

**MODİFİYE EDİLMİŞ GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARIN HÜCRESEL
ALIMLARI VE SİTOTOKSİSİTESİ**

Dilek ÇAM

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2009
ANKARA**

Dilek ÇAM tarafından hazırlanan MODİFİYE EDİLMİŞ GÜMÜŞ
NANOPARÇACIKLARIN HÜCRESEL ALIMLARI VE SİTOTOKSİSİTESİ adlı
bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Fatma ÜNAL
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Mustafa ÇULHA
Ortak Tez Danışmanı, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek
Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Orhan ARSLAN
Biyoloji Eğitimi, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Fatma ÜNAL
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Mustafa ÇULHA
Biyoteknoloji, Yeditepe Üniversitesi

Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Cengiz SANCAK
Biyoteknoloji, Ankara Üniversitesi

Tarih: 19/06/2009

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini
onamıştır.

Prof. Dr. Nail ÜNSAL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Dilek ÇAM

MODİFİYE EDİLMİŞ GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARIN HÜCRESEL ALIMLARI VE SİTOTOKSİSİTESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Dilek ÇAM

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAZİRAN 2009**

ÖZET

Bu çalışmada, gümüş nanoparçacıkların (GNP) ve bu GNP'ların glukoz, laktoz, oligonükleotid ve Cy5'in (floresans boya) çeşitli kombinasyonlarıyla modifiye edilmiş hallerinin, insan akciğer kanseri (A549) hücreleri ve immortilize edilmiş fare fibroblast (L929) hücreleri tarafından alımları, sitoplazmik lokalizasyonları/davranışları ve sitotoksisite testleri araştırılmıştır. Modifiye edilen GNP'lar (MGNP); Ag/Glukoz, Ag/Laktoz, Ag/ssDNA, Ag/Glukoz/ssDNA, Ag/Laktoz/ssDNA, Ag/ssDNA/Cy5, Ag/Glukoz/ssDNA/Cy5, Ag/Laktoz/ssDNA/Cy5 şeklinde hazırlanmış; 100 µl olmak üzere tek konsantrasyon kullanılarak A549 ve L929 hücreleri ile 1 s, 6 s ve 24 s inkübe edilmiş ve bu nanoparçacıkların (NP) hücrel alımları incelenmiştir. Ayrıca MTS (hücre proliferasyonu testi) testi ile, hücrelere uygulanan bu NP konsantrasyonunun sitotoksik etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Sitotoksiste testinde DMSO (Dimetilsülfoksit) pozitif kontrol (PK), besiyeri ise negatif kontrol (NK) olarak kullanılmıştır. Çeşitli GNP'lar ile muamele edilen hücrelerin, NP'ları alım oranları, farklı inkübasyon süreleriyle değişkenlik göstermiştir. Bu NP'lar arasında L929 hücreleri tarafından Ag/Glukoz'un ilk 1 saatteki alımı %33 oranla en fazla alınan NP olurken; A549 hücreleri tarafından Ag/Laktoz, %68 oranla 6. saatte en fazla alınan NP olmuştur. Sitoplazmik lokalizasyonlara bakıldığında, bu NP'lar L929 hücrelerinde genellikle küçük toplanmalar oluşturarak, sitoplazmanın her yerinde rastgele

dağılım göstermiştir. A549 hücrelerinde ise özellikle Cy5 bulunan GNP'lar daha büyük toplanmalar oluşturmuş ve genellikle sitoplazmanın orta kısımlarında yerleşmiştir. GNP'lar bu konsantrasyonda L929 hücrelerine uygulandığında sitotoksosite göstermezken, A549 hücrelerinde Ag/Glukoz/ssDNA/Cy5, %24 olmak üzere en fazla sitotoksik etki gösteren NP olmuştur. Bu sonuçlar, hazırlanan GNP'ların sağlıklı ve kanserli hücrelere uygulandığında, kanserli hücreler tarafından bazılarının seçici olarak alınabildiğini ve stoplazmik yerleşim açısından fototermal kanser terapi uygulamalarında önemli olabilecek toplanmalar oluşturabileceğini göstermiştir. Ayrıca, hücrelere bu konsantrasyonda uygulanan NP'lar, L929 hücrelerinde toksik etki oluşturmazken, A549 hücrelerinde toksisite göstermesinden dolayı, kanserli hücrelerin GNP'lar aracılığıyla tedavi imkanlarının iyileştirilebileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır.

Bilim Kodu : 203.1.048
Anahtar Kelimeler : Gümüş nanoparçacıklar, hücresel alım, sitotoksosite
Sayfa Adedi : 80
Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Mustafa ÇULHA
Prof. Dr. Fatma ÜNAL

CELLULAR UPTAKE AND CYTOTOXICITY OF MODIFIED SILVER NANOPARTICLES

(M.Sc. Thesis)

Dilek ÇAM

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
JUNE 2009**

ABSTRACT

In this study, for A549 (human lung cancer cells) and L929 (immortalized mouse fibroblast cells) cells; cellular uptake, cytoplasmic localizations or behaviors and cytotoxicity of silver nanoparticles (SNPs) and their chemically modifications one by one and by different combinations with glucose, lactose, oligonucleotide and fluorescence dye (Cy5) are investigated. The modified SNPs (MSNPs) prepared as Ag/Glucose, Ag/Lactose, Ag/ssDNA, Ag/Glucose/ssDNA, Ag/Lactose/ssDNA, Ag/ssDNA/Cy5, Ag/Glucose/ssDNA/Cy5, Ag/Lactose/ssDNA/Cy5 were incubated with A549 and L929 cells during 1 h, 6 h and 24 h, and cellular uptake of these nanoparticles (NPs) was examined. Additionally, by MTS (cell proliferation assay) assay, it was investigated whether the applied concentration of these NPs had cytotoxic effect or not. DMSO (Dymethylsulfoxide) was used for positive control, medium was used for negative control in the cytotoxicity test. For the cells incubated with different SNPs, variant cellular uptake ratios were detected during different incubation times. Among these NPs, while for L929 cells, cellular uptake of Ag/Glucose at the first hour was the most amount NPs with 33%; for A549 cells cellular uptake of Ag/Lactose was the most amount NPs with 68% at 6th hour. As for cytoplasmic localization of NPs, whereas the NPs in the L929 cells formed small aggregates and they diffused randomly in the cell cytoplasm; in A549 cells, especially dye included SNPs formed large aggregates in the cytoplasm. When this concentration of all SNPs was applied to L929 cells, no cytotoxicity was

observed. In A549 cells, on the other hand, Ag/Glucose/ssDNA/Cy5 had the most cytotoxic effect with 24%. These results showed that when prepared SNPs are applied to healthy and cancer cells, some of the NPs are uptaken selectively for cancer cells; and in the terms of cytoplasmic localization and aggregations of NPs become an important tool for the photothermal cancer therapy applications. While the applied concentration of the nanoparticles didn't show toxic effect to the L929 cells but they were toxic to A549 cells; enhanced treatment opportunities of cancer cells via SNPs was risen due to spontaneous toxic effect only in the cancer cells.

Science Code : 203.1.048

Key Words : Silver nanoparticles, cellular uptake, cytotoxicity

Page Number: 80

**Adviser : Assoc. Prof. Mustafa ÇULHA
Prof. Dr. Fatma ÜNAL**

TEŞEKKÜR

Çağımızın teknolojisi olan Nanoteknolojiye, henüz gelişme aşamasında iken adım atma fırsatını bulmamda ve devam ettirmemde beni yönlendiren, maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve bana asla “yok” demeyen, değerli hocam Prof. Dr. Orhan ARSLAN’a; tez çalışmamı yapabilmem için Yeditepe Üniversitesi’nin bütün kapılarını bana açarak yolumu ve ufkumu genişleten, kendimi iyi yetiştirmem adına birçok deneyiminden ve fikirlerinden yararlandığım danışman hocam Doç. Dr. Mustafa ÇULHA’ya; tez çalışmamı yapabilmem için yollarımın açılmasına müsaade eden, uzakta olmama rağmen desteğini ve yardımını hiç bir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL’a; her zaman desteğim olan Araş. Gör. Dr. Çiğdem Alev ÖZEL’e; laboratuvar çalışmalarımda benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Araş. Gör. Mehmet KAHRAMAN’a; bana bu süre zarfında hep yardımcı olan arkadaşım İlknur SUR’a ve en önemlisi bu telaşlı ve zahmetli yollarda bana güvenip, amaçlarıma ulaşmama sabırla müsaade eden aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Nanoteknoloji-Nanobilim, Nanobiyoteknoloji	4
2.2. Nanoparçacıkların Özellikleri.....	5
2.2.1. Yüzey plazmonları ve fototermal terapi	5
2.2.2. Altın ve gümüş nanoparçacıklar.....	8
2.3. Nanoparçacıkların Yüzey Modifikasyonunun Önemi.....	11
2.4. Nanoparçacıkların Toksisitesi.....	17
3. MATERYAL VE METOT.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Nanoparçacıkların sentezlenmesi için kullanılan materyaller.....	21
3.1.2. Hücre kültürü ve sitotoksisite için kullanılan materyaller	21
3.2. Metot	22
3.2.1. Gümüş nanoparçacıkların sentezlenmesi	22

Sayfa

3.2.2. Ti yol bağı olan karbohidratların sentezlenmesi	22
3.2.3. Gümüş nanoparçacıkların karbohidratlarla yüzey modifikasyonlarının yapılması	23
3.2.4. Gümüş nanoparçacıkların oligonükleotid ve karbohidratlarla birlikte yüzey modifikasyonlarının yapılması	24
3.2.5. Gümüş nanoparçacıkların floresans boya ile oligonükleotid ve karbohidratlarla birlikte yüzey modifikasyonlarının yapılması	26
3.2.6. Hücre kültürü	28
3.2.7. MTS testi	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI (1. BÖLÜM)	30
4.1. Hazırlanan Nanoparçacıklar	30
4.2. L929 ve A549 Hücreleri Tarafından Alınan Nanoparçacıkların Sitoplazmik Yerleşimleri	31
4.3. Nanoparçacıkların Zamana Bağlı Olarak Hücresel Alımları.....	33
4.3.1. Karbohidratla modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların zamana bağlı olarak hücresel alımları	33
4.3.2. Oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların zamana bağlı olarak hücresel alımları	35
4.4. MTS Testi	36
4.4.1. Karbohidratla modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların sitotoksitesi	38
4.4.2. Oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların sitotoksitesi	40
5. ARAŞTIRMA BULGULARI (2. BÖLÜM)	43
5.1. Cy5 ile Modifiye Edilmiş Gümüş Nanoparçacıkların Zamana Bağlı Olarak Hücresel Alımları.....	43

Sayfa

5.1.1. L929 ve A549 hücreleri tarafından alınan Cy5, oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların sitoplazmik yerleşimleri.....	44
5.1.2. Cy5, oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların zamana bağlı olarak hücresel alımları	47
5.2. MTS Testi	49
5.2.1. Cy5, oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların sitotoksitesi.....	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ.....	80

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Modifiye edilmemiş GNP'lar ile karbohidrat, oligonükleotid ve Cy5'in farklı kombinasyonları ile yüzeyi modifiye edilmiş GNP'ların Zeta Potansiyeli ölçümleri	30
Çizelge 4.2. Hazırlanan GNP'ların değişik maruziyet sürelerinde L929 ve A549 hücreleri tarafından alın(a)mayan (süpernatantta kalan) miktarlarının, Atomik Absorbsiyon ile ölçümlerinin % konsantrasyonları.....	33
Çizelge 4.3. Hazırlanan NP'ların L929 ve A549 hücrelerinde değişik maruziyet sürelerinde MTS testi sonuçlarına göre % sitotoksosite/canlılık durumları.....	37
Çizelge 5.1. Cy5 ile modifiye edilmiş GNP'ların değişik maruziyet sürelerinde L929 ve A549 hücreleri tarafından alın(a)mayan (süpernatantta kalan) miktarlarının Atomik Absorbsiyon ile ölçümlerinin % konsantrasyonları	47
Çizelge 5.2. Cy5, oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş GNP'ların L929 ve A549 hücrelerinde % sitotoksosite değerleri	50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Sentezlenen GNP'ların SEM görüntüsü ve UV-Görünür bölge absorpsiyon dalga boyu.....	22
Şekil 3.2. Glukoz veya laktozun Tiyol bağı kazanma reaksiyonu	23
Şekil 3.3. Modifiye edilmemiş GNP ve glukoz, laktoz ve oligonükleotid ile tek tek veya çeşitli kombinasyonlarla yüzeyi modifiye edilmiş GNP'ların şematik olarak kimyasal yapısının gösterimi	25
Şekil 3.4. Cy5 boyasının yapısı ve Cy5'in Sistamin ara molekülü ile Tiyol bağı kazanma reaksiyonu	26
Şekil 3.5. Sentezlenen Cy5 ile modifiye edilmiş GNP'ların şematik gösterimi	27
Şekil 4.1. Ag, Ag/Glukoz, Ag/Laktoz, Ag/ssDNA, Ag/Glukoz/ssDNA ve Ag/Laktoz/ssDNA NP'larının 24 s inkübasyondan sonra L929 ve A549 hücreleri tarafından alımlarının Konfokal mikroskop görüntüleri.....	32
Şekil 4.2. GNP'ların ve karbohidratla modifiye edilmiş GNP'ların L929 ve A549 hücreleri tarafından zamana bağlı olarak hücresel alımlarının % konsantrasyonu	34
Şekil 4.3. Oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş GNP'ların L929 ve A549 hücreleri tarafından zamana bağlı olarak hücresel alımlarının % konsantrasyonu	35
Şekil 4.4. Karbohidratla modifiye edilmiş GNP'ların ve modifiye edilmemiş GNP'ların L929 ve A549 hücrelerinde % sitotoksosite değerleri	39
Şekil 4.5. Oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş GNP'ların L929 ve A549 hücrelerinde % sitotoksosite değerleri.....	40
Şekil 5.1. A549 hücrelerinde Cy5 ve modifiye edilmiş GNP'lardan gelen ışımaların üst üste çakıştırılması	44
Şekil 5.2. Ag/ssDNA/Cy5, Ag/Glukoz/ssDNA/Cy5 ve Ag/Laktoz/ssDNA/Cy5 NP'larının 24 s inkübasyondan sonra L929 ve A549 hücreleri tarafından alımlarının Konfokal mikroskop görüntüleri	46

Şekil**Sayfa**

Şekil 5.3. Cy5, oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş GNP'ların L929 ve A549 hücreleri tarafından zamana bağlı olarak hücresel alımlarının % konsantrasyonu	48
Şekil 5.4. Cy5, oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş GNP'ların L929 ve A549 hücrelerinde % sitotoksosite değerleri	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
dk	Dakika
g	Gram
M	Molarite
mm	Milimetre
ml	Mililitre
µg	Mikro gram
µl	Mikrolitre
rpm	Devir sayısı
s	Saat
Kısaltmalar	Açıklama
Ag	Gümüş
Au	Altın
APD	Aminofenildisülfid
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DAB	Dimetilaminboran
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
FBS	Fetal bovine serum
LDH	Laktat dehidrogenaz
MGNP	Modifiye edilmiş gümüş nanoparçacık

Kısaltmalar**MN****MTS****MTT****NP****PBS****PSA****ROS****SEM****ssDNA****TEM****YZRS****Açıklama**

Mikronükleus

Hücre proliferasyonu testi

Hücre proliferasyonu testi

Nanoparçacık

Phosphate buffer saline

Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin

Reaktif oksijen türleri (species)

Scanning Electron Microscopy

Tek iplikli DNA parçası (oligonükleotid)

Transmissing Electron Microscopy

Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman

Saçılması

1. GİRİŞ

İnsanlığın başlangıcından beri canlı ve cansız tüm varlıkların daha iyi anlaşılması ve yaşam koşullarının iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Dolayısıyla gerek ilkel gerekse gelişmiş tekniklerle yapılan birçok girişim, hiç şüphesiz giderek artan bir bilgi birikimine ve buna paralel olarak da yeni bilim dallarının doğmasına sebep olmuştur. Ancak, geçmişten bu yana çeşitli girişimler sonucunda giderek iyileştiğini (!) düşündüğümüz yaşam koşulları, insan başta olmak üzere tüm varlıkları çok değişik şekilde etkileyebilmektedir. Bu etkileri de en aza indirmek üzere, bugün hızla gelişen yeni bilim dalları bir çare niteliğinde geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunun en güzel örneğini, bugün gelmiş olduğumuz nanoteknoloji çağı da göstermektedir. Hızlı bir şekilde birçok uygulama alanı oluşturan ve hayatımıza girmeye başlayan nanoteknoloji, birçok hayalin gerçekleşebileceği ve cevaplanmamış soruların, hayatı oluşturan moleküllerin bizzat kendi yapısına sorularak cevap bulunabileceği ümidini de beraberinde getirmiştir. Özellikle insan için vazgeçilemez durumlardan biri olan sağlık sorunları ve bunların çözümlerinde, nanobiyoteknoloji uygulamalarına, (şimdilik) geleceğin akıllı moleküler cerrahları gözüyle bakılmaktadır. Henüz tam anlamıyla çaresi bulunamayan çağımızın hastalığı kanser ise nanobiyoteknolojinin de önemli odak noktalarından biri olmuştur. Bu nedenle çok kısa bir sürede birçok kanserli hücre çeşidinin çeşitli NP'lar ile etkileşimi ve tedavisine yönelik çalışmalar araştırılmaya başlamıştır.

Nanobiyoteknoloji uygulamalarını çekici kılan özellikler ise, kullanılan NP'lardan kaynaklanmaktadır. Biyolojik uygulamalarda ve tıpta –özellikle kanserli hücre uygulamalarında- şu an üzerinde çalışılan en önemli NP'lar; metal NP'lar, Karbon nanotüpler, Kuantum noktaları, TiO_2 (Titanyum dioksit) ve manyetik NP'lardır. Nano boyutlarda iken farklı özellikleri (termal, elektrokimyasal ve optik) [El-Sayed, 2001] ortaya çıkan NP'lar, antibakteriyel [Pal ve ark., 2007]; canlı hücrelerde hedeflenmiş bölgeye giden seçici moleküller [Pitsillides ve ark., 2003]; toksisite oluşturan veya oluşturmayan yapılar ya da biyolojik numunelerde oldukça iyi görüntüleme imkanı sunabilen floresans yapılar olarak kullanılabilir. NP'ların bir kısmı özellikle yüzey plazmonlarından dolayı tercih edilebilmektedir. NP'larda

oluşan bu yapı, onların çeşitli ışınlarla etkileştiklerinde, boyutlarına, şekline ve etkileştiği maddelere göre farklı renkler oluşturarak kolorimetrik belirlemelerin yapılmasına [Tsai ve ark., 2005] bazı spektroskopik uygulamalarda gelen ışın ile maddenin etkileşiminin artırılarak [Jackson ve Halas, 2004] spektroskopik olarak moleküler ayrımların yapılmasına; nanobiosensör geliştirilmesine [Haes ve ark., 2004]; fototermal kanser terapisi veya fototermal antibakteriyel terapide [Deckers ve ark., 2008] kullanılmasına imkan sağlamaktadır. Özellikle altın (Au) ve GNP'lar yüzey plazmonları, kolay kontrol edilebilir yüzey özellikleri ve modifikasyon imkanlarıyla biyolojik uygulamalarda kullanılabilirliği en çok araştırılan NP'lar olmuştur. Örneğin GNP'lar, antibakteriyel özelliklerinden dolayı tekstil alanında önemli bir yer tutarken, çeşitli biyolojik uygulamalarda ve tıbbi cihazlarda da yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Bunların yanında spektroskopik tekniklerle analiz yapılmasında, özellikle muhteşem yüzey plazmonlarından dolayı yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılmasına (YZRS) dayalı spektroskopide tercih edilen NP'ların başında gelmiştir [Chen ve ark., 1995]. Böylece biyolojik numunelerle etkileşime giren GNP'lar, numunenin çok kısa bir sürede spektroskopik bir teknikle kimliklendirilerek, hızlı bir şekilde analiz edilmesine imkan sağlamıştır. Ayrıca GNP'ların yine plazmon özellikleri sayesinde kaliteli bir hücresel görüntüleme sağladığı bilinirken [Chen ve ark., 2003], gen ekspresyonunu artırdığı [El-Sayed ve ark., 2006] ve virüs infektivitesini inhibe ettiği de [Gupta ve ark., 2003] tespit edilmiştir. Fakat bazı araştırmacılar, GNP'ların çeşitli hücrelerde genotoksik ve sitotoksik hasar oluşturduğunu da bildirmiştir [Arora ve ark., 2009].

Geliştirilen NP'ların canlı organizmalarda etkisi ise aynı olmamaktadır. Dolayısıyla Nanobiyoteknoloji araştırmalarında kullanılan parçacıkların canlı hücrelere olan etkisini test etmek için öncelikle onların birtakım *in vitro-in vivo* uygulamalardan geçmesi ve optimize edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle kullanılacak olan NP'lar, çeşitli hücre kültürü teknikleriyle hücrelerle muamele edilmekte ve genotoksisite/sitotoksisite durumları [Jacobsen ve ark., 2008] belirlenerek kullanılabilirlikleri araştırılmaktadır.

Bu çalışmada, yaklaşık 50 nm olan GNP'ların tek başına ve çeşitli moleküllerle (karbohidrat, oligonükleotid, floresans boya) modifiye edilmiş hallerinin, L929 hücreleri ve A549 hücrelerinde, *in vitro* olarak alım oranları/davranışları, stoplazmik yerleşimleri ve sitotoksik etkileri incelenmiş; GNP'ların sağlıklı ve kanserli hücreler tarafından seçici alımlarının sağlanması ve kanserli hücrelerin öldürülebilmesi için, GNP'ların uygun bir model oluşturup oluşturmayacağı araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nanoteknoloji-Nanobilim, Nanobiyoteknoloji

Nanoteknoloji ismi, yunanca “nannos=cüce” kelimesinden gelmektedir. Nanoteknoloji kavramının ilk defa 1959 yılında Amerikalı fizikçi Richard Feynman tarafından “There's Plenty of Room at the Bottom” (Aşağıda Daha Çok Yer Var) sözüyle ortaya çıktığı bilinmektedir. Nanoteknoloji terimi ise, Tokyo Bilim Üniversitesi profesörlerinden Norio Taniguchi tarafından 1974 tarihinde yapmış olduğu bir yayında tanımlanmıştır [Taniguchi, 1974]. Vizyonu aslında çok eskilere dayanan nanoteknoloji, yaklaşık son 10 yıldır çok hızlı bir şekilde gelişmeye başlamış ve daha sonra nanobiyoteknoloji alanının da içinde olduğu birçok özel alt bilim dallarına ayrılmıştır.

Nanoteknoloji kısaca tanımlanacak olursa, her bir atom ve molekülü değiştirerek iyileştirme esasına dayanan ve maddenin nanometre boyutlarındaki olağanüstü özelliklerini kullanarak, bu özelliklerin kontrollü moleküler yapılar ve yeni materyaller oluşturmak üzere kullanılmasına imkan sunan disiplinler arası bir alan olduğu söylenebilir. Nanoteknoloji tanımı, bazı kaynaklarda “nanobilim” olarak da geçebilmektedir. Fakat nanobilim, daha geniş bir terim olup, “nano boyutlardaki materyallerin çeşitli disiplinler içerisinde farklı işlemlerde kullanılması” şeklinde yorumlanabilir. Günümüzde giderek önemi artan nanobiyoteknoloji ise; “biyolojik ve kimyasal analizlerde daha hassas, yüksek tanı özelliği sunan çok fonksiyonlu yeni alet ve sistemlerin oluşturulmasına öncülük eden, mühendislik ve moleküler biyolojinin ortak bir yaklaşımı” olarak ifade edilebilir. Büyüklük olarak “metrenin milyarda birini” teşkil eden “nm” terimi de nanoteknoloji uygulamalarındaki madde büyüklüğünü belirten ölçü birimi olmuştur. 1 nm’nin içine 2-3 atomun sığabileceği belirtilmekte ve bugün üzerinde yoğunlaşılan NP’ların büyüklüğü de 1-100 nm arasında belirlenmektedir.

2.2. Nanoparçacıkların Özellikleri

Nanoteknoloji uygulamalarını cazip kılan, kullanılan parçacıkların nano boyutlardaki çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri olmuştur. NP'ların bu boyutlarda oluşturulması ise farklı yöntemlerin kullanılmasına bağlı olarak değişmektedir. Dolayısıyla nano boyutlardaki materyallerin fiziksel ve kimyasal özellikleri kaba hallerinden farklı olabilmektedir. Bu durum, onların geniş reaktif yüzey alanı ile olmakta ve bu yüzey alanı da boyuta bağlı olarak farklı özelliklerin ortaya çıkmasına öncülük etmektedir. Chatterjee ve arkadaşları (2008) küçük boyutlu NP'ların toplam parçacık yüzey alanının artmasından dolayı, yüksek ilaç salınımı etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, 200 nm'den küçük olan parçacık boyutlarının biyolojik uygulamalarda optimum boyut olduğunu ve bu durumun hem kan-tümör transferini etkilediğini hem de tümörlü dokuda uzun süre alıkonulmasına imkan verdiğini bildirmiştir [Chatterjee ve ark., 2008].

