

**NANOTEKNOLOJİK YAKLAŞIMLARIN KANSER
METASTAZI ÜZERİNE ETKİLERİ**

**NANOTECHNOLOGY PLATFORM FOR CANCER
METASTASIS**

MEHDI TAYYBI AZAR

PROF. DR. NECDET SAĞLAM
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2016

MEHDİ TAYYBİ AZAR'ın hazırladığı “**NANOTEKNOLOJİK YAKLAŞIMLARIN KANSER METASTAZI ÜZERİNE ETKİLERİ**” adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak Kabul edilmiştir.

Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Başkan

.....

Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

Danışman

.....

Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Üye

.....

Doç. Dr. Eylem GÜVEN

Üye

.....

Yrd. Doç. Dr. Mesut ŞAM

Üye

.....

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

Prof. Dr. Salih Bülent Alten
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

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

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

beyan ederim.

24/06/2016

Mehdi Tayybi Azar

ÖZET

NANOTEKNOLOJİK YAKLAŞIMLARIN KANSER METASTAZI ÜZERİNE ETKİLERİ

MEHDI TAYYBI AZAR

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. NECDET SAĞLAM

HAZİRAN 2016, 99 sayfa

Kanser oluşumunda yer alan moleküler mekanizmalardan biri epitelyal mezenkimal değişimdir (EMT). Embriyonun gelişiminde normalde var olan ve yetişkin insanlarda anormal bir şekilde aktif olması nedeniyle kansere yol açan EMT, kanserli hücrelerin saldırgan olmalarına ve çevre organlara yayılmasına (metastaz) yol açar. EMT mekanizmasında aktif olan yollardan biri WNT/ β -Katenin yolağıdır. Wnt sinyali memede birçok gelişime neden olurken, meme gelişiminin başlamasında, kanalların dallanmasında, hamilelik döneminde alveollerin morfogenezinde önemli role sahiptir.

Normal epitel hücrelerinde ekstraselüler matrikste Wnt proteinlerini inhibe edecek proteinler mevcuttur ve Wnt proteinine bağlanarak onu inhibe ederler. Ancak bu inhibitörlerin yokluğunda veya Wnt'lerin yüksek miktarlarda salındığı durumlarda, Wnt kendi reseptörü olan Frizzled reseptörüne bağlanır. Bağlanmanın sonucunda hücre içinde bir dizi reaksiyonlar başlatılır. Son olarak hücreler arası bağlayıcılar olan E-kadherinler gevşer ve β -katenin çekirdeğe girerek kendi genlerini eksprese edip hücrenin hareketliliğini artırır. Bu durum EMT'ye sebep olur ve hücreler ayrılarak metastaz yaparlar.

Son yıllarda literatürde nanopartiküller taşıyıcı sistemler etkili bir yer edinmiştir. nanopartiküllerin boyutları 1 ile 1000 nm arasında değişebilir ve nanoteknoloji ile geliştirilen nanopartiküller etkin madde taşıyabilen koloidal sistemlerdir. Nanopartiküllerin en önemli özelliği doku hedeflemeyi başarabilmeleri ve etken maddelerin hücre içine penetrasyonunu küçük boyutlarından dolayı arttırmalarıdır.

Altın nanopartiküller kolay sentezlenebilmeleri, kimyasal yapı stabiliteleri, çok fonksiyonlu olmaları, biyouyumlu olmaları ve kolay yüzey modifikasyonu sayesinde monoklonal antikörlerle spesifik hedeflendirme yapılabilmektedir ve bu özellikleri nanopartiküllerin aktif bir şekilde hedeflediğimiz dokuda birikmesine olanak sağlamaktadır. Tez kapsamında MCF-7 meme kanser hücrelerinde anti Wnt-1 monoklonal antikör kullanarak ekstraselluler matrikste Wnt-1 proteini inhibe ederek kanserli hücrelerin apoptoza gitmelerinin sağlanması hedeflenmiştir. Birçok araştırmada MCF-7 meme kanser hücrelerinde Wnt-1 proteini ve onun inhibasyonu etkisi konu olmuştur. Araştırmalarda hücrelerde genlerin ifadesini, hücre içinde aracı molekülleri veya ekstraselluler matrikste Wnt-1 proteinini inhibe ederek bu proteinin kendi reseptörü olan Frizzled'e bağlanmasını engelleyerek hücrelerin apoptozunu gerçekleştirmişlerdir.

Burada amaç altın nanopartiküller kullanarak monoklonal Anti Wnt-1 monoklonal antikörün etkisini arttırarak daha etkili bir şekilde Wnt-1 proteinini engellemek ve daha fazla hücrenin apoptoza uğramasını sağlamaktır.

Bu amaçla tez kapsamında, Turkevich metodu ile sentezlenen altın nanopartiküllerinin yüzey modifikasyonları yapıldıktan sonra anti Wnt-1 monoklonal antikörle kaplandı ve devamında MCF-7 hücreleriyle hücre kültürü ortamında etkileştirildi. Bu örneklerin hücre üzerindeki toksik etkilerini anlamak için sitotoksikite testi olarak MTT testi yapıldı devamında örneklerin hücre üzerindeki apoptotik etkileri değerlendirildi. Yapılan değerlendirmelerde antikör bağlı altın nanopartiküllerin hücreler üzerindeki apoptotik etkilerinin monoklonal antiköre göre daha fazla olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Epitelyal mezenkimal değişim (EMT), WNT/ β -Katenin Yolağı, Altın nanopartiküller, Anti Wnt-1 monoklonal antikor, MCF-7 meme kanser hücreleri, Apoptoz



ABSTRACT

NANOTECHNOLOGY PLATFORM FOR CANCER METASTASIS

MEHDI TAYYBI AZAR

**Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and
Nanomedicine**

Supervisor: Prof. Dr. NECDET SAĞLAM

JUNE 2016, 99 pages

One of the molecular mechanisms being involved in cancer development is epithelial mesenchymal transition (EMT). Being normally existed in development of embryo and caused to cancer due to being abnormally active in adults, EMT leads cancerous cells to be aggressive and to expand in peripheral organs (metastasis). One of the active pathways in EMT mechanism is WNT/ β -Catenin pathway. While Wnt signal causes several developments in breast, it also has a significant role in beginning of breast development, branching of ducts and morphogenesis of alveolus in gestation period.

There are proteins inhibiting Wnt proteins in extracellular matrix within normal epithelial cells which inhibit Wnt proteins by binding to them. But in cases of absence of these inhibitors or oscillation of Wnt in high amounts, Wnt binds to Frizzled receptor as its receptor. As a result of binding, a set of reactions initiate within the cell. Finally, E-catherins as binder of paracellulars release and β -catenin adjusts its genes and increases mobility of cell by penetrating into core. This case leads to EMT and cells cause metastasis by being separated.

Recently, nanoparticles carrier systems have an effective part in literature. The sizes of nanoparticles may vary between 1 and 1000 nm and nanoparticles being developed

by nanotechnology are colloidal systems that may carry active substances. The most important characteristic of nanoparticles is that they may succeed in tissue targeting and increase penetration of active substances within cell due to their small sizes.

Gold nanoparticles may perform specific targeting with monoclonal antibodies due to being easily synthesised, their chemical structure stabilities, multifunctional structure, biocompatibility and easy surface modification and these characteristics enable nanoparticles to actively accumulate in tissue targeted. In the scope of thesis, providing apoptosis of cancerous cells after Wnt-1 protein being inhibited in extracellular matrix by using anti-Wnt-1 monoclonal antibody in MCF-7 breast cancer cells has been aimed.

In many researches, Wnt-1 protein and its inhibition effect in MCF-7 breast cancer cells are discussed. Researches performed apoptosis of cells by inhibiting description of genes in cells, mediator molecules within cell and Wnt-1 protein in extracellular matrix; and by preventing to bind to Frizzled as the receptor of this protein.

The objective herein is to prevent Wnt-1 protein in a more active way by using gold nanoparticles and increasing the effect of monoclonal Anti Wnt-1 monoclonal antibody; and to perform apoptosis of more cells.

In the scope of thesis, gold nanoparticles synthesised with Turkevich method were covered with Wnt-1 monoclonal antibodies after having done their surface modifications and then, were activated in cell culture environment with MCF-7 cells in accordance with this purpose. MTT testing as cytotoxicity test was applied in order to understand toxic effects of these samples on cell and then, apoptotic effects of samples on cell were evaluated. In these evaluations, it has been determined that apoptotic effects of antibody-binded gold nanoparticles on cells were bigger than monoclonal antibody.

Keywords: Epithelial mesenchymal transition (EMT), WNT/ β -catenin pathway, Gold nanoparticles, MCF-7 breast cancer cells, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleri ile bu çalışmanın planlanması, titizlikle yürütülmesi ve sonuçlandırılmasını sağlayan, bana her zaman yol gösteren değerli danışmanım sayın Prof. Dr. Necdet Sağlam'a,

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren ve laboratuvarının kapılarını her zaman sonuna kadar açan ve yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Mustafa Türk'e,

Tezin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan ve laboratuvarında imkân sağlayan sayın Prof. Dr. S. Ali Tuncel'e,

Tez izleme jürimde olup bana zaman ayıran sayın Doç. Dr. Eylem GÜVEN ve Yrd. Doç. Dr. Mesut ŞAM'a

Hayatım boyunca beni gönülden destekleyen ve her zaman yanımda olan sevgili Annem'e ve Babam'a,

Her zaman canı gönülden bana yardımcı olan arkadaşım Reza Didarian'a

Sonsuz Teşekkürlerimle...



Huzurum'a

İçindekiler

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	I
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR.....	VI
İçindekiler	VIII
ŞEKİLLER.....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIV
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİ	3
2.2 Kanser.....	3
2.2.1 Kanserin Temeli ve Kanser Türlerinin Benzerliği.....	3
2.2.4 Kanser İstatistikleri	4
2.3 Tümör Oluşumu, Tipleri ve Kanserin Evreleri.....	5
2.5 Metastaz.....	6
2.6 Meme Kanserinin Biyolojisi ve Genetiği	7
2.6.2 Meme Anatomisi ve Yapısı.....	8
2.6.4 Meme Kanserinin Belirtileri.....	9
2.7 Meme Kanserinde Görüntüleme Yöntemleri.....	10
2.7.1 Mamografi	10
2.7.2 Ultrasonografi	11
2.7.3 Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG).....	12
2.8 Kanserin Geleneksel Tedavisi	13
2.8.1 Cerrahi Yöntemi	13
2.8.2 Radyasyonla Tedavisi	14
2.8.3 Kemoterapi	14
2.9 Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT).....	14
2.10 WNT/ β -Katenin Yolağı.....	16
2.10.1 Wnt/ β -katenin Sinyal Yolunun Hücre Zarındaki Mekanizması	18
2.11 Wnt Proteinleri.....	19
2.12 Wnt Sinyal Mekanizması	20
2.12.1 WNT-1 ve WIF-1 Proteini	20

2.13 Kanser Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar.....	21
2.14 Nanotıp.....	22
2.14.1 Nanopartiküller	23
2.14.2 Altın Nanopartiküller	24
2.15 Bağışıklık Sistemi	28
2.15.1 Monoklonal Antikorlar ve Etki Mekanizmaları	30
2.16 Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar	30
2.16.1 Zeta-sizer	30
2.16.2 UV Spektrofotometri	31
2.16.3 Zeta Potansiyel.....	31
2.16.4 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM).....	31
2.16.5 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	32
2.16.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	32
3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	34
3.1 Kimyasallar ve Cihazlar	34
3.1.1 Altın Nanopartiküllerin Sentez Ve Karakterizasyonu İçin Kullanılan Cihazlar Ve Kimyasallar.....	34
3.1.2 Altın Nanopartiküllerinin Yüzey Modifikasyon'ları İçin Kullanılan Kimyasallar Ve Cihazlar	35
3.1.3 Antikor Bağlı Altın Nanopartiküller için kullanılan Kimyasallar Ve Cihazlar.....	35
3.1.4 İn Vitro Çalışmaları İçin Kullanılan Kimyasallar Ve Cihazlar	35
3.2 Altın Nanopartiküllerin Sentezi	35
3.2.1 Altın Nanopartiküllerin Konsantrasyonu.....	37
3.2.2 Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	37
3.3 Altın Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonları.....	38
3.3.1 Hazırlanan Sistamin Molekülünü Altın Nanopartiküllerle Karıştırılması	39
3.3.2 Sistamin Kaplı Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	40
3.4 Modifiye Altın Nanopartiküllerin Antikorla Bağlanmaları	40
3.4.1 Monoklonal Antikorların Hazırlanması	40
3.4.2 Antikorla Sistamin Kaplı Altın Nanopartikül Etkileştirilmesi.....	41
3.4.3 Monoklonal Antikor Bağlı Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	42
3.5 Hücre Etkileşimleri.....	42
3.5.1 Hücrelerin Hazırlanması	42

3.5.2 Hücre Kültürü	42
3.5.3 Hücre Kültürü İçin Hazırlanan Örnekler	44
3.6 Sitotoksisite Testi	45
3.7 Apoptozun belirlenmesi	45
3.7.1 Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan İkili Boyama Metodu	45
3.8 İstatistiksel Analiz	47
4.BULGULAR	48
4.1 Sentezlenen altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	48
4.1.2 UV Spektrofotometri Çalışması	49
4.1.3 Zeta Potansiyel Değerlendirilmesi	50
4.1.4 Atomik Kuvvet Mikroskopu Değerlendirmesi	51
4.2 Altın Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonları	52
4.2.1 S-GNP Zeta Potansiyeli	52
4.2.2 UV Spektrofotometri Değerlendirilmesi	53
4.3 Modifiye Altın Nanopartiküllerin, Antikora Bağlanması	55
4.3.1 mAb-GNP Bağlanma Oranı	55
4.4 Monoklonal Antikor Bağlı Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	56
4.4.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi	56
4.5 Sitotoksisite Testi	58
4.6 Yapılan hücre kültürü apoptoz oranları	60
4.6.1 Hücre Kültürü Çalışmalarından Elde Edilen Sonuçlar	62
4.7 İstatistiksel Analiz	68
5.SONUÇLAR	70
6.KAYNAKLAR	75

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2. 1. 2013 yılında kadınlarda en sık görülen bazı kanser türleri [4].....	4
Şekil 2.2. Yıllara göre en sık görülen kanserler [4].	5
Şekil 2. 3. Vücutta sağlıklı hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve tümör oluşumu[6].....	6
Şekil 2. 4. Memenin dokusu [17]	9
Şekil 2. 5. Epitelyal mezenkimal geçişin ve kök hücrelerinin meme kanserinin oluşumundaki rolü[38]	15
Şekil 2. 6. Wnt/ β -katenin yolağında aktif ara moleküller[41]	17
Şekil 2. 7. Antikorların (IgG) yapısı[143].....	29
Şekil 3. 1. Turkevich metodu ile sentezlenen altın nanopartikülleri	36
Şekil 3. 2. Sistamin molekülünün yapısı.	38
Şekil 3. 3. Altın nanopartiküllerin sistamin molekülüne bağlanması.	39
Şekil 3. 4. Invitrogen-Countess hücre sayım cihazı.....	43
Şekil 4. 1. Zeta-sizer cihazında boyut ölçme işleminden çıkan	48
Şekil 4. 2. Sentezlenen altın nanopartiküllerin UV spektrofotometrisi.....	49
Şekil 4. 3. Sentezlenen altın nanopartiküllerin Zeta potansiyel değeri (mv)	50
Şekil 4. 4. Sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutunu gösteren AFM görüntüsü... 51	
Şekil 4. 5. Sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutunu gösteren TEM görüntüsü... 52	
Şekil 4. 6. UV-VIS spektrofotometrisi. a altın nanopartikülleri. b modifiye altın nanopartikülleri.	53
Şekil 4. 7. Roche Cobas Integra 400 plus cihazı ile ölçülen mAb-GNP bağlanma oranları.	55
Şekil 4. 8. Sistamin kaplı altın nanopartiküllerin FTIR-ATR analizi.	56
Şekil 4. 9. Antikor bağlı altın nanopartiküllerin FTIR-ATR analizi.	57
Şekil 4. 10. MTT test sonucu ve MCF-7 hücre canlılık oranları	59
Şekil 4. 11. Yapılan hücre kültürü deneylerinden elde edilen apoptoz ve standart sapma değerleri.....	61
Şekil 4.12. Kontrol grubunda Floresan Mikroskopta (10x5 büyütme ile) DAPI filtresi kullanılarak çekilen hücre kültürü fotoğrafları.	63
Şekil 4. 13. MCF-7 hücrelerinin WNT-1 proteini ile etkileşimini gösteren Floresan Mikroskopta (10x5 büyütme ile) DAPI filtresi kullanılarak çekilen hücre kültürü fotoğrafları.	64
Şekil 4. 14. Altın nanopartiküllerin MCF-7 hücreleriyle etkileşimini gösteren Floresan Mikroskopta (10x5 büyütme ile) DAPI filtresi kullanılarak çekilen fotoğrafları.....	65
Şekil 4. 15. Anti WNT-1 monoklonal antikorla MCF-7 hücrelerin etkileşimlerini gösteren Floresan Mikroskopta (10x5 büyütme ile) DAPI filtresi kullanılarak çekilen fotoğraflar.	66

Şekil 4. 16. Antikor bağlı altın nanopartiküllerin MCF-7 hücreler üzerindeki etkisini gösteren Floresan Mikroskopta (10x5 büyütme ile) DAPI filtresi kullanılarak çekilen fotoğraflar.	67
Şekil 4. 17. Apoptoz oranının 48 saat sonunda p değerinin istatistiksel olarak hesaplanması	68



ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2. 1 Altın nanopartiküllerin biyomedikal uygulamaları.....	27
Çizelge 3. 1. mAb'lerin ve GNP'lerin bağlanma oranları.....	42
Çizelge 3. 2. Yapılacak hücre kültürü etkileşimlerde kullanılacak.....	44
Çizelge 4. 1. Altın nanopartikülleri ve sistamin kaplı altın nanopartiküllerin.....	53
Çizelge 4. 2. . MTT test sonucu ve MCF-7 hücre canlılık oranları.....	58
Çizelge 4. 3. Hücre kültürü deneylerinden elde edilen apoptoz ve standart sapma değerleri.	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

mAb	Anti-wnt 1 monoklonal antikor
GNP	Altın nanopartikülü
WP	Wnt-1 proteini
GNP-mAb	Anti-wnt 1 monoklonal antikor bağlı altın nanopartikül
S-GNP	Sisteamin kaplı altın nanopartiküller
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
PDI	Poly Dispersity İndeks
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskoplarını
WIF-1	Wnt inhibitory factor 1
AFM	Atomik kuvvet mikroskopu
Fz	Frizzled reseptörü
HAuCl ₄	Tetrakloroaurik (III)
DI	Deiyonize
Sh	Tiyol grubu
PI	Propidium iodide
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)
NHS	N-Hydroxysuccinimide

1.GİRİŞ

Kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Sık görülmesi ve ölüm oranının yüksek olması sebebiyle de bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Kanser vücudun herhangi bir yerinde bulunan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve bölünmesi sonucunda ortaya çıkan ve pek çok türü mevcut olan bir hastalıktır. Ancak tüm kanser türlerinin temelinde yatan sorun metastaz olarak adlandırılan kontrolsüz çoğalmadır. Kanser olan hücre normal hücreden farklı davranarak çevre dokulara saldırmaya başlar. Kan veya lenf dolaşımına girerek daha uzak organlara metastaz yaparak organlarda yeni tümörler oluşmasını sağlar. Kanser tedavisinde, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin yanı sıra hedeflendirilmiş moleküllerle tedavi gibi yeni yöntemlerin ortak amacı; anti kanser ajanların normal dokularda gösterdiği olumsuz etkileri ortadan kaldırmaktır. Kanser hücrelerinin gelişimleri sırasında uğradığı fizyolojik ve morfolojik değişimler sonucunda ortaya çıkan tümör, spesifik belirleyici moleküller ve bu yapılara özgü ligandlar kullanılarak tanınmakta, bu sayede hem daha az miktarda etkin madde kullanılarak terapötik etkinlik sağlanmakta hem de sağlıklı dokuların etkilenme riski azaltılmaktadır.

Kanser nanoteknolojisi günümüzde en çok çalışılan konulardan biridir. Kanser çalışmalarında birçok yöntemle kanserli hücreler hedeflenerek kanserin çoğalması ve yayılması engellenmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla, kanserli hücrelerde özellikle aktif olan yolaklar tercih edilmektedir. Kanserli hücrelerin diğer hücrelere göre farklılıkları bu tercihlerde önem kazanmaktadır. Kanserli hücreler diğer hücrelere göre daha hızlı bölünmekte, bu sebeple protein sentezi, besin ve oksijen kullanımında diğer hücrelere göre daha farklı hareket etmektedirler. Kanser çalışmalarında hücrelerin daha hızlı ve bitmeyen bölünmelerine sebep olan apoptotik yolaklar, kinaz yolakları, multi drug rezistans yolaklar, metastaz yolakları, otofaji yolakları hedef alınarak, kanser gelişim süreci durdurularak; kanserin tedavi edilmesi amaçlanmaktadır.

Nanoteknolojik çalışmalarda birçok nano yapı kullanılmaktadır. Bunlardan biri de altın nanopartikülleridir. Altının toksik olmaması ve oksidasyona uğramaması bu metalin nanoteknolojik çalışmalarında önemli bir rol oynamasına olanak sağlamaktadır.

Tez kapsamında, Wnt/ β katenin yolağı kullanılarak Wnt-1 monoklonal antikor (mAb) ile ekstraselüler matrikste bulunan Wnt-1 proteini hedeflenmiştir. Wnt-1 proteini birçok

solid tümörde (meme kanseri, akciğer kanseri, sarkoma) hücreler arasında yüksek miktarda üretilir ve bu proteinin inhibisyonunun solid tümörün baskılanmasında, hücrelerin metastazının önlenmesinde ve apoptozun indüklenmesinde önemli rol oynadığı araştırmalarla ispatlanmıştır.

Hücre dışı (Ekstraselüler) hedeflendirme yoluyla, anti Wnt-1 mAb, altın nanopartiküllere takılarak MCF-7 hücreleriyle etkileştirilmiştir normal ve sağlıklı hücreler zarar görmeden hücrelerin metastaz yapması önlenmiştir ve hücrelerin apoptoza girdikleri gösterilmiştir. Çalışma kapsamında anti Wnt-1 ile konjuge edilmiş, altın nanopartiküllerin formülasyonu, karakterizasyonu ve sitotoksosite testleri yapılmıştır.

2.GENEL BİLGİ

2.2 Kanser

Kanser vücudun herhangi bir yerinde hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve normal hücre sayısından daha fazla olmaları durumunda başlayabilir. Bu durum vücudun normal çalışmasını zorlamaktadır.

Kanser tedavisi birçok insanda başarılı olmamaktadır böylelikle insanların tedaviden sonra normal yaşam sürelerini etkilemektedir[1].

2.2.1 Kanserin Temeli ve Kanser Türlerinin Benzerliği

Birçok kanser türü mevcuttur. Kanseri karaciğerde, memede, bağırsakta veya kanda başlayabilir. Kanseri birçok yönden aynı olmalarına rağmen, büyüme ve vücutta dağılıma şekilleri farklılık göstermektedir [2].

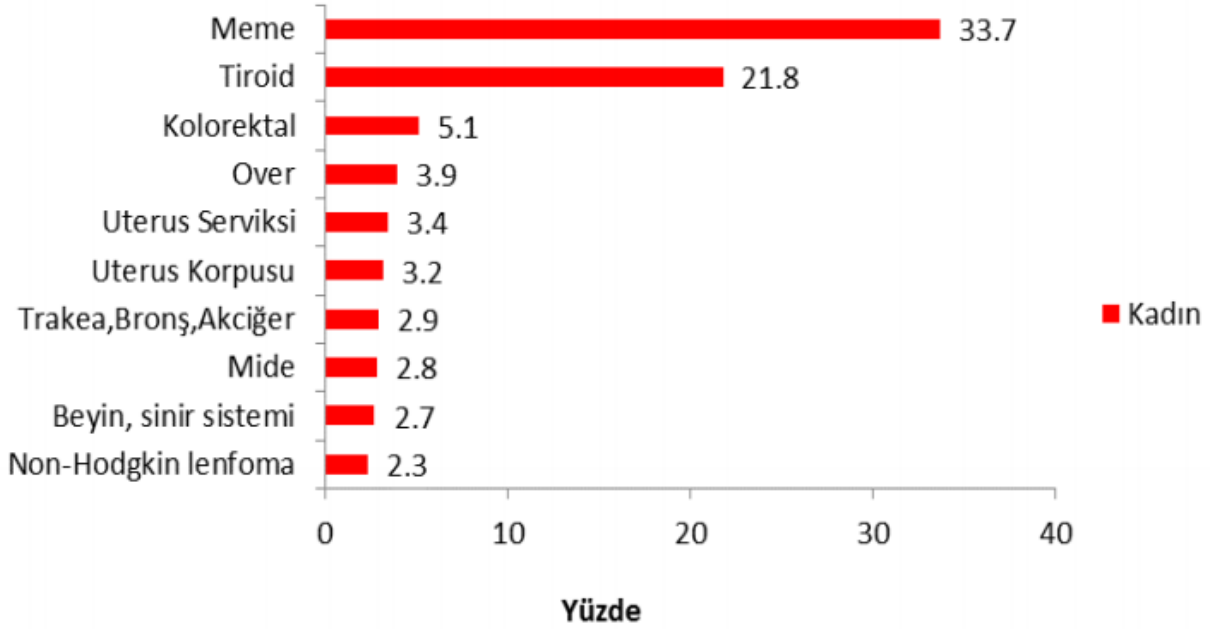
Vücuttaki tüm hücrelerin belli bir görevi bulunmaktadır. Normal hücreler belli bir programa bağlı olarak bölünmektedirler. Hücreler yaşlandıklarında veya hasar gördüklerinde ölmekte ve yerlerini ise yeni hücreler almaktadır. Hücreler kontrolsüz büyüdükleri zaman kanser oluşmaktadır. Böylelikle kanser hücreleri büyümeye ve yeni hücreler oluşturmaya devam ederken sayıca normal hücrelerden daha fazla olmaktadır. Bu sebepten dolayı vücudun kanser olan bölgesinde sorunlar oluşmaya başlamaktadır.

Kanseri hücreleri vücudun başka yerlerine dağılıma eğilimi içindedirler. Örnek olarak, akciğerdeki kanseri hücreleri göç edebilmekte ve kemiğe yerleşebilmektedir. Kanseri hücrelerinin yayılması metastaz olarak adlandırılır. Akciğer kanseri kemiğe yerleşse bile yine akciğer kanseri olarak tanımlanır.

Bazı kanseri türleri hızlı bir şekilde çoğalıp ve dağılırlar. Bazılar ise daha yavaş büyürler. Bunlar aynı zamanda farklı şekilde tedaviye cevap verirler. Bazı kanseri türlerinin en iyi tedavi yolu cerrahi operasyondur, bazılar ise en iyi kemoterapi ilaçlarına cevap verirler. Genellikle en iyi tedavi için iki yöntem veya daha fazlası beraber kullanılmaktadır [3].

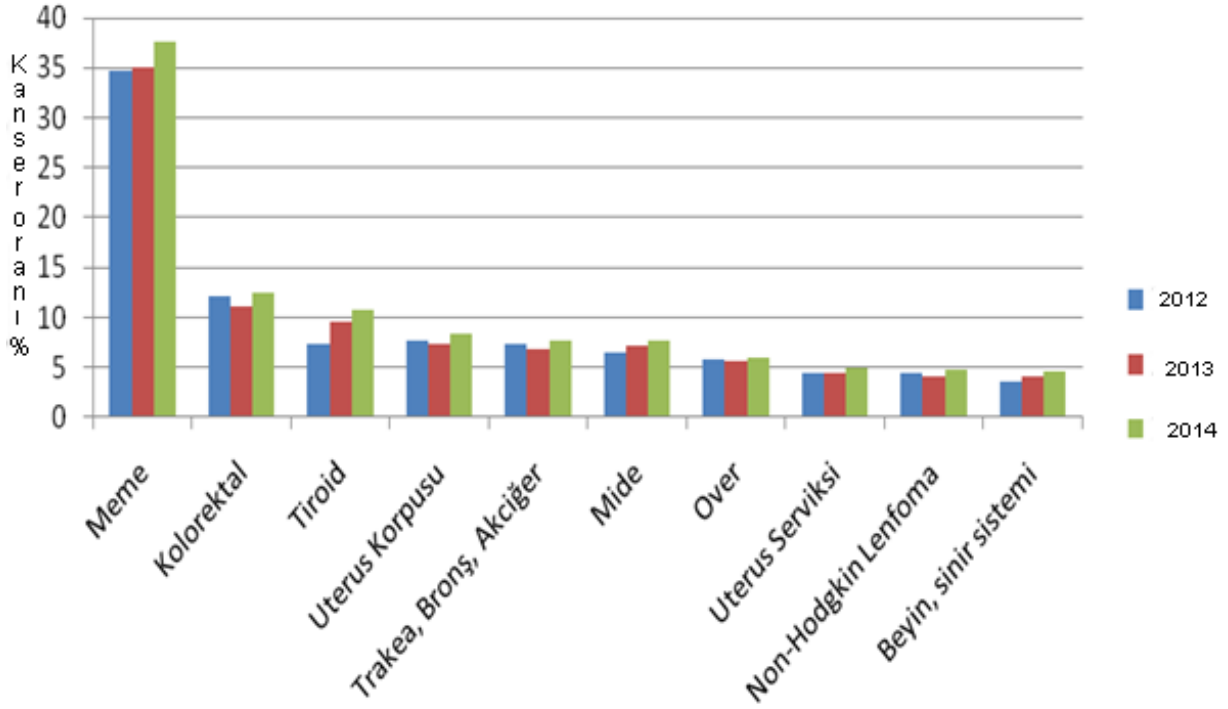
2.2.4 Kanser İstatistikleri

Kanser günümüzün en önemli hastalıklarından biri hale gelmiştir. Kansere olma ihtimali ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir ve bu da ülkelerin kanserle mücadele için nasıl önlemler ve politikalar izlediklerine bağlıdır.



Şekil 2. 1. 2013 yılında kadınlarda en sık görülen bazı kanser türleri [4].

Şekil 2.1 ve Şekil 2.2 de Türkiye Sağlık Bakanlığının 2013 yılında elde ettiği bulgular grafiklerle ifade edilmiştir [5]. Şekil 2.1’de görüldüğü gibi 2013 yılında en çok görülen kanser türü meme kanseridir ve bu da meme kanserindeki önlem ve tedavisindeki araştırmaların önemini vurgulamaktadır. Şekil 2.2 de görüldüğü gibi kadınlarda meme kanseri 2012 den 2014 e kadar bir artış göstermektedir.



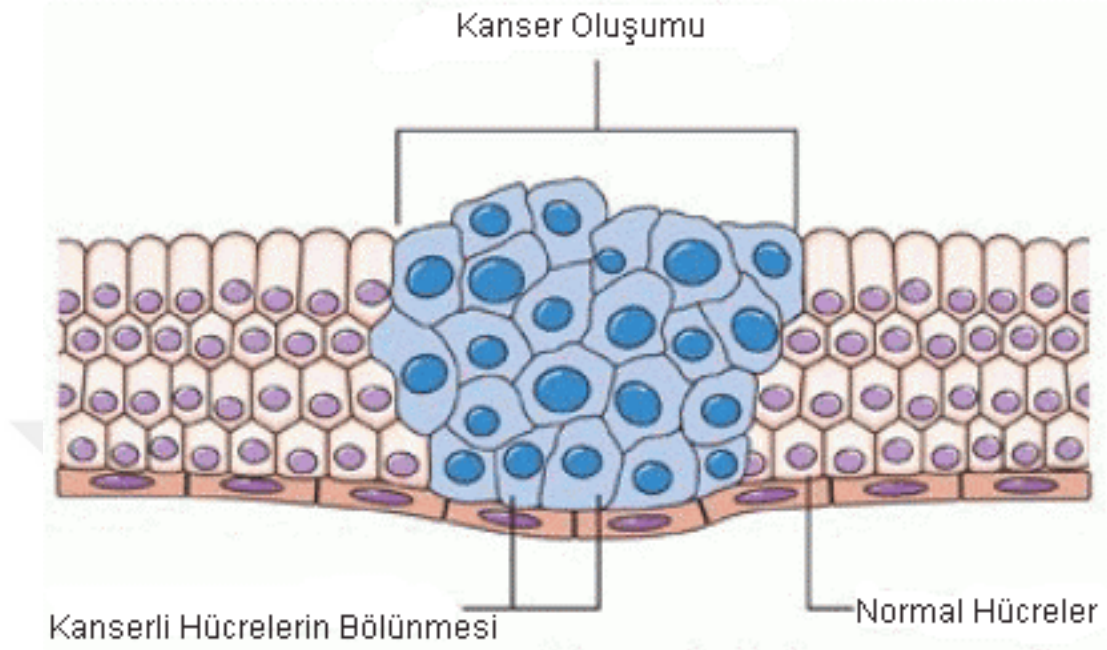
Şekil 2.2. Yıllara göre en sık görülen kanserler [4].

2.3 Tümör Oluşumu, Tipleri ve Kanserin Evreleri

İnsan vücudu milyarlarca hücreden oluşmaktadır ve bir insanın sağlıklı olması için bu hücrelerin belli bir programla beraber çalışmaları gerekmektedir. Bazen bu hücrelerden biri kontrolsüz bir şekilde büyümeye ve bölünmeye başlar ve bir süre sonra bir kitle (tümör) oluşturur. Şekil 2.3 te gösterildiği gibi bazen bu hücrelerden biri kontrolsüz bir şekilde büyümeye ve bölünmeye başlar ve bir süre sonra bir kitle (tümör) oluşturur.

Birçok kanser formu bir kitleden oluşur. Ama tüm kitleler kanser değil. Çok nadir kanser türleri, kan kanseri (lösemi) gibi, tümör şeklinde olmazlar. Bunlar kan hücrelerinde veya vücudun başka hücrelerinde büyürler. Kötü huylu (malign) ve iyi huylu (benign) olmak üzere iki tip tümör vardır.

İyi huylu tümörler buldukları yerde kalırlar ve başka organlara sıçramazlar. İyi huylu olan beyin tümörleri hariç hayatı tehlike arz etmezler.



Şekil 2. 3. Vücutta sağlıklı hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve tümör oluşumu[6].

Kötü huylu tümörler belli bir boyuta ulaştıktan sonra kan veya lenf yolu ile başka organlara göç etmeye başlayarak metastaz yaparlar ve girdikleri yerde yeniden çoğalıp büyümeye başlarlar ve kitle oluştururlar, bu yüzden bu kanser tipi ölümcül olabilir.

