasyonunu engellediği belirtilmiştir. Sadece Sema 3F ve AuNPs@PEG ile fonksiyonelleştirilmiş Sema 3F'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi karşılaştırıldığında AuNPs@PEG ile fonksiyonelleştirilmiş Sema 3F'nin çok daha etkin bir şekilde hücre proliferasyonunu durdurabildiği yaptığımız çalışmada gösterilmiştir.

Yapılan çalışmada önemli olan ilk defa Sema 3F, taşıyıcı nanosistem olarak AuNPs@PEG ile fonksiyonelleştirilmiş ve NP'ler ile birlikte kullanıldığında aktif hedefleme aracılığıyla VEGF uyarımlı endotel hücre proliferasyonunda daha fazla düşüş gözlenmiştir. Bu durum NP'ler ile Sema 3F kullanıldığında etkisinin daha da arttırılabileceğini ortaya koymaktadır. Halbuki nanopartiküler sistemler kullanılmadan Sema 3F direk kan yoluna verildiğinde hedefe non-spesifik olarak yayılım gösterir. Dolayısıyla tümörler gelişmeye başladığında anjiyogenez sürecini yavaşlatmak için Sema 3F ile fonksiyonelleştirilen AuNPs@PEG'ler normale göre arttırılmış etki gösterdiği için gelecekte ilaç olarak kullanılabilir. Ayrıca bu yöntemle ilaçların sadece hedeflendirilebilmesi sayesinde olası yan etkileri azalmış olur. Çünkü bu şekilde hem ilacın doz miktarı düşürülebilir hem de etkisi arttırılabilir.

Çalışmada AuNP'lerin kullanılması daha etkin sonuçlar veren diğer yöntemlerin dışında kullanılabilecek nanoteknolojik tedavi yöntemlerine dikkati çekmektedir. Bu şekilde bilinen anti-anjiyogenik tedavilerle birlikte daha etkin ve verimli bir kanser tedavisi sağlanabilir, hastanın yaşam kalitesi ve ömrü arttırılabilir.

5. SONUÇLAR

- Bu tez çalışması kapsamında AuNP üretimi için hızlı, nispeten dar boyut dağılımlı, şekil yönünden tekdüze partiküllerin üretimine olanak sağlaması; ayrıca partikül yüzeyine orta düzey bir güçte bağlanan bir kaplama ajanı olan sitrat sayesinde ilerleyen süreçlerde partiküllerin faz ve ligand değişimi gibi yollarla fonksiyonelleştirilmesine olanak sağlamasından dolayı Bastus yöntemi tercih edilmiştir. Tez çalışmasında 30 nm'den daha küçük partiküllerin kullanılması düşünüldüğü için Bastus yönteminde özellikle büyük partiküllerin üretim sürecinde gözlenen Oswald olgunlaşması olmadığından boyut dağılımının daha dar bir aralıkta olması sağlanarak AuNP'ler sentezlenmiştir.
- Sentezlenen AuNP'ler PEG ile modifiye edilerek (AuNPs@PEG) hem daha stabil olmaları sağlanmış hem de yüzey fonksiyonelleştirilmesini daha kolay hale getirmek için gerekli yüzey hazırlanmıştır.
- Sitrat stabilizeli sentezlenen AuNP ve AuNPs@PEG'ler UV-Vis, TEM, DLS ve ζ -potansiyeli gibi teknikler kullanılarak boyut dağılımı, yüzey yükü gibi özellikleri karakterize edilmiş ve sonuçlar karşılaştırılarak tartışılmıştır.
- AuNPs@PEG'nin serumlu ve serumsuz besiyerleri içerisinde stabilitesini koruduğu DLS ölçümleriyle gösterilmiştir.
- AuNPs@PEG'ler BSA ve Sema 3F ile EDC kimyasalı vasıtasıyla güçlü kovalent bağlarla fonksiyonelleştirilmiş ve floresans boya TAMRA ile etiketlenmiştir. Biyokonjugatların fonksiyonelleştirildiği UV-Vis ve floresans spektroskopisi, TEM, DLS, ζ -potansiyeli, agaroz jel elektroforezi gibi çok sayıda teknik kullanılarak doğrulanmıştır. Ayrıca ilk defa Sema 3F gibi ağır bir proteinin (Semaphorin 3F Fc Chimera ~111.6 KDa) NP'ler ile fonksiyonelleştirilmesi gerçekleştirilmiştir.
- AuNP@PEG ve biyokonjugatların A549 ve HUVEC hücre serileri ile MTT yöntemi kullanılarak sitotoksikite üzerine etkileri incelenmiş ve toksik etkiye neden olmadığı gösterilmiştir.

- Sema 3F'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi hem MTT hem de Click-EdU yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçta Sema 3F'nin hem VEGF uyarımlı endotel hücre proliferasyonu hem de A549 hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir.
- Biyokonjugatlar TAMRA floresans boya ile etiketlendiği için hücresel alım üzerine etkileride floresans mikroskopla incelenmiş ve sonuçlar tartışılmıştır.
- Hazırlanan biyokonjugatların (AuNPs@PEG-T, AuNPs@PEG-T&BSA, AuNPs@PEG-T&Sema 3F) ve Sema 3F'nin VEGF indüklü endotel hücre proliferasyonu üzerine etkileri MTT yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Sonuçta sadece Sema 3F ve AuNPs@PEG ile fonksiyonelleştirilmiş Sema 3F'nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi karşılaştırıldığında AuNPs@PEG ile fonksiyonelleştirilmiş Sema 3F'nin çok daha etkin bir şekilde hücre proliferasyonunu durdurabildiği yaptığımız çalışmada gösterilmiştir.
- Sema 3F direk kan yoluna verildiğinde non-spesifik olarak yayılım gösterir. Ancak nanopartiküler sistemler ile hedef bölgeye toplanır. Bu yolla hem doz miktarı düşürülebilir hem de etkisi artırılabilir. Bu çalışmada ilk defa Sema 3F'nin tam protein dizisi taşıyıcı platform olarak seçilen AuNP@PEG ile fonksiyonelleştirilmiş ve bu biyokonjugatlar kullanılarak tümöral gelişim ve anjiyogenez daha da etkin bir şekilde baskılanmıştır. Sonuçlar AuNP@PEG-T&Sema 3F biyokonjugasyonun tümöre hedeflendirilerek güçlü bir anti-tümöral ve anti-anjiyogenik etki yaratmak üzere tedavide kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Folkman, J., What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 4-6, **1990**.
- [2] Folkman, J., Tumor angiogenesis, *Advances in Cancer Research*, 19, 331-358, **1974**.
- [3] Özuysal, S., Tümöral Anjiogenezis, *Türk Patoloji Dergisi*, 17, 90-93, **2001**.
- [4] Folkman, J., Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. *Regulation of Angiogenesis*, (eds: Goldberg, I. D. and Rosen, E. R.), Birkhäuser Basel, 1-8, **1997**.
- [5] Papisov, M. I., Theoretical considerations of RES-avoiding liposomes: Molecular mechanics and chemistry of liposome interactions, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32, 119-138, **1998**.
- [6] Woodle, M. C., Controlling liposome blood clearance by surface-grafted polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32, 139-152, **1998**.
- [7] Nagayasu, A., Uchiyama, K. and Kiwada, H., The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 40, 75-87, **1999**.
- [8] Maruyama, K., Ishida, O., Takizawa, T. and Moribe, K., Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 40, 89-102, **1999**.
- [9] Neufeld, G., Lange, T., Varshavsky, A. and Kessler, O., Semaphorin Signaling in Vascular and Tumor Biology. *Semaphorins: Receptor and Intracellular Signaling Mechanisms*, (eds: Pasterkamp, R. J.), Springer New York, 118-131, **2007**.
- [10] Rehman, M. and Tamagnone, L., Semaphorins in cancer: Biological mechanisms and therapeutic approaches, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 24, 179-189, **2013**.
- [11] Brambilla, E., Constantin, B., Drabkin, H. and Roche, J., Semaphorin SEMA3F Localization in Malignant Human Lung and Cell Lines: A Suggested Role in Cell Adhesion and Cell Migration, *The American Journal of Pathology*, 156, 939-950, **2000**.
- [12] Kusy, S., Nasarre, P., Chan, D., Potiron, V., Meyronet, D., Gemmill, R., Constantin, B., Drabkin, H. and Roche, J., Selective suppression of in vivo tumorigenicity by semaphorin SEMA3F in lung cancer cells, *Neoplasia*, 7, 457-465., **2005**.
- [13] Kessler, O., Shraga-Heled, N., Lange, T., Gutmann-Raviv, N., Sabo, E., Baruch, L., Machluf, M. and Neufeld, G., Semaphorin-3F Is an Inhibitor of Tumor Angiogenesis, *Cancer Research*, 64, 1008-1015, **2004**.
- [14] Weinberg, R. A., How cancer arises, *Scientific American*, 275, 62-70, **1996**.
- [15] Parkin, D. M., Stjernswärd, J. and Muir, C. S., Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers, *Bulletin of the World Health Organization*, 62, 163-182, **1984**.