Genel olarak nano ölçeklerde bir yapının hazırlanması için aşağıdan yukarıya (bottom up) ve yukarıdan aşağıya (top down) olmak üzere iki yaklaşım vardır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımı küçük yapıların büyük yapılar üzerine toplanması esasına dayanır ve kimyasal sentez, lazerle oluşturulmuş toplanma, kolloidal toplanma, kendiliğinden düzenlenme gibi yöntemleri içerir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımı ise büyük yapıların küçük yapılar oluşturmak üzere modifiye edilmesi esasına dayanır ve; litografik teknikleri, film üzerinde oluşturma tekniklerini, lazer ışını ile yapılan birtakım işlemleri ve mekanik teknikleri içerir. NP sentezi de fiziksel, kimyasal, mekanik ve karışık yöntem olmak üzere, katı, sıvı ve gaz halinde oluşturulacak şekilde sınırlandırılabilir.

2.2.1. Yüzey plazmonları ve fototermal terapi

Farklı yöntemlerle oluşturulan bazı NP'ların en önemli özellikleri, yüzey plazmonları oluşturmalarıdır. Yüzey plazmonları da birçok farklı materyalde farklı özellikleriyle karşımıza çıkmaktadır. Yüzey plazmonu; metal nanoparçacıkların yüzeyinde oluşan bir elektron bulutuna benzetilebilir. Bu plazmonların bir ışık kaynağı ile

uyarıldığında oluşan durumuna da yüzey plazmon titreşimi (rezonans) denilmektedir [Kerker, 1985]. Günümüzde nanomateriyallerin yüzey plazmonu titreşimi özelliklerinden yararlanılarak, biyolojik uygulamalarda kullanılabilirliği gösterilmiştir. Yüzey plazmonları NP'ların boyutuna bağlı olduğu kadar, şekline ve ışığı absorblama özeliğine de bağlıdır. Örneğin küresel bir NP'ın yüzeyinde tamamen çevresini saracak şekilde bir plazmon oluşurken, üçgen şeklindeki nanoparçacıklarda bu oluşum farklıdır [Chan ve ark., 2008].

Nanomateriyallerin ışıkla etkileşimleri (yüzey plazmonu oluşumu), değişik uygulamalarda karşımıza çıkmaktadır [Lazarides ve ark., 2000; Kelly ve ark., 2003]. Örneğin, Au NP'ın absorbladığı ışık, hem yüzey plazmonlarını uyarır hem de pikosaniyede ısıya dönüşür [Link ve El Sayed, 2003]. Bu ısı dönüşümü ise bu özelliğe sahip NP'ların terapötik uygulamalarda fototermal ajan olarak kullanılmasına imkan sunar. Fototermal terapi, hastalıklı hücrelerin veya dokuların, foto-duyarlı özel ilaçların ve ışığın kombinasyonu ile yıkılmasına ya da zarar görmesine sebep olan klinik bir yöntemdir. Bu yöntemde genellikle görünür bölgede ve yakın infrared bölgede uygun dalga boyu ile uygulama yapılır. El Sayed ve arkadaşları (2005), 15-60 nm Au NP'ların yüzeyine anti-EGFR antikoru bağlayarak, bu NP'ları *in vitro* koşullarda bazı kanserli hücrelerle muamele etmiştir. Kanser hücrelerine özgü antikorumları taşıyan Au NP'lar sağlıklı hücrelere rastgele ve az miktarda tutunurken, kanser hücrelerine seçici olarak bağlanmıştır. Böylece kanserli hücrelerde daha fazla yüzey ışık saçılması oluşmuştur. Araştırmacılar, bu fazla ışıma ve toplanmanın etkisiyle bu hücrelerde fototermal terapinin uygulanabileceğini bildirmişlerdir [El Sayed ve ark., 2005].

Kong ve arkadaşları (2008) glukoz ile modifiye ettikleri Au NP'ları, 2 s boyunca kanserli hücrelere (MCF-7) uygulamıştır. Bu hücrelere 200 kVp X-ışını uygulamışlar ve Au NP olmayan MCF-7 hücrelerine uygulanan radyasyon sonuçlarıyla karşılaştırdıklarında, %63,5 oranında sitotoksik artışın oluştuğunu bildirmişlerdir [Kong ve ark., 2008].

Yüzey plazmonları, nanomateriyallerin çeşitli moleküllerle etkileşime girdikten önce ve sonraki hallerine bağlı olarak, ekranda dalga boylarında oluşan değişikliklere bakılarak algılamada kullanılma imkanı da sunmaktadır [Li ve ark., 2009; Shin ve ark., 2007]. Aynı şekilde NP'lar çeşitli moleküllerle etkileşime girdikten önce ve sonra yüzey plazmonlarından dolayı renk değişikliğine sebep olurlar ve bu değişikliklere bakılarak kolorimetrik (renge dayalı) tayinlerin yapılmasında kullanılabilirler [Kim ve ark., 2006; Schofield ve ark., 2006].

NP'lardaki yüzey plazmonlarının bir başka avantajı da Raman saçılmasını zenginleştirmesidir. Raman saçılması, bir numunenin görünür bölge veya yakın-infrared monokromatik ışıktan oluşan güçlü bir lazer kaynağıyla ışınlanmasından sonra saçılan ışının belirli bir açıdan ölçümüne dayanır. Moleküllerin şiddetli bir monokromatik ışın demeti ile etkileşmesi sırasında ışık absorpsiyonu olayı gerçekleşmiyorsa ışık saçılması olayı meydana gelir. Raman saçılması sırasında, saçılan ışığın enerjisinde, molekül ile etkileşen ışığın enerjisine göre bir fazlalık veya azlık oluşur. Bu durum, ışıkla etkileşen molekülün titreşim enerji düzeyleri arasındaki enerji farkları kadar olduğundan, bu yöntemle moleküllerin titreşim enerji düzeyleri hakkında bilgi edinilir. Ancak; normal Raman saçılmasıyla alınan sinyaller zayıftır. Oysa NP'ların küçülen boyutlarına bağlı olarak oluşturdukları yüzey plazmonları, etkileşime girdikleri moleküllerde yüzeyde zenginleştirme yaparak Raman saçılmasının da zenginleşmesine katkıda bulunmaktadır. Hatta metal nanoyapılarla çeşitli moleküller birbirleriyle yakın temas kurduğu zaman Raman saçılmasında 10^{14} gibi müthiş bir zenginleşmenin olduğu da bildirilmiştir. Oluşan bu duruma ise, YZRS denmektedir ve bu uygulamayla tek molekül seviyesinde belirlemenin yapılabileceğini gösteren araştırmalar bulunmaktadır [Lin ve ark., 2006]. Kneipp ve arkadaşları (2009), Rose Bengal ve Kristal Viyole gibi Raman aktif maddelerin Au NP'lara tutunmasını sağlamışlar ve hazırlanan bu NP'larla 3T3 hücrelerini 4 s inkübe etmişlerdir. Hücrelerin içerisine giren ve topluluk oluşturan hibrit Au NP'ların YZRS'si, PBS içindeki hücrelerden 2 mV lazer gücü kullanılarak elde edilmiştir [Kneipp ve ark., 2009]. Böylece sitoplazmanın farklı yerlerinde toplanan NP'ların sağladığı YZRS ile NP'ların hücre içindeki durumları hakkında bilgi alabilme fikri gelişmiştir (hücresele YZRS).

Yehia ve arkadaşları (2007), HeLa hücrelerini tek katlı Karbon nanotüpler ile 60 s inkübe ederek, perinükleer bölgeden ve sitoplazmadan Raman sinyalleri almışlardır. Böylece NP'ların zamanla hücreye alım mekanizmalarını bu şekilde tesbit etmeye çalışmışlardır [Yehia ve ark., 2007].

Çulha ve arkadaşları (2008) da, GNP'ların daha güçlü bir şekilde YZRS'yi artırmasından dolayı, NP'ları termofilik bakteriler ile basit karıştırma yöntemiyle karıştırarak, bu bakterilerin YZRS'ye dayalı karakterizasyonlarının yapılabileceğini göstermişler ve çok kısa bir sürede birçok mikroorganizma çeşidinin kimliklendirilmesinin mümkün olabileceğini bildirmişlerdir [Çulha ve ark., 2008].

2.2.2. Altın ve gümüş nanoparçacıklar

Günümüzde biyolojik uygulamalarda karşılaşılan en yaygın NP'lar, Karbon nanotüpler [Bethune ve ark., 1993], manyetik NP'lar [Pankhurst ve ark., 2003], Kuantum noktaları [Medintz ve ark., 2005], Au ve GNP'lardır. Bunların arasında metal NP'lar üzerinde oldukça yoğun çalışmalara odaklanılmıştır. Dolayısıyla biyoloji alanında metal NP'ların biyosensör [Nam ve ark., 2003], hücre ve biyomolekül işaretlemesi [Franzen ve Feldheim, 2003], kanser terapötikleri [Hirsch ve ark., 2003] gibi birçok alanda uygulanması keşfedilmiştir. Au ve gümüş metal NP'lar ise; üzerinde hemen hemen en çok araştırma yapılan NP'lar olmuştur. Nitekim insanlık tarihine göz atıldığında Au ve gümüş metallerden oldukça faydalandığı görülmektedir [Kerker, 1985]. Örneğin 4. yy.'da bu metallerin renklendirici özelliklerinden yararlanılmış; 17. yy.'da ise resim sanatı uygulamalarında kullanılmıştır. Hatta Hintlilerin, gümüş tozu yedikleri, Çinlilerin de yemeklerine ince Au film karıştırdıkları da uzun zamandır bilinmektedir. Bu nedenle Au, birtakım özelliklerinden dolayı NP'lar içerisinde birçok uygulamada cazip hale gelen bir yapı olmuştur. Au'nın nano boyutlarına ulaşıldığında da biyoyumlu olduğu ve sitotoksik özellik göstermeyen bir yapı olduğu birçok araştırmada gösterilmiştir [Connor ve ark., 2005; Shukla ve ark., 2005]. Au NP'ları cazip kılan özelliklerinden biri de yüzeylerinin kolayca biyomodifikasyon işlemlerine adapte edilebilmesidir. Çünkü Au NP'ların yüzeyi tiyol, disülfid ve aminlere karşı güçlü bir ilgi gösterir.

Böylece basit bir Au-tiyol kimyası; çeşitli peptid, protein ve DNA'nın yüzey konjugasyonuna imkan sağlamaktadır [Katz ve Willner, 2004; Niemeyer, 2001]. Au NP'ların çeşitli antikorlar ile yüzeyinin fonksiyonlaşması [El-Sayed ve ark., 2005; Sokolov ve ark., 2003] ise kanser hücrelerinin seçici bir şekilde hedeflenmesinde kullanılmasına olanak sağlamakta iken, çok iyi bir hücre içi hedefleme parçacığı olarak kullanılabileceği de desteklenen görüşler arasındadır.

Son zamanlarda GNP'ların da nano-boyutlardaki özelliklerinin keşfedilmesiyle nanobiyoteknoloji alanında oldukça faydalı olabileceği anlaşılmış ve hızla birçok uygulamada kullanılabilirliği araştırılmaya başlamıştır. Bu nedenle, fiziksel ve kimyasal özellikleri farklı olan değişik boyutlarda çeşitli GNP'lar sentezlenmiş ve geliştirilmiştir. Ayrıca GNP'ların değişik indirgeyici ajanlarla sentezlenebileceği ve buna bağlı olarak toplanmalarının da önlenebileceği ya da azaltılabileceği belirtilmiştir [Ramana ve ark., 2008]. Dolayısıyla hazırlanan değişik yapılarıdaki GNP'ların analizi yapıldığında absorpsiyon bantlarında değişiklik gözlenmiştir [Chien ve ark., 2008]. Böylece geliştirilmeye çalışılan GNP'ların kısa sürede biyolojik numunelerde kullanılabilirliği araştırılmaya başlanmış ve bazı önemli bulgular elde edilmiştir. Örneğin Au'dan daha iyi özellikte olan yüzey plazmon rezonansları sayesinde moleküler işaretlemeye ideal bir NP olabileceği fark edilmiştir [Schultz ve ark., 2000]. Ayrıca GNP'ların antimikrobiyal olması da bilinen en önemli özellikleri arasındadır. Örneğin Baker ve arkadaşları (2005), sentezledikleri GNP'ların *E.coli* için toksik olduğunu bildirmiştir [Baker ve ark., 2005]. Holt ve Bard (2005) ise GNP'ların, bakteri solunum zincirlerinde bazı düşük potansiyelli enzimlere bağlanarak ROS üretimine sebep olduğu için *E.coli* bakterisinin ölümüne sebep olduğunu bildirmişlerdir [Holt ve Bard, 2005]. Ayrıca GNP'ların virüslerin konak hücreye bağlanmasını inhibe ettiği ya da azalttığı da tesbit edilmiştir [Elechiguerra ve ark., 2005]. Günlük yaşamımızda giderek artan GNP temelli tüketim ürünlerinin varlığı, GNP'lara olan ilgiyi daha da artırmış ve birçok ürünün yapılandırılmasında, onu tercih edilebilecek bir sanayi ürünü haline getirmiştir. Ayrıca GNP'ların antibakteriyel özelliklerinden dolayı terapötik uygulamalarda yararlanılmak üzere gümüş emdirilmiş kateter ve sargı bezleri

günümüzde kullanılmaya başlamıştır [Lok ve ark., 2006; Gogoi ve ark., 2006; Kim ve ark., 2007; Samuel ve Guggenbichler, 2004; Chen ve ark., 2006].

GNP'ların canlı hücrelerle olan ilişkisi henüz tam anlaşılamamasına rağmen yapılan bazı çalışmalar, GNP'ların hücre çalışmalarında da ümit vaat edici özelliklerinin olabileceğini göstermektedir. Şimdiye kadar tesbit edilen bazı bulgular, NP'ların hücre içerisine genel olarak (reseptör aracılı) endositoz yoluyla alındığını göstermiştir [Tsuji ve ark., 2006]. Fakat GNP'ların hücre içerisine alınma mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Dolayısıyla hücrelerin besiyeri içerisindeki GNP'ları tek tek mi, yoksa toplanmış halde mi alındığı hakkında net bir bilgi bulunmamaktadır. Oysa NP'ların hücre içerisinde veya hücre dışında oluşturduğu topluluğun hacmi, hücre alımları hakkında önemli ipuçları veren bulgulardan biridir. Nitekim Carlson ve arkadaşları (2008), TEM analizi sonucunda hücre içindeki NP'ların 2 μm 'den küçük topluluklar oluşturduğunu, bu nedenle 10 μm 'den büyük olan geniş NP toplanmalarının 24 s sonra etkili bir şekilde hücrelere alınamayacağını GNP'lar ile yaptıkları çalışma sonucunda bildirmişlerdir [Carlson ve ark., 2008].

GNP'ların hücreler tarafından alım şekilleri ve davranışları pek araştırılmamış olsa da, hücre içinde birtakım önemli olayları etkileyebildiği bildirilmiştir. Örneğin NP'ların çekirdeği hedefleyebilme [Nativo ve ark., 2008; Li ve ark., 2008] özelliklerinden yola çıkarak GNP'ların gen ekspresyonunu artırabileceği ve 12-30 nm boyuttaki GNP'ların da çekirdeğe gidip ekspresyon yapabilecek uygun boyutlar olabileceği bildirilmiştir [Chien ve ark., 2008]. Ayrıca mannoz türevi ile stabilize edilen GNP'lar kolorimetrik biyo-testlerin geliştirilmesi için de kullanılmıştır [Schofield ve ark., 2006]. GNP'ların canlı hücrelerde kullanılmasının diğer bir avantajı da hücresel görüntüleme sağlamasıdır; çünkü oluşturdukları toplanmalardan kaynaklanan yüzey plazmonlarının hücre içinde iyi bir floresans özellik verdiği tesbit edilmiştir [Lesniak ve ark., 2005].

2.3. Nanoparçacıkların Yüzey Modifikasyonunun Önemi

Geliştirilen NP'ların, hücrelerde istenilen amaca ulaşması için sadece tek bir fonksiyonu değil aynı anda birçok fonksiyonu yerine getirebilmek üzere fiziksel, kimyasal veya elektrokimyasal olarak yüzey modifikasyonları yapılmaktadır. Çünkü NP'ların yüzey modifikasyonları onların hücresel alımlarını veya hücrelere bağlanmalarını, çekirdek hedeflenmesini, gen susturulmasını ve tümör penetrasyonunun hedeflenmesini artırabilir [Yang ve ark., 2007; Nativio ve ark., 2008; El-Sayed ve ark., 2005; El-Sayed ve ark., 2006]. Biyolojik uygulamalarda kullanılmak üzere geliştirilen NP'larda yüzey modifikasyonu yapmak için genellikle çeşitli protein/peptid, oligonükleotid, aminoasit, floresans yapılar veya başka nano yapılar şu an için kullanılan en yaygın moleküller olmuştur. Son zamanlarda karbohidratların da NP'lar ile birlikte muamele edilmeye başlaması, karbohidratların yüzey modifikasyonunda önemli etkiler oluşturabileceğini göstermiştir. Organizmaların temel enerji kaynağını öncelikle karbohidratların oluşturduğu dikkate alındığında, bu özelliklerinin nanoteknoloji kavramıyla birleştirilmesinin, nanobiyoteknoloji için faydalı olabileceği düşünülmüştür. Karbohidratlarla yapılan NP temelli çalışmaların olduğu alana, Glikobiyoloji ve nanoteknoloji çatısı altında birleştirilerek bahsedilmiş Glikonanoteknoloji veya Glikonanobiyoteknoloji isimleriyle rastlamak mümkündür [Barrientos ve ark., 2003]. Dolayısıyla karbohidratlarla muamele edilen NP'lar hakkında da glikonanoparçacık şeklinde bahsedilmektedir.

Şu ana kadar karbohidrat ile yapılan NP modifikasyonlarında mannoz türevleri, galaktoz, laktoz, nişasta ve glukoz kullanılmıştır [Schofield ve ark., 2006]. Fakat karbohidratların, NP modifikasyonlarında çeşitli kombinasyonları henüz tam olarak araştırılmamış, yapılan araştırmalarda da sadece birkaç çeşit NP üzerinde durulmuştur. Karbohidatlarla yapılan modifikasyonlar arasında ise genellikle glukoz tercih edilmiştir. Çünkü, glukoz hem sağlıklı hücrelerin hem de kanserli hücrelerin enerji ihtiyacı karşıladığı temel yakıt molekülüdür. Dolayısıyla hücrelerin en çok tükettiği moleküller arasındadır ve en önemlisi kan-beyin bariyerine ulaşmaktadır. NP'ların da kan-beyin bariyerine, plasenta bariyerine ve diğer doğal koruyucu

bariyerlere penetre olma özelliğinden dolayı [Wang ve ark., 2004] glukozla fonksiyonlaşmış glikonoparçacıkların, glukozu beyine ulaştırmada iyi bir taşıyıcı olabileceği düşünülmüştür. Diğer önemli bir karbohidrat çeşidi olan laktoz (süt şekeri) da karbohidrat-protein ve karbohidrat-karbohidrat etkileşimi gibi birçok biyolojik sürecin işleminde önemli rol oynamaktadır. Dolayısıyla NP'ların üzerinde bulunan moleküllerin yapısına bağlı olarak (kimyasal özellik, hidrofobik-hidrofilik özellik, yüzey enerjisi, yükü vs.), NP – hücre etkileşimi ve toksisite gibi birçok biyolojik süreç de değişik şekillerde etkilenmektedir [Berry ve ark., 2003; Gupta ve ark., 2003; Ahamed ve ark., 2008; Lesniak ve ark., 2005].

Karbohidratların NP'lar ile ilişkilendirilerek yapılan az sayıdaki çalışmaları, aslında önemli bulguların ortaya çıkabileceğini göstermiştir. Örneğin Schofield ve arkadaşları (2006) Au ve gümüş glikonoparçacıkların, kolorimetrik temelli biyotestlerin geliştirilmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir [Schofield ve ark., 2006]. Benzer şekilde laktoz stabilize edilmiş 16 nm Au glikonoparçacıklar kolera toksininin kolorimetrik olarak belirlenmesinde de kullanılmıştır [Schofield ve ark., 2007]. Glikonoparçacıkların diğer önemli bir özelliği de canlı organizmaların hücre yüzeyi ile çok yakın ilişkiler (yüksek afinite) kurabilmesi olmuştur. Çünkü hücreler, yüzeylerinde çok çeşitli karbohidrat türevleri bulundurmakta (glikokaliks örtü) ve bu hücre yüzeyi karbohidratları da biyolojik süreçlerde çok önemli roller üstlenmektedir. Örneğin, immün tanıma olaylarında [Kiessling ve ark., 2000], bakteri ve virüslerin konak hücreyle etkileşiminde [Karlsson, 1995], doku büyümesi ve tamirinde [Varki, 1993] yüzey karbohidratları kilit fonksiyonlara sahiptir. Dolayısıyla NP'ların hücre yüzeyi ile olan ilişkileri de bu fonksiyonların daha detaylı incelenmesine olanak sağlayabilecektir. Örneğin virüs-hücre adhezyon çalışmalarında Au glikonoparçacıkların, virüs yüzeyindeki glikoproteinlere oldukça güçlü ilgi gösterdiği ve sıkı bir şekilde tutunduğu tesbit edilerek, NP-hücre etkileşimi hakkında bilgi alınabilmiştir [Nolting ve ark., 2003]. Dolayısıyla karbohidratların NP'lar üzerinde bulunması, NP'ların hücre yüzeyindeki karbohidrat bağlayıcı proteinlerle daha iyi etkileşime girmesini [Chen ve ark., 2003] sağlamıştır. Hatta hücrelerin yüzeyinde bulunan proteinler tarafından spesifik tanınmaya katkıda bulunarak, hücrelere özgü “akıllı” tabir edilebilecek NP'ların geliştirilmesine imkan

sunabilmesi de diğer önemli bir özellik olacaktır. Çünkü, karbohidrat-protein etkileşimi hücresel tanımda, endositozda, fertilizasyonda, hücre adhezyonunda ve bilgi transferinde kritik bir biyolojik rol oynamaktadır [Dwek, 1996].

Glikonanoparçacıkların fonksiyonu, sadece hücre yüzeyi etkileşimleri ile sınırlı değildir. Günümüzde hızlı ve basit şekilde teşhis yapabilecek biosensörlerin geliştirilmesinde de glikonanoparçacıkların oldukça hassas ve güvenilir sonuçlar verebileceği ortaya çıkmıştır. Örneğin Aslan ve arkadaşları (2004), dekstran kaplı Au NP'lara Konkavalin A (Kon A) ekleyerek, Au NP'ların topluluk oluşturmalarını sağlamışlardır. Bu toplulukları da glukoz ile muamele etmişler ve glukoz/Kon A'nın birbirleriyle bağlanması sonucunda, Au NP topluluklarının dağıldığını ve bu dağılıma bağlı olarak Au NP'nin absorbansının değiştiğini gözlemlemişlerdir. Bu absorbans değişikliğine dayanarak da oldukça hassas glukoz nanobiyosensör geliştirdiklerini bildirmişlerdir [Aslan ve ark., 2004]. Benzer şekilde El-Boubbou ve arkadaşları (2007), memeli hücrelerinin yüzeyindeki karbohidratları, manyetik GNP'lara bağlayarak bakterilerle birkaç dk. inkübe etmişlerdir. Oluşan süspansiyona manyetik alan uygulaması ile bakteriler manyetik alana doğru çekilmiştir. Üstelik bu olay 5 dk. gibi kısa bir sürede gerçekleşmiştir. Böylece hangi bakterinin hangi karbohidrata bağlanmayı tercih ettiği, belirlenerek mikrobiyal kimliklendirmenin ve ortamdaki bakterilerin saptanmasının çok kısa bir sürede yapılabileceği gösterilmiştir [El-Boubbou ve ark. 2007].