Kanser evreleri kanserin vücuttaki durumunu belirler. Kanser evreleri 1-4 arasında değişiklik göstermektedir. Her bir kanser için belirli testlerle kanser evresi belirlenmektedir. Birinci evre, kanserin vücutta yayılmadığına işaret etmektedir. İkinci evre, kanserin vücutta fazla yayılmadığını gösterir. Üçüncü evre, kanserin vücutta yayıldığına işaret etmektedir. Dördüncü evre ise en yüksek evre olup kanserin vücudun her yerine yayılmış olduğuna işaret eder.

2.5 Metastaz

Memede oluşan tümör kitlesinden ayrılan bir hücre vücutta kan veya lenf yoluyla dolaşır ve tutunabildiği ve damarlanmayı tetikleyebildiği yerde çoğalır böylelikle metastaz kitlesini oluşturur. Normal hücreler birbirlerine belli bağlarla tutunurlar. Metastaz yapabilmesi için bir hücrenin bu bağlardan kurtulması gerekmektedir. Hücreleri birbirine bağlanmasında bağlayıcı proteinleri kodlayan genler bulunmaktadır. Eğer bu genler

mutasyona uğrarsa bağlayıcı proteinler üretilemez veya hasarlı oluşurlar ve görevlerini yerine getiremezler. Bunun sonucu hücreler birbirlerine tutunamazlar. Birçok araştırmada metastaz yapan hücrelerde bu proteinlerin üretiminin azaldığı gösterilmiştir. Bir tümör kitlesini metastaz yapmadan cerrahi operasyonla alınması büyük bir oranda ölüm oranında düşüğe neden olur [7]. Tez kapsamında çalışılan konu meme kanserinin tedavisine yönelik olduğundan meme kanseri üzerine daha fazla bilgi verilmektedir.

2.6 Meme Kanserinin Biyolojisi ve Genetiği

Tanı ve tedavi yöntemlerinin gelişmesine rağmen meme kanseri her sene birçok insanın (erkek ve kadın) canını almaktadır. Meme kanseri kanser türleri arasında kadınlarda en çok ölüme sebep olan türdür [5,8].

Her gün meme kanserine karşı yeni yöntemler geliştiriliyor olsa da birçok insan bu hastalığa yakalanma riski altındadır. Kanserli hücrelerin küçük molekül yapılarını incelemek bize bu hastalığın oluşumu ve tedavisine yönelik yardımcı olmaktadır [9,10]. Kanser biyolojisinin önemi birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır. Bir kanserin biyolojisini anlamak o kanserle mücadelede bize yardımcı olmaktadır.

Kanser kalıtsal olmayan genetik bir hastalıktır. Kalıtsal ve genetik karıştırılmaması gereken birbirinden farklı kavramlardır. Kalıtsal hastalık durumunda hastalık ebeveynlerden bir genin hatalı kodlanması sonucunda çocuğa geçer. Çok nadir olsa da kanserin kalıtsal olduğu durum olabilir. Tüm kanser türleri gibi meme kanseri de genlerin yanlış kodlanmasından meydana gelen genetik bir hastalık olup bir istisna olarak retinoblastoma kanseri kalıtsal olan kanser türüne örnek verilebilir. [11].

Kanser hücre içindeki genlerin mutasyonu sonucu meydana gelir. Mutasyon ya tamamen kazara oluşur ya da mutasyona sebep olan maddelerden (mutajenlerden) dolayı meydana gelir. Mutajen maddelere, kimyasallar, radyasyonlar, ultraviyole ışınlar örnek olarak verilebilir. Birçok mutasyon kalıcı olmayıp DNA'da oluşan hasarlar vücut tarafından onarılır ama bazen de kanserle sonuçlanır [12].

Her insan vücudunda 35000 gen mevcuttur. Fakat mutasyon eğer anahtar genlerin birinde oluşursa kanserle sonuçlanır. Bu genler 3 kola ayrılmaktadır.

Protoonkogenler, hücrenin büyümesinden ve çoğalmasından sürümlü proteinleri kodlayan genlerdir. Tümör supresör genler, hücre büyümesini ve bölünmesini engeller. DNA onarıcı genler, DNA'da oluşan hasarları onarmakla görevli genlerdir.

İnsanın vücudu milyarlarca hücreden oluşmaktadır. Bu hücrelerin sürekli bölünmesi, yaşlanması, ölmesi ve yeni hücrelerle yer değiştirmesi, daha hızlı ve sürekli yenilenen dokularda genetik hatasının oluşmasına ihtimal kılar. Meme dokusu da her adet döneminde sürekli değişime uğradığı için kansere yakalanma riski yüksektir.

2.6.2 Meme Anatomisi ve Yapısı

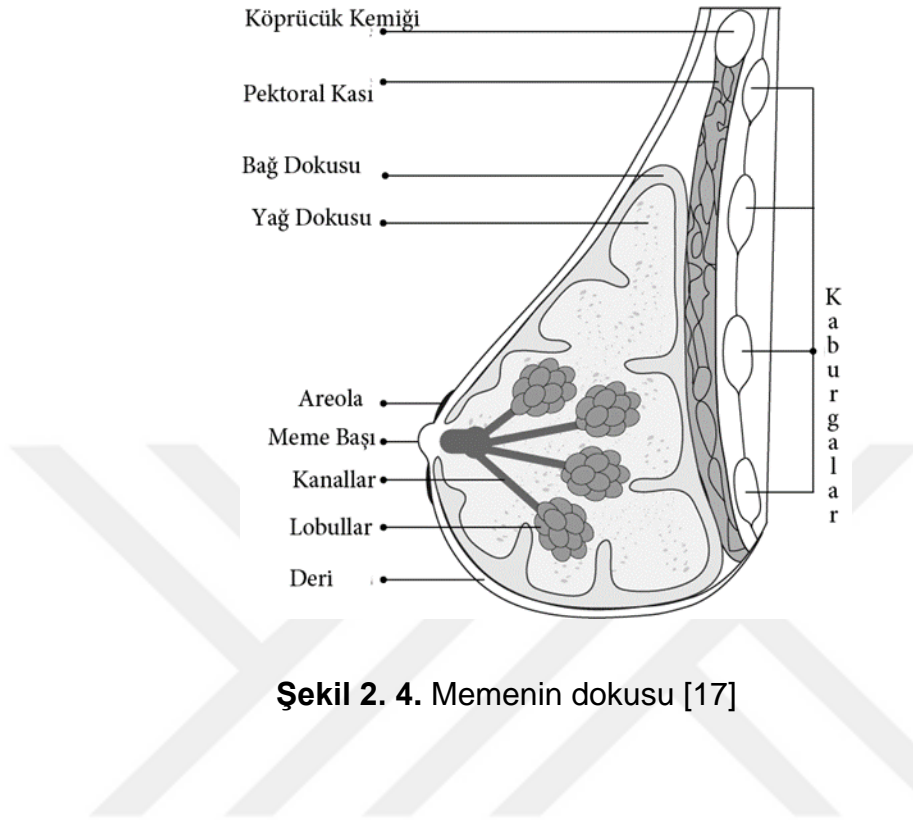
Meme vücutta bulunan bezlerden biri olup meme bezleri hamilelik ve emzirme dönemi hariç bir uyku modunda bulunmaktadır.

Meme kanserini tanımlamak için önce normal meme dokusunu doğru tanımamız çok önem taşımaktadır. Şekil 2.4 te Meme dokusu süt yapımından sorumlu olan lobüllerden, ince kanallardan, yağ ve bağ dokusundan, kan ve lenf damarlarından oluşmaktadır ve memenin yapısında kas bulunmamaktadır. Meme vücuda cooper tendonu ile bağlanır.

Her Meme lob denilen 15-20 bölmeden oluşmaktadır. Her lob binlerce lobül içinde barındırır. Lobüller birbirlerine ve meme ucuna süt kanalları ile bağlanırlar.

Meme kanserinin büyük çoğunluğu kanallarda meydana gelirken, bazıları ise lobüllerde ve çok azı diğer dokularda oluşmaktadır [13-16].

Vücutta salınan çeşitli hormonlar memenin gelişiminde, büyümesinde ve hamilelik döneminde süt üretmesinde rol oynarlar. Östrojen hormonu memenin büyümesinden ve lobüllerin gelişmesinde rolü vardır. Projestron hormonu sütün üretilmesi için lobülleri uyarırken Prolaktin ise hipofizden salgılanır ve sür üretimini artırır. Kanserin başladığı noktaya (lobüller, kanallar vs.) göre kanser türleri değişir Ama en çok görülen kanser türü süt kanallarında meydana gelen türdür.



Şekil 2. 4. Memenin dokusu [17]

2.6.4 Meme Kanserinin Belirtileri

- Memede kitle genelde hasta tarafından ve ya doktor tarafından fark edilir, nadiren ağrılı olur.
- Meme ucunda akıntı eğer kanlı değilse iyi huylu fibrokistik bir kitle olma ihtimali yüksektir.
- Meme derisinde çökme veya gerginlik ortaya çıkabilir, meme deformasyona uğrar derisinde yara, şişkinlik ortaya çıkıp ve portakal kabuğu görünüm kazanır.
- Meme ucunda değişiklik olursa, meme ucu derisinde dökülmeler meydana gelir buna paget hastalığı denir, belirtileri yanma hissi kaşıntı kızarıklık sertlik ve deri pullanması (dökülmesi) şeklindedir.
- Memede oluşan herhangi bir kanser metastaza geçtiğinde ilk durağı koltuk altı bezleridir. Metastazda bu lenf bezleri büyürler ve ağrılıdır.
- Memedeki kitleye göre meme boyu da değişir.

Yaş, genetik, obezite, sigara, alkol, erken menarş (ilk adet) ve geç menopoz meme kanserinde risk faktörü olarak bilmektedir[18].

2.7 Meme Kanserinde Görüntüleme Yöntemleri

2.7.1 Mamografi

Mamografi, düşük dozdaki X ışını yardımıyla insan meme muayenesinde yardımcı bir tanı testi olarak etkin bir şekilde kullanılan görüntüleme yöntemlerinden biridir. Mamografinin amacı karakteristik kitlelerin belirlenmesiyle olası meme kanserinin erken teşhis edilmesidir. Meme muayenesinin mamografiyle yapılması esnasında şüpheli bir kitlenin varlığı, bu kitlenin yeri ve aynı zamanda kitlenin nitelikleri mamografi yardımıyla görüntülenebilir.

Memede yağ dokusu, bağ dokusu, grandüler doku olmak üzere farklı dokular vardır. Bu dokular destek dokusu olan yağ dokusu ile fibröz bağ dokusu ve süt üreten lobüllerle, sütü meme başına ileten kanallardan oluşur. Fibröz ve yağ dokuları memeye şekli verirken, meme yapısını oluşturan lobüller ve süt kanallarıdır. Yağ ve fibröz doku birleşimi grandüler yapı olarak adlandırılır. Bu dokular birbirlerinden farklı olsa da radyolojik olarak birbirlerine benzerler. Yağ dokusu daha düşük dansiteye sahipken, bağ dokusu ve grandüler doku yakın dansiteye sahiptir.

Mamografik görüntüleme temel olarak meme lezyonlarının biçimsel özelliklerini temel olarak gerçekleştirilir. Meme dokusunda yer alan iyi huylu (benign) lezyonların mamografik görüntüleri lobül konturlu kitle lezyonu olup keskin sınırlı şekilde görüntülenirken, kötü huylu lezyonlar spiküle konturlu kitleler olup düzensiz sınırları belirsiz şeklindedir [19,20].

Mamografi tekniği ile memenin tümü ya da olabildiğince fazla meme alanı, optimum görüntü ayrıntısı ve yüksek kontrast ile görüntülenebilmektedir. Memede elle kendi kendine kontrol sırasında ve muayene sürecinde tespit edilemeyecek kadar küçük, özellikle kanser olabileceği düşünülen oluşumların belirlenmesi ve erken teşhisi aynı zamanda meme iç yapılanmasının görüntülenmesi hedeflenmektedir.

Mamografi memenin görüntüsünü alabilen röntgen cihazı olarak açıklanabilse de, Mamografi tekniği, klasik röntgen cihazı tekniklerinden farklı bazı özellikler taşımaktadır. Mamografi, klasik röntgenle karşılaştırıldığında en belirgin avantajı düşük

doz X ışını kullanılarak daha yüksek kalitede görüntü elde edilebilmesidir. Kolay ulaşılabilir olması ve yüksek lezyon saptama özelliği gibi avantajlarından dolayı meme kanseri teşhisinde klinik bulgu vermeyen durumlarda hem tanı amaçlı hem de tarama yöntemi olarak en sık kullanılan en öncül görüntüleme yöntemidir.

Mamografi yüksek duyarlıklı bir teknik olmasına rağmen özellikle meme dokusunun yoğun olduğu ve cerrahi uygulanmış hastalarda kötü huylu lezyonları iyi huylu lezyonlardan ayırt edemez.

Mamografi tekniğinde, yaşın ilerlemesine bağlı olarak yağ dokusu oranı arttığı ve mememin yoğunluğu azaldığı için anormal değişiklikleri saptamak ve lezyon tespitinde bulunmak kolaylaşmaktadır. Ama yoğun meme dokusuna daha çok genç kadınlarda sık rastlanmasına bağlı olarak mamografinin duyarlılığı azaldığı için meme dokusundaki lezyonların tespiti zorlaşmaktadır.

Bazen mamografi ile saptanamayan meme kitlesi hekim tarafından yapılan klinik meme muayenesi ile belirlenebilmektedir. Bu sebeple kitlenin ve lezyonların türünün belirlenebilmesi için hastalarda bazen gereksiz klinik ve cerrahi tetkiklere ve müdahaleye sebep verebilmektedir. Bu da mamografinin maliyeti arttırmasına neden olmaktadır[21]

2.7.2 Ultrasonografi

Ultrasonografi, ultrasonik dalgalar oluşturarak yani yüksek frekanslı ses dalgaları aracılığıyla görüntü elde edebilen bir tanı yöntemidir. Bu yöntem de X ışını yoktur ve radyasyon içermez.

Ultrasonografi, mamografide saptanan lezyonların iç yapılarının değerlendirilmesinde etkinliği çok yüksek bir yöntemdir. Bu sebeple günümüzde mamografinin tamamlayıcısı durumundadır. Ultrasonografi, mamografiden farklı olarak, kesitsel bir görüntüleme yöntemi olup görüntüleme sırasında memedeki dokular birbiri üzerine binmediği için tanı hatasını en aza indirger. Ayrıca elle muayene sırasında hissedilen herhangi bir lezyon bulunmuyorsa ve 35 yaşından küçük genç kadınlarda öncül görüntüleme yöntemi olarak seçilen bir yöntemdir. Gereksiz biyopsi ve gereksiz kısa dönem takiplerinin önlenmesinde aynı zamanda mamografide tam olarak görülemeyen lezyonların değerlendirilmesinde kullanılması ultrasonografi yönteminin avantajları arasında yer alır[22]

2.7.3 Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

Mamografi ve ultrasonografi meme kanseri teşhisinde henüz istenilen duyarlılıkta olmadığı için bu yöntemlerdeki yetersizlik yeni arayışlara neden olmuş ve MRG meme dokusunun incelenmesinde kullanılmaya başlanmıştır.

Manyetik Rezonans Görüntüleme manyetizma dayanan bir prensiple çalışır. Büyük mıknatıslarla oluşturulan güçlü manyetik alan altında atomlar, manyetik alan yönünde yönelir ve üzerlerine radyo dalgaları uygulanan bu atomlar belirli bir frekans aralığında salınım yaparak aldıkları radyo dalgalarını geri yansıtırlar. Manyetik Rezonans (MR) tekniğinde manyetik alan altındaki insan hücresinde bulunan atom çekirdeklerinin titreşim yapması ve yansıttıkları radyo dalgaları ile MR görüntü oluşturur. Böylece bu teknik belirli anatomik yapıların diğer yapılardan ayırt edilmesini, sağlıklı ve hastalıklı dokular arasındaki farklılıkların tespitini ve tanımlanmasını sağlar.

MR cihazı vücuttaki yumuşak dokularda etkili bir kullanım alanına sahip olup bu dokularda maksimum görüntüleme sağlar. Bu sayede MRG ile yumuşak dokulardaki lezyonlar ve kitleler kolayca incelenebilir.

MRG, memenin malign lezyonlarının tespitinde duyarlılığı en yüksek meme görüntüleme yöntemi olsa da görüntüleme süresinin uzun sürmesi, maliyetinin yüksekliği, ulaşılabilirliğinin her zaman mümkün olmaması meme MRG ' de bazı dezavantajlar olarak sayılır. Mamografi ve ultrasonografi ile iyi huylu ve kötü huylu lezyonların ayrımının her zaman yapılması mümkün olmamakla birlikte MRG, bu tekniklere göre ve elle muayene ile tespit edilemeyen durumlara oranla lezyonların tespitini %20-%25 oranında gerçekleştirebilmektedir. MRG'de tümör dokularının görüntülenmesi, memedeki malign lezyonlarının belirlenmesi ve saptanmasındaki duyarlılık ise %90'ın üzerindedir. Böylece MR yoğun memelerin fibrokistik yapılı olduğu durumlarda cerrahi tedavinin netleşmesinde çok önemli etkinliğe sahiptir. Bu yüzden kanserin tekrarlayabileceğinin tahmin edildiği süreçlerde önemli bir yol göstericidir.