- [16] Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P., Global Cancer Statistics, 2002, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55, 74-108, **2005**.
- [17] Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D., Global cancer statistics, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61, 69-90, **2011**.
- [18] Jain, R. K., Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts, *Oncology (Williston Park)*, 19, 7-16, **2005**.
- [19] Kieran, M. W., Kalluri, R. and Cho, Y. J., The VEGF pathway in cancer and disease: responses, resistance, and the path forward, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, a006593, **2012**.
- [20] Kobayashi, H. and Lin, P. C., Nanotechnology for antiangiogenic cancer therapy, *Nanomedicine (London)*, 1, 17-22, **2006**.
- [21] Xiao, Z., Levy-Nissenbaum, E., Alexis, F., Lupták, A., Teply, B. A., Chan, J. M., Shi, J., Digga, E., Cheng, J., Langer, R. and Farokhzad, O. C., Engineering of targeted nanoparticles for cancer therapy using internalizing aptamers isolated by cell-uptake selection, *ACS Nano*, 6, 696-704, **2012**.
- [22] Karamysheva, A. F., Mechanisms of angiogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, 73, 751-762, **2008**.
- [23] Conway, E. M., Collen, D. and Carmeliet, P., Molecular mechanisms of blood vessel growth, *Cardiovascular Research*, 49, 507-521, **2001**.
- [24] Carmeliet, P., Angiogenesis in health and disease, *Nature Medicine*, 9, 653-660, **2003**.
- [25] Jain, R. K., Molecular regulation of vessel maturation, *Nature Medicine*, 9, 685-693, **2003**.
- [26] Risau, W., Mechanisms of angiogenesis, *Nature*, 386, 671-674, **1997**.
- [27] Bhadada, S. V., Goyal, B. R. and Patel, M. M., Angiogenic targets for potential disorders, *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 25, 29-47, **2011**.
- [28] Ferrara, N., VEGF as a therapeutic target in cancer, *Oncology*, 69 Suppl 3, 11-16, **2005**.
- [29] Dvorak, H. F., Rous-Whipple Award Lecture - How tumors make bad blood vessels and stroma, *American Journal of Pathology*, 162, 1747-1757, **2003**.
- [30] Secomb, T. W., Konerding, M. A., West, C. A., Su, M., Young, A. J. and Mentzer, S. J., Microangiectasias: Structural regulators of lymphocyte transmigration, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7231-7234, **2003**.
- [31] Brown, L. F., Yeo, K. T., Berse, B., Yeo, T. K., Senger, D. R., Dvorak, H. F. and van de Water, L., Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing, *The Journal of Experimental Medicine*, 176, 1375-1379, **1992**.
- [32] Nagy, J. A., Vasile, E., Feng, D., Sundberg, C., Brown, L. F., Detmar, M. J., Lawitts, J. A., Benjamin, L., Tan, X., Manseau, E. J., Dvorak, A. M. and Dvorak, H. F., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth

- factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis, *The Journal of Experimental Medicine*, 196, 1497-1506, **2002**.
- [33] Nagy, J. A., Vasile, E., Feng, D., Sundberg, C., Brown, L. F., Manseau, E. J., Dvorak, A. M. and Dvorak, H. F., VEGF-A induces angiogenesis, arteriogenesis, lymphangiogenesis, and vascular malformations, *Cold Spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology*, 67, 227-237, **2002**.
 - [34] Ren, G., Michael, L. H., Entman, M. L. and Frangogiannis, N. G., Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts, *The journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50, 71-79, **2002**.
 - [35] Carmeliet, P. and Collen, D., Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 237, 133-158, **1999**.
 - [36] Bhattacharya, R. and Mukherjee, P., Biological properties of "naked" metal nanoparticles, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1289-1306, **2008**.
 - [37] Folkman, J., Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?, *Nature Reviews Drug Discovery*, 6, 273-286, **2007**.
 - [38] Harold, F. D., Janice, A. N., Dian, F. and Ann, M. D., Tumor Architecture and Targeted Delivery. *Radioimmunotherapy of Cancer*, (eds: CRC Press, 107-135, **2000**.
 - [39] Fukumori, Y. and Ichikawa, H., Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis, *Advanced Powder Technology*, 17, 1-28, **2006**.
 - [40] Maeda, H., Seymour, L. W. and Miyamoto, Y., Conjugates of anticancer agents and polymers: advantages of macromolecular therapeutics in vivo, *Bioconjugate Chemistry*, 3, 351-362, **1992**.
 - [41] Folkman, J., Tumor Angiogenesis-Therapeutic Implications, *New England Journal of Medicine*, 285, 1182-1186., **1971**.
 - [42] Hirschi, K. K. and D'Amore, P. A., Pericytes in the microvasculature, *Cardiovascular Research*, 32, 687-698, **1996**.
 - [43] Siemann, D. W., Bibby, M. C., Dark, G. G., Dicker, A. P., Eskens, F. A. L. M., Horsman, M. R., Marmé, D. and LoRusso, P. M., Differentiation and Definition of Vascular-Targeted Therapies, *Clinical Cancer Research*, 11, 416-420, **2005**.
 - [44] Ching, L.-M., Goldsmith, D., Joseph, W. R., Körner, H., Sedgwick, J. D. and Baguley, B. C., Induction of Intratumoral Tumor Necrosis Factor (TNF) Synthesis and Hemorrhagic Necrosis by 5,6-Dimethylxanthenone-4-Acetic Acid (DMXAA) in TNF Knockout Mice, *Cancer Research*, 59, 3304-3307, **1999**.
 - [45] Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, S. and Dvorak, H. F., Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science*, 219, 983-985, **1983**.
 - [46] Ferrara, N. and Henzel, W. J., Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161, 851-858, **1989**.

- [47] Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M. and Persico, M. G., Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3, *Circulation*, 93, 1493-1495, **1996**.
- [48] Mohammed, N. S., *Growth Factor Dependent Co-receptor Function of Neuropilins in Breast Carcinoma*, Master's of Science, University of Toronto Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, **2011**.
- [49] Lähteenvuori, J. E., Lähteenvuori, M. T., Kivelä, A., Rosenlew, C., Falkevall, A., Klar, J., Heikura, T., Rissanen, T. T., Vähäkangas, E., Korpisalo, P., Enholm, B., Carmeliet, P., Alitalo, K., Eriksson, U. and Ylä-Herttuala, S., Vascular Endothelial Growth Factor-B Induces Myocardium-Specific Angiogenesis and Arteriogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1– and Neuropilin Receptor-1–Dependent Mechanisms, *Circulation*, 119, 845-856, **2009**.
- [50] Li, X., Tjwa, M., Van Hove, I., Enholm, B., Neven, E., Paavonen, K., Jeltsch, M., Juan, T. D., Sievers, R. E., Chorianopoulos, E., Wada, H., Vanwildemeersch, M., Noel, A., Foidart, J.-M., Springer, M. L., von Degenfeld, G., Dewerchin, M., Blau, H. M., Alitalo, K., Eriksson, U., Carmeliet, P. and Moons, L., Reevaluation of the Role of VEGF-B Suggests a Restricted Role in the Revascularization of the Ischemic Myocardium, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28, 1614-1620, **2008**.
- [51] Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R. F., Alitalo, K. and Eriksson, U., Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 2576-2581, **1996**.
- [52] Li, Y., Zhang, F., Nagai, N., Tang, Z., Zhang, S., Scotney, P., Lennartsson, J., Zhu, C., Qu, Y., Fang, C., Hua, J., Matsuo, O., Fong, G.-H., Ding, H., Cao, Y., Becker, K. G., Nash, A., Heldin, C.-H. and Li, X., VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1–mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats, *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 913-923, **2008**.
- [53] Hagberg, C. E., Falkevall, A., Wang, X., Larsson, E., Huusko, J., Nilsson, I., van Meeteren, L. A., Sameni, E., Lu, L., Vanwildemeersch, M., Klar, J., Genove, G., Pietras, K., Stone-Elander, S., Claesson-Welsh, L., Ylä-Herttuala, S., Lindahl, P. and Eriksson, U., Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake, *Nature*, 464, 917-921, **2010**.
- [54] Aase, K., von Euler, G., Li, X., Pontén, A., Thorén, P., Cao, R., Cao, Y., Olofsson, B., Gebre-Medhin, S., Pekny, M., Alitalo, K., Betsholtz, C. and Eriksson, U., Vascular Endothelial Growth Factor-B–Deficient Mice Display an Atrial Conduction Defect, *Circulation*, 104, 358-364, **2001**.
- [55] Byrne, A. M., Bouchier-Hayes, D. J. and Harmey, J. H., Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9, 777-794, **2005**.
- [56] Lee, J., Gray, A., Yuan, J., Luoh, S. M., Avraham, H. and Wood, W. I., Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific

- activator of the tyrosine kinase receptor Flt4, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 1988-1992, **1996**.
- [57] Makinen, T., Veikkola, T., Mustjoki, S., Karpanen, T., Catimel, B., Nice, E. C., Wise, L., Mercer, A., Kowalski, H., Kerjaschki, D., Stacker, S. A., Achen, M. G. and Alitalo, K., Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3, *The EMBO Journal*, 20, 4762-4773, **2001**.
- [58] Achen, M. G., Jeltsch, M., Kukk, E., Mäkinen, T., Vitali, A., Wilks, A. F., Alitalo, K. and Stacker, S. A., Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 548-553, **1998**.
- [59] Kaiser, P. K., Antivascular Endothelial Growth Factor Agents and Their Development: Therapeutic Implications in Ocular Diseases, *American journal of ophthalmology*, 142, 660.e661-660.e610, **2006**.
- [60] Djordjevic, S. and Driscoll, P. C., Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor, *Drug Discovery Today*, 18, 447-455, **2013**.
- [61] Ferrara, N., Gerber, H.-P. and LeCouter, J., The biology of VEGF and its receptors, *Nature Medicine*, 9, 669-676, **2003**.
- [62] Broll, R., Erdmann, H., Duchrow, M., Oevermann, E., Schwandner, O., Markert, U., Bruch, H. P. and Windhövel, U., Vascular endothelial growth factor (VEGF) – a valuable serum tumour marker in patients with colorectal cancer?, *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 27, 37-42, **2001**.
- [63] Harper, S. J. and Bates, D. O., VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics?, *Nature Reviews Cancer*, 8, 880-887, **2008**.
- [64] Geretti, E. and Klagsbrun, M., Neuropilins: Novel Targets for Anti-Angiogenesis Therapies, *Cell Adhesion and Migration*, 1, 56-61, **2007**.
- [65] Aktaş, S. H., *Kemoterapinin Kolon Kanseri, Meme Kanseri ve Mide Kanserinde VEGF Düzeylerine Etkisinin In Vivo ve In Vitro İncelemesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, **2010**.
- [66] Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T. and De Bruijn, E. A., Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis, *Pharmacological Reviews*, 56, 549-580, **2004**.
- [67] Chiodelli, P., Mitola, S., Ravelli, C., Oreste, P., Rusnati, M. and Presta, M., Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate the Angiogenic Activity of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Agonist Gremlin, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31, 116-127, **2011**.
- [68] Soydinc, H. O., Duranyıldız, D., Bilgin, E., Taş, F. and Yayasever, V., Küçük hücreli akciğer kanserinde anjiogenik faktörler (VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2), *Türk Onkoloji Dergisi*, 27, 55-61, **2012**.
- [69] Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. and Heldin, C. H., Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor, *Journal of Biological Chemistry*, 269, 26988-26995, **1994**.

- [70] Ellis, L. M., The role of neuropilins in cancer, *Molecular Cancer Therapeutics*, 5, 1099-1107, **2006**.
- [71] Gaur, P., Bielenberg, D. R., Samuel, S., Bose, D., Zhou, Y., Gray, M. J., Dallas, N. A., Fan, F., Xia, L., Lu, J. and Ellis, L. M., Role of Class 3 Semaphorins and Their Receptors in Tumor Growth and Angiogenesis, *Clinical Cancer Research*, 15, 6763-6770, **2009**.
- [72] Parker, M. W., Xu, P., Li, X. and Vander Kooi, C. W., Structural Basis for Selective Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) Binding to Neuropilin-1, *Journal of Biological Chemistry*, 287, 11082-11089, **2012**.
- [73] Lantuéjoul, S., Constantin, B., Drabkin, H., Brambilla, C., Roche, J. and Brambilla, E., Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines, *The Journal of Pathology*, 200, 336-347, **2003**.
- [74] Neufeld, G., Cohen, T., Shrager, N., Lange, T., Kessler, O. and Herzog, Y., The Neuropilins: Multifunctional Semaphorin and VEGF Receptors that Modulate Axon Guidance and Angiogenesis, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 12, 13-19, **2002**.
- [75] Fuh, G., Garcia, K. C. and de Vos, A. M., The Interaction of Neuropilin-1 with Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor Flt-1, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 26690-26695, **2000**.
- [76] Whitaker, G. B., Limberg, B. J. and Rosenbaum, J. S., Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 and Neuropilin-1 Form a Receptor Complex That Is Responsible for the Differential Signaling Potency of VEGF165 and VEGF121, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 25520-25531, **2001**.
- [77] Favier, B., Alam, A., Barron, P., Bonnin, J., Laboudie, P., Fons, P., Mandron, M., Herault, J.-P., Neufeld, G., Savi, P., Herbert, J.-M. and Bono, F., Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration, *Blood*, 108, 1243-1250, **2006**.
- [78] Goodman, C. S., Kolodkin, A. L., Luo, Y., Püschel, A. W. and Raper, J. A., Unified Nomenclature for the Semaphorins/Collapsins, *Cell*, 97, 551-552, **1999**.
- [79] Bagnard, D., Lohrum, M., Uziel, D., Puschel, A. W. and Bolz, J., Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections, *Development*, 125, 5043-5053, **1998**.
- [80] Goshima, Y., Ito, T., Sasaki, Y. and Nakamura, F., Semaphorins as signals for cell repulsion and invasion, *The Journal of Clinical Investigation*, 109, 993-998, **2002**.
- [81] Behar, O., Golden, J. A., Mashimo, H., Schoen, F. J. and Fishman, M. C., Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart, *Nature*, 383, 525-528, **1996**.
- [82] Tamagnone, L. and Comoglio, P. M., To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration, *EMBO reports*, 5, 356-361, **2004**.

- [83] Serini, G., Valdembri, D., Zanivan, S., Morterra, G., Burkhardt, C., Caccavari, F., Zammataro, L., Primo, L., Tamagnone, L., Logan, M., Tessier-Lavigne, M., Taniguchi, M., Puschel, A. W. and Bussolino, F., Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function, *Nature*, 424, 391-397, **2003**.
- [84] Roche, J., Boldog, F., Robinson, M., Robinson, L., Varella-Garcia, M., Swanton, M., Waggoner, B., Fishel, R., Franklin, W., Gemmill, R. and Drabkin, H., Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer and identification of a new human semaphorin, *Oncogene*, 12, 1289-1297, **1996**.
- [85] Christensen, C. R. L., Klingelhofer, J., Tarabykina, S., Hulgaard, E. F., Kramerov, D. and Lukanidin, E., Transcription of a Novel Mouse Semaphorin Gene, M-semaH, Correlates with the Metastatic Ability of Mouse Tumor Cell Lines, *Cancer Research*, 58, 1238-1244, **1998**.
- [86] Tomizawa, Y., Sekido, Y., Kondo, M., Gao, B., Yokota, J., Roche, J., Drabkin, H., Lerman, M. I., Gazdar, A. F. and Minna, J. D., Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 13954-13959, **2001**.
- [87] Suzuki, K., Kumanogoh, A. and Kikutani, H., Semaphorins and their receptors in immune cell interactions, *Nature Immunology*, 9, 17-23, **2008**.
- [88] Bismuth, G. and Bomsell, L., Controlling the Immune System Through Semaphorins, *Science's STKE*, 2002, re4, **2002**.
- [89] Kumanogoh, A. and Kikutani, H., Roles of the Semaphorin Family in Immune Regulation, *Advances in Immunology*, 81, 173-198, **2003**.
- [90] Kolodkin, A. L., Matthes, D. J. and Goodman, C. S., The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules, *Cell*, 75, 1389-1399, **1993**.
- [91] Koppel, A. M., Feiner, L., Kobayashi, H. and Raper, J. A., A 70 Amino Acid Region within the Semaphorin Domain Activates Specific Cellular Response of Semaphorin Family Members, *Neuron*, 19, 531-537, **1997**.
- [92] Bork, P., Doerks, T., Springer, T. A. and Snel, B., Domains in plexins: links to integrins and transcription factors, *Trends in Biochemical Sciences*, 24, 261-263, **1999**.
- [93] Neufeld, G., Shraga-Heled, N., Lange, T., Guttmann-Raviv, N., Herzog, Y. and Kessler, O., Semaphorins in cancer, *Frontiers in Bioscience*, 1, 751-760, **2002**.
- [94] Kolodkin, A. L., Levengood, D. V., Rowe, E. G., Tai, Y.-T., Giger, R. J. and Ginty, D. D., Neuropilin Is a Semaphorin III Receptor, *Cell*, 90, 753-762, **1997**.
- [95] He, Z. and Tessier-Lavigne, M., Neuropilin Is a Receptor for the Axonal Chemorepellent Semaphorin III, *Cell*, 90, 739-751, **1997**.
- [96] Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G. and Klagsbrun, M., Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor, *Cell*, 92, 735-745, **1998**.