Organizmalar için çok önemli fonksiyonları olan karbohidratların ve daha birçok hücresel yapının, biyolojik süreçleri yerine getirebilmesi için, asıl kontrolü sağlayan genetik yapının da önemi tartışılmazdır, dolayısıyla nanobiyoteknoloji ilgisi giderek bu yöne de kaymaktadır. Günümüzde oldukça önemli bir yere sahip olan çeşitli gen uygulamaları, hala birçok sorunla karşılaşmaktadır, hatta birçok genetik hastalığın teşhisi veya tedavisi ise henüz bulunmamaktadır. Bunların en önemli sebeplerinden biri ise, canlı hücreler içinde bulunan ve hücrenin birçok biyokimyasal sürecini moleküler seviyede gerçekleştiren molekül ya da yapıların küçük dünyasına ulaşamamasıdır. Dolayısıyla hücre içinde bulunan milyonlarca sayıda nano boyutlu yapıların anlaşılması ve en önemlisi hücreyi yöneten genetik materyal (DNA)

hakkında daha iyi bilgi edinilmesi, hücrede genetik düzenlemelerin daha ayrıntılı anlaşılabilmesi ve gen çalışmalarındaki bazı sorunların çözümlenebilmesi için NP'larla gen ilişkisi detaylı olarak araştırılmaya başlanmıştır. Bu nedenle öncelikle NP'ların üzerine çeşitli yapılarda ve uzunluklarda DNA molekülleri veya oligonükleotidler tutturulmuş ve bunların hücresel alımları nasıl etkilediği incelenmiştir [Giljohann ve ark., 2007]. Son zamanlarda DNA moleküllerinin NP'lar üzerine hangi açıyla bağlanabileceği de hesaplanmıştır [Hill ve ark., 2009]. Ayrıca gen ekspresyon sistemlerinde karşılaşılan sorunların aşılmasında NP'ların önemli “aracılar veya koruyucular” olabilecekleri dikkati çekmiştir. Örneğin gen ekspresyon sistemlerinde (viral olmayan) DNA çabuk bozulabildiği için onun korunmasını artırıcı bazı uygulamalara ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir. NP'lar ile yapılan çalışmalarda ise DNA'nın genellikle korunduğu farkedildiği için [Prabha ve Labhasetwar, 2004], NP'lar aracılığıyla gen çalışmaları üzerindeki yoğunlaşma giderek artmıştır. Dolayısıyla DNA yüklü NP'ların, gen transfeksiyonu veya transformasyonuna katkıda bulunulabileceği ya da DNA'nın sitozoldeki stabilitesini artırabileceği düşünülmüştür. Çünkü NP aracılığıyla gen transfeksiyonu veya gen salınması, katyonik lipidler gibi diğer DNA taşıyıcılarından daha etkili bir taşıma sağlayabilmektedir. Örneğin Li ve arkadaşları (2008) 3,5 nm Au NP'lara DNA bağlamışlar ve bu kompleksi HEK 293 hücreleriyle muamele etmişlerdir. Sonuçta bu yapının DNA taşıyıcı bir katyonik lipid olan DOBAB molekülüne kıyasla daha stabil olduğunu, üstelik çekirdek içine giren Au NP/DNA kompleksinin gen transfeksiyon etkisinin DOBAB'tan 5 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir [Li ve ark., 2008].

Li ve arkadaşları (2008) başka bir çalışmalarında nükleik asit, polikasyonik peptid ve katyonik liposom kompleksinden oluşan NP'ların C57BL/6 farelerine enjekte edildiğinde bazı dokularda (akciğer, karaciğer vs) gen susturulmasında oldukça güçlü etkiye sahip olduğunu ve bu amaçla hedeflenmiş NP'ların yapılabileceğini de belirtmişlerdir [Li ve ark., 2008].

DNA yüklü NP'ların kanser hücrelerinde de etkileri araştırılmaya başlamasına rağmen bu tür NP'ların değişik kanser hücrelerindeki detaylı bilgileri ya da etkileri henüz yeterli aşamaya gelmemiştir. Fakat yapılan bazı araştırmalar, NP'ların DNA

ile birlikte bulunduğunda kanserli hücrelerin gelişimini etkileyebileceğini, örneğin DNA yüklü NP'ların göğüs kanseri hücrelerinde (MDA-MB-435S) antiproliferatif etki yapabileceğini belirtmiştir [Prabha ve Labhasetwar, 2004].

Peptid bağlı NP'ların da, DNA bağlanmış NP'lar gibi, bazı kanser hücrelerini olumsuz etkileyebileceği de edinilen bulgular arasındadır. Tkachenko ve arkadaşları (2004), BSA ve peptid kompleksini Au NP'lara (22 nm) bağlayarak nükleer lokalizasyonuna bakmışlar ve kompleksin bazılarının 3 s sonra %70 oranında çekirdeğe girdiğini, üstelik %20 oranında HeLa hücrelerinin ölümüne sebep olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca NP'ların hücre alımlarının ve nükleer translokasyonlarının da büyük oranda hücre çeşidine ve NP yüzeyine bağlanan peptidlerin sekansına bağlı olduğunu görmüşlerdir [Tkachenko ve ark., 2004]. Dolayısıyla NP'ların bu özelliklerinin keşfedilmesiyle birlikte birçok NP'a değişik gen ya da gen ürünleri, DNA veya oligonükleotidler bağlanarak yüzey modifikasyonlarının geliştirilmesi ve bu NP'ların da hücrelerle olan ilişkisinin araştırılması vazgeçilmez olmuştur. Fakat daha önce de belirtildiği gibi önemli özelliklere sahip olan GNP'ların, bu tür modifikasyon ve hücre etkileşim çalışmaları üzerinde pek durulmamıştır. Bu nedenle GNP'lara da çeşitli biyolojik moleküller ve oligonükleotidler yükleyerek gen ifadelerine olan etkileri [Chien ve ark., 2008] ya da kanserli hücrelere karşı davranışlarının araştırılması önem kazanmıştır.

NP'ların yüzey modifikasyonlarının yapılmasında yaygın olarak kullanılan diğer bir yapı da floresans özellik gösteren moleküller ve bazı boyalardır. Floresans yapılar NP'lar ile birlikte bulunduğu zaman, biyolojik örneklerin derin bölgelerinin dahi görüntülenmesini sağlayabilmektedir [Sharma ve ark., 2006]. Ayrıca floresans yapılar bu tür bölgelerin optik, elektrokimyasal ve spektroskopik tayinlerinin yapılmasına büyük katkılar sağlayabilmektedir [Tansil ve Gao, 2006]. Dolayısıyla bu şekilde geliştirilen NP'ların özellikle nanotıp uygulamalarında veya biyomedikal görüntülemelerde olumlu katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir. Floresans gösteren boyaların bu şekilde önemli işlevi olmasına rağmen, bazı NP'lar da yüzey plazmonlarından dolayı oldukça güçlü ışıma verir [Michalet ve ark., 2005]. Bu durumda hücrelerin görüntülenmesinde bu tür boyaların NP'lara bağlanmasına gerek

kalmayabilir. Örneğin Robinson ve arkadaşları (2005) yumurta hücresi üzerinde bulunan bir karbohidrat çeşidiyle Kuantum noktalarını modifiye etmişler ve karbohidratla modifiye edilmiş bu NP'ları sperm hücreleriyle maruz bırakmışlardır. Sonuç olarak spermin bu moleküle tutunmasını floresans olarak görüntülemeyi denemişler ve böylece fertilizasyonunun ve akromozom reaksiyonunun, Kuantum noktalarının floresans özelliklerinden yararlanılarak anlaşılmasını ve floresans olarak görüntülenmesini hedeflemişlerdir [Robinson ve ark., 2005]. Fakat yüzey plazmonları zayıf olan NP'lar için de bu tür floresans yapıları hala ihtiyaç duyulmaktadır. Neticede çeşitli boyaların değişik NP'lara bağlanmasıyla, hücre (içi/dışı) görüntülemeye kullanılabileceği bazı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Örneğin Gianotti ve arkadaşları (2009), floresans hibrit mezo-porlu silika nanomateriyallerin sentezlenmesini ve karakterizasyonunu tanımlamıştır ve bunları L929, RBL/mast hücreleri, ovaryum karsinoma ve insan nöroblastoma hücreleri ile muamele ettikten sonra bu nanomateriyallerin, sitotoksik olmadığını ve oldukça iyi hücre içi biyo-görüntüleme özelliği oluşturduğunu göstermişlerdir. Nanomateriyallere bağlanan organik floresans boya miktarlarını da değişik konsantrasyonlarda deneyerek görüntüleme için en uygun olanını bulmayı hedeflemişlerdir. Böylece bu araştırmada biyo-uyumlu, endositozla alınan ve hücre içinde yerleşimler gösteren floresans NP'ların sentezlenmesini ve memeli hücrelerindeki durumlarının incelenebileceğini bildirmişlerdir [Gianotti ve ark., 2009].

Prabha ve Labhasetwar (2004) da benzer şekilde DNA molekülü bağlı NP'ların üzerine, boya (TOTO veya YOYO boyaları) tutturmuşlardır. Bu nanoyapıların hücre içinde dağılımını ve DNA'nın salınımını, floresans özellikleri dikkate alarak gözlemlemişlerdir. Bu floresans özellik sayesinde NP'ların çekirdek çevresinde de lokalize olduğunu gözlemlemişlerdir [Prabha ve Labhasetwar, 2004].

Meng ve arkadaşları (2007) DAOY hücrelerinde (insan medulloblastoma hücre hattı) ilaç dağılımında kullanılmak üzere geliştirdikleri boya (Rh6G) işaretli manyetik mikro kürelerinin alımını benzer şekilde incelemişlerdir [Meng ve ark., 2007]. Floresans boya bağlanmış bazı NP'ların, görüntüleme özelliklerinin yanında, diğer bir avantajı da; NP'ların hücre içi dağılımı hakkında, spektroskopik olarak önemli

bilgiler verebilmesidir. Bu amaçla, yapılan ve hücre haritalama diyebileceğimiz spektroskopik temelli (Raman spektroskopisi) NP-hücre çalışmalarında da Raman aktif boya olarak tabir edilen organik boyalar kullanılmıştır [Kneipp ve ark., 2009; Yehia ve ark., 2007].

2.4. Nanoparçacıkların Toksisitesi

Bütün bilimsel çalışmalarda atılan her yeni adımın, insanlığın daha rahat ve iyi kalitede devam etmesi için atılması gerekir. Dolayısıyla eskiden bu yana yapılan tüm girişimler insan sağlığı için hep en iyiyi bulma yolunda olmuştur. Bugün ulaştığımız nanoteknoloji çağı da bu amaçlara hizmet etmek üzere atılan yeni adımlardan biri olmuştur. Bu anlamda oluşturulan yeni NP'lar biyolojik uygulamalarda her ne kadar ümit verici görünse de, bu NP'ların organizmalarda kullanılabilirliklerini belirleyen birinci ve en önemli faktör, onların toksik etki oluşturup oluşturmamasıdır. Doğada nasıl ki birçok makro ve mikro yapı insan sağlığını tehdit ediyorsa, milyonlarca nanoyapının da insan sağlığı için tehdit oluşturması şüphesiz kaçınılmazdır. Bu nedenle nanotıp ya da diğer biyolojik uygulamalarda kullanılmak üzere geliştirilmeye çalışılan NP'ların, öncelikle toksisitelerinin araştırılması gerekmektedir.

Bu anlamda yapılan bazı araştırmalar, genel olarak nano boyutlu parçacıkların büyük parçacıklardan daha toksik olabileceğini göstermektedir [Oberdorster ve ark., 2005; Lam ve ark., 2004]. Buna paralel olarak, nanomateriyaller tüm organizma seviyesinde, hücre seviyesinde, hücre-altı (sub-cellular) veya fonksiyonel biyomoleküler seviyede nanotoksik etki gösterebileceği gibi, gen ya da protein seviyesinde de gösterebilir [Gurr ve ark., 2005; Stolle ve ark., 2005; Hussain ve ark., 2005; Ding ve ark., 2005; Schubert ve ark., 2006; Bermudez ve ark., 2004; Lam ve ark., 2004]. NP toksisitesi henüz tam olarak anlaşılamamasına rağmen yapılan bazı araştırmalar toksisitenin çeşitli faktörlere bağlı olduğunu göstermiştir. Bu faktörler; NP'ların çeşidi, yüzey kimyası (ör; katyonik Au NP'lar genellikle toksik iken aniyonikler toksik değildir), büyüklüğü (tek başına veya toplanmış hallerinin büyüklüğüne), şekli, konsantrasyonu ve sentezlenmesinde kullanılan bazı

maddelerdir [Goodman ve ark., 2004; Pan ve ark., 2007; Huff ve ark., 2007; Rogers ve ark., 1999; Curtis ve ark., 2006].

NP'ların hücrelerdeki toksik etkilerinin hemen hemen benzer mekanizmalarla oluşabileceği düşünülmekte olup, bazı bulgular NP'ların genel olarak mitokondriyal fonksiyonu, LDH salınımını, plazma membran geçirgenliğini etkileyebileceğini, aynı zamanda apoptoz ya da nekroz yoluyla hücre ölümü oluşturabileceğini göstermiştir [Jeng ve Swanson, 2006; Brown ve ark., 2007]. Örneğin Hussain ve arkadaşları (2005), değişik boyutlardaki birçok değişik NP'ın BRL 3A rat akciğer hücrelerindeki toksik etkisini MTT testi ile, LDH salınımıyla, mitokondriyal membran potansiyeli ile ve ROS oluşmasına dayalı birtakım testlerle ölçerek, NP'ların bahsedilen bu toksisite ölçüm kriterlerinin hepsine sebep olabileceğini göstermişlerdir. Özellikle 6 s maruziyette aynı konsantrasyondaki 100 nm GNP'ın, 50 nm GNP'tan daha fazla LDH salınımı ve ROS oluşturduğunu bildirmişlerdir [Hussain ve ark., 2005]. Dolayısıyla parçacıkların küçülmesiyle toksik etkilerinin artacağı şimdilik genel olarak kabul edilen bir görüş olsa da, bu genellemenin her zaman her NP için yapılamayacağı sonucuna varılmıştır.

NP'ların sitotoksitesinin benzer mekanizmalarla olduğu Park ve arkadaşları (2008) tarafından da gösterilmiştir. Araştırmacılar, değişik konsantrasyonlarda 21 nm TiO_2 'in insan bronşiol epitelyal (BEAS-2B) hücrelerinde sitotoksitesini incelemişlerdir. Sonuç olarak bu NP'ların oksidatif stres oluşturduğu ve ROS üretimini artırdığını, stoplazmik kaspazları aktifleştirdiğini, böylece apoptotik süreçle hücre ölümünü başlattığını bildirmişlerdir. Ayrıca MTT testi ile TiO_2 NP'larının zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını da belirtmişlerdir [Park ve ark., 2008]. Dolayısıyla bu durum NP toksisitesinde, NP'ların hücre içerisinde tutulma süresinin ve konsantrasyonun önemini açığa çıkarmıştır.

NP'ların büyüklüklerindeki çok küçük farkların dahi sitotoksiteyi değiştirebileceğini ise Pan ve arkadaşlarının (2007) yaptığı bir çalışma göstermektedir. Araştırmacılar, L929 hücreleri, HeLa hücreleri ve melanom hücrelerini 12 s süreyle farklı büyüklüklerdeki Au NP'lar ile muamele etmişler ve toksisitelerini

incelemişlerdir. Sonuç olarak 15 nm Au'ın toksik olmadığını; 1,4 nm Au'ın nekrozla hücre ölümüne; 1,2 nm Au'ın ise apoptoz ile programlı hücre ölümüne sebep olduğunu bildirmişlerdir. [Pan ve ark., 2007]. Böylece NP büyüklüğünün sitotoksisteye ne kadar önemli olabileceği de anlaşılmıştır. Ayrıca NP büyüklüğünün değişmesinin, yüzey alanını da etkilemesi göz önüne alınırsa, sitotoksisteye yüzey alanının da önemli değişikliklere sebep olabileceği görülebilir.

NP'ların hücrelerde sitotoksisteye sebep olduğu gibi genotoksik hasara da neden olduğu tesbit edilen bulgular arasındadır. Örneğin Türkez ve Geyikoğlu (2007) insan lenfosit kültürlerinde farklı konsantrasyonlardaki TiO₂ NP'larının genotoksik hasara sebep olduğunu, antioksidan enzim cevaplarının oluşturulmasına dayanarak belirlemişlerdir [Türkez ve Geyikoğlu, 2007]. Lindberg ve arkadaşları da (2009) Karbon nanotüplerle insan bronş epitelyal hücrelerini (BEAS 2B) muamele etmişler ve Comet testi sonucunda, bu NP'ların tüm dozlarda DNA hasarını artırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu durum, 48 s sonra mikronükleuslu (MN) hücrelerin artışına da sebep olmuş, ancak bu kez doza bağlı hasar artışı oluşturmamışlardır [Lindberg ve ark., 2009]. Karbon nanotüplerle yapılan başka bir çalışmada ise tek katlı Karbon nanotüplerin V79 (Çin hamster akciğer fibroblast) hücrelerinde genotoksik ve sitotoksik hasara sebep olduğu belirtilmiştir [Kisin ve ark., 2007].

Şu ana kadar yapılan çalışmalarda, toksisitesi en çok araştırılan ve toksik etkisi bulunmayan NP'ların başında, genellikle Au NP'lar yer almaktadır [Connor ve ark., 2005]. Genellikle toksik olduğu düşünülen NP'lar ise TiO₂ [Gheshlaghi ve ark., 2008], Kuantum noktaları [Hardman, 2006], Karbon nanotüpler [Helland ve ark., 2007] ve GNP'lardır [Uyguy ve ark., 2009]. Bu çalışmada da özellikle tercih edilen GNP'ların birçok farklı hallerinin, test edilen hücre tiplerinde genellikle toksik olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Örneğin büyüklüğüne ve konsantrasyonuna bağlı olarak, GNP'ların toksik etkisinin değiştiği ve küçük olanların daha fazla toksisite (apoptoz yoluyla) oluşturduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda gümüşlerin özellikle oksidatif stres yoluyla veya ROS oluşumuyla toksisite oluşturduğu, dolayısıyla mitokondriyi etkileyen NP'lar olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle GNP'ların sitotoksik,

genotoksik ve antiproliferatif olabileceği görülmüştür [Carlson ve ark., 2008; Hussain ve ark., 2005; Stolle ve ark., 2005; AshaRani ve ark., 2009].

Bu tez kapsamında GNP'ların güçlü yüzey plazmonlarından yararlanarak, NP'ların yüzey modifikasyonunun hücresel uygulamalardaki önemini dikkate alarak ve kanserli hücreler ile sağlıklı hücreler arasındaki karbohidrat tüketimini de göz önünde bulundurarak, tüm bu özelliklerin ilk kez bir arada birleştirilerek yapıldığı bu çalışmada; karbohidrat, oligonükleotid ve floresans boyanın değişik kombinasyonlarıyla MGNP'ların L929 ve A549 hücreleri tarafından spesifik alımlarının ve stoplazmik lokalizasyonlarının sağlanması hedeflenmiştir. Ayrıca bunlara paralel olarak spesifik toksisitenin oluşturulması ve bu NP'ların hücresel görüntülemeye kullanılabilmesi de hedeflenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Nanoparçacıkların sentezlenmesi için kullanılan materyaller

- Gümüş nitrat (AgNO_3 -Fluka)
- Trisodyum sitrat (Merck)
- Glukoz (Sigma-Aldrich, Germany)
- Laktoz ((Merck, Germany)
- Cy5 (GE Healthcare)
- APD (Sigma-Aldrich, Germany)
- DAB (Sigma-Aldrich, Germany)
- Asetik asit
- Sistamin (Fluka)
- ssDNA (5'-[ThiSS] AGAGTTCTGAAGC-3)

3.1.2. Hücre kültürü ve sitotoksosite için kullanılan materyaller

- DMEM besiyeri (Sigma-Aldrich)
- DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM besiyeri (Sigma-Aldrich)
- %0,25 Trypsin/EDTA solüsyonu (Sigma)
- PBS (Sigma)
- PSA, L-Glutamin, FBS (Sigma-Aldrich)
- Paraformaldehit (Lachema)
- Mounting medium (destekleyici besiyeri-Sigma)
- MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) 2Htetrazolium, (Promega))
- DMSO
- İmmortalize edilmiş fare fibroblast hücreleri (L929)
- İnsan akciğer kanseri (A549) hücreleri

3.2. Metot

3.2.1. Gümüş nanoparçacıkların sentezlenmesi

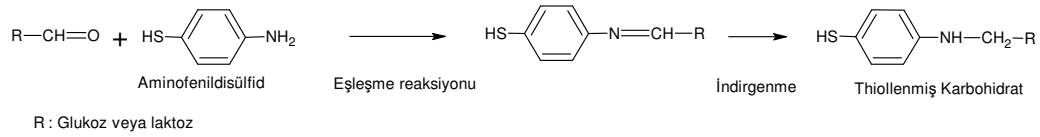
GNP'lar, Lee ve Meisel (1982) metoduna göre, gümüş tuzlarının Sodyum sitratla kimyasal olarak indirgenmesiyle hazırlanmıştır [Lee ve Meisel, 1982]. Kısaca 90 mg Gümüş nitrat (AgNO_3), 500 ml distile su içerisinde çözülmüş ve kaynayana kadar 1000 rpm 300°C 'de ısıtılmıştır. Kaynadıktan sonra 10 ml %1'lik Sodyum sitrat yavaş yavaş çözeltiye eklenmiş ve çözeltinin hacmi başlangıç miktarının yarısına düşünceye kadar kaynatılmaya devam edilmiştir. Hazırlanan çözeltide farklı büyüklüklerde GNP'lar oluştuğundan dolayı, bu çözelti steril filtrelerden geçirilerek içerisinde ortalama 50 nm büyüklükteki GNP'lar olan sıvı süspansiyonlar hazırlanmıştır. Şekil 3.1, sentezlenen GNP'ların SEM görüntüsünü ve UV-Görünür bölge absorpsiyon dalga boyunun 420 nm olduğunu göstermektedir.

Şekil 3.1. Sentezlenen GNP'ların SEM görüntüsü ve UV-Görünür bölge absorpsiyon dalga boyu

3.2.2. Tiyol bağı olan karbohidratların sentezlenmesi

Karbohidratların GNP'lar üzerine kimyasal olarak bağlanabilmesi için Tiyol bağı taşımaları gerekmektedir. Bu nedenle glukoz ve laktoz çözeltileri hazırlandıktan sonra onlara Tiyol bağı olan bir ara molekülün kimyasal olarak bağlanması gerekmektedir. Kimyasal sentez basamakları şu şekilde yapılmıştır: 0,198 gr glukoz, 10 ml distile suda çözülerek 100 mM glukoz çözeltisi hazırlanmış ve 0,36 gr laktoz, 10 ml distile suda çözülerek 100 mM laktoz çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu karbohidratlara Tiyol bağı sağlamaya üzere 0,124 gr APD, 10 ml %100 asetik asitte çözülerek, 50 mM APD çözeltisi hazırlanmıştır. İndirgenme reaksiyonunun tamamlanması için 0,058 gr DAB, 10 ml steril suda çözülerek, 100 mM DAB çözeltisi hazırlanmıştır (DAB, karışıma ekleneceği anda taze hazırlanıp kullanılmıştır).

Çözeltiler bu şekilde ayrı ayrı hazırlandıktan sonra 2 ml glukoz ve 2 ml laktoz çözeltisi, 2 ml APD çözeltisi ile ayrı ayrı tüplerde karıştırılmış ve aminleşme reaksiyonunun tamamlanması için, ağzı kapalı cam tüplerde 1 saat 20°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her bir tüpe 2 ml taze hazırlanmış DAB çözeltisi eklenmiş ve ağzı açık olarak çeker ocak içerisinde 1 saat 20°C'de indirgenme reaksiyonunun tamamlanması beklenmiştir. Yoğunlaşmanın (çökelti oluşumu) gerçekleşmesi için, tüplerin ağzı tekrar kapatılarak Nitrojen gazı ile 1 saat 250°C'de kahverengi-turuncu renk oluşuncaya kadar bekletilmiştir. Sentezin bu basamakları Seo ve arkadaşlarının (2007) metoduna göre yapılmıştır [Seo ve ark., 2007]. Daha sonra bu çökelti 10 ml distile suda çözülerek -20°C'de muhafaza edilmiştir. Karbohidratların Tiyol bağı kazanma reaksiyonu Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Glukoz veya laktozun Tiyol bağı kazanma reaksiyonu

3.2.3. Gümüş nanoparçacıkların karbohidratlarla yüzey modifikasyonlarının yapılması

Hazırlanan Tiyol bağı kazanmış glukoz ve laktoz çözeltileri, steril su ile 100 kat seyreltilerek 1 ml gümüş kolloid içerisine 1 µl olacak şekilde ayrı ayrı eklenmiş ve oda sıcaklığında bir gün çalkalanacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün bu NP'lar 10 000 rpm 30 dk. olacak şekilde, tutunmayan moleküllerin uzaklaşması için üç kez 1 ml steril su ile durulanmış ve en son olarak pellete 1 ml su eklenerek Ag/glukoz ve Ag/laktoz NP'ları hazır hale getirilmiştir. Daha sonra NP'ların süspansiyonda homojen olarak dağılmaları için yaklaşık 15 dk. sonikasyon cihazında bekletilmiştir.