MRG tekniklerinden biri olan Dinamik kontrastlı teknik meme görüntüleme en yaygın kullanılan bir tekniktir. Dinamik kontrastlı teknikte invaziv kanserleri tespit etme duyarlılığı %90-100 oranındayken özgüllüğü %75 oranındadır. Bu yüzden bazı durumlarda şüpheli radyolojik görüntüleme bulgularına sebebiyet verir ve bu durum MRG yapılan ölçümlerde yanlış pozitiflik oranının yüksek çıkmasına sebebiyet verir.

Negatif biyopsi oranını azaltabilmek için yöntemin özgüllüğünü arttırmak amacıyla ileri MR görüntüleme yöntemleri üzerinde çalışılmaktadır. Çalışılan bu yöntemlerden difüzyon MR görüntüleme yöntemi en popüler olanı en rövanşta olan ve üzerinde en çok çalışma yapılanı olup diğer yöntemler Manyetik Rezonans Spektroskopi ve Perfüzyon Manyetik Rezonans görüntülemedir.

Difüzyon görüntüleme, birçok vücut bölgesinin ve özellikle meme tümörlerinin benign-malign ayrımında etkindir. MR Spektroskopi dokuların biyokimyasal yapısını analiz eden bir tanı yöntemidir. Perfüzyon Manyetik Rezonans görüntülemede ise beyin dokusunun fonksiyonel durumu hakkında bilgi edinilir.

MRG ile şüpheli dokuya karar verilemeyen durumlarda doğrudan biyopsi yapılması önerilmektedir. MRG, çoklu malign lezyonları tespit etmede daha yüksek hassasiyet gösterirken ve MRG ile meme dokusunda bulunan tümör boyutu en yakın ölçümle alınabilmekte iken mamografi ve ultrasonografi ile ölçümde 2 cm'den büyük lezyonların olduğundan daha küçük olduğu görülür. [23]

MG ile görüntülemede gözden kaçan kanser odakları varken MRG ile iki memenin de aynı anda görüntüsü alınabilmektedir. Görüntüleme sonucu elde edilen veriler ve sonuçların değerlendirilmesi ve raporlanması aşamasının standart olması için Meme MRG'si standardize edilmiştir. Bu kapsamda, ACR'nin (American Collage of Radiology) tarafından 'Uluslararası Meme MRG Çalışma Grubu (International Working Group on Breast MRI)' kurulmuştur ve bu grup 1998 yılından itibaren çalışmalarına devam etmektedir. Rapor için kullanılması gereken terminoloji bu grup belirlenmiş ve BI-RADS sınıflama sistemi geliştirilmiştir [24].

2.8 Kanserın Geleneksel Tedavisi

Meme kanserine yönelik geleneksel tedaviler hastanın yaşına, fiziksel durumuna, kanserin evresine ve tedavi yönteminin avantaj ve dezavantajlarına göre seçilmektedir:

2.8.1 Cerrahi Yöntemi

Cerrahi yönteminde tümör çıkartılır, tümörle beraber sağlıklı dokunun bir kısmı da çıkartılır. Meme kanseri için memenin bir veya tümü alınır. Prostat kanserinde prostat bezi çıkartılır. Ama cerrahi tüm kanser türlerinde kullanılamaz. Örneğin lösemide en iyi tedavi yöntemi ilaçtır.

2.8.2 Radyasyonla Tedavisi

Radyasyonla tedavide verilen X-Ray ışını kanserli hücreleri öldürme veya bu hücreleri yavaşlatma amacı ile kullanılır. Bu yöntemde kanserli bölgeye bir prob yerleştirilerek radyasyonların o bölgede toplanıp yoğunlaşması sağlanmaktadır [25].

2.8.3 Kemoterapi

Kemoterapide kanserli hücreleri öldürmek veya bölünmelerini yavaşlatmak için ilaç kullanımıdır. Bazı kemoterapi ilaçları toplardamar yolu ile verilir ve bazıları ise yutularak alınır. Kemoterapi ilaçları vücudun neredeyse her yerine giderek kanserin dağıldığı her bölgeye etki eder [26].

Geleneksel tedavilerin getirdiği avantajların yanı sıra dezavantajları da mevcuttur. Dezavantajları en aza indirmek için, kanserin moleküler mekanizmasını açıklamaya çalışan araştırmalar sonucunda, kanser oluşumunun aydınlanmasında kayda değer yol kat edilmiştir.

Bu mekanizmalardan biri epitelyal mezenkimal geçiş değişimidir (EMT). Embriyonun gelişiminde normalde var olan ve yetişkin insanlarda anormal bir şekilde aktif olması nedeniyle kansere yol açan EMT, kanserli hücrelerin saldırgan olmalarına ve çevre organlara yayılmasına yol açar [27].

2.9 Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT)

Günümüzde tıp alanındaki ilerlemelere rağmen, metastaz, tümörün nüksü ve ilaçlara karşı direnç kazanması meme kanserinde ölüm sebeplerinin başını çekmektedir. Etkin bir tedavi yönteminin geliştirilmesi meme kanserinin moleküler mekanizmasını düzgün anlamının altında yatmaktadır. Giderek bilgimiz gizli embryonik yolaklarının anormal şekilde aktive olması hakkında artmaktadır, EMT bunlardan biridir. Epitel dokunun en önemli özelliği vücudun yapısal bütünlüğünü sağlamaktır. Dış epitelyal vücudu dış etkenlere (virüsler, bakteriler vs.) karşı korur. İç epitelyal organların iç yüzeyini kaplar ve organların sınırlarını belirler.

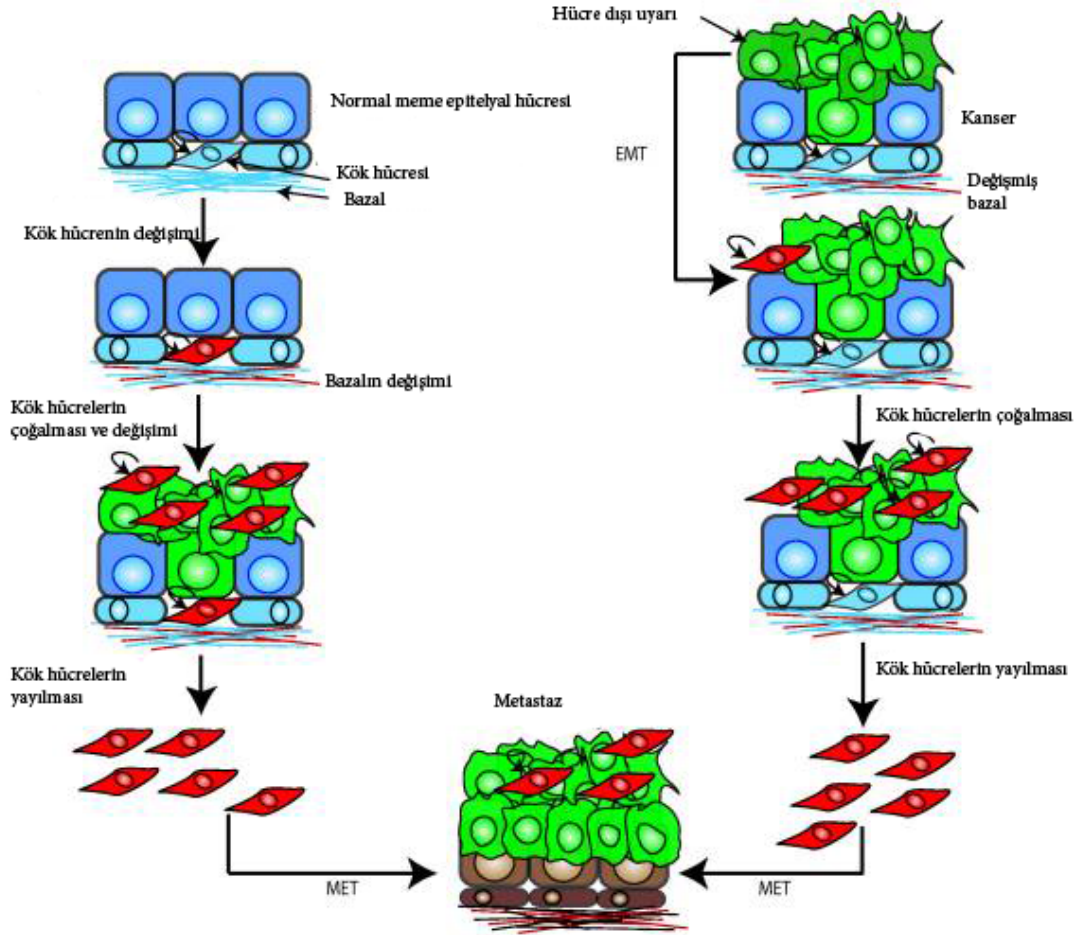
Epitel doku epitel hücrelerinden oluşur ve hücreler arası boşlukları dolduran ve hücreleri birbirine bağlayan ve destekleyen kompleks bir yapıdır. Hücreler arası bağlantılar, hücre-hücre arası bağlantılar ve hücre- matriks bağlantıları şeklindedir.

Hücre-hücre arası bağlantılar hücrelerin bir arada tutunmalarına olanak sağlarken hücre-matriks bağlantıları ise ekstraselüler matriks tarafından hücrelerin bir arada tutulmasını sağlar [28].

EMT kanser hücrelerine göç etme ve metastaz yeteneği kazandırır [29-31]. Tümör, kanserli hücrelerin küçük bir grubundan oluşur. Bu hücelere kanser kök hücreleri veya tümörü başlatan hücreler denir. Bu hücrelerin iki karakteristik özelliği vardır:

- Kendilerini yenileme yeteneği
- Başladıkları hücreden (ebeveyn hücresinden) farklı bir fenotipe sahip bir tür oluşturmak [32].

Kanser kök hücreleri, primer tümörlerin oluşmasında, desteklenmesinde ve kanser hücrelerinin uzak bölgelere yayılmasında önemli rol oynamaktadır [33-37].



Şekil 2. 5. Epitelyal mezenkimal geçişin ve kök hücrelerinin meme kanserinin oluşumundaki rolü[38]

Tümörler normal dokularda var olan kök hücrelerinin değişim geçirmesinden veya normal doku hücrelerin kendilerini yenileme kabiliyeti kazanması ile oluşur [32].

Meme tümörleri şekil 2.5'te görüldüğü gibi ya normal yetişkin dokunun kök hücrelerinden ya da yetişkin bir hücrenin farklılaşma ve kendini yenileme yeteneğini kazanmasıyla ortaya çıkar. Görüldüğü gibi kök hücre programsız bir şekilde çoğalmaya başlar ve epitelyal formdan mezenkimal (EMT) forma girerek hareketlilik kazanır. Dokudan ayrılıp metastaz yaparak farklılaşmış bir hücre kök hücre özelliği kazanır. Farklılaşmış hücre, hedef bölgeye ulaştığında ise mezenkimal formdan epitelyal forma (MET) geçerek dokuya tutunur ve çoğalmaya başlar [39,40].

EMT organların gelişimi sırasında çok önemli bir süreçtir. Normal embriyonik gelişimi sırasında, EMT hücre hücre arası bağların kopmasından ve hücrelerin hareketlik kazanmasından sorunludur. Böylece gerekli geniş hücre hareketlerini, gastrülasyon ve organogenez için kazanmış olur. EMT normal yetişkin dokuda, yaralanma ve yenilenme sırasında meydana gelir, EMT'nin düzensizliği organ fibrosis ve dokuların yapısının bozulması gibi patolojik hastalıklara yol açabilir. Metastatik olmayan hücreler EMT programının metastaz anına kadar inhibe ederler [29-31].

2.10 WNT/ β -Katenin Yolağı

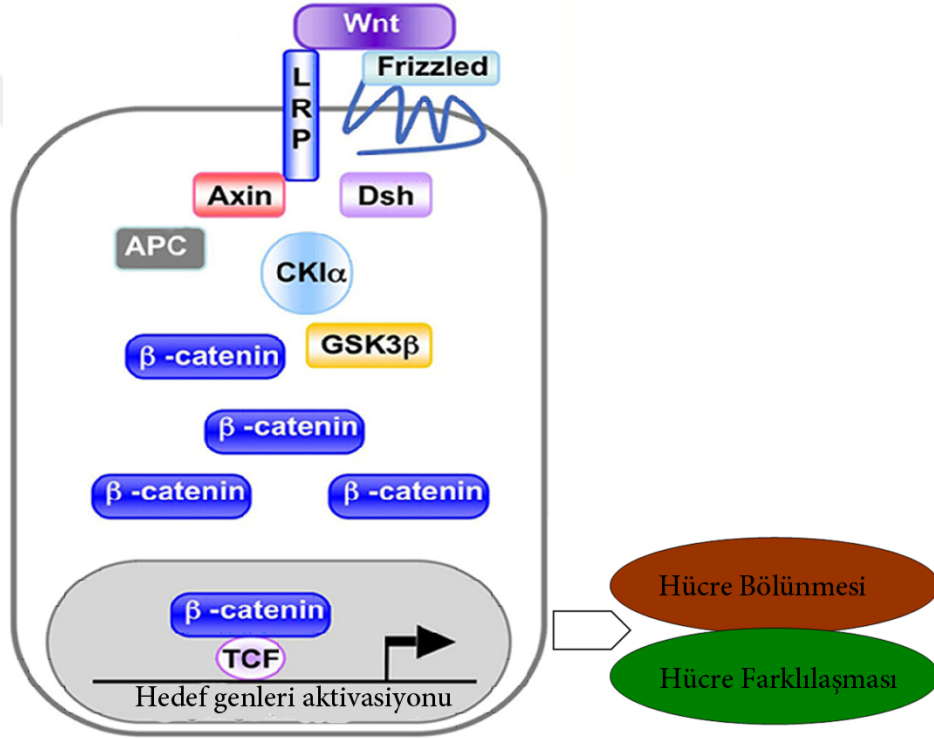
Bu yolağın proto onkojen etkisi ve kanserde rol oynayabileceği araştırmalarca ispatlanmıştır. Normal dokuda hücreler birbirlerine hücreler arası bağlarla tutunurlar. Embriyo gelişimi sırasında veya bir yaralanma esnasında hücreler birbirlerinden ayrılma ve göç etme sürecine girerler. Bu süreçte WNT/ β -katenin yolağı kullanılmaktadır. WNT / β katenin yolağı pek çok protein ve gen tarafından kontrol edilen aktif bir yoldur.

Bu yolak yetişkin canlılarda kontrolsüz şekilde aktif olursa birçok dejeneratif hastalığa ve en önemlisi kansere neden olmaktadır. Wnt proteinleri çevre hücrelerdeki genlerin ekspresyonu ile üretilir ve ECM'e salınır (Şekil 2.6.).

Memenin gelişiminin başlaması, kanalların dallanması ve alveollerin morfogenezi hamilelik sırasında Wnt sinyali tarafından gerçekleşir. Wnt sinyali memede birçok gelişime neden olmaktadır. Wnt sinyali, meme gelişiminin başlamasında, kanalların dallanmasında ve hamilelik döneminde alveollerin morfogenezinde önemli role sahiptir

Normal hücrelerde ECM'te WIF-1 (Wnt inhibitory factor 1) proteini mevcuttur ve WNT proteinine bağlanarak onu inhibe eder. Ancak WIF'in yokluğunda veya WNT'nin yüksek miktarlarda salındığı durumlarda, WNT kendi reseptörü olan Frizzled'e bağlanır. Bağlanmanın sonucunda hücre içinde bir dizi reaksiyonlar başlatılır.

Son olarak hücreler arası bağlayıcılar olan E-kadherinler gevşer ve β -katenin çekirdeğe girerek kendi genlerini eksprese edip hücrenin hareketliliğini artırır. Bu durum EMT'ye sebep olur ve hücreler ayrılarak metastaz yaparlar.



Şekil 2. 6. Wnt/ β -katenin yolağında aktif ara moleküller[41]

Organizmalarda hem embriyonik hem de ergin dönemlerde önemli birçok biyolojik süreçlerde aktivite gösteren ve görev alan üç adet Wnt sinyal yolu bulunmaktadır [42]. Birinci yol Wnt sinyal yoludur. Bu yol hücre polaritesinin sağlanmasında görev alır. Böylelikle embriyonik dönemde hücre iskeletinin oluşmasında katkı sağlar [43]. İkinci yol "Wnt/ Ca^{+2} sinyal yoludur. Bu yol kalsiyum (Ca^{+2}) metabolizmasında görevli biyomolekülleri aktive eder ve hücre içindeki Ca^{+2} miktarını artmasına neden olur [44]. Bazı araştırmacılar bu iki yol, standart olmayan veya β -katenin bağlı olmayan sinyal

yolu olarak birlikte tanımlamışlardır [42,45]. Üçüncü sinyal yolu ise Wnt/ β -katenin sinyal yoludur. Wnt/ β -katenin sinyal yolunda görev yapan moleküllerde oluşabilecek bir mutasyon, birçok kanser türünün de ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki Wnt/ β -katenin sinyal yolunun çeşitli kanser türleri ile olan ilişkisi bulunmaktadır. Bu sinyal yolu standart ya da klasik yol olarak da literatürde yer almaktadır [42]. Wnt/ β -katenin sinyal yolu tümör oluşumunda rol aldığı ve birçok hastalıkla yakın ilişkisi olduğu için araştırmacıların dikkatini çeken ve en çok çalışılan Wnt sinyal yoludur [46].