- [97] Xiang, R.-H., Hensel, C. H., Garcia, D. K., Carlson, H. C., Kok, K., Daly, M. C., Kerbacher, K., van den Berg, A., Veldhuis, P., Buys, C. H. C. M. and Naylor, S. L., Isolation of the Human Semaphorin III/F Gene (SEMA3F) at Chromosome 3p21, a Region Deleted in Lung Cancer, *Genomics*, 32, 39-48, **1996**.
- [98] Sekido, Y., Bader, S., Latif, F., Chen, J. Y., Duh, F. M., Wei, M. H., Albanesi, J. P., Lee, C. C., Lerman, M. I. and Minna, J. D., Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 4120-4125, **1996**.
- [99] Shimizu, A., Mammoto, A., Italiano, J. E., Pravda, E., Dudley, A. C., Ingber, D. E. and Klagsbrun, M., ABL2/ARG Tyrosine Kinase Mediates SEMA3F-induced RhoA Inactivation and Cytoskeleton Collapse in Human Glioma Cells, *Journal of Biological Chemistry*, 283, 27230-27238, **2008**.
- [100] Takahashi, T. and Strittmatter, S. M., PlexinA1 Autoinhibition by the Plexin Sema Domain, *Neuron*, 29, 429-439, **2001**.
- [101] Yaron, A., Huang, P.-H., Cheng, H.-J. and Tessier-Lavigne, M., Differential Requirement for Plexin-A3 and -A4 in Mediating Responses of Sensory and Sympathetic Neurons to Distinct Class 3 Semaphorins, *Neuron*, 45, 513-523, **2005**.
- [102] Schwarz, Q. and Ruhrberg, C., Neuropilin, you gotta let me know: Should I stay or should I go?, *Cell Adhesion and Migration*, 4, 61-66, **2010**.
- [103] Clarhaut, J., Roche, J. and Drabkin, H. A., Semaphorins in Lung Cancer, *Journal of Thoracic Oncology*, 1, 203-204, **2006**.
- [104] Gu, C. and Giraudo, E., The role of semaphorins and their receptors in vascular development and cancer, *Experimental Cell Research*, 319, 1306-1316, **2013**.
- [105] Potiron, V. A., Roche, J. and Drabkin, H. A., Semaphorins and their receptors in lung cancer, *Cancer Letters*, 273, 1-14, **2009**.
- [106] Potiron, V. A., Sharma, G., Nasarre, P., Clarhaut, J. A., Augustin, H. G., Gemmill, R. M., Roche, J. and Drabkin, H. A., Semaphorin SEMA3F Affects Multiple Signaling Pathways in Lung Cancer Cells, *Cancer Research*, 67, 8708-8715, **2007**.
- [107] Bielenberg, D. R., Hida, Y., Shimizu, A., Kaipainen, A., Kreuter, M., Kim, C. C. and Klagsbrun, M., Semaphorin 3F, a chemorepellent for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype, *The Journal of Clinical Investigation*, 114, 1260-1271, **2004**.
- [108] Kashiwagi, H., Shiraga, M., Kato, H., Kamae, T., Yamamoto, N., Tadokoro, S., Kurata, Y., Tomiyama, Y. and Kanakura, Y., Negative regulation of platelet function by a secreted cell repulsive protein, semaphorin 3A, *Blood*, 106, 913-921, **2005**.
- [109] Lepelletier, Y., Smaniotto, S., Hadj-Slimane, R., Villa-Verde, D. M. S., Nogueira, A. C., Dardenne, M., Hermine, O. and Savino, W., Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated

- interactions, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 5545-5550, **2007**.
- [110] Banu, N., Teichman, J., Dunlap-Brown, M., Villegas, G. and Tufro, A., Semaphorin 3C regulates endothelial cell function by increasing integrin activity, *The FASEB Journal*, 20, 2150-2152, **2006**.
- [111] Tan, G., Onur, M. A. and Sağlam, N., Nano Altın ve Biyotıp, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 32, 499-506, **2012**.
- [112] Chen, P. C., Mwakwari, S. C. and Oyelere, A. K., Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. Nanotechnology, *Science and Applications*, 2008, 45-66, **2008**.
- [113] Sahoo, S. K. and Labhasetwar, V., Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discovery Today*, 8, 1112-1120, **2003**.
- [114] Ratner, M. A. and Ratner, D., *Nanotechnology: a gentle introduction to the next big idea*, Prentice Hall Press, New Jersey, **2002**.
- [115] Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C. and Mirkin, C. A., Gold Nanoparticles for Biology and Medicine, *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 3280-3294, **2010**.
- [116] Huaizhi, Z. and Yuantao, N., China's ancient gold drugs, *Gold Bulletin*, 34, 24-29, **2001**.
- [117] Mahdihassan, S., The Tradition of Alchemy in India, *The American Journal of Chinese Medicine*, 09, 23-33, **1981**.
- [118] Daniel, M.-C. and Astruc, D., Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology, *Chemical Reviews*, 104, 293-346, **2003**.
- [119] Shaw, C. F., Gold-Based Therapeutic Agents, *Chemical Reviews*, 99, 2589-2600, **1999**.
- [120] Berners-Price, S. J., Girard, G. R., Hill, D. T., Sutton, B. M., Jarrett, P. S., Faucette, L. F., Johnson, R. K., Mirabelli, C. K. and Sadler, P. J., Cytotoxicity and antitumor activity of some tetrahedral bis(diphosphino)gold(I) chelates, *Journal of Medicinal Chemistry*, 33, 1386-1392, **1990**.
- [121] Haiduc, I. and Silvestru, C., Rhodium, iridium, copper and gold antitumor organometallic compounds, *In Vivo*, 3, 285-293, **1989**.
- [122] Fries, J. F., Bloch, D., Spitz, P. and Mitchell, D. M., Cancer in rheumatoid arthritis: A prospective long-term study of mortality, *The American Journal of Medicine*, 78, 56-59, **1985**.
- [123] Wai-Yin Sun, R., Ma, D.-L., Wong, E. L.-M. and Che, C.-M., Some uses of transition metal complexes as anti-cancer and anti-HIV agents, *Dalton Transactions*, 4884-4892, **2007**.
- [124] Murphy, C. J., Gole, A. M., Stone, J. W., Sisco, P. N., Alkilany, A. M., Goldsmith, E. C. and Baxter, S. C., Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging, *Accounts of Chemical Research*, 41, 1721-1730, **2008**.

- [125] Hu, M., Chen, J., Li, Z.-Y., Au, L., Hartland, G. V., Li, X., Marquez, M. and Xia, Y., Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, 35, 1084-1094, **2006**.
- [126] El-Sayed, M. A., Some Interesting Properties of Metals Confined in Time and Nanometer Space of Different Shapes, *Accounts of Chemical Research*, 34, 257-264, **2001**.
- [127] Sun, Y. and Xia, Y., Increased Sensitivity of Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoshells Compared to That of Gold Solid Colloids in Response to Environmental Changes, *Analytical Chemistry*, 74, 5297-5305, **2002**.
- [128] Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L. and Schatz, G. C., The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *The Journal of Physical Chemistry B*, 107, 668-677, **2003**.
- [129] Noguez, C., Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment, *The Journal of Physical Chemistry C*, 111, 3806-3819, **2007**.
- [130] Tong, L., Wei, Q., Wei, A. and Cheng, J.-X., Gold Nanorods as Contrast Agents for Biological Imaging: Optical Properties, Surface Conjugation and Photothermal Effects, *Photochemistry and Photobiology*, 85, 21-32, **2009**.
- [131] Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R. and Schlag, P. M., Hyperthermia in combined treatment of cancer, *The Lancet Oncology*, 3, 487-497, **2002**.
- [132] Cai, W., Gao, T., Hong, H. and Sun, J., Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology, *Nanotechnology, Science and Applications*, 2008, 17-32, **2008**.
- [133] Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J. and Wyatt, M. D., Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity, *Small*, 1, 325-327, **2005**.
- [134] Lu, A.-H., Salabas, E. L. and Schüth, F., Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application, *Angewandte Chemie International Edition*, 46, 1222-1244, **2007**.
- [135] Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G. and Whitesides, G. M., Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, *Chemical Reviews*, 105, 1103-1170, **2005**.
- [136] Lasagna-Reeves, C., Gonzalez-Romero, D., Barria, M. A., Olmedo, I., Clos, A., Sadagopa Ramanujam, V. M., Urayama, A., Vergara, L., Kogan, M. J. and Soto, C., Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393, 649-655, **2010**.
- [137] Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R. and Sastry, M., Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview, *Langmuir*, 21, 10644-10654, **2005**.
- [138] Polizzi, M. A., Stasko, N. A. and Schoenfish, M. H., Water-Soluble Nitric Oxide-Releasing Gold Nanoparticles, *Langmuir*, 23, 4938-4943, **2007**.