3.2.4. Gümüş nanoparçacıkların oligonükleotid ve karbohidratlarla birlikte yüzey modifikasyonlarının yapılması

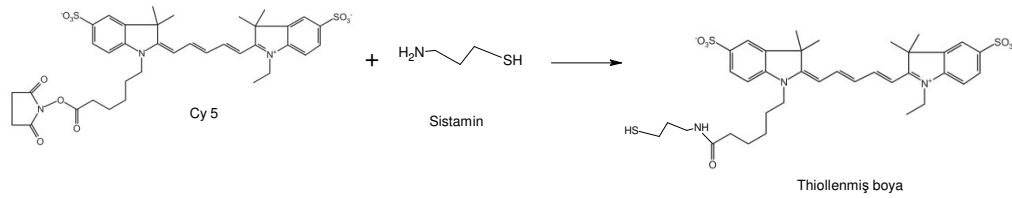
GNP'lar üzerine tek başına veya karbohidratlarla birlikte oligonükleotidlerin de kimyasal olarak bağlanması sağlanmıştır. Bunun için, 1 ml gümüş kolloid içerisine bir ucunda Tiyol bağı bulunduran ssDNA'dan 8 µl eklenerek Ag/ssDNA; 1 ml gümüş kolloid içerisine 1 µl glukoz veya laktoz ve beraberinde 8 µl ssDNA eklenerek Ag/Glukoz/ssDNA ve Ag/Laktoz/ssDNA NP'ları hazırlanmıştır. Bu işlemler yapıldıktan sonra, karışımlar çalkayıcıda bir gün inkübasyona bırakılmış ve ertesi gün 10 000 rpm 30 dk. olacak şekilde santrifüj edilmiştir. Bu şekilde 3 defa 1 ml steril su ile durulandıktan sonra, üzeri 1 ml steril suyla tamamlanmıştır. Daha sonra 15 dk. sonikasyon cihazına bırakılarak NP'ların homojen şekilde dağılmaları sağlanmıştır. Sentezlenen MGNP'ların kimyasal yapısı şematik olarak Şekil 3.3'te gösterilmektedir.

Şekil 3.3. Modifiye edilmemiş GNP ve glukoz, laktoz ve oligonükleotid ile tek tek veya çeşitli kombinasyonlarla yüzeyi modifiye edilmiş GNP'ların şematik olarak kimyasal yapısının gösterimi. 1) Ag, 2) Ag/Glukoz, 3) Ag/Laktoz, 4) Ag/ssDNA, 5) Ag/Glu/ssDNA, 6) Ag/Lak/ssDNA

3.2.5. Gümüş nanoparçacıkların floresans boya ile oligonükleotid ve karbohidratlarla birlikte yüzey modifikasyonlarının yapılması

Tiyol bağı olan Cy5'in hazırlanması

Floresans boya olarak Cy5 tercih edilmiştir. Ancak Cy5'in GNP'ların yüzeyine bağlanması için yine Tiyol bağı taşıması gerekmektedir. Bu nedenle öncelikle Cy5'e Tiyol bağı kazandıracak olan 10^{-3} M 1 ml Sistamin ara molekülü hazırlanmıştır. Daha sonra 1800 µl Cy5 çözeltisi içine 200 µl Sistamin (9:1) eklenerek, karanlık koşullarda bir (1) gün çalkalanacak şekilde inkübasyona bırakılmış ve Cy5'in Tiyol bağı kazanması sağlanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Cy5 boyasının yapısı ve Cy5'in Sistamin ara molekülü ile Tiyol bağı kazanma reaksiyonu

Cy5'in oligonükleotid ve karbohidratlarla birlikte GNP üzerine kimyasal olarak bağlanması

Öncelikle 45 µl Cy5 ve 8 µl oligonükleotid bir ependorf tüpünde karıştırılmış ve hemen ardından üzerine 1 ml gümüş kolloid eklenerek Ag/ssDNA/Cy5 NP'ları hazırlanmıştır. Daha sonra 45 µl Cy5, 8 µl oligonükleotid ve 1 µl karbohidrat (glukoz/laktoz), ependorf tüpleri içerisinde karıştırılmış ve üzerine yine 1 ml gümüş kolloid eklenerek Ag/Glu/ssDNA/Cy5 ve Ag/Lak/ssDNA/Cy5 NP'ları hazırlanmıştır. Karanlık koşullarda yapılan tüm bu işlemlerin ardından, hazırlanan NP süspansiyonları çalkalanacak şekilde 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün 10000 rpm 30 dk. santrifüj edilerek üç defa steril suyla durulanmıştır. En son 1 ml steril suda çözülerek 15 dk. sonikasyona bırakılmıştır. Sentezlenen Cy5 ile MGNP'ların yapısı ise şematik olarak Şekil 3.5'te gösterilmiştir.

Şekil 3.5. Sentezlenen Cy5 ile modifiye edilmiş GNP'ların şematik gösterimi.
Ag/ssDNA/Cy5, Ag/Glu/ssDNA/Cy5 ve Ag/Lak/ssDNA/Cy5

3.2.6. Hücre kültürü

Hazırlanan NP'ların hücrel etkilerini ve davranışlarını belirlemek için, L929 ve A549 hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, Yeditepe Üniversitesi Moleküler Diyagnostik laboratuvarından temin edilmiştir. L929 hücreleri %10 FBS, %1 PSA ve %1 L-Glutamin eklenmiş DMEM besiyerinde; A549 hücreleri de aynı şekilde %10 FBS, %1 PSA ve %1 L-Glutamin ile desteklenmiş DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM besiyerinde T-75 flaskları içerisinde kültüre alınarak, %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde 37°C'de büyütülmüştür.

Muamele edilen hücrelerin Konfokal mikroskop görüntüsü

NP topluluklarının hücre içerisinde yerleşmelerine Leica Konfokal mikroskop ile bakılmıştır. Öncelikle, hücreler 6 kuyucuklu petri kaplarının içine konulmuş steril lamel üzerine 1×10^5 adet olacak şekilde ekilmiştir ve üzerine 100 µl NP eklenmiştir. En son lamellerin üzerini kaplayacak şekilde besiyeri (1 ml) konulup 24 s inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, petrideki besiyerleri steril koşullarda çekilerek üç defa steril PBS ile 5 dk. durulanmış (PBS ile yıkama) ve %2'lik paraformaldehit ile 30 dk. +4°C'de fikse edilmiştir. Tekrar üç defa PBS ile yıkadıktan sonra temiz bir

lam üzerine 1 damla mounting medium (destekleyici besiyeri) damlatılmış ve kuyucuklardaki lameller çıkarılıp ters çevrilerek, bu lamaların üzerine kapatılmıştır (hücreler ikisinin arasında kalacak şekilde). Lamellerin etrafı oje ya da benzer kapaticılarla sabitleştirilip Konfokal mikroskopta incelenmiştir. GNP'ların hücrelerdeki konumlarından yeterli ışınımı alabilmek üzere yüzey plazmonlarını uyarmak için, GNP'lar 488 nm dalga boyu ile uyarılmıştır.

Hücrelerin nanoparçacıklarla muamele edilmesi ve nanoparçacıkların hücresel alımları

L929 ve A549 hücreleri, 6 kuyucuklu petrilere steril kabin içerisinde ekilmiştir (1×10^5 hücre/kuyucuk). Daha sonra bu hücreler, 100 μ l NP ile maruz bırakılmış ve kuyucuklardaki son konsantrasyon 1 ml olacak şekilde üzeri besiyeri ile tamamlanmıştır. Hücreler 1 s, 6 s ve 24 s olmak üzere %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde 37°C'de NP'lar ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi dolan hücreler, besiyeri ile birlikte çekilerek ependorf tüplere alınmış 1000 rpm 5 dk. olacak şekilde santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Daha sonra yukarıda kalan süpernatant alınmış ve değişik sürelerdeki maruziyetten sonra, besiyerinde (süpernatantta) kalan GNP'ların miktarı, gümüş atomlarının konsantrasyonunu ölçen GTA 120 Grafit tüp atomlaştırıcısından oluşan Varian AA 280Z Zeeman Atomik Absorbsiyon spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Spektral ışın kaynağı olarak, GNP oyuk katot lambası kullanılmıştır. Dalga boyu ve spektral aralığın genişliği sırayla 328,1 nm ve 0,5 nm'ye ayarlanmıştır. Optimize edilmiş fırın sıcaklık programları ise sırayla; kuru 85-120°C (alıkoyma süresi 55 s), ısıyla bozulma (pirolisis) 400°C (alıkoyma süresi 8 s), atomlaştırma sıcaklığı 2000°C (alıkoyma süresi 2 s) olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.7 MTS testi

Hazırlanan NP'ların L929 ve A549 hücrelerindeki toksisite değerlendirmesi MTS testi ile 96 kuyucuklu petrilere yapılmıştır. Öncelikle hücreler, 200 μ l besiyeri içerisinde 3000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu petriye ekilip 24 s büyümeye

bırakılmıştır. Ertesi gün, bu besiyeri çekilmiş ve üzerine 1. gün için; içinde 2,5 µl NP olacak şekilde 80 µl besiyeri, 2. gün için; 160 µl, 3. gün için; 240 µl ve 4. gün için; 320 µl besiyeri eklenmiştir. Hücreler aynı şartlarda %20 DMSO içeren besiyeri ile maruz bırakılmıştır (pozitif kontrol). Negatif kontrol olarak besiyeri kullanılmıştır. İnkübasyon süreleri bittiğinde kuyucuklardaki besiyeri çekilmiş ve içerisinde %10 MTS olacak şekilde 100 µl besiyeri bu kuyucuklara eklenmiştir. MTS ile maruz bırakılan hücreler 3 s inkübasyona bırakılmıştır ve inkübasyon sonrasında hücre canlılığı 490 nm’de otomatik petri okuyucu ile (KC junior software, Elx80) ölçülmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI (1. BÖLÜM)

Cy5 içeren ve içermeyen GNP’ların uygulama sonuçları, daha iyi anlaşılması adına iki bölüm halinde verilmiştir. Birinci bölümde Cy5 içermeyen NP’ların, ikinci bölümde ise Cy5 içeren NP’ların aynı hücre hatlarında sitoplazmik lokalizasyonlarının, hücresel alımlarının ve sitotoksitelerinin deneysel sonuçları verilmiştir.

4.1. Hazırlanan Nanoparçacıklar

GNP’ların yüzeyini modifiye etmek için bir ucu Tiyol bağı içeren glukoz, laktoz, floresans boya ve oniki baz çiftinden oluşan oligonükleotid kullanılmıştır. Hazırlanan NP’lar arasında MGNP’lar, solusyonda toplanma meyilinde iken modifiye edilmemiş GNP’lar daha homojen dağılım göstermiştir. Sentezlenen NP’ların yüzey yükü özellikleri, Zeta Potansiyel cihazı (MALVERN Zeta Sizer nanoseries, Nano-ZS) ile ölçülmüştür. NP’ların yüzeyi, üzerine kimyasal olarak bağlanan moleküllerin çeşidine göre değişik negatif (-) yükler göstermiştir. Bağlanan moleküllerin yüklerinin birbirlerine yakın özellik göstermesi, GNP’ların da yakın değerlikli

yüklere sahip olmasına neden olmuştur. Çizelge 4.1, sentezlenen farklı GNP'ların yüzey yük özelliklerini göstermektedir.

Çizelge 4.1. Modifiye edilmemiş GNP'lar ile karbohidrat, oligonükleotid ve Cy5'in farklı kombinasyonları ile yüzeyi modifiye edilmiş GNP'ların Zeta Potansiyeli ölçümleri, ZP: Zeta Potansiyeli, SS: Standart Sapma

Materyalin adı	ZP	SS	Mob	Cond
	(mV)		($\mu\text{mcm/Vs}$)	mS/cm
Ag	-36,2	0,945	-2,833	0,0271
Ag/Glu	-29,4	0,458	-2,304	0,0273
Ag/Lak	-31,4	0,95	-2,462	0,0306
Ag/ssDNA	-31,5	0,321	-2,466	0,0223
Ag/Glu/ssDNA	-33,8	1,77	-2,645	0,0263
Ag/Lak/ssDNA	-29,8	0,379	-2,332	0,0207
Ag/ssDNA/Cy5	-7,45	0,286	-0,5845	0,0436
Ag/Glu/ssDNA/Cy5	-33	0,283	-2,586	0,0291
Ag/Lak/ssDNA/Cy5	-28,5	0,636	-2,239	0,021

4.2. L929 ve A549 Hücreleri Tarafından Alınan Nanoparçacıkların Sitoplazmik Yerleşimleri

Hücre içinde toplanan NP'ların görüntüleri Konfokal mikroskop ile alınmıştır. Şekil 4.1, NP'ların L929 ve A549 hücrelerinde değişik sitoplazmik bölgelerde toplanmasını göstermiştir. GNP'ların oluşturduğu toplulukların yüzey plazmonlarından yararlanılarak, NP'ların hücresel alımları ve yerleşimleri görüntülenmiştir. GNP'ların yüzey plazmonları ise 488 nm dalga boyu ile uyarılmıştır. Hücre içindeki NP'ların ışımaları, düşük objektif gücünde rahatlıkla görünmesine rağmen, oluşan NP toplanmalarının daha net görünebilmesi için her bir hücreye 63x objektif ile odaklanılmıştır.

MGNP toplulukları L929 hücrelerinde genel olarak sitoplazmik membran yakınlığında yerleşim gösterirken (Şekil 4.1 a-k), A549 hücrelerinde genellikle sitoplazmanın orta kısımlarına yakın yerlerde yerleşmiş ve daha büyük toplanmalar oluşturmuştur (Şekil 4.1 b,l). Ayrıca hücrelere uygulanan NP'lardan Ag/Glu/ssDNA ve Ag/Lak/ssDNA, L929 hücrelerinde morfolojik değişikliğe sebep olmuştur (Şekil 4.1 i, k). Normalde yüzeye tutunmuş olan L929 hücrelerinin şekli yayvan-uzun

haldeyken, NP'larla maruz bırakılmasının ardından yuvarlak hale gelmiştir. Ayrıca NP'ların hücre içinde veya hücre dışında büyük boyutlarda topluluk oluşturma meyilinde oldukları gözlenmiştir. Şekil 4.1, hücrelerin GNP'ları toplanmış halde besiyerinden alabileceğini gösterirken, hücre içine giren NP'ların stoplazmada daha büyük toplanmalar oluşturabileceğini de göstermektedir. Ayrıca besiyerinde görülen NP toplanmaları, hücrelerin alınan NP'ları dışarıya vermiş olma ihtimalini de göstermektedir. Çünkü alınan NP'ların hücreler tarafından dışarıya verilebileceği, Atomik Absorbsiyon ölçümleriyle de örtüşmektedir.

Şekil 4.1. Ag, Ag/Glukoz, Ag/Laktoz, Ag/ssDNA, Ag/Glukoz/ssDNA ve Ag/Laktoz/ssDNA NP'larının 24 s inkübasyondan sonra L929 ve A549 hücreleri tarafından alımlarının Konfokal mikroskop görüntüleri

4.3. Nanoparçacıkların Zamana Bağlı Olarak Hücresel Alımları

Hazırlanan NP'ların hücresel alım oranları, besiyerinde kalan GNP'ların konsantrasyonlarının Atomik Absorbsiyon cihazı ile ölçülerek % absorbans değerlerinin hesaplanmasıyla test edilmiştir. Zamana bağlı olarak, hücrelerin al(a)madığı, besiyerinde kalan, NP konsantrasyonları ise Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Hazırlanan GNP'ların değişik maruziyet sürelerinde L929 ve A549 hücreleri tarafından alın(a)mayan (süpernatantta kalan) miktarlarının,

Atomik Absorbsiyon ile ölçümlerinin % konsantrasyonları

L929	% Absorbans (konsantrasyon) Değerleri					
Süre (saat)	Ag	Ag/Glu	Ag/Lak	Ag/ssDNA	Ag/Glu/ssDNA	Ag/Lak/ssDNA
0	100	100	100	100	100	100
1	76,43	67,8	96,44	84,44	79,36	99,69
6	69,03	80,91	74,73	74,72	92,73	98,45
24	72,85	69,34	69,63	81,66	86,04	76,24
A549						
Süre (saat)	Ag	Ag/Glu	Ag/Lak	Ag/ssDNA	Ag/Glu/ssDNA	Ag/Lak/ssDNA
0	100	100	100	100	100	100
1	90,3	93,51	82,02	99,7	94,53	85,19
6	99,86	83,2	32,14	93,6	65,1	60,82
24	76,91	69,17	53,22	78,77	68,48	55,34

4.3.1. Karbohidratla modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların zamana bağlı olarak hücresel alımları

Atomik Absorbsiyon sonuçlarına göre, L929 hücrelerinin NP'ları alım oranları 24 s sonunda birbirlerine yakın oranda olurken, ilk 6 s maruziyetteki alım oranlarında bazı farklar olmuştur. Örneğin, 1. saatte laktoz MGNP neredeyse hiç alınmazken, glukoz MGNP %30 ve sadece GNP %22 oranında alınmıştır. 6. saate kadar ise GNP ve laktoz MGNP'ların alımı yavaşça devam ederken glukoz MGNP'ların bir kısmı dışarı verilmiştir (Şekil 4.2 a). Sonuç olarak bir (1) gün inkübasyon sonunda NP'ların alım oranları hemen hemen aynı olurken, o zamana kadar geçen sürede alım davranışları değişkenlik göstermiştir.

Şekil 4.2. GNP'ların ve karbohidratla modifiye edilmiş GNP'ların L929 (a) ve A549 (b) hücreleri tarafından zamana bağlı olarak hücresel alımlarının % konsantrasyonu

A549 hücrelerinin ise bazı NP'ları seçici bir farkla aldığı görülmüştür. Bu seçici alım laktoz MGNP'larda olup 6. saatte maksimum orana ulaşmıştır. Laktoz MGNP'ların alımı 1. saatte diğerlerine göre hızlı olurken bu hız 6. saate kadar daha da artmıştır. Bu durum A549 hücrelerinin, laktoz MGNP'ları L929 hücrelerinden daha çok ve seçici olarak alabilme eğiliminde olduğunu göstermiştir. Konfokal mikroskop

görüntüleri de bu seçici alımı destekler niteliktedir (Şekil 4.1 f). Glukoz MGNP'ların alımı ise 1. ve 24. saatler arasında çok yavaş şekilde devam etmiştir. Oysa GNP'ların hepsi 1. saatin sonunda tekrar dışarı verilmiş 24. saate kadar tekrar yavaş yavaş alınmaya devam etmiştir (Şekil 4.2 b). Kısaca 24. saatin sonunda en fazla alınan NP oranı yine laktoz MGNP'lar olurken, en az alınan ise GNP'lar olmuştur. Burada dikkati çeken başka bir önemli nokta ise NP'ların hücre içerisinde tutulma süreleridir. Yukarıda da belirtildiği gibi GNP'lar alındıktan 1 s sonra dışarı verilirken, karbohidrat MGNP'lar farklı miktarlarda da olsa 6 s boyunca alınmaya devam etmiştir. Sonuç olarak, Şekil 4.2'ye bakıldığında, 1 s gibi kısa sürede GNP ile sonuç alınması istenen hücre çalışmalarında; L929 hücreleri için glukoz MGNP'lar ideal görünürken, A549 hücrelerinde laktoz MGNP'lar ideal NP olarak görülmektedir.

4.3.2. Oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların zamana bağlı olarak hücresel alımları

Oligonükleotidlerin (ssDNA) tek başına ve karbohidratlarla birlikte GNP'ların yüzeyinde bulunmasının hücresel alımları ve etkileşimleri nasıl etkilediğine bakmak için, oligonükleotidlerin de bağlandığı MGNP'lar deneysel kısımda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Şekil 4.3, MGNP'ların zamana bağlı olarak hücresel alımlarının durumunu göstermektedir. L929 hücreleri, ilk 1 saatte sadece ssDNA ve glukoz/ssDNA MGNP'ları %20 oranında alırken, laktoz/ssDNA MGNP'ları hiç almamıştır. 6. saate kadar diğerlerinin durumlarında önemli bir değişiklik olmazken alınan glukoz/ssDNA MGNP'larının büyük bir kısmı dışarı verilmiştir. Bu durum Şekil 4.2 a'daki sonuçla benzerlik göstermektedir. 24. saatin sonunda ise her üç NP'nın hücre alım oranları hemen hemen eşitlenmiş ve ortalama %15 seviyesinde olmuştur (Şekil 4.3 a).

Şekil 4.3. Oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş GNP'ların L929 (a) ve A549 (b) hücreleri tarafından zamana bağlı olarak hücresel alımlarının % konsantrasyonu

A549 hücrelerinin alım oranlarına bakıldığında, 1. saatte Ag/ssDNA ve Ag/Glu/ssDNA'nın hemen hemen hiç alımı olmaz iken, laktoz/ssDNA MGNP'ları ise yaklaşık 18 kat daha fazla alınmıştır. 6. saate kadar laktoz ve glukoz/ssDNA MGNP'nın alım hızları ve oranları giderek artmış, sonuçta %40 olacak şekilde hemen hemen eşitlenmiştir, ssDNA MGNP'ların alımı ise sadece %3 kadar olmuştur. 24. saatin sonunda en fazla alınan ve içerde en fazla tutulan NP, laktoz/ssDNA MGNP'lar olurken, en az alınan ssDNA MGNP'lar olmuştur (Şekil 4.3 b). Sonuçta A549 hücreleri L929 hücrelerine göre, yine laktozun da içinde bulunduğu oligonükleotid MGNP'ları seçici olarak almayı tercih etmiştir.

Şekil 4.2 ve Şekil 4.3 karşılaştırıldığında, oligonükleotidlerin tek başına veya karbohidratlarla modifiye edilmiş hallerinin hücresel alımları etkilediği de gözlenmiştir. Örneğin ssDNA; laktoz MGNP'ların alımını L929 hücrelerinde 1. ve 5. saatlerde durdurmuştur. Glukoz MGNP'ların 1. saatteki alımını ilk durumuna göre %13 azaltırken, 24. saatte ise %16 azaltmıştır. Sadece GNP'ların alımını ise 1. saatte %8 azaltmış ve 24 saat sonundaki alımının da %9 azalmasına sebep olmuştur. Kısaca, oligonükleotidlerin GNP'lar üzerinde tek başına veya karbohidratlarla bulunması onların L929 hücreleri tarafından daha az alınmasına sebep olmuştur.

A549 hücreleri açısından bakılırsa ssDNA; laktoz MGNP'ların alımını sadece 6. saatte ilk duruma göre %32 oranında azaltmış diğer inkübasyon sürelerindeki alımı değiştirmemiştir. Glukoz MGNP'ların alımını ise 6. saatte bu kez sürpriz bir şekilde %18 oranında artırmıştır. Tıpkı laktoz MGNP'ların alımındaki gibi, diğer inkübasyon sürelerindeki alım oranını da değiştirmemiştir. ssDNA'nın sadece GNP'ların alımına etkisine bakıldığında, 1. saatte alımı ilk duruma göre %9 azalttığı, 6. saatte kadar da %7 artırdığı görülmüştür. Kısaca, oligonükleotidlerin tek başına veya karbohidratlarla birlikte GNP'ların üzerindeki varlığı, L929 hücrelerindeki gibi doğrudan hepsinin hücresel alımının azalmasına neden olmamış, aksine az farkla da olsa bazısının alımını belli inkübasyon sürelerinde artırmıştır (Glukoz MGNP).

4.4. MTS Testi

Bu çalışmada hücrelere uygulanan NP'ların sitotoksitesitesi MTS testi ile ölçülmüştür. Bu test, hücre proliferasyonunda veya sitotoksitesite testlerinde canlı hücrelerin sayısını belirlemek için kullanılan kolorimetrik bir metoda dayanır. MTS bileşeni ve elektron eşleşme ajanı olan PMS, solusyonun içinde birlikte bulunmaktadır. MTS bileşeni canlı hücreler tarafından biyo-indirgenerek besi yerinde çözünebilir mor renkli formazan ürününe dönüşür. Kısaca bu test, MTS+PMS'yi formazana indirgeyen enzimlerin aktivitesini ölçmektedir [Mosmann, 1983; Cory ve ark., 1991]. 490 nm absorbans ile ölçülen formazanın niceliği, kültürdeki canlı hücre sayısı ile direkt orantılıdır. MTS testi, daha etkili indirgenme özelliğine sahip olduğundan ve ürünü suda çözünebildiğinden dolayı yaygın olarak kullanılan bir testtir. Çeşitli ajanlarla muamele edilen hücrelerin MTS testi uygulaması sonucu oluşturduğu mor renkli formazanın miktarı, muamele edilmemiş (kontrol) hücrelerin oluşturduğu formazan miktarı ile karşılaştırıldığında, metabolik değişikliğe veya hücre ölümüne sebep olan ajanın etki derecesi, oluşturulan doz-cevap standartına göre belirlenir. Çizelge 4.3, MTS testi sonuçlarına göre L929 ve A549 hücrelerinde, NP'ların % sitotoksitesitesini veya hücre canlılığına olan etkilerini göstermektedir.