Wnt/ β -katenin sinyal yolağının bulunduğu yıllarda hücre döngüsünün düzenlenmesinde, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve adezyonunda önemli rolü olduğu ortaya konulmuştur [47,48]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Wnt/ β -katenin sinyal yolağının, sinaps oluşumu, adipogenez ve anjiogenez gibi önemli biyolojik olaylarda, tümör oluşumunda ve başta meme, kolorektal ve servikal kanserler olmak üzere çeşitli ciddi hastalıkların oluşumunda önemli rol oynamaktadır [48-50]. Wnt/ β -katenin sinyal yolu, hücre zarı, stoplazma ve çekirdek olmak üzere bir hücrenin üç ayrı bölgesinde gerçekleşmektedir.

Sinyal iletim mekanizması hücre zarında başlar ve hücre dışındaki (ekstracellülar) bir uyarı hücre içindeki (intracellüler) bir sinyale dönüşmüş olur. Sinyal mekanizmasının tam olarak anlamamız için Wnt/ β -katenin sinyal yolağının hedef hücre zarındaki olayların ayrıntılı olarak ortaya konulması ile mümkün olabilir. Aşağıda sinyal yolunun başlangıç aşamasında Wnt, hedef hücre zarında bulunan Frizzled (Fz) ve LRP5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein) proteinin yapıları ayrıntılı olarak anlatılmaktadır.

2.10.1 Wnt/ β -katenin Sinyal Yolunun Hücre Zarındaki Mekanizması

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ismini Wnt proteininden almaktadır [51]. Wnt proteini yetişkin bir insanda hematopoietik hücreler, epitel dokusunun en alt tabasındaki bazal hücreler, kan damarları, beyin, karaciğer, akciğer, prostat gibi doku ve organlarda bulunan erişkin kök hücreler tarafından sentezlenir [51]. Sentezlenen Wnt proteini çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar geçirerek bu hücreler tarafından hücre dışına salınır. Hücre dışında difüzyon ile hedef hücre zarına gelen Wnt proteini hedef hücre zarında bulunan Fz ve LRP5/6 reseptörlerine bağlanır [52,53]. Böylece Wnt proteininin

reseptörlerine bağlanan “Wnt-Fz- LRP5/6” üçlü kompleks yapı oluşur. Bu yapı sinyal yolağının başlaması için oluşması gereken asıl yapıdır [52,54].

Bu sebeple, Wnt/ β -katenin sinyal mekanizmasının hücre zarındaki aktivasyonunda rol alan biyomoleküllerden Wnt proteini ile hücre zarı reseptör proteinlerinden Fz ve LRP5/6 proteinlerinin özellikleri ve önemleri aşağıda detaylı olarak anlatılmıştır.

2.11 Wnt Proteinleri

Her zaman karışık dokuların gelişmesi tartışma konusu olmuştur. Nasıl olurda tabaka halinde ve farklılaşmamış bir hücre farklılaşır ve fonksiyon kazanıp doku oluşturur? Bilindiği üzere bu işlem hücreler arası muazzam bir haberleşme ve iletişim gerektirir. Hücreler arası iletişim yollarından hücreler tarafından hücre dışı ortama (extracellular space) sinyal moleküllerinin salgılanmasıdır. Bu sinyal molekülleri hedef hücreye varınca membrandaki reseptörüne bağlanıp ve hücre içinde bir dizi reaksiyonu başlatır ve çoğalmayı (proliferation), farklılaşmayı (differentiation) ve göç (migration) etmeyi tetikler. Bu sinyal moleküllerinin salınımı, taşınması, alımı hücrelerin sağlıklı bir şekilde çoğalması için sıkı bir şekilde kontrol altında tutulur. Birçok araştırma için bu mekanizmanın nasıl çalıştığı konu olmuştur [55].

İlk olarak 1982 yılında Wnt proteinini kodlayan Wnt geni farenin meme tümörü ile yapılan viral insersiyon mutasyonu çalışmaları sonucunda protoonkogen olarak bulunmuş ve int-1 adını almıştır [56]. Daha sonra 1991 yılında Wnt geninin Drosophila'daki segment polaritesinden sorumlu wingless geni ile homolog olduğu anlaşılmıştır ve bu sebepten dolayı iki genin ismini birleştirerek Wnt geni olarak literatüre geçmiştir [57]. Wnt genleri omurgalı ve omurgasız birçok canlıda saptanmış olmasına rağmen tek hücreli bir ökaryot olan Saccharomyces Cerevisiae'de ve prokaryotlarda bulunamamıştır [51,58,59]. Son yıllarda yapılan çalışmalar bitkilerde de Wnt sinyal yolağında görev alan biyomoleküllerin homologları göstermiştir [60,61]. Tüm bu çalışmalar bu proteinin evrimsel geçmişini ortaya koymaya yönelik olup, çalışmalar sonucu bu gen ailesinin Sölenterlerden (Hydra) insana kadar oldukça korunarak aktarıldığı gösterilmiştir. Omurgalılarda 24 Wnt proteinleri mevcuttur. Wnt proteinleri glikoproteinlerin büyük bir ailesini oluştururlar. Wnt proteinleri hücre dışı sinyal iletme mekanizmasında yer alırlar ve omurgasızlardan insanlara kadar aynı mekanizmayla

çalışırlar. Bu proteinler işlevlerini Frizzled reseptörleri vasıtası ile gerçekleştirirler, Frizzled ailesi 11 üyeden oluşur [62]. Bu ailenin embriyo gelişiminde ve hücre bölünmesinde önemli rolünün olduğu bilinmektedir [63,64].

Wnt proteinlerinin embriyo gelişiminde rol oynaması araştırmalarca ispatlanmıştır ve bu araştırmalar Wnt sinyallerini anlamamıza büyük katkılar sağlamıştır [65,66].

2.12 Wnt Sinyal Mekanizması

Wnt sinyal şebekesi 24 Wnt ligandı ve 11 Frizzled reseptörü ile çok karışık bir mekanizmadır. Wnt sinyalleşme yolağının aktif ve ya inhibasyonu hücre dışında Wnt proteinleri ve reseptörleri olan Frizzled'ler tarafından kontrol edilir [62,67]. Literatürde Wnt sinyal mekanizması şekilde gösterildiği gibi önerilir [68].

Sinyalleşme Wnt proteinlerinin salgılanması ile başlatılır ve Frizzled genleri tarafından kodlanan Frizzled reseptörüne bağlanır [69]. Bu reseptörün aktivasyonu hücre içinde bir seri reaksiyonu tetikler ve en son beta katenin hücre çekirdeğine girerek gerekli genlerin kodlanmasına sebep olur [68]. Wnt sinyalleşme sistemi, doğmadan önce organogenezde, doğumdan sonraki süreçlerde, yara iyileşmesine ve kanser oluşumunda kritik role sahiptir [70]. Wnt'ler vücutta birçok önemli rolleri vardır. Örneğin Wnt-2b plasentanin damarlanmasında ve Wnt-7b eksikliği akciğer damarlarında şiddetli rahatsızlıklara ve doğum öncesi ölümlere sebebiyet vermektedirler [71]. Wnt-1 proteininin fazla ekspersiyonu meme kanserine ve Wnt-1 ekspersiyonunun önlenmesi apoptoza sebep olur [72].

2.12.1 WNT-1 ve WIF-1 Proteini

Wnt-1 proteini 370 amino asitlik ve palmitoylation ailesine ait bir glikoproteindir ve Wnt-1 geni tarafından kodlanır. 41 kDa ağırlığına sahiptir. 23 sisteine ve 4 N-bağlı glikozilasyon bölgesine sahiptir [73].

Wnt-1 proteini birçok kanser türünde (meme kanseri, akciğer kanseri, sarkoma) fazla miktarda üretilir ve bu proteinin inhibisyonunun tümörün baskılanmasında, hücrelerin apoptozunda ve metastazında önemli rol oynadığı araştırmalarla ispatlanmıştır[74].

Sağlıklı bir vücutta Wnt sinyal yolağının aktifleşmesi belli bir mekanizmalarla kontrol edilmektedir. Bu önleyici mekanizmalar WIF-1 ve SFRPs proteinleridir.

SFRP1 (secreted frizzled-related protein 1) 300 amino asitten oluşur ve sistince zengin bir domaine sahip olup SFRP ailesinin bir üyesidir ve iki iş yapar:

- Frizzled reseptörüne bağlanıp Wnt proteininin bağlanmasının önler
- Wnt proteinine bağlanarak Wnt proteinine reseptörüne girmesini engeller [75,76].

Wnt inhibitör faktörü (WIF-1) WIF_1 geni tarafından kodlanır ve 379 amino asitten oluşmaktadır. Bir WIF domaine, 5 EGF tekrarına ve hidrofobik bir karboksil ucuna sahiptir. Wnt-1 proteinin anormal şekilde aktif olması meme kanserinde önemli rol oynadığından Wnt sinyalinin baskılanması hücrelerin çoğalmasını durdurmada önemli bir basamaktır. WIF-1 proteini Wnt proteinini inhibe ederek onların Frizzled reseptörüne bağlanmasını önler. WIF-1 normal epitel hücrelerinden salınır ama kanserli hücrelerde WIF'ın salgılanmasında düşüş gözlemlenir; mesela meme kanserinde % 60 düşüş gözlemlenmiştir [77,78].

2.13 Kanser Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar

Nanoteknoloji disiplinler arası bir daldır ve pek çok bilim dalının (biyoloji, kimya, fizik, tıp ve mühendislik) kesiştiği noktadır. Kanser hücrelerini hedeflemek için

- Çok fonksiyonlu (multifunctional) nanopartiküllerin dizaynı
- İstenilen yere ilaçların taşınması ve teslimi
- Kanserli hücrelerin özenle tanısı

Sadece nanoteknolojinin onkoloji kısmındaki potansiyellerinden bir kaçıdır [79].

Nanoteknoloji atomlar ve molekülleri kullanarak yeni malzemelerin 1-1000 nanometre arasında üretimi ve kontrolü olmakla beraber tıbbın onkoloji alanındaki bugüne kadar en yararlı bilim dalı olması beklenmektedir[80]. Nanoteknoloji ile üretilen malzemeler top-down veya bottom-up yöntemiyle 100 nm'nin altında olmaları gerekmektedir. Ortaya çıkan nano materyallerin özellikleri bunları oluşturan malzemelerden çok farklıdır. Nano materyallerin yüzey hacim oranları daha büyük, fizikokimyasal özellikleri, sürtünme, diğer moleküllerle etkileşimleri, malzemenin makro ölçüsünden daha farklı olmaktadır. Nanoteknolojinin tıp alanında en yaygın kullanımları şu şekildedir:

- Hastalıklara karşı yeni tedavi yöntemlerin geliştirilmesi

- Görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesi [81-83].

2.14 Nanotıp

Kanser dünyada en çok ölüme sebep olan hastalıklardan biri olmakla beraber her gün bu oran artmaktadır. Genel kanser tedavi yöntemleri konvansiyonel olup kemoterapi, radyasyon, cerrahi vb. yöntemlerle kısıtlıdır. Şimdiki tedavilerin en büyük sorunu anti tümör ajanların spesifik olmamaları ve vücutta dağılmaları, tümöre ulaşan ilaç oranının yetersiz olması ve bu tedaviye verilen etkinin görüntülenememesidir. Hedef bölgeye ilaçların iz miktarda ulaşması önemli komplikasyonlara ve ilaca karşı direnç oluşmasına sebep olmaktadır.

İstenilen bölgeye Mükemmel hedefleme ve teslimatın 2 önemli amacı tedavi edici ajanların geliştirilmesi ve görüntüleme sistemleri için kontrast ajanların sentezlenmesidir. Kusursuz halde, bir ilaç istenilen spesifik tümör bölgesine varır ve normal ve sağlıklı dokular zarar görmezler. Bu amaca ulaşmanın en mantıklı yolu tedavi edici ajanların tümöre spesifik olan monoklonal antikörlara (mb) bağlanmasıdır. Bu ilaçların geleneksel kemoterapi ilaçlarla karşılaştırıldığında tedavi yönünden büyük umut vaat etmektedir [84], zira teslimat ve hedefe spesifik yönünden eksik kalırlar. Örneğin damar yoluyla verilen 100,000 monoklonal antikör, tedavi ajanı ve ya kontrast ajanının 1-10 tanesi hedefe ulaşmaktadır [80,85].

İnsanda kanser teşhisinde kullanılan saldırgan olmayan (noninvaziv) görüntüleme yaklaşımları X-ray Tabanlı Bilgisayar Destekli Tomografi (BT), Pozitron Emisyon Tomografisi (PET), Tek Foton Emisyon Tomografisi ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) şeklindedir [86-91]. Tümöre spesifik hedeflenmede nanopartiküllerin kontrast ajanı olarak kullanılmaları in vivo çalışmalarında var olan klinik yöntemlere kıyasla daha fazla hassas ve spesifik olmaları umut vaat etmektedir. Nanopartiküllerin gelişimi, görüntüleme ve tedavi ve bugünkü kanser tedavisindeki engellere karşı birçok çözüm vaat etmektedir. Nanopartiküllerin boyutu 5-200 nm'dir. Moleküler düzeyde biyolojik sistemlerle benzersiz etkileşim sağlarlar. Özel yapılarından kaynaklı nanopartiküller self-assembly özellikte olup stabilitelerini ve spesifikisitelelerini koruma yeteneğine de sahiplerdir. Bu durum ilaç kapsülleme ve biyo uyumluluk açısından büyük önem taşımaktadır. Kanser nanoteknolojisindeki son gelişmeler

kişinin moleküler profiline özgü tane ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ile ilgili umut vaat etmektedir [92].

Kanser tedavisinde birçok nano taşıyıcı kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları: Dendrimerler, Nanoshells, Liposoms, Metal nanopartiküller, Polimerik Nanopartiküller, Manyetik Nanopartiküller, Kuantum noktacıklarıdır [80]. Nanotaşıyıcılar var olan ilaçların etkisini arttırarak, toksisitelerini azaltarak yüksek tedavi oranı gösterirler. Nanotaşıyıcılar ilaçların çözünürlüğünü ve dayanaklığını iyileştirirler. Nanotaşıyıcılar çok fonksiyonlu sistemlerin geliştirilmesini kolaylaştırırlar [93,94]. İlk nanotaşıyıcı 40 sene önce lipozomla geliştirildi [95]. Son 20 senede ilaç taşıma için geliştirilen nanotaşıyıcılar farklı fiziksel ve biyo kimyasal özelliklerle sahiptirler. Son zamanlarda, kanser nanoteknolojisinin potansiyeli giderek daha çok ortaya çıkmaktadır, Örneğin FDA tarafından onaylanmış nanotaşıyıcıların ilk jenerasyonu tedavi için Abraxane [96], Doxil [97], Daunoxome [98] ve tanı için Feridex'tir [99].

2.14.1 Nanopartiküller

Nano kelimesi Yunancada cüce anlamına gelmektedir. Nanometre (nm) bir metrenin milyarda biridir ($1 \text{ nm} = 10^{-9}$). Ve çok küçük maddelerin ölçümünde kullanılır. Mesela hücre zarı 10 nm iken, nanopartiküller 1-1000 nm arasında olabilirler. Nanoteknoloji çalışmaları 1-100 nm arasında boyutlar arasında olan nanoyapıların araştırılmasıdır.

Nanoteknolojinin eşsizliği nanoyapıların boyutlarına bağlı olarak gösterdikleri çok farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Nanopartiküller farklı optik, manyetik, elektronik ve floresan özellikleri yanında, yüksek yüzey hacim alanına sahip olup bu özellikler onların birçok uygulamada kullanılmalarına olanak sağlamaktadır.

Tıp alanında çeşitli patojenler, proteinler ve genlerin bulunmasında, genetik hastalıkların teşhis ve tedavisinde, kanserli hücrelerin bulunup ve yok edilmesinde ve birçok hastalığın erken teşhisinde nanopartiküllerin optik, floresans ve manyetik özelliklerinden yararlanılmaktadır.

En son farklı hastalıkların teşhis ve tedavisinin yanı sıra, çevre kirliliği ve biyolojik ajanların belirlenmesi için çeşitli nano biyosensörler kullanılmaktadır. Bu biyosensör uygulamalarında özellikle altın ve gümüş gibi metalik nanopartiküllerin eşsiz optik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Altın nanopartiküllerinin kararlı olması, toksik

olmaması ve yüzeyine biyolojik moleküllerin kolay bağlanması gibi avantajları nedeniyle çok kullanılan metalik nanopartiküllerdir.

Nanopartiküller birçok malzemedен oluşturulabilirler; bunlar metal, polimer ve seramik malzemelerdir. Üretim yöntemi ve kullanılan malzeme nanopartiküllerin boyunu, şeklini ve dolayısıyla özelliklerini değiştirir [92].

Son yıllarda metal nanopartiküllerin özellikle altın nanopartiküllerin kullanımı alanı çoğalmıştır. Altın nanopartiküller kendilerine özgü özellikleriyle (küçüklükleri, canlı hücrelerle etkileşimi, yüksek ısıda dayanıklı olmaları ve hücre içine girebilme kabiliyetleri vs.) tanı ve tedavi için kullanılır. Onlar çok farklı boyutlarda ve şekillerde olabilirler ve diğer nanopartiküllerle bir araya gelip yığın oluştururlar (agglomerate). Ayrıca güçlü optik özellikleri (kuantum etkisi) onları görüntüleme için uygun hale getirmiştir. Metal nanopartiküllerden bazıları altın, titanyum oksit, gümüş ve demir olarak sıralanabilir [100]. Altının atıl (inert) olması ve nispeten sitotoksitesinin fazla olmamasından dolayı ilaç ve gen taşınması için onu ideal hale getirmiştir [101-103]. Ancak nano boyutta olmaları sebebiyle tüm hücrelerin içine kolaylıkla girerler ve bu özellikleri altın nanopartiküllerin kullanılmasının en zorlu kısmıdır. Bu sorunu çözmek için araştırmacılar nanopartikülleri hedefe ulaşmaları için bunları farklı biyo moleküllerle ve ligandlarla birleştirirler.