- [139] Hong, R., Han, G., Fernández, J. M., Kim, B.-j., Forbes, N. S. and Rotello, V. M., Glutathione-Mediated Delivery and Release Using Monolayer Protected Nanoparticle Carriers, *Journal of the American Chemical Society*, 128, 1078-1079, **2006**.
- [140] Han, G., You, C.-C., Kim, B.-j., Turingan, R. S., Forbes, N. S., Martin, C. T. and Rotello, V. M., Light-Regulated Release of DNA and Its Delivery to Nuclei by Means of Photolabile Gold Nanoparticles, *Angewandte Chemie International Edition*, 45, 3165-3169, **2006**.
- [141] Pissuwan, D., Niidome, T. and Cortie, M. B., The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 149, 65-71, **2011**.
- [142] Li, D., Li, G., Guo, W., Li, P., Wang, E. and Wang, J., Glutathione-mediated release of functional plasmid DNA from positively charged quantum dots, *Biomaterials*, 29, 2776-2782, **2008**.
- [143] Hostetler, M. J., Wingate, J. E., Zhong, C.-J., Harris, J. E., Vachet, R. W., Clark, M. R., Londono, J. D., Green, S. J., Stokes, J. J., Wignall, G. D., Glish, G. L., Porter, M. D., Evans, N. D. and Murray, R. W., Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size, *Langmuir*, 14, 17-30, **1998**.
- [144] Gibson, J. D., Khanal, B. P. and Zubarev, E. R., Paclitaxel-Functionalized Gold Nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 11653-11661, **2007**.
- [145] Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K. and Rotello, V. M., Gold nanoparticles in delivery applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1307-1315, **2008**.
- [146] Tkachenko, A. G., Xie, H., Liu, Y., Coleman, D., Ryan, J., Glomm, W. R., Shipton, M. K., Franzen, S. and Feldheim, D. L., Cellular Trajectories of Peptide-Modified Gold Particle Complexes: Comparison of Nuclear Localization Signals and Peptide Transduction Domains, *Bioconjugate Chemistry*, 15, 482-490, **2004**.
- [147] Handley, D. A., Methods for Synthesis of Colloidal Gold. *Colloidal gold : principles, methods, and applications*, (eds: Hayat, M. A.), Academic Press, San Diego, 13-33, **1989**.
- [148] Turkevich, J., Stevenson, P. C. and Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75, **1951**.
- [149] Frens, G., Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature Physical Science*, 241, 20-22, **1973**.
- [150] Sönnichsen, C. and Alivisatos, A. P., Gold Nanorods as Novel Nonbleaching Plasmon-Based Orientation Sensors for Polarized Single-Particle Microscopy, *Nano Letters*, 5, 301-304, **2004**.

- [151] Pérez-Juste, J., Pastoriza-Santos, I., Liz-Marzán, L. M. and Mulvaney, P., Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications, *Coordination Chemistry Reviews*, 249, 1870-1901, **2005**.
- [152] Templeton, A. C., Wuelfing, W. P. and Murray, R. W., Monolayer-Protected Cluster Molecules, *Accounts of Chemical Research*, 33, 27-36, **1999**.
- [153] Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. and Whyman, R., Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1994, 801-802, **1994**.
- [154] Kabashin, A. V. and Meunier, M., Synthesis of colloidal nanoparticles during femtosecond laser ablation of gold in water, *Journal of Applied Physics*, 94, 7941-7943., **2003**.
- [155] Amendola, V., Polizzi, S. and Meneghetti, M., Laser Ablation Synthesis of Gold Nanoparticles in Organic Solvents, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 7232-7237, **2006**.
- [156] Abdulla-Al-Mamun, M., Kusumoto, Y., Mihata, A., Islam, M. S. and Ahmmad, B., Plasmon-induced photothermal cell-killing effect of gold colloidal nanoparticles on epithelial carcinoma cells, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8, 1125-1129, **2009**.
- [157] Walter, J. G., Petersen, S., Stahl, F., Scheper, T. and Barcikowski, S., Laser ablation-based one-step generation and bio-functionalization of gold nanoparticles conjugated with aptamers, *Journal of Nanobiotechnology*, 8, 1-11, **2010**.
- [158] Sobhan, M., Ams, M., Withford, M. and Goldys, E., Ultrafast laser ablative generation of gold nanoparticles: the influence of pulse energy, repetition frequency and spot size, *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 2831-2842, **2010**.
- [159] Suslick, K. S. and Price, G. J., Applications of Ultrasound to Materials Chemistry, *Journal*, 29, 295-326, **1999**.
- [160] Mann, S., Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry, *Nature*, 365, 499-505, **1993**.
- [161] Zhang, J., Du, J., Han, B., Liu, Z., Jiang, T. and Zhang, Z., Sonochemical Formation of Single-Crystalline Gold Nanobelts, *Angewandte Chemie*, 118, 1134-1137, **2006**.
- [162] Perrault, S. D. and Chan, W. C. W., Synthesis and Surface Modification of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of 50–200 nm, *Journal of the American Chemical Society*, 131, 17042-17043, **2009**.
- [163] Bastús, N. G., Comenge, J. and Puentes, V. c., Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening, *Langmuir*, 27, 11098-11105, **2011**.
- [164] Bigall, N. C., Härtling, T., Klose, M., Simon, P., Eng, L. M. and Eychmüller, A., Monodisperse Platinum Nanospheres with Adjustable Diameters from 10 to 100 nm: Synthesis and Distinct Optical Properties, *Nano Letters*, 8, 4588-4592, **2008**.

- [165] Brown, K. R., Walter, D. G. and Natan, M. J., Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2. Improved Control of Particle Size and Shape, *Chemistry of Materials*, 12, 306-313, **1999**.
- [166] Brown, K. R., Lyon, L. A., Fox, A. P., Reiss, B. D. and Natan, M. J., Hydroxylamine Seeding of Colloidal Au Nanoparticles. 3. Controlled Formation of Conductive Au Films, *Chemistry of Materials*, 12, 314-323, **1999**.
- [167] Brown, K. R. and Natan, M. J., Hydroxylamine Seeding of Colloidal Au Nanoparticles in Solution and on Surfaces, *Langmuir*, 14, 726-728, **1998**.
- [168] Jana, N. R., Gearheart, L. and Murphy, C. J., Seeding Growth for Size Control of 5–40 nm Diameter Gold Nanoparticles, *Langmuir*, 17, 6782-6786, **2001**.
- [169] Rodríguez-Fernández, J., Pérez-Juste, J., García de Abajo, F. J. and Liz-Marzán, L. M., Seeded Growth of Submicron Au Colloids with Quadrupole Plasmon Resonance Modes, *Langmuir*, 22, 7007-7010, **2006**.
- [170] Leonov, A. P., Zheng, J., Clogston, J. D., Stern, S. T., Patri, A. K. and Wei, A., Detoxification of Gold Nanorods by Treatment with Polystyrenesulfonate, *ACS Nano*, 2, 2481-2488, **2008**.
- [171] Xu, Z. P., Zeng, Q. H., Lu, G. Q. and Yu, A. B., Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery, *Chemical Engineering Science*, 61, 1027-1040, **2006**.
- [172] Faraji, A. H. and Wipf, P., Nanoparticles in cellular drug delivery, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 2950-2962, **2009**.
- [173] Lee, J. H., Lee, H. B. and Andrade, J. D., Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces, *Progress in Polymer Science*, 20, 1043-1079, **1995**.
- [174] Peppas, N. A., Keys, K. B., Torres-Lugo, M. and Lowman, A. M., Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 62, 81-87, **1999**.
- [175] Daou, T. J., Li, L., Reiss, P., Josserand, V. and Texier, I., Effect of Poly(ethylene glycol) Length on the in Vivo Behavior of Coated Quantum Dots, *Langmuir*, 25, 3040-3044, **2009**.
- [176] Kanaras, A. G., Kamounah, F. S., Schaumburg, K., Kiely, C. J. and Brust, M., Thioalkylated tetraethylene glycol: a new ligand for water soluble monolayer protected gold clusters, *Chemical Communications*, 2294-2295, **2002**.
- [177] Chen, L., *Surface Functionalization and Bioconjugation of Nanoparticles for Biomedical Applications*, Doctor of Philosophy, The University of Western Ontario Chemical and Biochemical Engineering, Canada, **2013**.
- [178] Sperling, R. A. and Parak, W. J., Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368, 1333-1383, **2010**.

- [179] Brennan, J. L., Hatzakis, N. S., Tshikhudo, T. R., Razumas, V., Patkar, S., Vind, J., Svendsen, A., Nolte, R. J. M., Rowan, A. E. and Brust, M., Bionanoconjugation via Click Chemistry: The Creation of Functional Hybrids of Lipases and Gold Nanoparticles, *Bioconjugate Chemistry*, 17, 1373-1375, **2006**.
- [180] El-Sayed, I. H., Huang, X. and El-Sayed, M. A., Selective laser photothermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles, *Cancer Letters*, 239, 129-135, **2006**.
- [181] El-Sayed, I. H., Huang, X. and El-Sayed, M. A., Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer, *Nano Letters*, 5, 829-834, **2005**.
- [182] Sharma, P., Brown, S., Walter, G., Santra, S. and Moudgil, B., Nanoparticles for bioimaging, *Advances in Colloid and Interface Science*, 123–126, 471-485, **2006**.
- [183] Sau, T. and Goia, D., Biomedical Applications of Gold Nanoparticles. *Fine Particles in Medicine and Pharmacy*, (eds: Matijević, E.), Springer, New York, 101-145, **2012**.
- [184] Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., Focella, T. M. and Smilowitz, H. M., Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent, *The British Journal of Radiology*, 79, 248-253, **2006**.
- [185] Roth, J., The silver anniversary of gold: 25 years of the colloidal gold marker system for immunocytochemistry and histochemistry, *Histochemistry and Cell Biology*, 106, 1-8, **1996**.
- [186] Boyer, D., Tamarat, P., Maali, A., Lounis, B. and Orrit, M., Photothermal Imaging of Nanometer-Sized Metal Particles Among Scatterers, *Science*, 297, 1160-1163, **2002**.
- [187] Kim, K., Huang, S.-W., Ashkenazi, S., O'Donnell, M., Agarwal, A., Kotov, N. A., Denny, M. F. and Kaplan, M. J., Photoacoustic imaging of early inflammatory response using gold nanorods, *Applied Physics Letters*, 90, -, **2007**.
- [188] Mallidi, S., Larson, T., Aaron, J., Sokolov, K. and Emelianov, S., Molecular specific optoacoustic imaging with plasmonic nanoparticles, *Optics Express*, 15, 6583-6588, **2007**.
- [189] Kim, C., Erpelding, T. N., Jankovic, L., Pashley, M. D. and Wang, L. V., Deeply penetrating in vivo photoacoustic imaging using a clinical ultrasound array system, *Biomedical Optics Express*, 1, 278-284, **2010**.
- [190] Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X. and Rotello, V. M., Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing, *Chemical Reviews*, 112, 2739-2779, **2012**.
- [191] Sperling, R. A., Rivera Gil, P., Zhang, F., Zanella, M. and Parak, W. J., Biological applications of gold nanoparticles, *Chemical Society Reviews*, 37, 1896-1908, **2008**.
- [192] Allen, T. M. and Cullis, P. R., Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream, *Science*, 303, 1818-1822, **2004**.