Çizelge 4.3. Hazırlanan NP'ların L929 ve A549 hücrelerinde değişik maruziyet sürelerinde MTS testi sonuçlarına göre % sitotoksosite/canlılık durumları, SS: Standart Sapma, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol

[illegible]

1	92 (0,82)	93 (1,73)	128 (8,98)	122 (6,12)	97 (4,14)	108 (4,81)	0	100
2	83 (2,34)	88 (5,83)	111 (2,75)	119 (6,38)	95 (0,77)	103 (3,15)	0	100
3	86 (8,62)	127 (3)	131 (3,17)	112 (18,54)	119 (0,26)	125 (5,84)	0	100
4	87 (9,36)	107 (2,56)	100 (1,44)	92 (2,52)	106 (1,7)	95 (3,85)	0	100

Şekil 4.4 ve Şekil 4.5 ise hücrelerle değişik sürelerde muamele edilen NP'ların sitotoksitesini/hücre canlılığını % absorbans değerlerine göre grafiksel olarak göstermektedir. Şekillerden de anlaşılacağı gibi NP toksisitesi, hücre çeşidine ve maruziyet sürelerine bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. Yaklaşık 50 nm büyüklüğündeki GNP'lar, A549 hücrelerinin canlılığını olumsuz yönde etkiye sebep olurken, L929 hücrelerine olumsuz etki yapmamıştır. Hücresel alımı ölçmek için uygulanan NP konsantrasyonunda, MGNP'lar ile maruz bırakılan hücrelerde dört gün boyunca genel olarak, önemli bir sitotoksik etki saptanmamıştır.

4.4.1. Karbohidratla modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların sitotoksitesi

NP'ların L929 ve A549 hücrelerinde göstermiş olduğu % sitotoksite değerleri Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, L929 hücrelerinde glukoz veya laktoz MGNP'ların sitotoksite durumları birbiriyle oldukça benzer çıkmıştır. İki gün boyunca bu NP'lara maruz kalan hücrelerin canlılığı NK'e göre ortalama %35 artmış, 4. günün sonuna doğru ise yavaşça azalarak NK ile aynı değere ulaşmıştır. Sadece GNP'lar ise, hücre canlılığını NK'e göre ilk gün %55 oranında artırırken, 4. günün sonuna kadar kademeli olarak yavaşça azalmasına ve tekrar NK ile aynı değere ulaşmasına sebep olmuştur (Şekil 4.4 a). Kısaca bu NP'lar, 4 gün maruziyette hücrelere toksik etki yapmamış, sadece değişik maruziyet sürelerinde hücre canlılığına olumlu etkiler yapmıştır.

Şekil 4.4. Karbohidratla modifiye edilmiş GNP'ların ve modifiye edilmemiş GNP'ların L929 (a) ve A549 (b) hücrelerinde % sitotoksosite değerleri

GNP'ların A549 hücrelerinde etkisine bakıldığında, GNP'lar ve glukoz MGNP'lar iki gün maruziyette hücre canlılığını NK'e göre %20 azaltmış ve 3. günde glukoz MGNP'lar tekrar hücre canlılığının %27 artmasına sebep olurken, GNP'ların etkisi sabit kalmıştır. Dolayısıyla A549 hücrelerinde toksik etki oluşturan NP'lar, GNP'lar olmuştur. Laktoz MGNP'lar ise ilk gün ve 3. gün hücre canlılığını NK'e göre %28 artırmış, 2. gün %17 ve 4. gün de %31 azaltarak tekrar NK ile aynı değere düşmesine sebep olmuştur (Şekil 4.4 b). Kısaca A549 hücrelerinde MGNP'ların sitotoksik etkileri, modifiye edildiği moleküle ve zamana bağlı olarak değişkenlik göstermiştir ve hücre canlılığında olumsuz etki yapmıştır.

Ayrıca, GNP'lar L929 hücrelerinde hiç toksik etkiye sebep olmazken, A549 hücrelerinde %20 oranında da olsa toksisite göstermiştir. Ayrıca A549 hücrelerinin az almayı tercih ettiği GNP ve glukoz MGNP'lar, az miktarda alınmalarına rağmen hücrelerin %10'unu öldürmeyi başarmıştır (1.günde). Oysa laktoz MGNP'lar, 1. günde daha çok alınmasına rağmen toksik etki oluşturmamıştır.

4.4.2. Oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların sitotoksitesi

Şekil 4.5, tek başına ve karbohidratlarla birlikte GNP'ın yüzeyine bağlanan oligonükleotidlerin L929 ve A549 hücrelerinde sitotoksosite durumunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre L929 hücrelerinde tüm NP'lar toksik etki göstermezken, 2. ve 3. günde hücre canlılığını NK'e göre önemli sayılmayacak derecede azaltmışlardır. Yine glukoz/ssDNA ve laktoz/ssDNA MGNP'ların etkisi birbirleriyle aynı derecede olup, hücre canlılığını NK'e göre iki günde ortalama %20 artırmış ve 4. günün sonuna kadar tekrar NK ile aynı konsantrasyona düşürmüştür. Oysa NP'lar arasında hücre canlılığını en az olumsuz etkileyen ssDNA MGNP'lar olmuştur (2 gün maruziyette). Bu NP'lar, 4. günün sonunda ise hücre canlılığını diğerleri gibi tekrar NK ile aynı konsantrasyona düşürmüştür (Şekil 4.5 a).

Şekil 4.5. Oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş GNP'ların L929 (a) ve A549 (b) hücrelerinde % sitotoksosite değerleri

GNP'lar üzerinde oligonükleotidlerin varlığı, A549 hücrelerinde L929 hücrelerine göre oldukça değişik etkilere sebep olmuştur. Bu hücrelerde glukoz/ssDNA MGNP'lar iki günde sadece %5 toksik etki göstermiş, 4. günün sonunda ise hücre canlılığını NK ile aynı değere ulaştırmıştır. Laktoz/ssDNA MGNP'lar, 3. günde hücre canlılığını NK'e göre %25 artırmış, 4. günde %5 toksik etkiye sebep olmuştur. Ag/ssDNA ilk günde hücre canlılığını NK'e göre %22 artırırken, 4 gün maruziyette %8 toksik etki yapmıştır (Şekil 4.5 b). Kısaca glukoz/ssDNA MGNP'ları, L929 hücrelerinin canlılığını artırırken, A549 hücrelerinin canlılığını azaltarak az da olsa toksik etki oluşturmuştur.

Şekil 4.4 a ile karşılaştırıldığında ise GNP'lara ssDNA bağlanması; L929 hücrelerinde, onun sadece 2. günde hücre canlılığını artırmasına neden olmuş, başka bir değişikliğe sebep olmamıştır. ssDNA, GNP üzerinde glukozla birlikte bulunduğu hücre canlılığında farklı bir etki yapmamış, laktozla birlikte bulunduğu ise hücre canlılığını 1. günde %11 azaltırken, 3. günde %12 artırmıştır. Kısaca L929 hücrelerinde, GNP üzerinde oligonükleotidlerin tek başına veya karbohidratlarla birlikte bulunması, önemli bir değişikliğe veya sitotoksositeye sebep olmamış sadece farklı zamanlarda küçük değişiklikler oluşturmuştur.

Oligonükleotidlerin tek başına veya karbohidratlarla birlikte GNP'lar üzerinde bulunması, A549 hücrelerinde önemli toksik etki değişikliğine sebep olmuştur. Örneğin ssDNA'nın GNP üzerine bağlanması, onun toksik etkisini azaltmış ve A549 hücrelerinin canlılığının 3 gün boyunca ortalama %40 artmasına sebep olmuştur. ssDNA, glukoz ile birlikte bulunduğunda hücre canlılığında önemli bir değişiklik oluşturmazken, laktozla birlikte bulunduğunda etki durumu benzer şekilde olup, 4 gün boyunca ortalama %10 hücre canlılığının azalmasına sebep olmuştur. Sonuç olarak oligonükleotidlerin tek başına veya karbohidratlarla birlikte GNP'lar üzerinde bulunması, A549 hücrelerine toksik etkiyi önemli ölçüde değiştirmiştir (Özellikle tek başına GNP'ların üzerindeyken).

Hücrelere uygulanan bu NP'ların 24 s maruziyet sonunda sitotoksitesinin, alım oranlarıyla doğru orantılı olarak bir ilişkisinin olup olmadığına değinmek gerekirse; alım oranlarının ve buna bağlı sitotoksitesinin, NP'ların yapısına bağlı olarak değiştiği ve doğrudan bir ilişki olmadığı görülmüştür. Örneğin, L929 hücrelerinde Ag/ssDNA, yalnız Ag'ye göre %10 daha az alınmasına rağmen, ikisi de aynı etkiyi göstermiştir. Ag/glukoz ve Ag/glukoz/ssDNA'ya bakıldığında; Ag/glukoz %16 daha fazla alınmış ve hücre canlılığı da %6 daha fazla olmuştur. Bu durum Ag/laktoz ve Ag/laktoz/ssDNA için de benzer çıkmıştır.

A549 hücrelerinde ise bu durum önemli bir şekilde daha değişik sonuçlar göstermiştir. Örneğin Ag ve Ag/ssDNA aynı oranda hücrelere alınırken, Ag hücre canlılığını %43 daha da azaltmıştır. Benzer şekilde Ag/laktoz ve Ag/laktoz/ssDNA da aynı oranda alınırken, bu kez Ag/laktoz/ssDNA %20 daha fazla hücre canlılığının azalmasına sebep olmuştur. Ayrıca aynı oranda alınan Ag/glukoz ve Ag/glukoz/ssDNA yine aynı oranda sitotoksitesite göstermiştir. Buradan da NP'ların sitotoksitesinin, NP'ların hücrelere çok veya az alınmasına göre paralellik göstermediği, tamamen yüzey özelliklerine ve hücre çeşidine göre değiştiği sonucuna varılmıştır. Genel bir sonuç olarak, glukoz veya laktoz MGNP'ların hücresel lokalizasyonu, hücresel alımları ve sitotoksitesisi L929 hücrelerinde aynı oranlarda olurken, A549 hücrelerinde bu durum oldukça değişken çıkmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI (2. BÖLÜM)

Bu bölümde karbohidrat ve oligonükleotidlere ilaveten Cy5'in de üzerinde bulunduğu GNP'ların, aynı koşullarda L929 ve A549 hücrelerine uygulanması sonucu, bunların stoplazmik lokalizasyonları, hücresel alım oranları ve sitotoksitesinin sonuçları verilmiştir.

5.1. Cy5 ile Modifiye Edilmiş Gümüş Nanoparçacıkların Zamana Bağlı Olarak Hücresel Alımları

Cy5'in de üzerinde bulunduğu MGNP'ların L929 ve A549 hücrelerindeki sitoplazmik yerleşimleri, 1. bölümde olduğu gibi Konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Hücre içi mikroskop görüntüleri alınırken, GNP'ların yüzey

plazmonlarının uyarılmasına (488 nm) ilaveten, Cy5 de 625 nm dalga boyuyla uyarılmış ve ikisinin hücre içindeki ışımaları üst üste çakıştırılmıştır. Böylece hem boyanın GNP'lar üzerine tutunduğu kanıtlanmış, hem de bunların hücreler tarafından alındığında hücre içi görüntülemenin de kalitesi artırılmıştır. Şekil 5.1, A549 hücrelerinde Cy5'ten ve GNP'lardan ayrı ayrı gelen hücre içi ışımaların üst üste (nasıl) çakıştırıldığını göstermektedir. Şekil 5.1.1'de GNP'lardan, Şekil 5.1.2'de Cy5'ten gelen ve Şekil 5.1.4'de ise bu ikisinden gelen ışımaların üst üste çakıştırılmış hali görülmektedir. Şekil 5.1.3'de ise NP'ların hücre içinde herhangi bir dalga boyuyla uyarılma olmaksızın oluşturduğu toplanmalar da siyah noktalar şeklinde görülmektedir. Bu şekil aynı zamanda Cy5'in varlığında MGNP'ların bu hücreler tarafından oldukça yoğun bir şekilde alındığını ve hücre içinde oldukça büyük toplanmalar oluşturduğunu da göstermektedir. Ayrıca Cy5 ile MGNP'ların hücre içi görüntülemeyi oldukça artırdığı da bu şekilde fark edilmektedir.

Şekil 5.1. A549 hücrelerinde Cy5 ve modifiye edilmiş GNP'lardan gelen ışımaların üst üste çakıştırılması. 1) 488 nm ile uyarılan MGNP'lardan gelen ışıma, 2) 625 nm ile uyarılan Cy5'ten gelen ışıma, 3) Uyarılma yapılmamış

(kontrol) hücre, 4) Cy5 ve modifiye edilmiş GNP'lardan gelen ışımların üst üste çakıştırılması (overlap)

5.1.1. L929 ve A549 hücreleri tarafından alınan Cy5, oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların sitoplazmik yerleşimleri

Cy5 bağlı tüm MGNP'ların hücresel lokalizasyonları Şekil 5.2'de gösterilmiştir. NP'ların L929 hücrelerindeki lokalizasyonuna bakılırsa, genel olarak küçük toplanmalar şeklinde ve sitoplazmada rastgele bir yerleşim gösterdiği görülmektedir (Şekil 5.2 a,e). Fakat Ag/Glu/ssDNA/Cy5, hücre içinde diğerlerine göre daha büyük toplanmalar oluşturmuştur (Şekil 5.2 c). MGNP'ların oluşturduğu toplanmalar aynı zamanda hücrelerin etrafında da görülmüştür. MGNP'ların A549 hücrelerinde yerleşimleri ise genel olarak daha büyük toplanmalar şeklinde olmuş ve hücrenin orta kısımlarında yoğunlaşmıştır. Özellikle Ag/ssDNA/Cy5 ve Ag/Glu/ssDNA/Cy5, L929 hücrelerine kıyasla, A549 hücrelerinde açıkça görülebilen büyük toplanmalar oluşturmuştur (Şekil 5.2 b,f). Ag/ssDNA/Cy5 NP'larının A549 hücrelerinde ve L929 hücrelerinde belirgin bir morfolojik değişiklik oluşturduğu da görülmüştür. Ayrıca Şekil 5.2 d' de, hücre içinde toplanan NP'ların sitoplazmanın orta kısmında iki membran arasını tamamen doldurdukları ve hücrelerin dışında yine toplanmalar gösteren NP'lar olduğu görülmektedir. Şekil 5.2 c ve e' de Cy5 taşıyan GNP'lar bulunmasına rağmen, görüntüleme kalitesindeki farkı göstermek adına bu hücrelerde sadece MGNP'lar uyarılmıştır. Dolayısıyla Cy5 uyarılmasının yapıldığı görüntüler az farkla da olsa daha net görüntü sağlamıştır. Şekil 4.1 ile Şekil 5.2 karşılaştırıldığında Cy5 MGNP'larının L929 hücrelerinin sitoplazmasında benzer şekilde küçük toplanmalar ve rastgele yerleşimler oluşturduğu görülmüştür. Fakat Cy5 MGNP'ların A549 hücrelerinde çok daha büyük toplanmalar oluşturduğu, ayrıca toplanmaların belirgin şekilde sitoplazmanın orta kısımlarında yerleştiği görülmüştür.

Şekil 5.2. Ag/ssDNA/Cy5, Ag/Glukoz/ssDNA/Cy5 ve Ag/Laktoz/ssDNA/Cy5 NP'lerinin 24 s inkübasyondan sonra L929 ve A549 hücreleri tarafından alımlarının Konfokal mikroskop görüntüleri

5.1.2. Cy5, oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların zamana bağlı olarak hücresel alımları

1. bölümde olduğu gibi Cy5 MGNP'ların da zamana bağlı hücresel alımları Atomik Absorbsiyon sonuçlarının % absorbsiyon değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. MGNP'ların L929 ve A549 hücreleri tarafından alınamayan (besi ortamındaki) miktarları % olarak Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Cy5 ile modifiye edilmiş GNP'ların değişik maruziyet sürelerinde L929 ve A549 hücreleri tarafından alın(a)mayan (süpernatantta kalan) miktarlarının Atomik Absorbsiyon ile ölçümlerinin % konsantrasyonları

L929	% Absorbans (konsantrasyon) Değerleri		
Süre (saat)	Ag/ssDNA/Cy5	Ag/Glu/ssDNA/Cy5	Ag/Lak/ssDNA/Cy5
0	100	100	100
1	98,13	72,44	86,30
6	99,62	74,48	99,63
24	96,35	98,72	94,42
A549			

Süre (saat)	Ag/ssDNA/Cy5	Ag/Glu/ssDNA/Cy5	Ag/Lak/ssDNA/Cy5
0	100	100	100
1	85,51	93,44	84,38
6	63,08	81,68	57,96
24	58,41	73,12	46,61

1. bölümde olduğu gibi, Cy5 ile MGNP'lar hücre çeşidine ve zamana bağlı olarak farklı alım oranları göstermiştir. L929 hücreleri ilk bir saat maruziyette en fazla (%28) Ag/Glu/ssDNA/Cy5'i, daha sonra Ag/Lak/ssDNA/Cy5'i (%14) almış, Ag/ssDNA/Cy5'i ise hemen hemen hiç almamıştır. 6. saatte ise alınan Ag/Lak/ssDNA/Cy5'in hepsi dışarı verilirken, Ag/Glu/ssDNA/Cy5'in sadece %2'si dışarı verilmiştir. 24 saatin sonunda ise bu GNP'ların hepsinin % alım değeri birbirine yakın olup yaklaşık %5 olarak kalmıştır (Şekil 5.3 a). Kısaca L929 hücreleri için bu NP'ların alımı en çok ilk bir saat içinde olmuş ve en fazla alınan NP, %28 oranla Ag/Glu/ssDNA/Cy5 olmuştur.

Şekil 5.3. Cy5, oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş GNP'ların L929 (a) ve A549 (b) hücreleri tarafından zamana bağlı olarak hücre alımlarının % konsantrasyonu

A549 hücrelerinde; ilk bir saatte Ag/ssDNA/Cy5 ve Ag/Lak/ssDNA/Cy5 aynı oranda (%15) alınmış, fakat Ag/Glu/ssDNA/Cy5 daha az (%7) alınmıştır. 6 saatlik maruziyette Ag/ssDNA/Cy5 ve Ag/Lak/ssDNA/Cy5'in alımları hızlanmış ve alımları sırayla %37 ve %43 olmuştur. Ag/Glu/ssDNA/Cy5'in alımı ise bunlara göre daha yavaş şekilde artarak %19 oranında olmuştur. 24 saatlik maruziyette de Ag/ssDNA/Cy5 ve Ag/Glu/ssDNA/Cy5'in alım hızları yavaşlamış ve alımları en son sırayla %48 ve %27 olmuştur. Ag/Lak/ssDNA/Cy5'in alımı ise daha da artarak maksimum %54'e ulaşmıştır (Şekil 5.3 b). Kısaca A549 hücreleri MGNP'lar ile çeşitli maruziyet sürelerinde en fazla Ag/Lak/ssDNA/Cy5'i almıştır (%54).

L929 ve A549 hücrelerinin Cy5 ile MGNP'ları alım durumları karşılaştırıldığında, L929 hücrelerinde ilk bir saatin, bu NP'ları hızlı ve maksimum oranda alması için önemli bir saat olduğu görülmüştür. Fakat A549 hücrelerinde zamana bağlı olarak

artan bir NP alımı gözlenmiştir. Dolayısıyla en hızlı alım oranı 6. saatte iken, maksimum alım miktarı 24. saatte olmuştur. Ayrıca L929 hücreleri aldıkları NP'ların hemen hemen hepsini tekrar dışarı vermişken, A549 hücreleri zamana bağlı olarak sürekli almaya devam etmiştir. Böylece hazırlanan bu MGNP'ların A549 hücrelerinde daha uzun süre alıkonulabildiği de görülmüştür.

Cy5'in MGNP'lar üzerinde bulunmasının ve bulunmamasının hücrelerin alım oranlarını nasıl etkilediğine kısaca değinmek gerekirse; Cy5'in varlığı L929 hücrelerinde, ilk bir saat içinde Ag/ssDNA'nın alımını %16 oranında azaltmış, Ag/Glu/ssDNA'nın alımını %9 artırmış ve Ag/Lak/ssDNA'nın alımını ise %14 artırmıştır. 24 saat içerisinde ise tüm NP'ların alımını yaklaşık olarak ortalama %16 azaltmıştır. Kısaca, Cy5'in MGNP'lar üzerinde bulunması, L929 hücrelerinin değişik maruziyet sürelerinde bu NP'ları almasını az miktarda etkilemiş, alım şekillerinde de küçük değişikliklere sebep olmuştur.

A549 hücrelerinde ise Cy5'in MGNP'lar üzerinde bulunması, onların alınma şeklini değiştirmemiş, fakat yüzde değerlerinde bazı önemli değişikliklere sebep olmuştur. Örneğin Ag/ssDNA NP'larının alımını tüm maruziyet sürelerinde (özellikle 6. saate kadar %32) önemli bir farkla artırmıştır ve 24 saat sonunda da bu artış değeri bu kez %25 olmuştur. Ag/Glu/ssDNA NP'larının alımını da sadece 6 saat maruziyette %24 oranında azaltmıştır. Ag/Lak/ssDNA NP'larının alım yüzdesini ise her maruziyet süresinde az miktarda da olsa artırmış ve 24 saat sonunda da %16 oranında artırmıştır. Kısaca MGNP'lar üzerinde Cy5 varlığı, onların alımlarını önemli ölçüde etkilemiştir. Ayrıca A549 hücreleri tarafından en fazla alınan laktoz taşıyan her iki GNP çeşidinde olduğu gibi yine laktoz taşıyan Cy5 MGNP'lar en fazla alınan NP olmuştur.

5.2. MTS Testi

5.2.1. Cy5, oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkların sitotoksitesi

Cy5 ile MGNP'ların sitotoksitesi 1. bölümde belirtildiği gibi MTS testi ile belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak DMSO kullanılırken; negatif kontrol olarak besiyeri tercih edilmiştir. Çizelge 5.2, L929 ve A549 hücrelerinde Cy5 MGNP'ların % sitotoksite değerini göstermektedir.

Çizelge 5.2. Cy5, oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş GNP'ların L929 ve A549 hücrelerinde % sitotoksite değerleri SS: Standart Sapma, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol

L929					
Gün	Ag/ssDNA/Cy5 (%SS)	Ag/Glu/ssDNA/Cy5 (%SS)	Ag/Lak/ssDNA/Cy5 (%SS)	PK	NK
0	100 (0)	100 (0)	100 (0)	0	100
1	133,3 (1,11)	112,6 (12,03)	98,2 (7,4)	0	100
2	146,4 (2,49)	129 (3,46)	110,1 (5,47)	0	100
3	115 (5)	124 (40,66)	124,9 (13,86)	0	100
4	101,4 (2,73)	109 (10,16)	104,2 (11,82)	0	100
A549					
Gün					
0	100 (0)	100 (0)	100 (0)	0	100
1	136 (0,69)	103,3 (4,16)	106,7 (3,15)	0	100
2	106,7 (7,23)	87,9 (0)	92 (16,88)	0	100
3	111,5 (13,17)	76,3 (11,37)	96,5 (0,46)	0	100
4	110,3 (12,41)	114,4 (14,88)	119,7 (6)	0	100

Hazırlanan NP'ların her biri hücre canlılıklarını değişik oranda etkilemiş fakat aralarında çok önemli farklara rastlanmamıştır. L929 hücreleri için hiçbir şekilde toksik etki göstermeyen bu NP'lar, A549 hücrelerinde özellikle 2. ve 3. günde toksik etki göstermişlerdir. L929 hücrelerinde; Ag/ssDNA/Cy5, 1. günde hücre canlılığını NK'e göre %35 artırmış, 2. günde ise %46 oranında artırarak hücre canlılığına maksimum katkıyı sağlayan NP olmuştur. Fakat bu NP, 3. ve 4. maruziyet günlerinde hücre canlılığını 2. güne göre azaltmasına rağmen NK'e göre önemli bir

düşüşe sebep olmamıştır. Ag/Glu/ssDNA/Cy5 NP'ları, ilk gün hücre canlılığını NK'e göre %12 artırmış, 2. gün hücre canlılığını daha da artırarak %29'a ulaştırmış fakat 3. ve 4. günde canlılığın biraz azalmasına sebep olmuştur. Ag/Lak/ssDNA/Cy5 NP'ları ise 3. güne kadar hücre canlılığını NK'e göre artırmış (%24) ve 4. günde NK ile aynı etkiyi göstermiştir (Şekil 5.4 a). Kısaca L929 hücrelerinde Cy5 ile MGNP'lar değişik maruziyet sürelerinde farklı etkiler oluştursa da bu farklar birbirlerine yakın sayılabilecek değerlerde hücre canlılığını etkilemişlerdir.