2.14.2 Altın Nanopartiküller

Altın nanopartiküller (GNP) eşsiz optik özelliklere (yüzey plazmon rezonans absorpsiyonu ve rezonans ışık saçılması), yüzey kaplama farklılığına ve yüksek biyo uyumluluğa sahiptir [104].

Altın nanopartiküller soy metal olduklarından hücreler üzerine toksik etki göstermemektedirler. Aynı zamanda gümüş ve demir gibi metallerin aksine oksidasyon tepkimesine girmezler. Altın nanopartiküller yüzeylerinde başka bir kaplama olmadan bile yük ve hidrofobite gibi yüzey özelliklerinin ayarlanmasına olanak tanımaktadır. Altın nanopartiküllerin yüzeyine tiyol (-SH) grubu kolaylıkla bağlanabilmektedir ve tiyol grubuna da oligonükleotit biyomoleküllerinde var olmasından bu GNP'ler gen taşımada, antikor bağlanmasında ve antisens terapide kullanılmaktadırlar. Yüklenen ilaçlar GNP'ler tarafından hücre içindeki pH değişimiyle ya da dışardan verilen uygulama ile (ışınla) hedef hücre ve ya dokuya salınmaktadır. GNP'ler yüzey

modifikasyonları sayesinde taşıdıkları biyomoleküllerin in vivo ortamında kararlılığını, biyo dağılımlarını ve dolaşım sürelerini artırmaktadırlar [105].

GNP'ler optik enerjiyi ısıya çevirir. Yani foto termal özellikleri vardır ve foto termal terapide kullanılabilir. GNP'ler güçlü ışık absorblayıcı, kararlıya sahip, toksik etkisi olmayan, antikorlara ya da proteinlere kolaylıkla bağlanabilen ve buna ek ayarlanabilir optik özellikleriyle foto termal tedavi için de umut verici araçlardır [106].

GNP'ler güçlü ışık absorblayıcı, kararlıya sahip, toksik etkisi olmayan, antikorlara ya da proteinlere kolaylıkla bağlanabilen ve buna ek ayarlanabilir optik özellikleriyle foto termal tedavi için de umut verici araçlardır [106].

Altın nanopartiküller Turkevich metoduyla sentezlenir. Bu metotta altın ve sitrat oranını değiştirerek altın nanopartiküllerin büyüklükleri değişiklik göstermektedir. GNP'lerle hücre içi özgül organellere hedefleme imkânı vardır. Hatta gen taşımada bile GNP'ler kullanılabilir [106]. Altın nanopartiküller ve onların biyomedikal, in vivo ve in vitro ortamlarında kullanımları son zamanlarda muazzam bir büyüme göstermiştir [107-110].

Altın nanopartiküller nanometre boyutunda altın partiküllerinin koloidal süspansiyonudur. Altın nanopartiküller bir dizi farklı metotla yapılabilir ama bu metotların hepsinde kloroaurik asidin indirgenmesi ve bir stabilize edici maddenin olması esastır. En sık kullanılan metot sitrat sentez metodudur. Trisodyum sitrate kullanılarak kloroaurik asit indirgenir [101-103,107]. Altın nanopartiküllerin boyutu, tuz oranına bağlı olup sıcaklık ve karıştırma hızı ile değerlendirildiğinde 10-25 nm arasındadır. Ancak tuz oranını ve sıcaklığı değiştirerek 1-100 nm arasında nanopartiküller elde edilebilir. Diğer yaygın olarak kullanılan yöntem ise toluen (toluene) kullanmaktır. (faz transfer için tetra-octanyl ammonium bromide (tetra- oktanyl) kullanılır) [111]. Birçok araştırmada nanopartiküllerin sentezleme ve boyutunu değiştirmeye yönelik temel metotta bazı değişiklikler yapılmıştır [112-114]. Kimyasal indirgeme de L- tryptophane kullanılarak altın iyonu oluşturma ve polietilen glikol ile HAUC₄ iyonu oluşturmak ve partiküllerin stabilizesini arttırmak, boy, şekil ve dağılımını homojen yapmaktır [115]. Diğer bir yöntem şifalı bitkilerden metanol ekstre edilir ve indirgeyici ajan olarak kullanılır. Bu şekilde çevre dost nanopartiküller elde edilir (GREEN nanoparticles) [116]. Başka bir prosedürde ekonomik altın nanopartiküller (eco –friendly altın nanoparticles) üretiminde, bir amino asit türevidir olan serrapeptase, stabitazör ve indirgeyici ajan olarak kullanılır [117]. Bu nanopartiküller her zamanki

küresel şekillerinin yanı sıra farklı şekillerde üretilebilir. Bu farklılıklar altın nanopartiküllere farklı fiziksel ve biyokimyasal özellikler kazandırır ve bu özellikler fonksiyonlandırılmış altın nanopartiküllerin biolabelling, bio assay, klinikal tanı ve tedavisinde kullanılmasına olanak sağlamaktadır [118]. Benzer şekilde üretilen altın nano kafesler (gold nanocages) ve altın nanorodlar biyomedikal alanında kanserin görüntüleme ve foto termal terapisinde kullanım alanları bulmaktadır [119]. İcat edilen tüm sentez metotlarının hedefi altın nanopartiküllerin biyolojik moleküllere ve hedef hücrelere olan afinitesini arttırarak ilaç taşıma etkinliği kazandırmaktır. Yaygın olarak fonksiyonlandırmak stratejisi için bu grupların (oligo or polypeptides, oligonucleotides, antisense or sense RNA molecules, antibodies, cell surface receptors and other similar molecules as) biri veya bir kaçının kombinasyonu kullanılır. Altın nanopartiküllerin biyomedikal uygulamaları Çizelge 2.1'de literatür taramasına göre yazılmıştır.



Çizelge 2. 1 Altın nanopartiküllerin biyomedikal uygulamaları.

S. No.	Fonksiyon Grubu	Ligand/ Taşıyıcı Molekül	Anahtar Özelliği	Kullanım	Referans
1	Polietilen Glikol (PEG)	PEG ve Boya Gibi Ligandları(tiyol grubu ile bağlanmış)	Hücre Zarına Bağlanma	Hücre ve Hücre İçi Hedefleme	[120-124]
2	Amin Grubu	PEG	siRNA Taşıyıcı	RNA teknolojisinde	[125]
3	Karboksil Grubu	Proteinler	-	Çeşitli Proteinlere Bağlanma	[126]
4	Peptit	Hücre Yüzeyi Reseptörler, Antikorlar	Adjuvant, kanser Hücrelerini hedefleme	Hücre ve Hücre içi Hedefleme, kanser hücrelerini Görüntüleme	[127-130]
5	DNA	Aptamer, PEGlenmiş Altın, Antisens terapi	Prostat Kanserine Hedefleme, siRNA	Görüntüleme, jen taşımada	[131-133]
6	RNA	Polivalent RNA-Altın nanokonjugatları	-	RNAi	[134]
7	Antikorlar	Patojenler Karşı	Küçük olmaları, kolay tanıma	İmonolojik testler, Tedavi ve Aflatoksinlere Karşı	[135-137]

2.15 Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık sistemi bir sürü farklı hücreden oluşmaktadır. Bunların bazıları, B lenfosit düğümleri ve doğal öldürücü olan nötrofillerdir. Sadece B hücreleri antikor (antibody) üretir.

Hümmoral bağışıklık cevabı kısmen, vücut sıvılarında, kanda ve lenfte dolaşan antikorlar tarafından başlatılır. B hücreleri kanda ve plazmada serbest bir şekilde dolaşan toksinlere olduğu kadar bakterilere, mantarlara, parazitik protozoonlara ve virüslere karşı özellikle etkindir. Böylece B hücreleri antikorlarıyla bu hücrelerin yüzey reseptörlerini tanıyabilmekte ve onlara bağlanabilmektedirler [138].

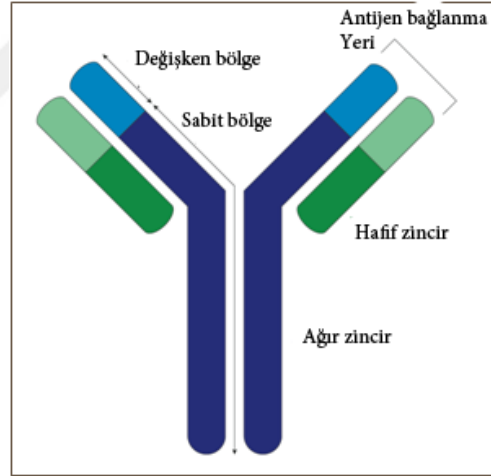
B hücrelerinin büyük bir kısmı kan ve lenf içinde sürekli birinden diğerine geçmek suretiyle yer değiştirilerek dolaşırlar ve geçici sürelerle dalakta ve lenf düğümlerinde dururlar. Buralarda durduklarında membranlarına bağlı olan antikorlarla vücut sıvılarını kontrol etme ya da antikorlarını serbest hale geçirerek antikorların vücuda salımı işlevlerini yerine getirirler.

Her antikor molekülü dört adet polipeptid zincirinden oluşur. Bunlar birbirine eş iki Ağır zincir ile birbirine eş iki Hafif zincirden ibarettir. Hafif zincirler iki ana gruba aittir; bunlar birbirinden fonksiyon bakımından farklı olmayıp ancak farklı genler tarafından kodlanırlar [139]. Ağır zincirler de beş ayrı sınıfa mensuptur (A ,D ,E ,G ,M); bunlar arasındaki fark, zincirin COOH (kuyruk) kısmındaki amino asit dizilimlerinin aynı olmamasıdır. Antikorum Kuyruk bölgesi özellikle bir şey yapmaz ama içinde bulunan durumda hümmoral antikor cevabın hangi reaksiyonunun gerçekleşeceğini belirler. Örneğin bir antijen bağlandıktan sonra G tipteki (yüksek omurgalılarda en yaygın olan antikor sınıfı) kuyruğa sahip ağır zincirlerin üç boyutlu yapılarında makrofajlar tarafından tanınmalarını sağlayacak allosterik bir değişiklik olur. Böylece makrofaj antikorum bağladığı antijenik yapı her ne ise – örneğin bir virüs- onu da beraberinde sindirir. Diğer tipteki ağır zincirlere sahip antikorlar, bağışıklık reaksiyonlarının diğer kısımlarını aktive ederler: E tipte kuyruk taşıyan antikorlar, mast hücrelerinin membranları üzerine yerleşirler ve bir antijen ortaya çıktığında bu erken-uyarı hücreleri histamin salmaya başlayarak diğer hücreleri uyarır. Diğer antikor tipleri ise değişik işlevler için özelleşmiştir; örneğin, yeni doğana anneden bağışıklığın nakledilmesi ya da komplement sistem olarak bilinen bir seri enzim reaksiyonunun aktive edilmesi

bunlara örnektir. Bütün bu antikorların hepsine birden immünoglobülinler (Ig) denilmektedir ve tek tek alt sınıfları da IgG, IgE vs. şeklinde göstermektedir [140].

Bir antikor molekülünün yapısına hangi sınıftan ağır yada hafif zincirin girdine bağlı olmaksızın, her bir zincirin sabit bir amino asit dizisi ve sabit bir yapısı vardır; antijen özgünlüğü için gerekli olan çeşitlilik ise çoğunlukla serbest amino uçlar sayesinde ortaya çıkar. Antijenin bağlanacağı yerler (her bir antikor molekülünde birbirine tıpatıp eş iki bölge), değişken bölgelerin uç kısımlarıdır. Her bağlanma bölgesi, bir kısmı ağır zincirin bir kısmı da hafif zincirin bağlanacağı noktalardan oluşan bir cep gibi düşünülebilir (Şekil 2.7.).

Antikorların yapısı onların nasıl çalıştığını anlamamıza yardımcı olur. Tüm antikor molekülleri aynı yapıya sahiptirler. Sadece antijenin bağlanma noktasında farklılık gösterirler. Bu farklılık antijenlerin antikora bağlanma noktasında, farklı yapıda farklı antijenlerin antikora bağlanmasını sağlamaktadır [141,142].



Şekil 2. 7. Antikorların (IgG) yapısı[143]

Her antikor iki ağır zincir ve iki hafif zincirden oluşur. Hafif ve ağır zincirler bir dizi art arda benzer yapılardan ve yaklaşık 110 amino asitten oluşurlar ve her ikisi amin uçlarında antijenleri tanımasında yardımcı değişken (V) bölümü vardır. Karboksil ucunda sabit (C) bölümü bulunmaktadır. Bir ağır zincirin (VH) hafif zincirin (VL) yanında konumlanması antijenin bağlanma yerini oluşturur. Antikorların yapısında 2 ağır ve 2

hafif zincir bulunduğundan her antikorun iki antijen bağlanma yeri mevcuttur. Disülfid bağları kovalant şeklinde ağır ve hafif zincirleri birbirine bağlar.

2.15.1 Monoklonal Antikorlar ve Etki Mekanizmaları

Tümör hücrelerinde bulunan çeşitli hedef moleküllere yönelik geliştirilmiş olan monoklonal antikorlar son yıllarda kanser tedavisinin en etkin araçları arasına girmiştir. Yüksek düzeyde spesifik ve nispeten olumlu toksisite profilleri bu ajanların standart tedaviler içinde yer almalarını sağlamıştır.

Monoklonal antikorlar yalnızca bir epitopa karşı reaksiyon gösterebilen antikorlardır ve sadece tek bir B-Lenfositin elde edilir. Monoklonal antikorların elde edilme yöntemi 1975'te César Milstein, Georges Köhler ve Niels Jerne tarafından bulunmuştur [144]. Monoklonal antikorun antijen bağlayan bölümünün diğer ucunda Fc bölgesi yer alır. Çeşitli mono nükleer hücreler ve lökositler taşıdıkları Fc reseptörleri aracılığıyla antikor ile kaplanmış tümör hücrelerini fagosite ederek ya da öldürücü granüllerini boşaltarak imha ederler. LgG yapısında monoklonal antikorlar klasik kompleman kaskadını da aktive ederek inflamasyon yanıtı oluşturabilirler. Sitokinler kemotaktik, opsonizasyon ve vasküler geçirgenliği arttırarak monoklonal antikorların tümöre geçişini kolaylaştırır.

2.16 Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar

2.16.1 Zeta-sizer

Zeta sizer cihazı ile boyut analizi yapılması ışık saçılması prensibine dayanır. Dinamik ışık saçılması kullanarak parçacık ve moleküllerin boyutunu nanometreden mikron mertebesine kadar ölçerken, elektroforetik ışık saçılmasıyla Zeta potansiyelini ve statik ışık saçılmasıyla molekül ağırlığını ölçebilmektedir.

Zeta-sizer cihazı belirlenmiş bir potansiyel değerinde hareketi sağlanmış partiküllerin hızını belirleyerek zeta potansiyelini hesaplayabilmektedir. Böylece proteinlerin ve polimer çözeltilerinin elektroforetik mobilitesini, koloidlerin ve nanopartiküllerin zeta potansiyelinin ölçümünde kullanılabilir.

Zeta-sizer boyut analizi için ölçüm yapılan nanopartiküllerin hidrodinamik boyutunu 0.6 nm – 6.0 µm aralığında, zeta potansiyelini maksimum iletkenlik 200 mS olacak şekilde

ve molekül ağırlığını ise $1 \times 10^3 - 2 \times 10^7$ aralığında belirlemeye olanak sağlayan bir sistemden oluşur.

2.16.2 UV Spektrofotometri

Bir madde içerisinde geçen ışın demetinin geçtikten sonra ne kadarının o madde tarafından geçirildiği veya madde üzerinden yansımından sonra gelen ışın demetinin ne kadar azaldığı prensibine dayanır. Böylelikle maddenin derişimi hesaplanabilir. Maddeden geçtikten sonra ışığın şiddetinin azalması absorplamanın arttığını gösterir. UV spektroskopide kullanılan ışığın dalga boyu ultraviyole bölgede 185-400 nm aralığındadır. Birçok molekül UV dalga boylarını absorplar ve farklı moleküller farklı dalga boylarını absorplarlar. Bir absorpsiyon spektrumu molekülün yapısını gösteren birçok absorplama bantlarından oluşmaktadır. Genellikle çözeltideki moleküller veya inorganik iyon ve komplekslerin ölçümünde kullanılır.

2.16.3 Zeta Potansiyel

Zeta-sizer cihazın başka bir özelliği örneklerin potansiyelini ölçmektir. Zeta potansiyel, koloidal parçacıklar arasındaki etkileşimin iyi bir göstergesidir ve Zeta potansiyel ölçümleri, koloidal sistemlerin kararlılığını değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. Sulu sistemde dağıtılmış koloidal partiküllerin çoğu belirli bir yüzey yüküne sahiptir. Bu yüzey yükünün, partikülün ve bunu çevreleyen ortamın içeriğine bağlı olarak, birçok kaynağı vardır.

Kararlı ve kararsız dağılımlar arasında bir ayırma çizgisi genellikle +30 veya - 30 mv'ta alınır.