- [193] Ferrari, M., Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Nature Reviews Cancer*, 5, 161-171, **2005**.
- [194] Vivero-Escoto, J. L., Slowing, I. I., Wu, C.-W. and Lin, V. S. Y., Photoinduced Intracellular Controlled Release Drug Delivery in Human Cells by Gold-Capped Mesoporous Silica Nanosphere, *Journal of the American Chemical Society*, 131, 3462-3463, **2009**.
- [195] Wei, H., Yang, K., Shu-Lin, P., Li-Sheng, D., Sheng, Z. and Bang-Jing, L., Vesicular gold assemblies based on host–guest inclusion and its controllable release of doxorubicin, *Nanotechnology*, 24, 495103, **2013**.
- [196] Kim, C. K., Ghosh, P., Pagliuca, C., Zhu, Z.-J., Menichetti, S. and Rotello, V. M., Entrapment of Hydrophobic Drugs in Nanoparticle Monolayers with Efficient Release into Cancer Cells, *Journal of the American Chemical Society*, 131, 1360-1361, **2009**.
- [197] Rafique, S., Idrees, M., Nasim, A., Akbar, H. and Athar, A., Transition metal complexes as potential therapeutic agents, *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 5, 38-45, **2010**.
- [198] Kumari, A., Yadav, S. K. and Yadav, S. C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18, **2010**.
- [199] Joshi, H. M., Bhumkar, D. R., Joshi, K., Pokharkar, V. and Sastry, M., Gold Nanoparticles as Carriers for Efficient Transmucosal Insulin Delivery, *Langmuir*, 22, 300-305, **2005**.
- [200] Karataş, Ö. F., Sezgin, E., Aydın, Ö. and Çulha, M., Interaction of gold nanoparticles with mitochondria, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71, 315-318, **2009**.
- [201] Chang, M.-Y., Shiau, A.-L., Chen, Y.-H., Chang, C.-J., Chen, H. H. W. and Wu, C.-L., Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice, *Cancer Science*, 99, 1479-1484, **2008**.
- [202] Sperling, R. A., Pellegrino, T., Li, J. K., Chang, W. H. and Parak, W. J., Electrophoretic Separation of Nanoparticles with a Discrete Number of Functional Groups, *Advanced Functional Materials*, 16, 943-948, **2006**.
- [203] Hanauer, M., Pierrat, S., Zins, I., Lotz, A. and Sönnichsen, C., Separation of Nanoparticles by Gel Electrophoresis According to Size and Shape, *Nano Letters*, 7, 2881-2885, **2007**.
- [204] Heukeshoven, J. and Dernick, R., Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining, *ELECTROPHORESIS*, 6, 103-112, **1985**.
- [205] Heukeshoven, J. and Dernick, R., Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels, *ELECTROPHORESIS*, 9, 28-32, **1988**.
- [206] Zhang, G., Yang, Z., Lu, W., Zhang, R., Huang, Q., Tian, M., Li, L., Liang, D. and Li, C., Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated

- gold nanoparticles in tumor-xenografted mice, *Biomaterials*, 30, 1928-1936, **2009**.
- [207] Mizuno, T., Namiki, A. and Tsuzuki, S., A Novel Filter Rating Method Using Less Than 30-nm Gold Nanoparticle and Protective Ligand, *Semiconductor Manufacturing, IEEE Transactions on*, 22, 452-461, **2009**.
- [208] Müller, R. H., *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis: Einführung in die Theorie, Praktische Meßdurchführung, Dateninterpretation*, First Edition, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Germany, **1996**.
- [209] Chen, H., Wang, L., Yu, Q., Qian, W., Tiwari, D., Yi, H., Wang, A. Y., Huang, J., Yang, L. and Mao, H., Anti-HER2 antibody and ScFvEGFR-conjugated antifouling magnetic iron oxide nanoparticles for targeting and magnetic resonance imaging of breast cancer, *International Journal of Nanomedicine*, 8, 3781—3794, **2013**.
- [210] Mamedova, N. N., Kotov, N. A., Rogach, A. L. and Studer, J., Albumin–CdTe Nanoparticle Bioconjugates: Preparation, Structure, and Interunit Energy Transfer with Antenna Effect, *Nano Letters*, 1, 281-286, **2001**.
- [211] Dulkeith, E., Ringler, M., Klar, T. A., Feldmann, J., Muñoz Javier, A. and Parak, W. J., Gold Nanoparticles Quench Fluorescence by Phase Induced Radiative Rate Suppression, *Nano Letters*, 5, 585-589, **2005**.
- [212] Nath, N. and Chilkoti, A., Label-Free Biosensing by Surface Plasmon Resonance of Nanoparticles on Glass: Optimization of Nanoparticle Size, *Analytical Chemistry*, 76, 5370-5378, **2004**.
- [213] Yonzon, C. R., Jeoung, E., Zou, S., Schatz, G. C., Mrksich, M. and Van Duyne, R. P., A Comparative Analysis of Localized and Propagating Surface Plasmon Resonance Sensors: The Binding of Concanavalin A to a Monosaccharide Functionalized Self-Assembled Monolayer, *Journal of the American Chemical Society*, 126, 12669-12676, **2004**.
- [214] Lee, S. and Pérez-Luna, V. H., Dextran–Gold Nanoparticle Hybrid Material for Biomolecule Immobilization and Detection, *Analytical Chemistry*, 77, 7204-7211, **2005**.
- [215] Englebienne, P., Van Hoonacker, A. and Valsamis, J., Rapid Homogeneous Immunoassay for Human Ferritin in the Cobas Mira Using Colloidal Gold as the Reporter Reagent, *Clinical Chemistry*, 46, 2000-2003, **2000**.
- [216] Yu, C. and Irudayaraj, J., Multiplex Biosensor Using Gold Nanorods, *Analytical Chemistry*, 79, 572-579, **2006**.
- [217] Zanchet, D., Micheel, C. M., Parak, W. J., Gerion, D. and Alivisatos, A. P., Electrophoretic Isolation of Discrete Au Nanocrystal/DNA Conjugates, *Nano Letters*, 1, 32-35, **2000**.
- [218] Shang, L., Wang, Y., Jiang, J. and Dong, S., pH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin:Gold Nanoparticle Bioconjugates: A Spectroscopic Study, *Langmuir*, 23, 2714-2721, **2007**.

- [219] Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H. and Plech, A., Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 15700-15707, **2006**.
- [220] Jana, N. R. and Peng, X., Single-Phase and Gram-Scale Routes toward Nearly Monodisperse Au and Other Noble Metal Nanocrystals, *Journal of the American Chemical Society*, 125, 14280-14281, **2003**.
- [221] Ji, Z., Jin, X., George, S., Xia, T., Meng, H., Wang, X., Suarez, E., Zhang, H., Hoek, E. M. V., Godwin, H., Nel, A. E. and Zink, J. I., Dispersion and Stability Optimization of TiO₂ Nanoparticles in Cell Culture Media, *Environmental Science and Technology*, 44, 7309-7314, **2010**.
- [222] Lordan, S. and Higginbotham, C. L., Effect of serum concentration on the cytotoxicity of clay particles, *Cell Biology International*, 36, 57-61, **2012**.
- [223] Safi, M., Courtois, J., Seigneuret, M., Conjeaud, H. and Berret, J. F., The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles, *Biomaterials*, 32, 9353-9363, **2011**.
- [224] Zhang, Y., Chen, Y., Westerhoff, P. and Crittenden, J., Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles, *Water Research*, 43, 4249-4257, **2009**.
- [225] Santander-Ortega, M. J., Csaba, N., Alonso, M. J., Ortega-Vinuesa, J. L. and Bastos-González, D., Stability and physicochemical characteristics of PLGA, PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanoparticles: A comparative study, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 296, 132-140, **2007**.
- [226] Fatisson, J., Quevedo, I. R., Wilkinson, K. J. and Tufenkji, N., Physicochemical characterization of engineered nanoparticles under physiological conditions: Effect of culture media components and particle surface coating, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 91, 198-204, **2012**.
- [227] ISO, *Tests for In Vitro Cytotoxicity, Biological evaluation of medical devices, ISO 10993-5:2009* Switzerland, **2009**.
- [228] Niidome, T., Yamagata, M., Okamoto, Y., Akiyama, Y., Takahashi, H., Kawano, T., Katayama, Y. and Niidome, Y., PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications, *Journal of Controlled Release*, 114, 343-347, **2006**.
- [229] Lipka, J., Semmler-Behnke, M., Sperling, R. A., Wenk, A., Takenaka, S., Schleh, C., Kissel, T., Parak, W. J. and Kreyling, W. G., Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection, *Biomaterials*, 31, 6574-6581, **2010**.
- [230] Cho, W.-S., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Cho, H.-Y., Han, B. S., Kim, S. H., Kim, H. O., Lim, Y. T., Chung, B. H. and Jeong, J., Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236, 16-24, **2009**.
- [231] Cho, W.-S., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Han, B. S., Shin, H.-S., Hong, J., Chung, B. H., Jeong, J. and Cho, M.-H., Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245, 116-123, **2010**.