Şekil 5.4. Cy5, oligonükleotid ve karbohidrat ile modifiye edilmiş GNP'ların L929 (a) ve A549 (b) hücrelerinde % sitotoksosite değerleri

A549 hücrelerinde Ag/ssDNA/Cy5 NP'ları 1 gün maruziyette hücre canlılığını NK'e göre %36 artırarak, hücre canlılığını maksimum artıran NP olmuştur. Takip eden günlerde ise NK'e göre hücre canlılığını çok değiştirmemiştir. Ag/Glu/ssDNA/Cy5 NP'ları 1. ve 4. günde hücre canlılığını NK'e göre önemli şekilde değiştirmemiş fakat 2. ve 3. günde toksik etki oluşturarak, hücre canlılığını NK'e göre sırayla %13 ve %24 oranında azaltarak, A549 hücreleri için toksisite oluşturan NP olmuştur. Ag/Lak/ssDNA/Cy5 NP'ları, 1. günde hücre canlılığını NK'e göre sadece %6 artırmış, 2. ve 3. günde ortalama %4 azaltmış ve 4. günde de %29 artırmıştır (Şekil 5.4 b).

Cy5 ile MGNP'ların L929 ve A549 hücrelerindeki etkisine genel olarak bakılırsa; Ag/ssDNA/Cy5 NP'larının her iki hücre için de hücre canlılığını maksimum artıran NP'lar olduğu görülmüştür. Ag/Glu/ssDNA/Cy5 NP'ları L929 hücreleri için değişik maruziyet sürelerinde pozitif etkiye sahip iken, A549 hücreleri için en çok toksik etkiyi yapan NP olmuştur. Ag/Lak/ssDNA/Cy5 NP'ları ise L929 ve A549 hücrelerinde hemen hemen benzer hücre canlılık değerleri göstermiştir.

L929 hücrelerinde Cy5'in NP'lar üzerinde bulunmasının, NP'lar üzerinde bulunmadan önceki haline göre sitotoksik etkiyi nasıl etkilediğine bakılacak olursa; Ag/ssDNA NP'larının hücre canlılığına olan olumlu katkısını ilk 2 günde az miktarda (ortalama %11) azaltırken, 3. günde bu kez az miktarda artırdığı (%10) ve 4. günde de herhangi bir değişiklik oluşturmadığı görülmüştür. Ag/Glu/ssDNA

NP'larının hücre canlılığına olan olumlu katkısını ilk 2 günde çok az miktarda azaltmış (ortalama %7), 3. ve 4. günde ise sırayla %24 ve %5 artırmıştır. Ag/Lak/ssDNA NP'larının hücre canlılığına olan olumlu katkısını da ilk 2 günde az miktarda azaltmış (ortalama %16), 3. günde %12 artırmış, 4. günde ise değiştirmemiştir. Kısaca Cy5'in MGNP'lar üzerinde bulunması, yukarıda belirtilen NP'ların hücre canlılığına olan olumlu katkılarını L929 hücrelerinde ilginç bir şekilde, standart olarak ilk 2 günde azaltırken, 3. günde artırmış ve 4. günde de herhangi bir şekilde değiştirmemiştir. Dolayısıyla her iki şekilde de bu NP'ların L929 hücreleri için bu konsantrasyonda, farklı inkübasyon sürelerinde toksik etkisi olmadığı görülmüştür.

Cy5'in MGNP'lar üzerinde bulunması, L929 hücrelerinde olduğu gibi A549 hücrelerinin canlılığına etkilerini, standart bir şekilde değiştirmemiştir. Kısaca Ag/ssDNA NP'larının hücre canlılığına olan olumlu etkisini 1. ve 4. günde az miktarda artırmış, 2. günde azaltmış ve 3. günde değiştirmemiştir. Ag/Glu/ssDNA NP'larının etkisini 1., 2. ve 4. günde çok az değiştirmişken, 3. günde olumlu etkisini %38 oranında düşürerek toksik olmasını sağlamıştır. Ag/Lak/ssDNA NP'larının etkisini de 1. ve 2. günde önemsiz sayılabilecek kadar değiştirmişken, 3. gündeki olumlu etkisini %23 azaltmış ve 4. gündeki olumsuz etkisini de %25 artırmıştır. Kısaca Cy5'in yukarıda bahsedilen MGNP'lar üzerinde bulunması, onların sitotoksik etkilerini belirtilen maruziyet sürelerinde çok önemli derecede etkilememiş, fakat A549 hücrelerinde sitotoksikite oluşturduğundan dolayı önemli sayılabilecek sonuçlar ortaya koymuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

NP'ların biyolojik uygulamalarda ve nanotıpta kullanılmasının önemi giderek artmakta ve her geçen gün daha farklı ve yeni bulgular elde edilmektedir. Çeşitli teknik ve modifikasyonlarla NP'lar daha da iyileştirilmeye ve organizmalar için

biyoyumlu, biyobozunur ve çok fonksiyonlu hale getirilmeye çalışılmaktadır. Geliştirilen birçok NP'nin organizmalar için faydalı olup olmayacağı ise öncelikle *in vitro* koşullarda çeşitli hücre kültürü teknikleriyle denenmekte ve daha sonra *in vivo* uygulamalarla kullanılabilirliği test edilmektedir. Bu nedenle *in vivo* uygulamalara geçmeden önce NP'ların çeşitli hücre, doku ya da organlarda kullanılmasının mümkün olması için ihtiyaç duyulan temel bilgilerin *in vitro* koşullarda tamamlanması gerekmektedir. Dolayısıyla, ilk olarak hücrelerle NP ilişkisinin anlaşılması gerekmektedir. Şu ana kadar yapılan *in vitro-in vivo* NP - hücre etkileşimi çalışmaları ise, NP'ların genel olarak bazı yolları izleyebileceği yönünde bulgular edinmiştir. Örneğin, NP'lar hücre besiyeri içerisine girince besiyerindeki bazı serum proteinleri ile rastgele birtakım etkileşimlere girerek boyutları ve yükleri değişebilir, böylece serum proteinlerinin yardımıyla hücre içerisine alımları da artabilir ya da kolaylaşabilir [Giljohann ve ark., 2007]. Nitekim, çalışmamızda kullanılan NP'ların besiyeri ile etkileşime girince yüzey yüklerinin değişmesi de bu sonuçlarla benzerlik göstermiştir. NP'ların serum proteinleri ile etkileştikten sonra onların endositozla [Tsoli ve ark., 2005; Tsuji ve ark., 2006; Chithrani ve ark., 2006] ya da reseptör aracılı endositozla hücre içine alındıkları ve sitoplazmada veziküller içinde bulundukları [AshaRani ve ark., 2009] da genel olarak kabul edilen bir görüş olmuştur. NP'ların alımlarının sıcaklığa bağlı olduğunu gösterir çalışmalar da mevcuttur [Chithrani ve ark., 2006; Yehia ve ark., 2007]. Ayrıca NP'ların, hücrelerle muamele edildiğinde şu yolları izleyebileceği de kabul edilebilecek görüşler arasında sayılabilir; birincisi, NP'ların hücreye girişi ve nüklear membrana taşınması, ikincisi, NP'ların hücreye girişi ve nüklear translokasyonu; üçüncüsü ise, NP'ların hücreye girişi ve ekzositozudur. Nitekim bu çalışmamızda da, hücrelerin NP'ları alırken stabil davranmaması ve alınan NP'ları dışarı vermesi üçüncü maddeyi destekler nitelikte olup, inkübasyon zamanının da çok önemli olduğunu göstermektedir.

NP'ların hücresel alımlarını ve sitotoksitelerini etkileyen önemli bulgulardan bazıları onların şekli, boyutu, toplanmalarının oluşturduğu boyut, ortamda serum proteinlerinin varlığı/yokluğu, NP'ların yüzey özellikleri ve konsantrasyonlarıdır [Lin ve ark., 2006; Hauck ve ark., 2008]. Pozitif yüklerin de, NP'ların hücre membranına aktif olarak bağlanmaya yardım edebileceği kuvvetli ihtimaller

arasındadır (Chithrani ve ark., 2006; AshaRani ve ark., 2009; Yang ve ark., 2007). Nitekim Hauck ve arkadaşlarının (2008) Au nanoçubuklarla (nanorod) yaptığı çalışmada, yüzeyi pozitif yüklü olan Au nanoçubuklar HeLa hücreleriyle daha hızlı etkileşime girerken, negatif yüklü gruplarla kaplanmış nanoçubuklar ise daha az alınmıştır [Hauck ve ark., 2008]. Ayrıca, NP'ların alımlarını etkileyen bir başka faktör de besiyerindeki serum proteinleriyle, NP üzerine tutunan proteinlerin hücre membranına gitme rekabeti ya da NP üzerindeki CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) olabilir. Fakat şunu da belirtmek gerekir ki, birçok hücrenin belli boyutlardaki NP'ları maksimum alma eğilimi olacaktır. Örneğin Chithrani ve arkadaşları (2006), 50 nm olan Au NP'ların HeLa hücrelerinde daha fazla alındığını [Chithrani ve ark., 2006], benzer şekilde Osaki ve arkadaşları (2004) da 50 nm boyutundaki NP'ların hücreler tarafından daha iyi alınabildiğini belirtmiştir [Osaki ve ark., 2004].

Yukarıdaki bilgiler eşliğinde NP'ların hücrelerle etkileşimi araştırılırken, NP'ların çeşitli kimyasal ve biyolojik moleküllerle modifikasyonlar yapılarak yüzey özelliklerinin iyileştirilmeye çalışılması da önem kazanmıştır. Bu şekilde NP'ların hücreler tarafından seçici ya da hedeflenmiş olarak alınabilmesi [De la Fuente ve ark., 2006], aynı zamanda sitotoksik etkilerinin de en aza indirilmesi çalışmalarına daha da yoğunlaşmıştır. Çünkü NP'lar kan-beyin ya da kan-testis bariyerini de geçebilen [Borm ve Kreyling, 2004; Chen ve ark., 2003] nadir moleküllerden biridir, bu nedenle sitotoksik/genotoksik olmayacak şekilde üretilmesi (nano) tıp uygulamalarının ilk hedeflerinden biri olmuştur. Bu anlamda Chithrani ve arkadaşları (2006), NP'ların oligonükleotid, protein, şeker ve bazı ilaçlarla yapılan yüzey modifikasyonunun, NP'ların seçiciliğini ve spesifikliğini artırdığını, ayrıca hücresel alımlarını da etkilediğini bildirmiştir [Chithrani ve ark., 2006].

NP'ların spesifik yüzey modifikasyonları kullanılarak bunların hücre hedefleme özellikleri artırılabilir için [El-Sayed ve ark., 2006]; bu çalışma, GNP'ların yüzeyini glukoz/laktoz, oligonükleotid ve floresans boya ile kimyasal olarak modifiye edilerek; L929 ve A549 hücrelerinde spesifik alımların olup olmayacağını, GNP'ların sitotoksik etkisinin azalıp azalmayacağını test etmek ve hücresel

görüntüleme kalitelerini de artırmak amacıyla, GNP'ların organizmalarda güvenle kullanılabilirliğini geliştirebilmek adına yapılmıştır.

Üzerine çeşitli moleküllerin kimyasal olarak bağlandığı MGNP'lar, modifiye edilmemiş GNP'lara göre solusyonda çökme ve toplanma meyili gösterirken, modifiye edilmemiş GNP'lar daha homojen dağılmıştır. Oysa Murdock ve arkadaşları (2007) bazı kaplanmış olan NP'ların solusyonda daha dağınık halde bulunabileceğini bildirmiştir [Murdock ve ark., 2007].

Elde edilen sonuçlara göre MGNP'ların hücreler tarafından alımı değerlendirildiğinde; Konfokal mikroskop görüntüleri NP'ların hücrede endozomlar [Chithrani, ve ark., 2006] içinde olabileceğini desteklemiş ve yine bu görüntülerin bazılarında da olduğu gibi, NP'ların önce besiyeri içerisinde toplanıp, sonra hücreye alınmış olma ihtimalinin yüksek olabileceğini göstermiştir. Fakat hücre içinde yansıma veren daha büyük toplanmalar, NP dolu endozomların içeride birleşmiş olma ihtimalini de kuvvetle desteklemiştir. Ayrıca hücre içerisinden alınan bu NP ışımaları, hücrelerin floresans bir boyayla boyanmasına [Ahamed ve ark., 2008] gerek kalmadan Konfokal mikroskobu ile oldukça iyi görüntü alınabileceğini de göstermiştir. Hücrelere uygulanan NP'ların genel olarak toplanma eğiliminde olduğunu ve endozomlarda tutulduğunu bazı araştırmalar da desteklemiştir.

Carlson ve arkadaşları, (2008) farklı boyutlarda (15 nm , 30 nm, 55 nm) GNP ile yaptığı çalışmada makrofaj hücrelerinin içinde veya dışında GNP'ların mikron boyutta topluluk oluşturma meyilinde olduklarını bildirmiştir [Carlson ve ark., 2008].

Tkachenko ve arkadaşları (2004) BSA (Bovine serum albumin) ve peptid kompleksini Au NP'lara (22 nm) bağlamış ve HeLa hücreleriyle inkübe ettikten sonra 1s içerisinde NP'ların hücre içine girdiğini ve sitoplazmada toplanmalar oluşturduğunu, 2 s sonra ise çok az bir kısmının çekirdeğe girdiğini bildirmiştir. Ayrıca bazı NP'ların endozomlardan kaçabildiğini bazılarının da kaçamadığını belirtmişlerdir [Tkachenko ve ark., 2004]. Link ve El Sayed (2003) de hidrofilik

NP'ların fagositlerden, retikülo-endotel sistemlerden ve makrofajlardan kaçabileceğini bildirmiştir [Link ve El Sayed, 2003].

Brigger ve arkadaşları (2002) ise, hidrofob yüzeye sahip olan NP'ların karaciğer, akciğer ve böbreğe hızlı bir şekilde gitme eğiliminde olduğunu tesbit etmiştir [Brigger ve ark., 2002]. Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan Cy5, hidrofobik yapıya sahip olduğu için ve laktoz/ssDNA ile birlikte GNP üzerinde bulunduğu, bu NP'ların A549 hücreleri tarafından çok alınmasını sağladığı için, Cy5'in *in vivo* olarak kanserli doku ya da organlara taşınarak teşhis, tedavi ve görüntüleme imkanı sunması sağlanabilir.

Bu çalışmada MGNP'lar ve modifiye olmamış GNP'lar hücrelerde farklı şekillerde dağılmıştır. Ahamed ve ark., (2008) da polisakkaritle kaplanmış ve kaplanmamış GNP'ları fare embriyonik fibroblast hücreleri ve fare embriyonik kök hücreleri ile muamele ettiklerinde, bu NP'ların hücrelerde farklı dağılımlar gösterdiğini belirtmiştir [Ahamed ve ark., 2008]. Ayrıca bazı araştırmacılar da NP'ların hücre içinde membranlı yapılara lokalize olabileceğini bildirmiştir. [Tsoli ve ark., 2005; Shukla ve ark., 2005; Connor ve ark., 2005; Chithrani ve ark., 2006]. Bu çalışmada, glukozla veya laktozla MGNP'lar, tek başına GNP'lar ile kıyaslandığında, tıpkı glukoz bağlanmış Au NP'lar gibi [Kong ve ark., 2008] kanserli hücreler tarafından daha çok alınmıştır. Bu durum, karbohidrat ile MGNP'ların, A549 hücrelerinde membran karbohidrat taşıyıcısı (transporter) olarak görev yapan moleküller ile alınmış olabileceğini düşündürülebilir [Aloj ve ark., 1999]. A549 hücrelerinde laktoz MGNP'lar, glukoz MGNP'lardan daha fazla alınmıştır. Bu NP'ların farklı oranlarda alınmasının sebebi, GNP yüzeyine bağlanan karbohidratların farklı büyüklükte olmalarından kaynaklanabilir, çünkü glukoz monosakkarit, laktoz ise disakkarittir. Muhtemelen GNP'ların yüzeyindeki laktoz, besiyeri proteinleriyle daha iyi etkileşime girerek hücrenin daha hızlı alabileceği kompleksler oluşturuyor ya da NP yüzeyinden dışarı doğru uzanarak hücre yüzeyi reseptörleriyle [Lorenz ve ark., 2006] daha hızlı ve rekabetçi bir etkileşime girerek, alımı seçici ve hızlı hale getiriyor olabilir. A549 hücrelerinin disakkarit olan laktoz ile MGNP'ları daha hızlı almasının diğer bir açıklaması ise kanserli hücrelerin metabolizması gereği daha fazla şeker

ihtiyacı duyması ya da artan glikoliz olayı olabilir [Warburg ve ark., 1924; Baggetto, 1992]. Bu sonuç, kanserli hücrelerle-NP etkileşiminin anlaşılmasında, karbohidratlarla modifiye edilen NP'ların uygulanmasının daha uygun olabileceği fikrini kuvvetlendirmiştir. Dolayısıyla laktozun daha hızlı alınması, kanserli hücrelere uygulanabilecek hedefleme çalışmalarında önemli bir rol oynayabilir. Örneğin NP'lara kanser hücrelerinin çok tükettiği şeker türevi ve öldürücü bir zehirin birlikte bağlanması, kanser hücrelerinin hedeflenmiş olarak öldürülmesinde kullanılabilir (Truva atı modeli).

Hücrelere uyguladığımız NP'ların alım oranlarını etkileyen önemli bir faktör de oligonükleotidlerin GNP'lar üzerindeki varlığı olmuştur. Çünkü, oligonükleotidlerin GNP'lar üzerinde tek başına veya karbohidratlarla birlikte bulunması, onların L929 hücreleri tarafından daha az alınmasına sebep olmuştur. Bu durum, NP'ların üzerindeki oligonükleotidler gibi çok yüke sahip olan grupların hücre alımları engellemesinden [Giljohann ve ark., 2007] ya da oligonükleotidlerin GNP'lar üzerine az immobilize olma olasılığından kaynaklanabilir [Hsin ve ark., 2008]. Oligonükleotidlerin GNP'lar üzerindeki varlığı, A549 hücrelerinin bu NP'ları alımına L929 hücrelerine göre farklı etki etmiştir. Çünkü, az farkla da olsa bazısının (Ag ve Ag/Glu) alımını belli inkübasyon sürelerinde artırmıştır. Bu da kanserli hücrelere uygulanacak gen çalışmaları için optimize edilerek ileri uygulamalara zemin oluşturması açısından önemli bir sonuç olabilir. Çünkü bu çalışmada hücrelere sadece tek bir doz uygulanmıştır ve bu dozun konsantrasyonu ayarlanarak, hatta GNP'lar üzerine eklenen oligonükleotid miktarı [Giljohann ve ark., 2007] da ayarlanarak, bu NP'ların kanserli hücreler tarafından daha iyi ya da seçici olarak alınması sağlanabilir.

NP'ların hücre içindeki durumlarında önemli bir nokta ise alınan NP'ların hücre içerisinde tutulma süreleri olmuştur. Örneğin, GNP'lar A549 hücreleri tarafından alındıktan 1 saat sonra dışarı verilirken, karbohidrat MGNP'lar 6 saat boyunca alınmaya devam etmiştir. Böylece karbohidrat MGNP'ların kullanımıyla kanserli hücrelerde NP'ların daha uzun süre tutulmaları sağlanarak, kanserli hücrelere NP aracılığıyla etkili bir teşhis, görüntüleme ya da fototermal terapiye dayanan tedavi

imkanları kazandırılabilir. Bu tür uygulamalar da hücreye özgü akıllı moleküllerin üretimine temel oluşturabilir. Sonuç olarak Şekil 4.3'den de anlaşılacağı üzere, 1 saat gibi kısa sürede GNP ile sonuç alınması istenen hücre çalışmalarında; L929 hücreleri için glukoz MGNP'lar ideal görünüyor iken, A549 hücrelerinde ise laktoz MGNP'lar ideal görünmektedir. Ayrıca hücrelere uyguladığımız NP'ların alımları, L929 hücrelerinde ilk 6 saat sonunda yavaşlamış ya da durmuşken, A549 hücrelerinde çok az da olsa devam etmiştir. Dolayısıyla L929 hücrelerinin NP'ları alım süresi için ilk 1 saatin, A549 hücreleri için de 6 saatin uygun zaman dilimi olduğu görülmüştür. Bu zaman dilimleri ise hücre çeşidi, NP'ların yapısı ve hücrelere olan ilgisine göre değişmektedir. Örneğin Huff ve arkadaşları (2007) ilk 1 saatin NP alımının hızı ve oranı bakımından önemli bir zaman dilimi olduğunu tesbit etmiştir [Huff ve ark., 2007].

Pernodet ve arkadaşları (2006), Au NP'lar ile yapmış olduğu çalışmada, bu NP'ların insan dermal fibroblast hücreleri tarafından alımının, inkübasyondan 30 dk. sonra başladığını ve muhtemel değişikliklerin de bu sırada olabileceğini bildirirken [Pernodet ve ark., 2006]; Chithrani ve arkadaşları (2006) ise değişik boyutlardaki Au NP'lar ile yaptığı çalışmada inkübasyon süresinin ilk 2 saatinde HeLa hücreleri tarafından bu NP'ların alımının daha hızlı olduğunu ve bu çalışmamızda da genel olarak gözlemlendiği gibi 4. ve 7. saatte aşamalı olarak alımın yavaşladığını belirtmiştir [Chithrani ve ark., 2006]. Dolayısıyla NP'ların hücreler tarafından alınma zamanı değerlendirildiğinde, alım oranının NP ve hücre çeşidine bağlı olduğu ve değişik maruziyet süreleri içinde ortalama ilk 4-5 saatin ideal bir inkübasyon zamanı olduğu sonucu çıkarılabilir.

Hücrelere uygulanan NP'lardan Ag/glukoz/ssDNA ve Ag/laktoz/ssDNA, L929 hücrelerinde, Pernadet ve arkadaşlarının (2006) da bildirdiği gibi, hücrelerde morfolojik değişikliklere sebep olmuştur [Pernadet ve ark., 2006]. Hücrelerde görülen morfolojik değişikliklerin ise, apoptoz ya da toksisitenin göstergelerinden biri olduğu düşünülmektedir [Hussain ve ark., 2005; AshaRani ve ark., 2009]. Fakat L929 hücrelerindeki bu morfolojik değişikliğin, bu sebeplerden kaynaklanan morfolojik değişiklikle alakalı olmadığı kuvvetli bir ihtimaldir, çünkü bu hücrelerde

belirtilen NP'ların toksik etki oluşturmadağı deneysel bulgular kısmında belirtilmiştir. Değişik hücrelere uygulanan NP'ların çeşidi aynı olsa da, boyutlarının farklı olması hücrelerde morfolojik etkiyi de farklı kılabilmektedir. Örneğin Asharani ve arkadaşlarının (2009) 6-20 nm GNP'lar ile yapmış olduğı çalışmada, GNP'lar sağlıklı hücrelerde morfoloji değişikliğine sebep olurken [Asharani ve ark., 2009], bu çalışmamızda kullanılan GNP'lar (50 nm) sağlıklı hücrelerde (L929) morfoloji değişikliğine sebep olmamıştır.

Carlson ve arkadaşları (2008) da 55 nm GNP'lar ile makrofaj hücrelerini *in vitro* muamele etmişler ve bu NP'ların sitoplazmada oldukça büyük toplanmalar oluşturduğunu, az da olsa hücrelerde morfolojik değişikliğe sebep olduğunu bildirmiştir [Carlson ve ark., 2008].

Patra ve arkadaşları (2007) ise Au NP'ların çekirdeğe gidebildiklerini ve çekirdeğin de morfolojisini değiştirdiklerini bildirmişlerdir [Patra ve ark., 2007]. Bu çalışmadaki MGNP'ların sebep olduğı morfoloji değişiklikleri ise, hücre iskeleti fonksiyonlarında oluşan hasarlardan, NP'ların sitoplazmada birtakım proteinlerin sentezlenmesini tetiklemesinden veya başka metabolik adaptasyonlardan kaynaklanmış olabilir.