- +30mv'tan daha pozitif potansiyele sahip parçacıklar kararlı olarak kabul edilir.

-30mv'tan daha negatif potansiyele sahip parçacıklar kararlı olarak kabul edilir

2.16.4 Atomik kuvvet mikroskopu (AFM)

1982'de taramalı tünelleme mikroskopunun (STM) keşfiyle [145] yoğunlaşan çalışmalar sonucunda, proteinler gibi elektrik iletkenliği olmayan malzemelerin de yüzeyleri hakkında morfolojik bilgi alabilmek Binnig ve grubu tarafından Atomik kuvvet mikroskopu (AFM) geliştirilmiştir [146].

AFM ile ölçüm yapılacak örnekte arasında elektrik akımı yerine elektrostatik, van der Waals, sürtünme ve magnetik kuvvet gibi kuvvetler olduğundan her türlü katı malzemenin yüzey yapısı incelenebilir.

AFM, yüzeyi taramak için kullanılan genellikle silikondan yapılan esnek ve sivri bir gezici uçtan ile bu ucun bağlı olduğu manivela ile oluşur. Bu uç nanometre ölçeğinde eğrilik yarıçapına sahip bir uçtur. AFM ile görüntü alımı ve tarama sırasında gezici uç örnekte yüzeyine yakın bir mesafeye getirilir ve uç ile yüzey arasındaki kuvvetler Hooke kanununa uygun olarak gezici ucun bağlı olduğu manivelanın bükülmesine yol açar.

Atomik kuvvet mikroskobunun en temel çalışma prensibi görüntü alınacak yüzeyin üç boyutlu görüntülenmesi sağlamaktır. Hava ya da sıvı içerisinde görüntü alınabildiği gibi birkaç mikrondan 10 angstroma ve daha düşük çözünürlüğe yüzey görüntüsü alınabilmektedir. Atomik kuvvet mikroskobu modern yüzey karakterizasyonu teknikleri arasında en üstün olanıdır.

2.16.5 Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM)

Işık ışını yerine elektron ışını, optik mercek yerine elektron merceğinin kullanılmasıyla Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), malzemenin içinden geçirilen enerjisi yüksek elektronların görüntülenmesi prensibine dayanır. Görüntüsü alınacak malzemenin yüksek çözünürlükte görüntüsünü oluşturmak için vakum ortamında oluşturulan ve bu ortamda elektromanyetik lenslerle inceltelen elektron demeti ile malzemeyi analiz etme imkânı sunar.

TEM kullanılarak nano seviyenin de altına inerek bir hücre veya herhangi bir malzeme için, atomik boyutlarda çalışma gerçekleştirilebilir. Bu şekilde yüksek performansta karakterizasyon yapılabiliyor olması TEM'i hem biyoloji hem de malzeme bilimi alanında oldukça değerli kılmaktadır.

2.16.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Kızılötesi (IR) absorpsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir. IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Matematiksel Fourier dönüşümü spektroskopisinde ışımaya şiddeti, zamanın bir fonksiyonu olarak alınır. Her dalga boyunda ayrı ayrı tarama gerekmeksizin hızlı ve yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilebilir. Bu yöntem ile moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak,

katı, sıvı ve gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşimin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenebilir.

Ayrıca biyokimyasal olarak karbonhidrat, fosfolipit, aminoasit ve proteinlerin yapı analizlerinde belirleyicidir.

FTIR spektroskopisi, malzeme testleri, kalite kontrol, araştırma ve akademik çalışmalarda altın standarttır. FTIR-ATR (Attenuated Total Reflectance), absorpsiyon bantlarının dalga boyunda azalma meydana getirilerek daha az emekle ve örnek kalınlığından bağımsız olarak soğurganlığı çok fazla olabilen farklı maddelerin spektrum analizlerine olanak sağlar.

3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında yapılan çalışmalar sekiz ana bölümden oluşmaktadır.

1. Altın nanopartiküllerin Turkevich metodu kullanarak sentezlenmesi.
2. Hazırlanan altın nanopartiküllerin Zeta-sizer, UV spektrofotometri, AFM, TEM ve Zeta potansiyel kullanarak karakterizasyonlarının yapılması.
3. Sentezlenen altın nanopartiküllerinin sistamin molekülü kullanarak yüzey modifikasyonunun yapılması.
4. Sistamin molekülü ile kaplanan altın nanopartiküllerinin, Zeta potansiyel, UV spektrofotometri ve FTIR kullanarak karakterizasyonunun yapılması.
5. Yüzeyleri sistamin molekülü ile kaplanan ve karakterizasyonu yapılan altın nanopartiküllerin mAb'e kovalent olarak bağlanması ve FTIR kullanarak karakterizasyonunun yapılması.
6. Hazırlanan altın nanopartikülleri (GNP), anti Wnt-1 monoklonal antikörlerin(mAb), Wnt-1 proteinlerinin (WP), sistamin ile modifiye edilmiş altın nanopartiküllerinin (S-GNP) ve altın nanopartiküllerine bağlı antiWnt-1 monoklonal antikör'lerin (mAb-GNP) farklı konsantrasyonlarının MCF-7 meme kanser hücreleri ile etkileştirilmesi ve yapılan in vitro çalışmaları sonuçlarının değerlendirilmesi.

3.1 Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Altın Nanopartiküllerin Sentez Ve Karakterizasyonu İçin Kullanılan Cihazlar Ve Kimyasallar

Kimyasal olarak, Tetrakloroaurik asit, altın tuzunun indirgenmesi için sodyum sitrat (Sodium citrate tribasique dihydrate) (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Cihaz olarak, santrifuj işlemi için 14000 rpm'e çıkabilen santrifuj (Hettich Zentrifugen), ısıtmalı manyetik karıştırıcı, karakterizasyonu için Zeta-sizer (Malvern- 3000 HSA- İngiltere), AFM (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) ve TEM (Philips CM-10) kullanıldı.

3.1.2 Altın Nanopartiküllerinin Yüzey Modifikasyon'ları İçin Kullanılan Kimyasallar Ve Cihazlar

Sistamin hidrokloraide molekülü (cysteamine hydrochloride), etanol (Sigma-Aldrich), rotator karıştırıcı ve karakterizasyonu için Zeta-sizer (Malvern- 3000 HSA- İngiltere), FTIR Spektroskopisi (Nicolet iS10, ABD) ve UV / VIS Spektrofotometri (Jasco V530, ABD) kullanıldı.

3.1.3 Antikor Bağlı Altın Nanopartiküller için kullanılan Kimyasallar Ve Cihazlar

Yüzeyi modifiye olmuş altın nanopartiküllerin üzerine antikor bağlanması için kullanılan kimyasallar, NHS (N-Hydroxysuccinimide) ve EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)) (Sigma-Aldrich), Fosfat Buffer Salin (PBS), Anti Wnt-1 monoklonal antikor (Abcam) olarak belirlendi.

Kullanılan cihazlar ise santrifuj (Hettich Zentrifugen, Almanya), rotator karıştırıcı, antikor bağlanma yüzdesini elde etmek için Cobas Integra 400 plus cihazı (Roche Diagnostics, ABD) ve FTIR Spektroskopisi (Nicolet iS10, ABD) şeklindedir.

3.1.4 İn Vitro Çalışmaları İçin Kullanılan Kimyasallar Ve Cihazlar

Hücre kültür ortamlarının hazırlanmasında DMEM/F12, FBS, Penisilin/Streptomisin, L-Glutamin, (BD Bioscience), HEPES (Sigma-Aldrich), Sodyum Piruvat (Sigma-Aldrich), Sodyum Bikarbonat (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Çoklu kuyucuklu kültür kapları ve hücre kültür kapları Corning (BD, USA) firmasından temin edildi. Floresan mikroskopta (Leica DMI70, Almanya) ile görüntülerin alınması çalışmalarında, apoptoz nekroz belirlenmesi için ikili boyama solusiyonu (RNase, hoechst 33342, propidium iodide) kullanıldı.

3.2 Altın Nanopartiküllerin Sentezi

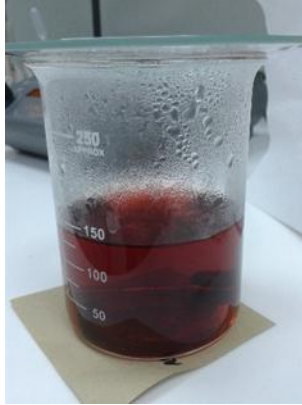
Literatürde altın nanopartiküllerinin sentezlenmesinde çok farklı yöntemlerin olduğu görülmektedir. Turkevich metodu ise altın nanopartikül sentezi için çok sık kullanılan bir yöntemdir. Bilim adamı Turkevitch tarafından 1951 yılında yapılan bu yöntem, altının Au^{3+} formunun Au^0 formuna sodyum sitrat ile indirgenmesi esasına dayanır. İndirgeme işlemi UV ışık altında, amino asitler, askorbik asit ve sitrat gibi indirgeyici ajanlarla gerçekleştirilebilmektedir [147,148].

Altın nanopartiküller Turkevich metoduyla altın tuzunun sitratla indirgenmesi sonucu elde edildi. Altın tuzu olarak Tetrakloroaurik (III) asit ve onun indirgenmesi için Sodyum Sitrat kullanıldı.

Bu amaçla önce deney stokları hazırlandı:

- 2.2 mM Sodyum Sitrat çözeltisi: Bu çözeltinin hazırlanması için 113,4 mg Sodyum Sitrat 200 ml deiyonize (DI) su içinde çözüldü.
- 46.8 mM Tetrakloroaurik (III) çözeltisi: 56,1 mg HAuCl_4 altın tuzu 3 ml DI su içerisinde çözüldü.

Stoklar hazırlandıktan sonra, 2.2 mM sodyum sitrat çözeltisinden 150 ml alınıp 200 ml'lik beher içinde ısıtmalı manyetik karıştırıcı 800 rpm'de kaynayana kadar ısıtıldı. Kaynamaya başladıktan sonra 1 ml 46.8 mM HAuCl_4 çözeltisi karışıma yavaş yavaş enjektörle eklendi. Daha sonra çözeltinin rengi önce gri daha sonra yavaş yavaş kırmızı rengine dönüştü. Şarap rengi oluşuktan sonra çözeltinin oda sıcaklığına gelmesi için karıştırılarak bekletildi.(Şekil 3.1)



Şekil 3. 1. Turkevich metodu ile sentezlenen altın nanopartikülleri

Daha sonra çözeltiden 2 ml alınıp santrifüjde 20 dakika 8500 rpm'de santrifuj yapıldı. Üst kısım atılırken alt kısım 10 ml DI su içerisinde dağıtıldı ve daha sonra kullanmak üzere $+4^{\circ}\text{C}$ dolaba kaldırıldı.

3.2.1 Altın Nanopartiküllerin Konsantrasyonu

Hazırlanan ve yıkama işlemi santrifujle yapılan altın nanopartiküllerin çözeltisinden 1 ml alınıp önceden ağırlığı hassas teraziyle ölçülmüş olan petri üzerine damlatılıp kuruması için 60°C ısıtılmış fırında 24 saat bekletildi. Süre sonunda ağırlığı yeniden ölçüldü. Böylece kuru madde ağırlığı ölçülmüş oldu ve altın nanopartiküllerin konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde ayarlandı [149,150].

3.2.2 Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Turkevich metodu ile sentezlenen altın nanopartiküllerin karakterizasyonu için Zeta-sizer, UV spektrofotometri, AFM ve TEM cihazları kullanıldı.

Tez kapsamında sentezlenen altın nanopartiküllerinin boyut analizi için Zeta-sizer küveti içerisinde 10 µl sentezlenen GNP'lerden 1 ml DI su içerisinde çözüldü ve ölçüm yapıldı.

Zeta-sizer sonucunda Poly dispersity indeks değeri bir çözeltinin içindeki taneciklerin dağılımları ile ilgili bize bilgi vermektedir. Elde edilen değerler şu şekilde değerlendirilir:

- 0.05 - 0.08 PDI değeri monodispers partikülleri temsil etmektedir.
- 0.08 - 0.7 PDI değeri Orta derecede polidispers değerini gösterir.
- 0.7 PDI değeri Çok polidispers çökme olduğuna işaret eder.

Sentezi yapılmış nanopartiküllerin GNP olup olmadığını anlamak için UV-Spektrofotometrisi görünür bölge spektroskopisi yardımı ile 400-800 nm dalga boyunda incelendi. Ölçüm için küvet içerisinde 1ml sentezlenen GNP'lerden yerleştirip ölçüm yapıldı.

Hazırlanan altın nanopartiküllerin Kararlı veya kararsız olduklarını göstermek için zeta-sizer cihazının başka bir özelliği olan zeta potansiyel kullanıldı. Dağılımlar arasında bir ayırma çizgisi genellikle +30 veya – 30 mv'ta alınır.

- +30mv'tan daha pozitif potansiyele sahip parçacıklar kararlı olarak kabul edilir.
- -30mv'tan daha negatif potansiyele sahip parçacıklar kararlı olarak kabul edilir [151].

Tez çalışmasında hazırlanan altın nanopartiküllerin yüzey karakterizasyonu için Atomik kuvvet mikroskobu kullanıldı. Örneklerin hazırlanması için önce örnekler

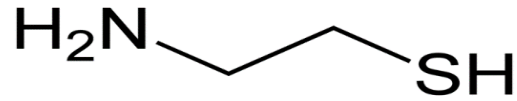
ependorfların içinde bir kaç saniye süresinde vortekslendi daha sonra her bir örnekten 10 µl mika üzerine damlatılıp oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnek mikroskopa yerleştirildi ve silikon uçla dinamik modda (taping mode) değerlendirildi. Sentezlenen nanopartiküllerin boyut analizi için TEM kullanıldı. TEM için örnekler grid üzerinde hazırlandı. Bunun için önce örnekler ependorfların içinde bir kaç saniyelik vortekslendi ve daha sonra her bir örnekten 10 µl grid üzerine damlatılıp infrared ışığı önünde kurutularak mikroskopta değerlendirildi. Sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutları, şekil analizi, yönelimleri ve homojen dağılımı TEM ile karakterize edildi.

3.3 Altın Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonları

Antikorların bir amino ve birde karboksil uçları bulunmaktadır. Antikorların amino uçları antikora antijene bağlanmasını sağlayan kısımdır.

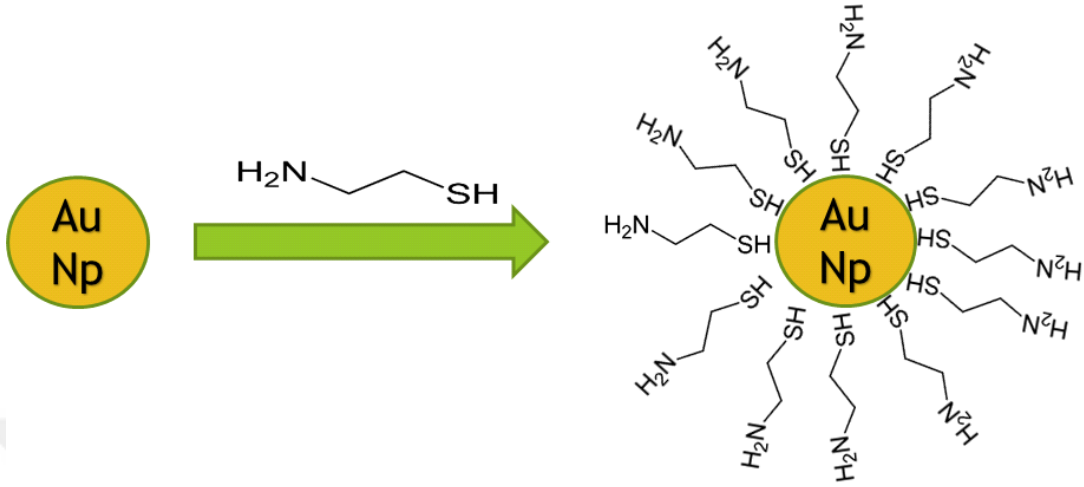
Antikorlar amino uçlarından bağlandıklarında antikor işlevselliklerini kaybedeceklerinden, çalışmada antikorların amino uçlarını korumak ve açıkta bırakmak amaçlanmıştır. Altın nanopartiküllerinin yüzeyine monoklonal antikorların bağlanması için çok farklı yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerde kovalent ve non kovalent bağlar kullanılmaktadır [137].

Literatür çalışmalarından faydalanılarak kovalent bağ kullanmaya ve bu amaçla farklı moleküller arasından sistamin molekülünün kullanılmasına karar verilmiştir [137,152].



Şekil 3. 2. Sistamin molekülünün yapısı.

Sistamin molekülü, altın nanopartiküllerine tiyol (-SH) grubundan bağlanır ve amin grubu (-NH₂) açıkta kalır. Amin grubu antikorun karboksil ucuyla etkileşime girer. Şekil 3.2'de bir ucunda tiyol diğer ucunda amin grubu bulunan sistamin molekül yapısı şematik olarak gösterilmiştir. Böylece sistamin altın nanopartikülü üzerine bağlanır ve antikorun bağlanması için bir yatak hazırlanmış olur.



Şekil 3. 3. Altın nanopartiküllerin sistamin molekülüne bağlanması.

Sistamin molekülünün altın nanopartiküllere bağlanmadan önce sistamin molekülünün stoğu hazırlandı. Bu amaçla sistamini etanolde dağıtma işlemi yapıldı. Sistamin molekülünden hassas terazi yardımı ile 385 mg alındı ve 5 ml etanolle bir 15 ml'lik falkon içerisinde tamamen dağılması için vorteksle karıştırma işlemi gerçekleştirildi.