- [232] Wagner, E., Curiel, D. and Cotten, M., Delivery of drugs, proteins and genes into cells using transferrin as a ligand for receptor-mediated endocytosis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 14, 113-135, **1994**.
- [233] Yang, P.-H., Sun, X., Chiu, J.-F., Sun, H. and He, Q.-Y., Transferrin-Mediated Gold Nanoparticle Cellular Uptake, *Bioconjugate Chemistry*, 16, 494-496, **2005**.
- [234] Jain, P. K., El-Sayed, I. H. and El-Sayed, M. A., Au nanoparticles target cancer, *Nano Today*, 2, 18-29, **2007**.
- [235] Chithrani, B. D. and Chan, W. C. W., Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes, *Nano Letters*, 7, 1542-1550, **2007**.
- [236] de la Fuente, J. M. and Berry, C. C., Tat Peptide as an Efficient Molecule To Translocate Gold Nanoparticles into the Cell Nucleus, *Bioconjugate Chemistry*, 16, 1176-1180, **2005**.
- [237] Rosi, N. L., Giljohann, D. A., Thaxton, C. S., Lytton-Jean, A. K. R., Han, M. S. and Mirkin, C. A., Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation, *Science*, 312, 1027-1030, **2006**.
- [238] Salem, A. K., Searson, P. C. and Leong, K. W., Multifunctional nanorods for gene delivery, *Nature materials*, 2, 668-671, **2003**.
- [239] Tkachenko, A. G., Xie, H., Coleman, D., Glomm, W., Ryan, J., Anderson, M. F., Franzen, S. and Feldheim, D. L., Multifunctional Gold Nanoparticle-Peptide Complexes for Nuclear Targeting, *Journal of the American Chemical Society*, 125, 4700-4701, **2003**.
- [240] Liu, Y., Shipton, M. K., Ryan, J., Kaufman, E. D., Franzen, S. and Feldheim, D. L., Synthesis, Stability, and Cellular Internalization of Gold Nanoparticles Containing Mixed Peptide-Poly(ethylene glycol) Monolayers, *Analytical Chemistry*, 79, 2221-2229, **2007**.
- [241] Nativo, P., Prior, I. A. and Brust, M., Uptake and Intracellular Fate of Surface-Modified Gold Nanoparticles, *ACS Nano*, 2, 1639-1644, **2008**.
- [242] Huff, T. B., Hansen, M. N., Zhao, Y., Cheng, J.-X. and Wei, A., Controlling the Cellular Uptake of Gold Nanorods, *Langmuir*, 23, 1596-1599, **2007**.
- [243] Ferrara, N., VEGF: an update on biological and therapeutic aspects, *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 617-624, **2000**.
- [244] Klagsbrun, M. and A. D'Amore, P., Vascular endothelial growth factor and its receptors, *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 7, 259-270, **1996**.
- [245] Fayette, J., Soria, J.-C. and Armand, J.-P., Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment, *European Journal of Cancer*, 41, 1109-1116, **2005**.
- [246] Guo, P., Hu, B., Gu, W., Xu, L., Wang, D., Huang, H.-J. S., Cavenee, W. K. and Cheng, S.-Y., Platelet-Derived Growth Factor-B Enhances Glioma Angiogenesis by Stimulating Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Tumor Endothelia and by Promoting Pericyte Recruitment, *The American Journal of Pathology*, 162, 1083-1093, **2003**.
- [247] Kondo, Y., Aii, S., Mori, A., Furutani, M., Chiba, T. and Imamura, M., Enhancement of Angiogenesis, Tumor Growth, and Metastasis by

- Transfection of Vascular Endothelial Growth Factor into LoVo Human Colon Cancer Cell Line, *Clinical Cancer Research*, 6, 622-630, **2000**.
- [248] Kavitha, C. V., Agarwal, C., Agarwal, R. and Deep, G., Asiatic Acid Inhibits Pro-Angiogenic Effects of VEGF and Human Gliomas in Endothelial Cell Culture Models, *PLoS ONE*, 6, e22745, **2011**.
- [249] Nasarre, P., Kusy, S., Constantin, B., Castellani, V., Drabkin, H. A., Bagnard, D. and Roche, J., Semaphorin SEMA3F has a repulsing activity on breast cancer cells and inhibits E-cadherin-mediated cell adhesion, *Neoplasia*, 7, 180–189, **2005**.
- [250] Wu, F., Zhou, Q., Yang, J., Duan, G.-j., Ou, J.-j., Zhang, R., Pan, F., Peng, Q.-p., Tan, H., Ping, Y.-f., Cui, Y.-h., Qian, C., Yan, X.-c. and Bian, X.-w., Endogenous Axon Guiding Chemorepulsant Semaphorin-3F Inhibits the Growth and Metastasis of Colorectal Carcinoma, *Clinical Cancer Research*, 17, 2702-2711, **2011**.
- [251] Chabbert-de Ponnat, I., Buffard, V., Leroy, K., Bagot, M., Bensussan, A., Wolkenstein, P. and Marie-Cardine, A., Antiproliferative Effect of Semaphorin 3F on Human Melanoma Cell Lines, *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 2343-2345, **2006**.
- [252] Futamura, M., Kamino, H., Miyamoto, Y., Kitamura, N., Nakamura, Y., Ohnishi, S., Masuda, Y. and Arakawa, H., Possible Role of Semaphorin 3F, a Candidate Tumor Suppressor Gene at 3p21.3, in p53-Regulated Tumor Angiogenesis Suppression, *Cancer Research*, 67, 1451-1460, **2007**.
- [253] Kigel, B., Varshavsky, A., Kessler, O. and Neufeld, G., Successful Inhibition of Tumor Development by Specific Class-3 Semaphorins Is Associated with Expression of Appropriate Semaphorin Receptors by Tumor Cells, *PLoS ONE*, 3, e3287, **2008**.
- [254] Terzioğlu, G., Keskin, A. Ü. and Demirel, G. Y., Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması, *Türk İmmünoloji Dergisi*, 1, 74-89, **2013**.
- [255] Wang, P., Henning, S. M. and Heber, D., Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols, *PLoS ONE*, 5, e10202, **2010**.
- [256] Sylvester, P. W., Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. *Drug Design and Discovery: Methods and Protocols*, (eds: Satyanarayanajois, S. D.), Humana Press, New York, 157-168, **2011**.
- [257] Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63, **1983**.
- [258] Plumb, J. A., Milroy, R. and Kaye, S. B., Effects of the pH Dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-based Assay, *Cancer Research*, 49, 4435-4440, **1989**.
- [259] Chehrehasa, F., Meedeniya, A. C. B., Dwyer, P., Abrahamsen, G. and Mackay-Sim, A., EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating

- cells in the nervous system, *Journal of Neuroscience Methods*, 177, 122-130, **2009**.
- [260] Chen, L., Nakano, K., Kimura, S., Matoba, T., Iwata, E., Miyagawa, M., Tsujimoto, H., Nagaoka, K., Kishimoto, J., Sunagawa, K. and Egashira, K., Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Into Lungs Ameliorates the Development and Induces Regression of Monocrotaline-Induced Pulmonary Artery Hypertension, *Hypertension*, 57, 343-350, **2011**.
- [261] Murphy, E. A., Majeti, B. K., Barnes, L. A., Makale, M., Weis, S. M., Lutu-Fuga, K., Wrasidlo, W. and Cheresch, D. A., Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 9343-9348, **2008**.
- [262] Paciotti, G. F., Myer, L., Weinreich, D., Goia, D., Pavel, N., McLaughlin, R. E. and Tamarkin, L., Colloidal Gold: A Novel Nanoparticle Vector for Tumor Directed Drug Delivery, *Drug Delivery*, 11, 169-183, **2004**.
- [263] Paciotti, G. F., Kingston, D. G. I. and Tamarkin, L., Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors, *Drug Development Research*, 67, 47-54, **2006**.
- [264] Dreaden, E. C., Mwakwari, S. C., Sodji, Q. H., Oyelere, A. K. and El-Sayed, M. A., Tamoxifen-Poly(ethylene glycol)-Thiol Gold Nanoparticle Conjugates: Enhanced Potency and Selective Delivery for Breast Cancer Treatment, *Bioconjugate Chemistry*, 20, 2247-2253, **2009**.
- [265] Chen, Y.-H., Tsai, C.-Y., Huang, P.-Y., Chang, M.-Y., Cheng, P.-C., Chou, C.-H., Chen, D.-H., Wang, C.-R., Shiau, A.-L. and Wu, C.-L., Methotrexate Conjugated to Gold Nanoparticles Inhibits Tumor Growth in a Syngeneic Lung Tumor Model, *Molecular Pharmaceutics*, 4, 713-722, **2007**.
- [266] Kumar, A., Huo, S., Zhang, X., Liu, J., Tan, A., Li, S., Jin, S., Xue, X., Zhao, Y., Ji, T., Han, L., Liu, H., Zhang, X., Zhang, J., Zou, G., Wang, T., Tang, S. and Liang, X.-J., Neuropilin-1-Targeted Gold Nanoparticles Enhance Therapeutic Efficacy of Platinum(IV) Drug for Prostate Cancer Treatment, *ACS Nano*, 8, 4205-4220, **2014**.
- [267] Murthy, N., Xu, M., Schuck, S., Kunisawa, J., Shastri, N. and Fréchet, J. M. J., A macromolecular delivery vehicle for protein-based vaccines: Acid-degradable protein-loaded microgels, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 4995-5000, **2003**.
- [268] Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T. and Rotello, V. M., Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains, *Bioconjugate Chemistry*, 15, 897-900, **2004**.
- [269] Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W. and Jähnen-Dechent, W., Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles, *Small*, 3, 1941-1949, **2007**.
- [270] Kirchner, C., Liedl, T., Kudera, S., Pellegrino, T., Muñoz Javier, A., Gaub, H. E., Stölzle, S., Fertig, N. and Parak, W. J., Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles, *Nano Letters*, 5, 331-338, **2004**.

- [271] Shenoy, D., Fu, W., Li, J., Crasto, C., Jones, G., DiMarzio, C., Sridhar, S. and Amiji, M., Surface functionalization of gold nanoparticles using hetero-bifunctional poly(ethylene glycol) spacer for intracellular tracking and delivery, *International Journal of Nanomedicine*, 1, 51-57, **2006**.

EKLER

EK-1. Kimyasallar ve Diğer Malzemeler

AuNP'lerin Sentezlenmesi

- * Distile su (Merck Milipore)
- * Hidroklorik asit (HCl, %37; Carl Roth, Art. Nr. 9277.1)
- * Nitrik asit (HNO₃, %65; Carl Roth, Art.Nr. X898.2)
- * Hidrojen tetrakloroaurat (III) hidrat (HAuCl₄xH₂O, %99.9; Alfa Aesar, #12325)
- * Sodyum sitrat dihidrat (Na₃C₆H₅O₇ 2H₂O, %99; Alfa Aesar, # A12274)

AuNP'lerin Modifikasyonu

- * α-Merkapto-ω-karboksi PEG (HS-C₂H₄-CONH-PEG-O-C₃H₆-COOH, MW 3KDa; Rapp Polymer, #133000-4-32)
- * Sodyum hidroksit (NaOH; Carl Roth, # 6771.1)

AuNP'lerin Fonksiyonelleştirilmesi

- * Sema 3F (Recombinant Mouse Semaphorin 3F Fc Chimera (Truncated), CF, R&D system, #3237-S3-025)
- * Bovin serum albümin (BSA, Bio-Rad #500-0206)
- * MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, Sigma-Aldrich)
- * PD-10 (GE Healthcare)
- * Heterobifonksiyonel polimer zinciri (MeO-PEG-NH₂; 750 Da)

Agaroz Jel Elektroföresi

- * Agaroz (Sigma-Aldrich)
- * Sıvı agaroz jel döküm aparatı (gel-caster, Bio-Rad)
- * Jel tepsisi (10 x 7 cm, Bio-Rad)
- * Tarak dişleri (Bio-Rad)
- * Güç kaynağı (Bio-Rad)

SDS-Page Jel Elektroföresi

- * SDS-Page Standardı (standart, # 161-0317 Bio-Rad)
- * SDS-Page standardı (ön boyalı standart, # 0025269 Thermo Scientific)
- * 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich #M6250)
- * Glisin (#3908.1, Carl ROTH)
- * Sodyum dodesil sülfat (#L5750, Sigma-Aldrich)
- * Trizma®base (T1503, Sigma)

Gümüş Boyama

- * Asetik asit glasiyal (#37384, Carl ROTH)
- * Etanol Rotipuran (#9065.2, Carl ROTH)
- * Gliserol (#G8773, Sigma)
- * Sodyum tiyosülfat pentahidrat (#217247, Sigma-Aldrich)
- * Formaldehit solüsyonu (#25,245-9 Sigma-Aldrich)
- * Gümüş nitrat (#204390, Aldrich)
- * Sodyum karbonat (#S7795, Sigma-Aldrich)

Floresan Spektroskopi

- * Kuartz küvet (1 cm, Hellma)

Hücre Kültürü

- * DMEM (PromoCell)
- * MTT kit (Hücre Proliferasyon Kit I (MTT) Roche)
- * HUVEC (PromoCell)
- * FBS(PromoCell)
- * Trypsin (PromoCell)
- * Click EdU Click-iT® Edu Alexa Fluor 488 görüntüleme kiti (Life Technologies)

EK-2. Kullanılan Cihazlar

Cihazlar

- * Floresans spectra (Horiba FluoroLog)
- * UV-Vis spectra (Agilent technologies 8453)
- * DLS (Malvern Zetasizer Nano ZS; Nanosizer ZS, Malvern Instruments Ltd.,UK)
- * Jel Elektroforezi (Bio Rad Power Pac Basic)
- * Santrifüj Cihazı (Hettich)
- * Floresan Mikroskop
- * Inverted Floresan Mikroskop (Zeiss, Axiovert 200M Widefield)
- * SDS Jel Elektroforezi (Bio-Rad)

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Gamze TAN

Doğum Yeri : İzmir

Medeni Hali : Bekar

E-Posta : gamzetan@hacettepe.edu.tr

Adresi: H.Ü Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji ABD, Beytepe Kampüsü ANKARA

Eğitim

Lise: Atakent Anadolu Lisesi

Lisans-Tezsiz Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği (ALM)

Doktora: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

Almanca (İleri Düzey), İngilizce (İyi Düzey), İspanyolca (Başlangıç Düzeyi)

İş Deneyimi:

10.2007 - 04.2008: Araştırma Görevlisi, Aksaray Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Aksaray

04.2008-....: Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

2011-2012: Araştırmacı (DAAD), Rubrecht –Karls Universität Heidelberg, Max Planck Institute Intelligente Systeme, Almanya

2012-2013: Araştırmacı (ÖYP), Philipps Universität Marburg, Almanya

2013-2014: Araştırmacı (TÜBİTAK), Philipps Universität Marburg, Almanya

Deneyim Alanları (Kurslar Sertifikalar)

2014 “From Gene to Protein” Interlab and Sigma Aldrich Seminar Series, ANKARA

2014 Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu, ANKARA

2012 TÜBİTAK BİDEB-2237 Tez Aşamasındaki Doktora Öğrencileri için Proje Eğitimi Etkinliği, 9-11 Temmuz (Teorik) 17-19 Temmuz (Uygulama), Ankara Üniversitesi, ANKARA

2011 International Summer School Cellular Systems, On the occasion of the 625th anniversary of the Rubrecht –Karls University Heidelberg, ALMANYA

2010 Experttissues training course cranio-maxillofacial animal models, Hacettepe Üniversitesi, ANKARA

2010 The Cell Culture Course, Süleyman Demirel Üniversitesi, ISPARTA

2010 8th International conference and workshop on Biological Barriers – in vitro Tools, Nanotoxicology and Nanomedicine Lab Course, Saarland University, Saarland/ALMANYA

2010 Winter School on Frontiers in Nanomedicine and Nanobiotechnology, Bilkent University, ANKARA

2009 Internationale Frankfurter Sommerkurse, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/ALMANYA

2009 IV. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu, Kocaeli Üniversitesi, İZMİT

2008 Konfokal Semineri ve Kursu, GATA, Ankara, 2008

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Koordinatörlüğü tarafından 010BİYP02604003 ve 014BİYP604004 no'lu projeler ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tan G., Onur M.A., Sağlam N., Nanogold and Biomedicine: Scientific Letter *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2012, 32(2):499-506

Tan G., Onur M.A., Sağlam N., Utilization of gold nanostructures in biomedical applications, *Turkish Journal of Biology* 2012, 36(6): 607-621

Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Tan G., Onur M.A., "Synthesis and Characterization of Colloidal Gold Nanoparticles", *7th Nanoscience and Nanotechnology Conference*, İstanbul, Turkey, June 27- July 01, 2011 (Poster Sunumu)