Hücrelerle muamele edilen NP'ların hücre içindeki durumu ya da etkileri çeşitli yöntemlerle belirlenebilmektedir. NP'ların hücre içinde veya dışında oluşturdukları toplanmalar ve bunların boyutları genellikle TEM ile teşhis edilse de, NP'lara tutturulmuş çeşitli floresans moleküller yardımıyla NP'ların görüntülenmeleri ve bunlardan özel spektrumların alınmasıyla, hücre içindeki etkilerini tesbit etmek de çok kısa bir sürede oldukça tercih edilen yöntemler olmuştur. Bu amaçla kullanılan spektroskopik yöntemlerde Raman Spektroskopisi, NP'ların YZRS özelliğinden dolayı şu an kullanılmaya çalışılmaktadır [Kneipp ve ark., 2009; Yehia ve ark., 2007]. Yarı iletken nanokristal yüzeyler de DNA [Chakrabarti ve Klibanov, 2003], peptid [Akerman ve ark., 2002] ve protein [Mattoussi ve ark., 2000] ile fonksiyonlaştırılarak biyolojik ajan ya da prob amacıyla ve hücre içi organellerin veya dokuların boyanması amacıyla kullanılmıştır [Waston ve ark., 2003; Wu ve ark., 2002]. Bu

çalışmada MGNP'ların üzerine ilaveten kimyasal olarak tutturulan Cy5 de hem hücre içi görüntülemenin kalitesini artırmış hem de NP'ların farklı oranlarda alınmasına sebep olmuştur. Örneğin L929 hücreleri bu NP'ları en çok ilk bir saat içerisinde almış ve en fazla Ag/Glu/ssDNA/Cy5 NP'larını tercih etmiştir. A549 hücreleri ise tüm maruziyet sürelerinde en fazla/hızlı Ag/Lak/ssDNA/Cy5 NP'larını almıştır. Ayrıca hazırlanan bu Cy5 ile MGNP'ların A549 hücrelerinde daha uzun süre alıkonulabildiği görülmüştür. Özetle Cy5'in MGNP'lar üzerinde bulunması, L929 hücrelerinin değişik maruziyet sürelerinde bu NP'ları almasını etkilemiş, alım davranışlarında da küçük değişikliklere sebep olmuştur. A549 hücrelerinde ise, MGNP'ların alım davranışlarını değiştirmezken, alım miktarlarını önemli ölçüde etkilemiştir, fakat daha önce çok alınan Ag/Lak/ssDNA'nın alımını çok az farkla artırmıştır (24 s maruziyette).

NP'ların yüzey yüklerinin, hücresel alımları etkilediği de bu çalışmadaki sonuçlar ile desteklenmiştir. Lesniak ve arkadaşları (2005) Gümüş/dendrimer nanokompozitlerde polikationik ve polianyonik olanların hücrelere aynı oranda alınırken, nötr olanların daha düşük alındığını belirtmiş, ayrıca pozitif ve negatif olanların hücre içindeki floresanslarının, nötr olanlara göre daha iyi olduğunu bildirmiştir [Lesniak ve ark., 2005]. Bu çalışmada Cy5 ile MGNP'ların görüntüleme kalitesini artırması da onların negatif yüklerinden kaynaklanmış olabilir. Fakat burada GNP'ların yüzey plazmonlarının rolünü hatırlamak gerekir. Çünkü bu çalışmada GNP'ların sitoplazmadan gelen ışımaları, Au NP ile hücre içinden alınan ışımalara [Patra ve ark., 2007] göre daha net olmuştur. Hücre içindeki NP ışımasının netliğini belirleyen bir başka faktör ise NP'ların oluşturduğu toplanmaların büyüklüğüdür. Çünkü büyük NP'lar sitoplazmaya daha zor geçse de küçük NP'lara göre daha güçlü ışıma verirler. Bu çalışmada, oluşan NP toplanmasının büyüklüğüne bağlı olarak ışıma netliğinin değişmesi de bu durumu destekler niteliktedir. Böylece kanser hücrelerinin spesifik bir şekilde Cy5 ile MGNP alımlarına paralel olarak daha iyi görüntülenmesi mümkün olabilecektir.

NP'ların yüzeyi, hücre içine girince veya hücre membranına tutununca farklı dielektrik çevreye sahip olacakları için NP'ların absorbans dalga boyları kayar [El-

Sayed ve ark., 2005], böylece hücre içindeki NP spektrumunun alınabilmesine de imkan sağlar. Cy5 ile MGNP'lar kullanılarak da hücre içi farklı bölge veya yapıların spektroskopik (Raman Spektroskopisi ile) olarak tayini yapılabilir. Çünkü Cy5 boyası Raman aktif bir boyadır ve gümüş kolloidler de görünür bölge uyarılma dalga boylarında yüksek YZRS aktivitesine sahiptir [Philip ve ark., 2008].

NP'ların alımlarını etkileyen faktörlerden sonra gelen diğer en önemli hususlardan biri de onların yüzey özelliklerine bağlı olarak oluşturduğu genotoksik ya da sitotoksik etkileridir. Dolayısıyla GNP'ların da farklı yüzey kimyası genotoksisitede ve sitotoksisitede değişik sonuçlar doğurabilir [Ahamed ve ark., 2008]. Ayrıca NP'ların sitotoksisite potansiyeli hücre çeşidine göre değişebileceğinden, birçok hücrede aynı olabileceği gibi farklı da olabilir. Örneğin gümüş/dendrimer nanokompozit ve GNP, değişik hücrelerde aynı derecede toksik etki oluşturmuştur [Lesniak ve ark., 2005]. Fakat, Au NP'lar A549 hücrelerinde toksik iken BHK21 hücrelerinde toksik olmamıştır [Patra ve ark., 2007]. Nitekim MGNP'lar da benzer şekilde L929 ve A549 hücrelerinde değişik sitotoksisite değerleri göstermiştir. Bu çalışmada karbohidratlarla MGNP'lar ve modifiye olmamış GNP'lar, uygulanan tek dozda, 4 gün maruziyette L929 hücrelerine toksik etki yapmamış, sadece hücre canlılığını değişik maruziyet sürelerinde değiştirmiştir. Bu sonuç modifiye ve modifiye olmamış GNP'ların sağlıklı hücrelerde bu konsantrasyonda kullanılabileceğini öngörmüştür. Benzer şekilde makrofaj hücreleri ile 55 nm GNP'lar muamele edildiğinde, GNP'ların toksik etki göstermediği ve 55 nm GNP'ların mitokondri membran potansiyelini en az etkileyen boyut olduğu da bildirilmiştir [Carlson ve ark., 2008].

De la Fuente ve arkadaşları (2007) ise insan fibroblast hücrelerini glukoz ve laktoz bağlanmış manyetik Au NP'lar ile muamele etmiş ve önemli toksisite oluşmadığını bildirmiştir [De la Fuente ve ark., 2007]. Bu sonuçlar, fare ve insan fibroblastlarında monosakkarit ve disakkaritle modifiye edilmiş Au ve GNP'ların toksisite oluşturmamasından dolayı, karbohidrat modifiyesinin, çeşitli NP'larda uygulanabilirliğine öncülük edebilmesi açısından önemli görülmüştür.

Fakat 16-20 nm nişasta ile kaplanmış GNP'ların akciğer fibroblastlarında toksisiteye sebep olduğu belirtilmiştir [AshaRani ve ark., 2009]. Chi ve arkadaşları (2008) da GNP ile CPB deterjanı kompleksinin, DNA ile elektrostatik ve hidrofobik etkileşime girerek genotoksik hasarın artabileceğini bildirmişlerdir [Chi ve ark., 2008]. Ayrıca 15 nm ve 100 nm GNP'ların rat karaciğer hücrelerinde morfolojik değişikliği; 6 s maruziyette ROS üretimine; ve LDH salınımına sebep olduğu; mitokondriyal membran potansiyelini ve GSH'ı (glutatyon) azaltabileceği de bildirilmiştir. Üstelik GNP'ların aynı boyutta olmasına rağmen, değişik hücrelerde daha fazla toksik etki oluşturabileceği ve böylece NP'ların hücrelerin hassasiyetini ortaya koyacağı da ifade edilmiştir [Hussain ve ark., 2005; Stolle ve ark., 2005].

GNP'ların farklı yüzey kaplamaları ve konsantrasyonları da farklı toksisite oluşturabilmektedir. Örneğin Ahamed ve arkadaşları (2008), polisakkarit kaplı GNP'ların (25 nm) fare embriyonik fibroblast ve kök hücrelerinde (50µg/ml konsantrasyonda, 24 saat maruziyette), kaplanmamış olanlara göre daha ciddi hücre hasarı oluşturduğunu bildirmiştir [Ahamed ve ark., 2008]. Oysa çalışmamızda kullanılan monosakkarit ve disakkarit MGNP'lar (50 nm) L929 hücrelerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Böylece GNP konsantrasyonunun, yüzey modifikasyonunun ve boyutunun hücre toksisitesinde ne kadar önemli olduğu desteklenmiştir. Dolayısıyla GNP'ların glukoz veya laktozla modifiye edilmiş halleri, sağlıklı hücrelere uygulanabilecek uygun bir NP modeli olabileceğini göstermiştir. Ayrıca bu sonuçlar, GNP'ların toksik olduğunu belirten birkaç çalışmanın [Hussain ve ark., 2005; Carlson ve ark., 2008, Ahamed ve ark., 2008] aksine, L929 hücrelerinde toksik olmadığı için *in vivo* uygulamalarda tercih edilebilir NP'lar arasına girebileceğini de desteklemiştir. Görülüyor ki hazırlanan GNP'ların bazıları tek başına veya karbohidratlarla modifiye edildiğinde, toksik etkiye sebep olabilecek bir yüzey ya da yapı oluşturmamıştır. Ya da endozomlarda olabilecekleri için sitoplazmadaki toksisite mekanizmasını uyarıcı etki yapmamış olabilirler. Bu nedenle NP'ların endozom içindeki davranışını belirlemek ya da serbest stoplazmik dolaşımını araştırmak gerekmektedir.

A549 hücrelerinde karbohidratla MGNP'ların sitotoksik etkileri, modifiye edildiği moleküle ve zamana bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. Bu değişkenlik de *in vitro* sitotoksiste çalışmalarında bir çok değişkenle açıklanabilir [Hsin ve ark., 2008; Park ve ark., 2007]. Kısaca, modifiye olmamış GNP'lar L929 hücrelerinde hiç toksik etkiye sebep olmazken, A549 hücrelerinde %20 oranda da olsa toksisite göstermiştir. Bu sonuç, kanserli hücelere özgü toksik moleküllerin oluşturulmasına ya da bu olağan toksisiteye ek olarak fototermal terapinin geliştirilmesine de katkıda bulunabilmesi açısından önemli bir bulgu olmuştur. Çünkü NP'lar aracılığıyla fototermal terapi daha da etkili toksisite gösterebilir [Yang ve ark., 2007]. Ayrıca Khan ve arkadaşlarının (2007) bildirdiğine göre kanser (HeLa) hücrelerine Au NP'lar uygulandığında herhangi bir sitotoksiste görülmemiştir (Khan ve ark., 2007]. Dolayısıyla GNP'ların da kanserli hücrelerde Au'a alternatif olarak kullanılmasının mümkün olabileceği ortaya çıkmıştır.

A549 hücrelerinde görülen önemli bir bulgu da, GNP üzerine kimyasal olarak bağlanan laktozun, bu hücrelerde GNP'ların sitotoksitesini azaltmasıdır ki bu durum çeşitli yüzey modifikasyonları ile sitotoksik özelliğe sahip NP'ların toksisitesinin azaltılabileceğini de desteklemiştir. Nitekim Parab ve arkadaşları da (2009) Au nano çubukların yüzeyini PSS (poly-styrenesulfonate) ile kaplamışlar, insan diş eti epitel hücreleri ve ağız kanseri hücreleriyle muamele etmişlerdir. PSS ile kaplanmış veya kaplanmamış nanoçubukların her ikisinin de hücre morfolojisini değiştirdiğini, aynı zamanda PSS kaplamayla nano çubukların hücre alımlarının kolaylaştığını ve hücre canlılığını da önemli şekilde artırdığını bildirmişlerdir [Parab ve ark., 2009].

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, AshaRani ve arkadaşlarının (2009) yapmış olduğu, nişasta kaplanmış GNP'ların akciğer fibroblast ve insan glioblastoma hücrelerinde önemli bir sitotoksiste oluşturmaması; ve karbohidratla modifiye edilmiş Au NP'ların da MCF-7 göğüs kanseri ve prostat kanseri hücrelerinde önemli toksisite oluşturmaması [Kong ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2008] sonuçlarıyla genel olarak benzerlik göstermiştir [AshaRani ve ark., (2009)]. Fakat nişasta bir polisakkarit olduğundan, kullanılan NP'ların kimyasal özellikleri ve hücre hatları da bu çalışmada

kullanılanlardan farklı olduğu için bu tür sonuçları doğrudan ilişkilendirmek yerine bu çalışmaları bir veri bankası olarak değerlendirmek daha yerinde olacaktır. Sonuç olarak modifikasyonlarla NP'ların toksik etkisinin azaltılabileceği; ve laktoz MGNP'ların kanserli hücrelerin stoplazmik mekanizmalarının anlaşılmasına imkan sağlayabileceği, GNP ve glukoz MGNP'ların da kanserli hücreleri etkili bir şekilde öldürme adına yeni yapılacak çalışmalara ön basamak oluşturabileceği söylenebilir.

GNP'ların üzerinde oligonükleotidlerin tek başına veya karbohidratlarla bulunması, L929 hücrelerinde, önemli bir değişikliğe veya sitotoksositeye sebep olmamış, sadece farklı zamanlarda küçük değişikliklere sebep olmuştur. Bu durum, hazırlanan bu NP'ların bu dozda kullanıldığında sağlıklı hücreler açısından uygun bir doz olabileceğini göstermektedir. Fakat oligonükleotidlerin GNP'lar üzerinde varlığı A549 hücrelerinde önemli sitotoksik değişimler oluşturmıştır. Özellikle GNP'lar, A549 hücrelerinde toksik etki gösterir iken, üzerine oligonükleotid bağlanması, onun toksik etkisini önemli derecede azaltmıştır. Dolayısıyla oligonükleotid yüklü NP'lar transfeksiyon ve genetik düzenlemeyi etkileyebileceğinden [Rosi ve ark., 2006] GNP'lar da genetik düzenlemelere [AshaRani ve ark., 2009; Ahamed ve ark., 2008] etki edebilir. Böylece GNP'ların üzerine eklenecek olan DNA'ların boyu, yapısı ve baz dizilimi de ayarlanarak toksik etkisi olan NP'ların toksisitesinin azaltılmasında kullanılabileceği de mümkün görünmektedir.

Bu çalışmada, hücrelere uygulanan MGNP'ların hücresel alım oranlarıyla sitotoksiteleri arasında doğrudan bir ilişki olmadığı da tesbit edilmiştir. Örneğin 24 s maruziyette, NP'ların A549 hücreleri tarafından alım oranı ve bu orana bağlı olarak hücre çoğalmasının inhibe edilmesi arasında paralel bir ilişki görülmemiştir. Bu durum ilginç bir şekilde Zhang ve arkadaşlarının (2008) belirttiğine göre radyasyona dayalı prostat kanseri hücre ölümünde de benzer şekilde görülmüştür. Çünkü glukoz bağlanmış Au NP'lar prostat kanseri hücreleri tarafından çok alınmasına rağmen, NP konsantrasyonuna bağlı olarak radyasyona dayalı tümör ölümü artmamıştır. Fakat NP'ların üzerine glukoz bağlanması fototermal terapiyi daha hassas hale getirmiştir [Zhang ve ark., 2008]. Dolayısıyla bu durum MGNP'lar açısından da uygulanabilir bir özellik olabilir, çünkü bu çalışmada A549 hücreleri laktoz MGNP'lara daha fazla

ilgi göstermiştir. Hatta bu hücrelere radyasyonla muamele edildiğinde GNP'ların daha etkili yüzey plazmonu etkisinden dolayı daha iyi inhibisyon oluşturacağı da yüksek ihtimaller arasındadır. Fakat, radyasyon destekli tedaviye alternatif olarak kendiliğinden toksik olabilecek NP'ların oluşturulması daha tercih edilir bir durum olduğu için, öncelikli hedefler bu yönde olmalıdır. Çünkü çeşitli hücrelere uygulanan NP'ların konsantrasyonu, diğer maddelerde de olduğu gibi toksik etki açısından çok önemli bir faktördür ve NP'ların uygun konsantrasyonları denenerek, yukarıda da bahsedilen yüzey kimyası özelliklerinin de etkisi göz önünde bulundurularak uygun bir NP dizaynı ile başka müdahalelere gerek kalmadan hedef hücreler yok edilebilir. Üstelik burada NP'ların alım oranlarında, inkübasyon zamanının çok önemli bir faktör olduğunu da unutmamak gerekir.

NP'ların konsantrasyon etkisi hücre çeşitlerine göre değişebileceğinden dolayı, konsantrasyona bağlı toksik etki bazen de artabilir. Örneğin Asharani ve arkadaşlarının (2009) GNP'lar ile Comet testine (genotoksisite testi) dayanarak yaptıkları bir toksisite çalışmasında, kanserli hücrelerdeki NP'ların konsantrasyonu arttıkça DNA hasarının da arttığını bildirmiştir [Asharani ve ark., (2009)].

Carlson ve arkadaşları (2008) da farklı boyutlardaki (15 nm, 30 nm, 55 nm) GNP'lar ile yaptıkları çalışmada, makrofaj hücreleri ile muamele edilen NP'ların hücrelerin etrafında toplandığını ve sitotoksitesinin de konsantrasyona bağlı olduğunu bildirmiştir [Carlson ve ark., 2008].

Henüz, kanserli hücrelerin içine gönderilen NP'lar aracılığıyla fototermal terapi çalışmalarının dışında, tam olarak etkili bir uygulamanın bulunamaması, şu an ki çalışmaları, sağlıklı hücrelere zarar vermeyen, kanserli hücreler tarafından da spesifik olarak alınabilen ve sadece onlarda toksik etki yapabilecek, daha fonksiyonlu NP'ların geliştirilmesine odaklanmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan MGNP'lar da bu anlamda ümit vaat edici sonuçların olabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada, etkili yüzey plazmonu özelliğinden dolayı birçok alanda kullanılma imkanı olan GNP'lar tercih edilmiştir. GNP'ların yüzeyine karbohidrat (glukoz/laktoz), oligonükleotid ve floresans bir boya kimyasal olarak tek tek ve çeşitli kombinasyonlarla bağlanmıştır. Böylece bu NP'ların L929 ve A549 hücreleri tarafından seçici olarak alınmasını sağlamak ve bunların stoplazmik yerleşimlerini görmek hedeflenmiştir. Aynı zamanda sağlıklı hücelere toksik olmayan fakat kanserli hücreler için kendiliğinden toksik olabilecek NP'ların geliştirilmesi ve iyi bir hücre içi görüntülemesi de hedeflenmiştir. Sonuç olarak, hazırlanan bu GNP'ların hemen hemen hepsi için ayrı ayrı ideal bir alım zamanı olduğu görülmüştür. Fakat A549 hücrelerinde Ag/laktozun kısa bir sürede diğer NP çeşitlerine ve L929 hücrelerine oranla önemli bir farkla alınması, A549 hücreleri için hedeflediğimiz seçici alımı göstermiştir. Dolayısıyla NP'ların hücreler tarafından maksimum ve seçici alımlarının sağlanabilmesi için, NP'lar amaca uygun şekilde dizayn edilmeli ya da geliştirilmeli, inkübasyon süreleri de detaylı şekilde ayarlanarak optimize edilmelidir. Hazırladığımız NP'ların L929 hücrelerine toksik olmayıp A549 hücrelerine toksik olması da, NP'ların seçici ve kendiliğinden toksisite oluşturabilecek kapasitesinin geliştirilebileceği hedefimizi kısmen yerine getirmiştir. Bu nedenle hücelere toksik özellikte olan NP'lar çeşitli hedefleme ve modifikasyon işlemleriyle kanserli hücelere özgü hale getirilerek, uygun konsantrasyonları da optimize edilerek, NP aracılığıyla kontrollü hücre ölümü çalışmaları yoğunlaştırılmalıdır. Bu çalışmada Cy5 ile MGNP'ların yoğun bir şekilde hücrelerde toplanması, fototermal terapi için bu NP'ların ideal NP'lar olabileceğini de ortaya çıkarmıştır. Çünkü fotodinamik terapide foto-duyarlı yapılar 700 nm'den küçük dalga boylu ışıkları absorbladığı ve bunun da deride sadece birkaç mm penetrasyon sağladığı belirtilmektedir. Böylece fotodinamik terapinin yüzeylere uygulamada ve hasta dokulara seçici olarak akümülyasyon olayında sınırlı kaldığı görülür. Bu nedenle bu NP'lar görüntülemeye olduğu kadar tedavide de kullanılabilir. Çünkü GNP'lar, hücre ve dokular için daha az zararlı olan yakın infrared bölge ışığını absorblayabilir [Chatterjee ve ark., 2008]. GNP'ların hücre içinde büyük toplanmalar oluşturması, daha fazla ışıının ısı enerjisine dönüşmesini sağlayarak hücre ölümlerini de daha etkili kılabilir. Ayrıca Cy5 ile MGNP'lar, üzerinde Raman aktif olan molekül (Cy5) taşımasından ve hücre içinde yeterince büyük toplanmalar oluşturmasından dolayı,

optimize edilerek *in vitro-in vivo* hücresel YZRS'de de kullanılabilir. Sonuç olarak, bu verilerin ışığı altında, sentezlenen değişik yüzey özelliklerine sahip GNP'ların, daha iyi geliştirilmesi, hücre uygulamalarının daha fazla genişletilmesi ve bu NP'ların nanobiyoteknolojide uygulamalarının artırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Hong, Y., "DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 233: 404–410 (2008).
- Akerman, M.E., Chan, W.C.W., Laakkonen, P., Bhatia, S.N., Ruoslahti, E., "Nanocrystal targeting in vivo", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 12617–12621 (2002).
- Aloj, L., Caraco, C., Jagoda, E., Eckelman, W., Neumann, R.D., "Glut-1 and hexokinase expression: relationship with 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake in A431 and T47D cells in culture", *Cancer Research*, 59 (18): 4709–4714 (1999).
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M., "Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236: 310–318 (2009).
- AshaRani, P.V., Mun, L.K.G., Hande, P.M., Valiyaveetil, S., "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells", *American Chemical Society Nano*, 3 (2): 279–290 (2009).
- Aslan, K., Lakowicz, J.R., Geddesa, C.D., "Nanogold-plasmon-resonance-based glucose sensing", *Analytical Biochemistry*, 330: 145–155 (2004).
- Baggetto, L.G., "Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells", *Biochimie*, 74 (11): 959–974 (1992).
- Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D.J., Shah, S.I., "Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles", *Journal Nanoscience and Nanotechnology*, 5: 244–249 (2005).
- Barrientos, A.G., de la Fuente, M.J., Rojas, T.C., Fernandez, A., Penades, S., "Gold glyconanoparticles: Synthetic polyvalent ligands mimicking. glycocalyx-like surfaces as tools for glycobiological studies", *Chemistry European Journal*, 9: 1909–1921 (2003).
- Bermudez, E., Mangum, J.B., Wong, B.A., Asgharian, B., Hext, P.M., Warheit, D.B., Everitt, J.I., "Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles", *Toxicological Sciences*, 77: 347–357 (2004).
- Berry, C.C., Wells, S., Charles, S., Curtis, A.S.G., "Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: Influence on fibroblasts in vitro", *Biomaterials*, 24: 4551–4557 (2003).
- Bethune, D.S., Kiang, C.H., de Vries, M.S., Gorman, G., Savoy, R., Vazquez, J., Beyers, R., "Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls", *Nature*, 363: 605–607 (1993).

- Borm, P.J. And Kreyling, W., “Toxicological hazards of inhaled nanoparticles potential implications for drug delivery”, *Journal Nanoscience and Nanotechnology.*, 4: 521–531 (2004).
- Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P., “Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis”, *Advanced Drug Delivery.*, 54: 631–51 (2002).
- Brown, S.C., Kamal, M., Nasreen, A., Baumuratov, A., Sharma, P., Antony, V.B., Moudgil, B.M., “Influence of shape, adhesion and simulated lung mechanics on amorphous silica nanoparticle toxicity”, *Advanced Powder Technology.*, 18 (1): 69–79 (2007).
- Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., Stolle, B.L.K., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J., “Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species”, *Journal of Physical Chemistry B.*, 112 (43): 13608-13619 (2008).
- Chan, G.H., Zhao, J., Schatz, G.C., Van Duyne, R.P., “Localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular Aluminum nanoparticles”, *The Journal of Physical Chemistry C.*, 112 (36): 13958–13963 (2008).
- Charkrabarti, R. And Klibanov, A.M., “Nanocrystals modified with peptide nucleic acids (PNAs) for selective self-assembly and DNA detection”, *Journal American Chemical Society.*, 125: 12531–12540 (2003).
- Chatterjee, D.K., Fong, L.S., Zhang, Y., “Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm”, *Advanced Drug Delivery.*, 60 (15): 1627-1637 (2008).
- Chen, J., Han, C.M., Lin, X.W., Tang, Z.J., Su, S.J., “Effect of silver nanoparticle dressing on second degree burn wound”, *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.*, 44: 50–52 (2006).
- Chen, M.C., Tsai, S.D., Chen, M.R., Ou, S.Y., Li, W.H., Lee, K.C., “Effect of silver-nanoparticle aggregation on surface-enhanced Raman scattering from benzoic acid”, *Physical Review B.*, 51: 4507-4515 (1995).
- Chen, Y., Ji, T. And Rosenzweig, Z., “Synthesis of glyconanospheres containing luminescent CdSe–ZnS Quantum dots”, *Nano Letters.*, 3 (5): 581-584 (2003).
- Chen, Y., Xue, Z., Zheng, D., Xia, K., Zhao, Y., Liu, T., Long, Z., Xia, J., “Sodium chloride modified silica nanoparticles as a non-viral vector with a high efficiency of DNA transfer into cells”, *Current Gene Therapy.*, 3: 273–279 (2003).
- Chi, Z., Liu, R., Zhao, L., Qin, P., Pan, X., Sun, F., Hao, X., “A new strategy to probe the genotoxicity of silver nanoparticles combined with cetylpyridine bromide”,

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 72 (3): 577-581 (2008).

Chien, S.F., Chen, S.H., Lin, C.T., “Nanomaterials enhanced gene expression in yeast cells”, *Research Article, Journal of Nanomaterials.*, 1-9 (2008).

Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C., “Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells”, *Nano Letters.*, 6 (4): 662-668 (2006).

Connor, E.E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C.J., Wyatt, M.D., “Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity”, *Small.*, 1: 325–327 (2005).

Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A., Cory, J.G., "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture", *Cancer communications.*, 3 (7): 207–212 (1991).

Culha, M., Adiguzel, A., Yazici, M.M., Kahraman, M., Sahin, F., Gulluce, M., “Characterization of thermophilic bacteria using surface-enhanced Raman scattering”, *Applied Spectroscopy.*, 62 (11): 1226-1232 (2008).

Curtis, J., Greenberg, M., Kester, J., Phillips, S., Krieger, G., “Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians”, *Toxicological Sciences.*, 25 (4): 245–260 (2006).

Deckers, S.A., Brun, E., Gouget, B., Carrière, M., Sicard-Roselli C., “Impact of gold nanoparticles combined to X-Ray irradiation on bacteria”, *Gold Bulletin.*, 41 (2): 187-194 (2008).

De la Fuente, J.M., Alcántara, D., Soledad, P., “Cell response to magnetic glyconanoparticles: “Does the carbohydrate matter?””, *IEEE Transactions on Nanobioscience.*, 6 (4): 275-281 (2007).

De la Fuente, J.M., Berry, C.C., Riehle, M.O., Curtis, A.S.G., “Nanoparticle targeting at cells”, *Langmuir.*, 22: 3286-3293 (2006).

Ding, L.H., Stilwell, J., Zhang, T.T., Elboudwarej, O., Jiang, H.J., Selegue, J.P., Cooke, P.A., Gray, J.W., Chen, F.F., “Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast”, *Nano Letters.*, 5 (12): 2448–24645 (2005).

Dwek, R.A., “Glycobiology: Toward understanding the function of sugars”, *Chemical Reviews.*, 96 (2): 683–720 (1996).

- El-Boubbou, K., Gruden, C., Huang, X., “Magnetic glyco-nanoparticles: A unique tool for rapid pathogen detection, decontamination, and strain differentiation”, *Journal American Chemical Society*, 129: 13392-13393 (2007).
- Elechiguerra, J.L., Burt, J.L., Morones, J.R., Bragado, C.A., Gao, X., Lara, H.H. And Yacaman, M.J., “Interaction of silver nanoparticles with HIV-1”, *Journal of Nanobiotechnology*, 3 (6): 1-10 (2005).
- El-Sayed, H.I., Huang, X., El-Sayed, A.M., “Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles”, *Cancer Letters*, 239 (1): 129-135 (2006).
- El-Sayed, H.I., Huang, X., El-Sayed, A.M., “Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer”, *Nano Letters*, 5 (5): 829-834 (2005).
- El-Sayed, M.A., “Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes”, *Accounts Of Chemical Research*, 34 (4): 257–264 (2001).
- Franzen, S. And Feldheim, D.L., “Multifunctional gold nanoparticle- peptide complexes for nuclear targeting”, *Journal American Chemical Society*, 125: 4700-4701 (2003).
- Gheshlaghi, Z.N., Riazi, G.H., Ahmadian, S., Ghafari, M. And Mahinpour, R., “Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein”, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40 (9): 777-782 (2008).
- Gianotti, E., Bertolino, C.A., Benzi, C., Nicotra, G., Caputo, G., Castino, R., Isidoro, C., Coluccia, S., “Photoactive hybrid nanomaterials: Indocyanine immobilized in mesoporous MCM-41 for “in-cell” bioimaging”, *ACS Applied Materials&Interfaces*, 1 (3): 678–687 (2009).
- Giljohann, D.A., Seferos, D.S., Patel, P.C., Millstone, J.E., Rosi, N.L., Mirkin, C.A., “Oligonucleotide loading determines cellular uptake of DNA-modified gold nanoparticles”, *Nano Letters*, 7 (12): 3818-3821 (2007).
- Gogoi, S.K., Gopinath, P., Paul, A., Ramesh, A., Ghosh, S.S., Chattopadhyay, A., “Green fluorescent protein-expressing Escherichia coli as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles”, *Langmuir*, 22: 9322–9328 (2006).
- Goodman, C.M., McCusker, C.D., Yilmaz, T., Rotello, V.M., “Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains”, *Bioconjugate Chemistry*, 15: 897-900 (2004).

Gupta, A.K., Berry, C.C., Gupta, M., Curtis, A.S.G., “Receptor mediated targeting of magnetic nanoparticles using insulin as a surface ligand to prevent endocytosis”, *IEEE Transactions Nanobioscience.*, 2 (4): 255–261 (2003).

Gurr, J.R., Wang, A.S., Chen, C.H., Jan, K.Y., “Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells”, *Toxicology.*, 15 (213): 66-73 (2005).

Haes, A.J., Stuart, D.A., Nie, S., Van Duyne, R.P., “Using solution-phase nanoparticles, surface-confined nanoparticle arrays and single nanoparticles as biological sensing platforms”, *Journal of Fluorescence.*, 14 (4):355-367 (2004).

Hardman, R., “A Toxicologic review of Quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors”, *Environmental Health Perspectives.*, 114 (2): 165-172 (2006).

Hauck, T.S., Ghazani, A.A., Chan, W.C., “Assesing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells”, *Small.*, 4 (1): 153-159 (2008).

Helland, A., Wick, P., Koehler, A., Schmid, K., Som, C., “Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes”, *Environmental Health Perspectives.*, 115 (8): 1125–1131 (2007).

Hill, H.D., Millstone, J.E., Banholzer, M.J., Mirkin, C.A., “The role radius of curvature plays in thiolated oligonucleotide loading on gold nanoparticles”, *ACS Nano.*, 3 (2): 418-424 (2009).

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

Holt, K.B. And Bard, A.J., “Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of Escherichia coli: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag”, *Biochemistry.*, 44: 13214–13223 (2005).

Hsin, Y.H., Chen, C.F., Huang, S., Shih, T.S., Lai, P.S., Chueh, P.J., “The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells”, *Toxicology Letters.*, 179 (3): 130–139 (2008).

Huff, T.B., Hansen, M.N., Zhao, Y., Cheng, J.X., Wei, A., “Controlling the cellular uptake of gold nanorods”, *Langmuir.*, 23: 1596-1599 (2007).

Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schlager, J.J., “In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells”, *Toxicology. In Vitro.*, 19 (7): 975-983 (2005).

Jackson, J.B. And Halas, N.J., “Surface-enhanced Raman scattering on tunable plasmonic nanoparticle substrates”, *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 101 (52): 17930–17935 (2004).

Jacobsen, N.R., Pojana, G., White, P., Moller, P., Cohn, C.A., Korsholm, K.S., Vogel, U., Marcomini, A., Loft, S., Wallin, H., “Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C60 fullerenes in the FE1-MutaTM mouse lung epithelial cells”, *Environmental and Molecular Mutagenesis.*, 49: 476-487 (2008).

Jeng, H.A. And Swanson, J., “Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells”, *Journal of Environmental Science and Health Part A.*, 41: 2699–2711 (2006).

Karlsson, K.A., “Microbial recognition of target-cell glycoconjugates” , *Current Opinion in Structural Biology.*, 5: 622–635 (1995).

Katz, E. And Willner, I., “Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties and applications”, *Angewandte Chemie International Edition.*, 43: 6042-6108 (2004).

Kelly, K.L., Coronado, E., Zhao, L.L., Schatz, G.C., “Optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment”, *Journal of Physical Chemistry B.*, 107 (3): 668-667 (2003).

Kerker, M., “The optics of colloidal silver: something old and something new”, *Journal of Colloid and Interface Science.*, 105 (2): 297-314 (1985).

Khan, J.A., Pillai, B., Das, T.K., Singh, Y., Maiti, S., “Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells”, *ChemBioChem.*, 8: 1237–1240 (2007).

Kiessling, L.L., Gestwicki, J.E., Strong, L.E., “Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell surface interactions”, *Current Opinion in Chemical Biology.*, 4: 696–703 (2000).

Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y., “Antimicrobial effects of silver nanoparticles”, *Nanomedicine.*, 3: 95–101 (2007).

Kim, K., Yoon, S.J., Kim, D., “Nanowire-based enhancement of localized surface plasmon resonance for highly sensitive detection: a theoretical study”, *Optics Express.*, 14 (25): 12419-12431 (2006).

Kisin, E.R., Murray, A.R., Keane, M.J., Shi, X.C., Berry, S.D., Gorelik, O., Arepalli, S., Castranova, V., Wallace, W.E., Kagan, V.E., Shvedova, A.A., "Single-walled carbon nanotubes: Geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells", *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A.*, 70: 2071–2079 (2007).

Kneipp, J., Kneipp, H., Rajadurai, A., Redmonda, R.W., Kneipp, K., "Optical probing and imaging of live cells using SERS labels", *Journal of Raman Spectroscopy.*, 40: 1–5 (2009).

Kong, T., Zeng, J., Wang, X., Yang, X., Yang, J., McQuarrie, S., McEwan, A., Roa, W., Chen, J., Xing, J.Z., "Enhancement of radiation cytotoxicity in breast-cancer cells by localized attachment of gold nanoparticles", *Small*, 4 (9): 1537–1543 (2008).

Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Hunter, R.L., "Pulmonary toxicity of single wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal installation", *Toxicological Sciences.*, 77: 126-134 (2004).

Lazarides, A.A., Kelly, K.L., Jensen, T.R., Schat, G.C., "Optical properties of metal nanoparticles and nanoparticle aggregates important in biosensors", *Journal of Molecular Structure: Theochem.*, 529: 59-63 (2000).

Lee, P.C. And Meisel, D., "Adsorption and surface-enhanced Raman of silver and gold sols", *Journal of Physical Chemistry.*, 86 (17): 3391-3395 (1982).

Lesniak, W., Bielinska, A.U., Sun, K., Janczak, K.W., Shi, X., Jr, J.R.B., Balogh, L.P., "Silver/dendrimer nanocomposites as biomarkers: Fabrication, characterization, in vitro toxicity, and intracellular detection", *Nano Letters.*, 5 (11): 2123-2130 (2005).

Li, P., Li, D., Zhang, L., Li, G., Wang, E., "Cationic lipid bilayer coated gold nanoparticles-mediated transfection of mammalian cells", *Biomaterials.*, 29: 3617–3624 (2008).

Li, S.D., Chono, S., Huang, L., "Efficient gene silencing in metastatic tumor by siRNA formulated in surface-modified nanoparticles", *Journal of Controlled Release.*, 126: 77–84 (2008).

Li, X., Jiang, L., Qiuqiang, Z., Qian, J., He, S., "Localized surface plasmon resonance (LSPR) of polyelectrolyte-functionalized gold-nanoparticles for bio-sensing", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.*, 332 (2-3): 172-179 (2009).

Lin, T.J., Huang, K.T., Liu, C.Y., "Determination of organophosphorous pesticides by a novel biosensor based on localized surface plasmon resonance", *Biosensors & Bioelectronics.*, 22 (4): 513-518 (2006).

Lin, W., Huang, Y., Zhou, X.D., Ma, Y., "In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217: 252–259 (2006).

Lindberg, H.K., Falck, G.C.M., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalán, J., Savolainen, K., Norppa, H., "Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro", *Toxicology Letters*, 186 (3): 166-173 (2009).

Link, S. And El-Sayed, M.A., "Optical properties and ultrafast dynamics in metallic nanocrystals", *Annual Review of Physical Chemistry*, 54: 331-366 (2003).

Lok, C.N., Ho, C.M., Chen, R., He, Q.Y., Yu, W.Y., Sun, H., Tam, P.K., Chiu, J.F., Che, C.M., "Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles", *Journal of Proteomic Research*, 5: 916–924 (2006).

Lorenz, M.R., Holzapfel, V., Musyanovych, A., Nothelfer, K., Walther, P., Frank, H., Landfester, K., Schrezenmeier, H., Mailänder, V., "Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells", *Biomaterials*, 27 (14): 2820–2828 (2006).

Mattoussi, H., Mauro, J.M., Goldman, E.R., Anderson, G.P., Sundar, V.C., Mikulec, F.V., Bawendi, M.G., "Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein", *Journal American Chemical Society*, 122 (49): 12142–12150 (2000).

Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R., Mattoussi, H., "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing", *Nature Materials*, 4: 435-446 (2005).

Meng, W., Kallinteri, P., Walker, D.A., Parker, T.L., Garnett, M.C., "Evaluation of poly (glycerol-adipate) nanoparticle uptake in an in vitro 3-D brain tumor co-culture model", *Experimental Biology and Medicine*, 232: 1100–1108 (2007).

Michalet, X., Pinaud, F.F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S.J., Li, J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S., Weiss, S., "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics", *Science*, 307 (5709): 538-544 (2005).

Mosmann, T., "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of immunological methods*, 65 (1-2): 55–63 (1983).

Murdock, R.C., Stolle, B.L., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., "Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique", *Toxicological Sciences*, 101: 239–253 (2007).

- Nam, J.M., Thaxton, C.S., Mirkin, C.A., “Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins”, *Science*, 301: 1884-1886 (2003).
- Nativo, P., Prior, I.A., Brust, M., “Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles”, *ACS Nano*, 2 (8): 1639-1644 (2008).
- Niemeyer, C. M., “Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science”, *Angewandte Chemie International Edition*, 40: 4128-4158 (2001).
- Nolting, B., Yu, J-J., Liu, G-yu., Cho, S-J., Kauzlarich, S., Gervay-Hague, J., “Synthesis of gold glyconanoparticles and biological evaluation of recombinant Gp120 interactions”, *Langmuir*, 19 (16): 6465–6473 (2003).
- Oberdorster, G., Oberdoster, E., Oberdorster, J., “Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles”, *Environmental Health Perspectives*, 113 (7): 823–829 (2005).
- Osaki, F., Kanamori, T., Sando, S., Sera, T., Aoyana, Y.J., “A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake on the size effects of endocytosis in the subviral region”, *American Chemical Society*, 126: 6520-6521 (2004).
- Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M., “Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram- negative bacterium *Escherichia coli*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (6): 1712–1720 (2007).
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahnke-Dechent, W., “Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles”, *Small*, 3 (11): 1941–1949 (2007).
- Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K., Dobson, J., “Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine”, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36 (13): 167-181 (2003).
- Parab, H.J., Chen, H.M., Lai, T-C., Huang, J.H., Chen, P.H., Liu, R-S., Hsiao, M., Chen, C-H., Tsai, D.P., Hwu, Y.K., “Biosensing, cytotoxicity, and cellular uptake studies of surface-modified gold nanorods”, *Journal of Physical Chemistry C*, 113 (18): 7574–7578 (2009).
- Park, E.J., Yi, J., Chung, K.H., Ryu, D.Y., Choi, J., Park, K., “Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells”, *Toxicology Letters*, 180: 222–229 (2008).
- Park, S., Lee, Y.K., Jung, M., Kim, K.H., Chung, N., Ahn, E.K., Lim, Y., Lee, K.H., “Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells”, *Inhalation Toxicology*, 19 (1): 59–65 (2007).

Patra, H.K., Banerjee, S., Chaudhuri, U., Lahiri, P., Dasgupta, A.K., “Cell selective response to gold nanoparticles”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.*, 3: 111-119 (2007).

Pernodet, N., Fang, X., Sun, Y., Bakhtina, A., Ramakrishnan, A., Sokolov, J., Ulman, A., Rafailovich, M., “Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts”, *Small.*, 2: 766 –773 (2006).

Philip, D., Gopchandran, K.G., Unni, C., Nissamudeen, K.M., “Synthesis, characterization and SERS activity of Au–Ag nanorods”, *Spectrochimica Acta Part A.*, 70: 780–784 (2008).

Pitsillides, C.M., Joe, E.K., Wei, X., Anderson, R.R., Lin, C.P., “Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles”, *Biophysical Journal.*, 84: 4023–4032 (2003).

Prabha, S. And Labhasetwar, V., “Nanoparticle-mediated wild-type p53 gene delivery. results in sustained antiproliferative activity in breast cancer cells”, *Molecular Pharmaceutics.*, 1 (3): 211-219 (2004).

Ramana, C.V., Durugkar, K.A., Puranik, V.G., Narute, S.B., Prasad, B.L.V., “C-Glycosides of dodecanoic acid: new capping/reducing agents for glyconanoparticle synthesis”, *Tetrahedron Letters.*, 49: 6227–6230 (2008).

Robinson, A., Fang, J.M., Chou, P.T., Liao, K.W., Chu, R.M. And Lee, S.J., “Probing lectin and sperm with carbohydrate-modified Quantum dots”, *ChemBioChem.*, 6: 1899–1905 (2005).

Rogers, R.A., Antonini, J.M., Brismar, H., Lai, J., Hesterberg, T.W., Oldmixon, E.H., Thevenaz, P., Brain, J.D., “In situ microscopic analysis of asbestos and synthetic vitreous fibers retained in hamster lungs following inhalation”, *Journal of Environmental Health Perspectives.*, 107 (5): 367-375 (1999).

Rosi, N.L., Giljohann, D.A., Thaxton, C.S., Lytton-Jean, A.K.R., Han, M.S., Mirkin, C.A., “Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation”, *Science.*, 312 (5776): 1027-1030 (2006).

Samuel, U. And Guggenbichler, J.P., “Prevention of catheter-related infections: The potential of a new nano-silver impregnated catheter”, *International Journal of Antimicrobial Agents.*, 23: 75–78 (2004).

Schofield, C.L., Haines, A.H., Field, R.A., Russell, D.A., “Silver and gold glyconanoparticles for colorimetric bioassays”, *Langmuir.*, 22: 6707-6711 (2006).

Schofield, C.L., Field, R.A., Russell, D.A., “Glyconanoparticles for the colorimetric detection of cholera toxin”, *Analytical Chemistry.*, 79 (4): 1356-1361 (2007).

Schubert, D., Dargusch, R., Raitano, J., Chan, S.W., “Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*., 342: 86-91 (2006).

Schultz, S., Smith, D.R., Mock, J.J., Schultz, D.A., “Single-target molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*., 97 (3): 996–1001 (2000).

Seo, J.H., Adachi, K., Lee, B.K., Kang, D.G., Kim, Y.K., Kim, K.R., Lee, H.Y., Kawai, T., Cha, H.J., “facile and rapid direct gold surface immobilization with controlled orientation for carbohydrates”, *Bioconjugate Chemistry*., 18 (6): 2197–2201 (2007).

Sharma, P., Brown, S., Walter, G., Santra, S., Moudgil, B., “Nanoparticles for bioimaging”, *Advances in Colloid and Interface Science*., 123–126: 471–485 (2006).

Shin, Y.B., Lee, J.M., Park, M.R., Kim, M.G., Chung, B.H., Pyo, H.B., Maeng, S., “Analysis of recombinant protein expression using localized surface plasmon resonance (LSPR)”, *Biosensors & Bioelectronics*., 22 (9-10): 2301-2307 (2007).

Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R.R., Sastry, M., “Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview”, *Langmuir*., 21: 10644–10654 (2005).

Sokolov, K., Follen, M., Aaron, J., Pavlova, I., Malpica, A., Lotan, R., Kortum, R.R., “Real-Time Vital Optical Imaging of Precancer Using Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles”, *Cancer Research*., 63: 1999-2004 (2003).

Stolle, B.L., Hussain, S., Schlager, J.J., Hofmann, M.C., “In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells”, *Toxicological Sciences*., 88 (2): 412–419 (2005).

Taniguchi, N., “On the Basic Concept of 'Nano-Technology'”, *Proceedings of the International Conference on Production*., London, Part II (1974).

Tansil, N.C. And Gao, Z., “Nanoparticles in biomolecular detection”, *Nanotoday*., 1 (1): 28-37 (2006).

Tkachenko, A.G., Xie, H., Liu, Y., Coleman, D., Ryan, J., Glomm, W.R., Shipton, M.K., Franzen, S., 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).

- Tsai, C.S., Yu, T.B., Chen, C.T., “Gold nanoparticle-based competitive colorimetric assay for detection of protein–protein interactions”, *Chemical Communications.*, 34: 4273-4275 (2005).
- Tsoli, M., Kuhn, H., Brandau, W., Esche, H., Schmid, G., “Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters”, *Small.*, 1: 841–844 (2005).
- Tsuji, J.S., Maynard, A.D., Howard, P.C., James, J.T., Lam, C.W., Warheit, D.B., Santamaria, A.B., “Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part IV: Risk assessment of nanoparticles”, *Toxicological Sciences.*, 89: 42–50 (2006).
- Türkez, H. And Geyikoğlu, F., “An in vitro blood culture for evaluating the genotoxicity of titanium dioxide: the responses of antioxidant enzymes”, *Toxicology and Industrial Health.*, 23: 19-23 (2007).
- Uyguy, B., Mason, M.D., Ng, A.K., “Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanomaterials”, *Nanotechnology.*, 2: 383–386 (2009).
- Varki, A., “Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct”, *Glycobiology.*, 3 (2): 97–130 (1993).
- Wang, H.F., Wang, J., Deng, X.Y., Sun, H.F., Shi, Z.J., Gu, Z.N., Liu, Y.F., Zhao, Y.L., “Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.*, 4 (8): 1019-1024 (2004).
- Warburg, O., Posener, K., Negelein, E., “The metabolism of cancer cells”, *Biochemische Zeitschrift.*, 152: 129-169 (1924).
- Waston, A., Wu, X., Bruchez, M., “Lighting up cells with Quantum Dots”, *Biotechniques.*, 34: 296–303 (2003).
- Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K.N., Treadway, J.A., Larson, J.P., Ge, N., Peale, F., Bruchez, M., “Immunofluorescent labelling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots”, *Nature Biotechnology.*, 21: 41–46 (2002).
- Yang, J., Zeng, J., Kong, T., Wang, X., Roa, W., El-Bialy, T., Xing, J., Chen, J., “The effect of surface properties of gold nanoparticles on cellular uptake”, *IEEE Life Science Systems and Applications Workshop, LISSA 2007.*, 92-95: (2007).
- Yehia, H.N., Draper, R.K., Mikoryak, C., Walker, E.K., Bajaj, P., Musselman, I.H., Daigrepont, M.C., Dieckmann, G.R., Pantano, P., “Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells”, *Journal of Nanobiotechnology.*, 5 (8): 1-17 (2007).
- Zhang, X., Xing, J.Z., Chen, J., Ko, L., Amanie, J., Gulavita, S., Pervez, N., Yee, D., Moore, R., Roa, W., “Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by gold nanoparticles”, *Clinical and investigative medicine.*, 31 (3): 160-167 (2008).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇAM, Dilek
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 22.02.1983, K.Maraş
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (216) 236 31 94
 e-mail : cam.dilek@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Biyoloji Bölümü	2009
Lisans	Gazi Üniversitesi /Biyoloji Eğitimi	2007
Lise	Çukurova Elektrik Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi

Yıl	Kurum	Görev
2007-2008	Gazi Üniversitesi	Ücretli Asistanlık
2008-2009	KSÜ	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. **Interaction of Gold Nanoparticles With Living Cells.** Erdinç SEZGİN, Ömer Faruk KARATAŞ, **Dilek ÇAM**, İlknur SUR, İsmail SAYIN, Ertuğ AVCI, Kemal KESEROĞLU, Selim SÜLEK, Mustafa ÇULHA. Sigma 26: 227-246 (2008).