3.3.1 Hazırlanan Sistamin Molekülünü Altın Nanopartiküllerle Karıştırılması

Hazırlanan her bir altın nanopartikül konsantrasyonundan 1 ml alıp üzerine 225 µl sistamin molekülü çözeltisinden ekleyip alüminyum folyo kâğıdı ile ışık almaması için kapatıldı. Daha sonra 12 saat boyunca oda sıcaklığında rotar karıştırıcıda birbirleriyle etkileşmeleri için karıştırıldı.

Karıştırıcıdan alındıktan sonra 10000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifuj yapıldı. Çökmüş örnek alınıp üzerine DI su eklendi. Vorteksledikten sonra yeniden 10000 rpm'de 10 dakika santrifuj yapıldı. Alt bölümü alınıp 1 ml saf su ile seyreltildi. Yıkama işlemi bittikten sonra bağlanmamış sistamin ve altın nanopartikülleri uzaklaşmış ve yüzeyi modifiye olan nanopartiküller elde edildi.

Hazırlanan örneğin karakterizasyonu için zeta potansiyel ve UV spektrofotometri kullanıldı.

3.3.2 Sistamin Kaplı Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Çalışmanın bu kısmında Zeta potansiyel değerlendirilmesi yapıldı. Sentezlenen altın nanopartiküllerin Zeta potansiyel değeri -56.6 mV olarak ölçüldü. Bu potansiyel değeri sentezlenen altın nanopartiküllerin sistamin molekülü ile kaplandığında, amino uçlarının açıkta kalması nedeniyle pozitif yüke doğru kayması gerektiğini göstermektedir. Alınan sonuç literatür çalışmalarıyla uyumluluk göstermektedir [137].

Tez kapsamında hazırlanan, modifiye altın nanopartiküller öncelikle UV görünür bölge spektroskopisi yardımı ile 400-800 nm dalga boyunda incelendi.

Hazırlanan örnekten 1 ml alıp küvette ölçüm yapıldı. Ölçüm sonucunda daha önce yapılan çıplak altın nanopartiküllerindeki 520 nm dalga boyundaki kırılma 800 nm dalga boyuna doğru kayma yapmış olduğu görüldü. Bu kaymanın sebebi sistamin molekülünün altın nanopartiküllerini kaplamasıdır ve yapılan işlemin doğruluğunun bir göstergesidir [137].

3.4 Modifiye Altın Nanopartiküllerin Antikorla Bağlanmaları

Bu amaçla nanopartiküllerin yüzeyine Anti Wnt-1 monoklonal antikor bağlanması için, EDC/NHS yöntemi kullanıldı[153]. NHS (N-Hydroxysuccinimide) ve EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)) kullanılarak kovalent (amid bağı) bağla mab ler nanopartiküllerin üzerine bağlandı [154].

Öncelikle hazırlanan ve santrifuj yapılarak saf su ile yıkanmış sistamin kaplı altın nanopartiküller yeniden PBS ile 3 defa santrifujla (11000 rpm'de 20 dakika) yıkama işlemi yapıldı. Bu işlem sonucu sistamin kaplı altın nanopartiküller yıkandı aynı zamanda bağlanmamış sistamin veya altın nanopartiküller uzaklaştırıldı. Devamında steril olmaları için 20 dakika UV ışığına maruz bırakıldı.

3.4.1 Monoklonal Antikorların Hazırlanması

Çalışmanın bu kısmında ise monoklonal antikorlar – 80 °C derin dondurucudan çıkartıldıktan sonra oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi ve daha sonra 4 °C'de muhafaza edildi. Antikorum konsantrasyonu 10 µg/ml olarak şekilde ayarlanmıştır.

3.4.2 Antikorla Sistamin Kaplı Altın Nanopartikül Etkileştirilmesi

Bunun için önce 1ml nanopartikül ve 40 mg EDC, 4ml PBS içinde süspansiyon edildi. Elde edilen süspansiyon, 2 saat +4 °C'de, ardından da 2 saat oda sıcaklığında (25 °C) sabit hızda karıştırıldı. 4 saat sonra nanopartikül solüsyonu 14.000 rpm, +4 °C'de 25 dakika santrifüj edilerek, nanopartiküllerin yüzeyine tutunamamış olan EDC uzaklaştırıldı. EDC bağlı nanopartiküller 1 ml PBS ile süspansiyon edildikten sonra 9.7 mg NHS eklendi. Aynı şekilde 4 saat karıştırıldıktan sonra yüzeye tutunamayan NHS'in uzaklaştırılması için nanopartiküller santrifüj (14.000 rpm, +4 °C'de 25 dakika) edildi. Antikor karıştırılmadan önce steril olmaları için 20 dakika UV ışığına maruz bırakıldı. Son olarak 1 ml PBS ile süspansiyon edilen nanopartiküllere 10 µg/ml Anti Wnt-1 monoklonal antikor eklenerek rotar karıştırıcıda 4 saat karıştırıldı.

Nanopartiküller, santrifüjden (14.000 rpm, +4 °C'de 25 dakika) sonra 1 ml PBS ile süspansiyon edilerek daha sonraki işlemlerde kullanılmak için +4 °C'de saklandı.

Süpernatant, nanopartiküllere anti Wnt-1 monoklonal antikor bağlanma veriminin belirlenmesi amacıyla kullanıldı ve süpernatantta protein miktarı Roche Cobas Integra 400 plus cihazı ile ölçüldü.

Tez kapsamında kullanılan altın nano partiküllerin, anti Wnt-1 monoklonal antikor üzerindeki etkiyi göstermek amacı ile 5 farklı altın nanopartikül konsantrasyonu kullanıldı. Bütün nanopartikül konsantrasyonlarında antikor miktarı sabit tutuldu.

Bu amaçla 100 µg/ml altın nanopartikülü stoğu kullanıldı ve farklı (5, 10, 25, 50 ve 100 µg/ml) altın nanopartikül konsantrasyonları dilue edilerek hazırlandı. Her bir konsantrasyon sistamin molekülü ile kaplandı ve 10 µg/ml Anti Wnt-1 monoklonal antikor ile etkileştirildi.

Hazırlanan örnek santrifüj (14.000 rpm, +4 °C'de 25 dakika) edildikten sonra alt kısmı 1ml PBS içinde süspansiyon edilip daha sonraki işlemlerde kullanılmak için +4 °C'de saklandı ama Süpernatantlar antikor bağlanma oranının miktarını bulmak için denetlendi ve standart sapma değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1'de gösterildi.

Çizelge 3. 1. mAb'lerin ve GNP'lerin bağlanma oranları.

mAb µg/ml	GNP µg/ml	Bağlanma µg/ml	Bağlanma oranı %	STD
10	5	3,9	39	3,51
10	10	5,7	57	2,73
10	25	7,3	73	5,19
10	50	6,9	69	3,49
10	100	6,5	65	4,21

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek bağlanma oranı 25 µg/ ml oranında altın nanopartiküllerinde gerçekleşti. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında daha değerli bir sonuç elde etmek için bağlanma oranları %57 ve % 69 olan örnekleri de deneye dâhil edilerek, 10, 25 ve 50 µg/ ml olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda mAb-GNP stoklarının kullanılmasına karar verildi.

3.4.3 Monoklonal Antikor Bağlı Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Antikorların, modifiye altın nanopartiküller üzerine bağlanıp bağlanmadığını anlamak ve karakterizasyonu için Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile 400-4000 cm⁻¹ orta IR bölgesi ve 632 nm lazer dalga boyunda karakterize edildi ve -SH gerilmesi ve Au-S piki için analiz yapıldı. Sonuçlar hem literatür çalışmalarıyla hem de sistamin kaplı altın nanopartiküllerden elde edilen pikler ile karşılaştırıldı [137,155].

3.5 Hücre Etkileşimleri

3.5.1 Hücrelerin Hazırlanması

MCF-7 hücrelerinin hücre kültürü koşulları için kültür vasatı %1 Penesilin/Steptomisin, % 10 PBS, %1 L-Glutamin içeren DMEM/F12 hazırlandı. Hücreler, 37±0,5 °C sıcaklığında, % 5'lik CO2 atmosferinde karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi.

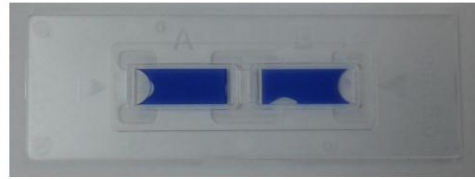
3.5.2 Hücre Kültürü

MCF-7 hücreleri -80°C'lik derin dondurucudan çıkartılıp 75 cm³'lük polistren flaslara ekim yapılmak üzere çözündürüldü. Kriyo tüpte bulunan MCF-7 hücreler falkon tüpe aktarıldı. Üzerine 1 ml vasat ilave edildi. 3000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra

Süpernatant kısmı atıldı. Aşağıda kalan hücrelerin üzerine her bir flask için 3,5 ml vasat ilave edilip homojen hale getirildi. Daha sonra 75 cm³lük polistren flasklara ekim yapıldı. 37°C'de 2 gün inkübe edilmek üzere enkübatöre bırakıldı.

2 gün sonunda flasklardaki vasatlar atılıp, her bir flaska 0,5 ml enzim (tripsinEDTA) eklendi. Flaskın tüm yüzeyine enzim temas edecek şekilde aşağı yukarı hareketlerle hücreler yıkandı. 3-4 dakika inkübatörde bekletildikten sonra hücrelerin flaskın yüzeyinden kalkıp kalkmadığı kontrol edildi. Hücreler tamamıyla kalktıktan sonra enzimin aktivitesinin durdurulması için hücrelerin üzerine en az 1 ml vasat eklendi. Enzim ve vasat karışımı falkon tüplere aktarıldı. 4000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip, Süpernatant kısmı atılıp, dipte kalan hücrelerin üzerine 1 ml vasat eklendi ve hücre sayımı yapıldı. Bu amaçla 10 mikrolitre hücreye 10 mikrolitre tripan blue çözeltisi eklendi ve daha sonra sayım lamı üzerine konularak hücre sayım cihazı (Invitrogen-Countess) ile sayım yapıldı (Şekil 3.4.). 10 ml'ye seyreltilen falkon tüpteki hücre vasat solüsyonundan her bir kuyucukta 150 µl (her welle 10 x10³ hücre olacak şekilde) ekim yapıldı.

Her deneyde 96 kuyucuklu bir kültür kabında ekim yapıldı. Devamında 4 saat inkübatörde bekletildi. 4 saat sonra hücreler morfolojik olarak mikroskopla kontrol edildi ve kontaminasyon olmadığı ispatlandıktan sonra her bir kuyucuğun vasatı, hazırlanan örneklerden 200 µl ile değiştirildi ve inkübatöre bırakıldı.



Şekil 3. 4. Invitrogen-Countess hücre sayım cihazı.

3.5.3 Hücre Kültürü İçin Hazırlanan Örnekler

GNP-mAb'lerin bağlanma oranları hesaplandıktan sonra, Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi %69 ve %73 bağlanma oranları bir birine çok yakın olduklarından, bağlanma oranı kabaca %70 olarak kabul edildi.

GNP'ler deneyden önce 30 dakika UV ışığına maruz bırakıldı ve steril olmaları sağlandıktan sonra PBS ile seyreltilerek 10, 25, 50 µg/ml olmak üzere 3 farklı konsantrasyon hazırlandı.

GNP-mAb'ler için 3 farklı stok kullanıldı. GNP'lerin antikor üzerindeki etkisini daha iyi göstermek için en yüksek antikor bağlanma oranının yanında %69 ve %57 bağlanma oranına sahip örnekler de kullanıldı. mAb'lerin GNP'lere bağlanma oranına göre 6 ve 7 µg/ml konsantrasyonlarında mAb'lerin iki farklı stoğu hazırlanıp kullanıldı.

Bu çalışmada Wnt-1 proteini, sadece kontrol amaçlı ve hücreler üzerindeki etkisi değerlendirilmek üzere kullanıldı. Wnt-1 proteini mAb bağlanma oranına eş değer şekilde 6 ve 7 µg/ml oranında iki farklı stoğu hazırlanıp kullanıldı. Hücre kültürü için hazırlanan örnekler Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 2. Yapılacak hücre kültürü etkileşimlerde kullanılacak örnekler ve konsantrasyonları.

Örnekler	Konsantrasyonlar µg/ml
GNP	10, 25, 50 µg/ml
mAb	6, 7, 7 µg/ml
GNP-mAb	Anti-wnt 1 mAb 10 µg/ml+ Altın nanopartikülü 10 µg/ml Anti-wnt 1 mAb 10 µg/ml+ Altın nanopartikülü 25 µg/ml Anti-wnt 1 mAb 10 µg/ml+ Altın nanopartikülü 50 µg/ml
WP	6, 7, 7 µg/ml

3.6 Sitotoksisite Testi

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-diphenyltetrazoluim bromide; Thiazolyblue) testi indirekt olarak hücre canlılığının ve böylelikle malzemelerin sitotoksisitesinin kolorimetrik olarak ölçülebildiği ve hücre kültürüne dayanan bir testtir [156].

GNP'lerin, mAb'lerin, GNP-mAb'lerin MCF-7 meme kanser hücrelerin üzerindeki toksik etkilerini ölçmek için MTT testinin yapılmıştır.

MTT testi için, MCF-7 hücreleri 150 µl vasat içinde 10×10^3 hücre / kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kabında ekildi ve bir gece 37°C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Sonra vasat uzaklaştırıldı ve 200 µg/ml hazırlanan her bir örnekten 3 tekrar olacak şekilde eklendi. Pozitif kontrol olarak H₂O₂'li ortam, negatif kontrol olarak sadece ortam hücrelere uygulanmıştır. MTT, 5 mg/ml olacak şekilde fenol-red içermeyen RPMI 1640 ile seyreltildi. 48 saat sonra her bir kuyucuğuna 150 µl MTT eklenip 37°C de mor formazan kristalleri oluşana kadar ortalama 3 saat inkübe edildi. Hücre canlılığının tespiti için 96 kuyucuklu platelerin absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate okuyucuda 570 nm'de okundu. Örnek eklenmeyen kontrol amaçlı kullanılan ilk 8 kuyucuğun hücre absorpsiyonu %100 kabul edildi ve test kuyucuklarından elde edilen absorbanların ortalamaları ile karşılaştırılarak sitotoksisite oranı belirlendi.

Bunun için OD (Test Kuyucuğu) x100/OD formülü kullanıldı.

3.7 Apoptozun belirlenmesi

3.7.1 Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan İkili Boyama Metodu

Bu boyama yöntemi hücrelerin çekirdeklerini boyar ve bu sayede apoptoz ve nekrozu gösterir.

Hoechst boyama (33342) +4 °C saklanır ve hücrelerin çekirdeklerini maviye boyamaktadır. Bu boya apoptotik hücreleri boyayıp ve apoptoza giden hücreleri belirlenmesinde kullanılır.

Boyama esnasında sadece DNA'nın boyanması için ribonükleaz A (Sigma R-500) hücreler ile muamele edilmiştir bu boya -20 °C de saklanır.

İkili boyamada kullanılan diğer boya Propidium Iodide'tir (PI). DNA'yı kırmızıya boyayarak nekrozu göstermektedir. Propidium Iodide normal hücrelerin zarlarından

geçmez, sadece hücre zarı hasar görmüş veya ölmüş hücrelerin zarlarından geçerek nekroza uğramış hücreleri göstermektedir.

Bütün hücreleri boyandıktan sonra apoptotik hücreler daha parlak ve çekirdek homojenliği kaybolmuş ve parçalanmış olarak görüldü. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler normal hücrelerden ayrıldı.

Boyama işlemi şu şekilde gerçekleştirildi:

İkili boyama solüsyonunun hazırlanışı:

- Ribonükleaz A'dan 1ml PBS'de 10 mg RNA olacak şekilde
- Hoechst ise 1 ml PBS'de 200 mikrogram olacak şekilde
- Propidiumlodide 1ml PBS'de 100 mikrogram olacak şekilde hazırlandı.

Çalışma solüsyonunun hazırlanışı:

- 10 mL PBS içine RNAaz stoktan 100 mikrolitre
- Hoechst stoktan 500 mikrolitre
- Propidiumlodide stoktan 100 mikrolitre ilave edilerek hazırlandı.

MCF-7 hücrelerinin hazırlanan örneklerle etkileşiminden 48 saatin sonra kuyucuklardaki üst sıvı atıldı ve üzerine 70 mikrolitre 2'li apoptoz-nekroz boyama solüsyonu eklendi. Devamında Hiç ışık görmeyecek şekilde 15 dakika yeniden inkübatörde bekletildi. Üst sıvı mikro pipetle alındı. Floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış ve FITC (480-520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Değerlendirme Floresan mikroskopta (Leica DMI70, Almanya) yaklaşık 1000 hücre olmak üzere 10 farklı alan sayılarak ortalaması alındı. Apoptotik indeks yüzde (%) olarak ifade edildi.

Değerlendirmede normal apoptotik olamayan hücreler çekirdekleri sönük mavi, çekirdekte DNA dağılmamış, hücrede veziküller oluşmamış olarak görüldü. Apoptoza girmiş hücre çekirdekleri ise normal hücre çekirdeklerine göre çok parlak, çekirdek homojenliği kaybolmuş, çekirdek kenarları düzgün olmayan şekilde ve DNA parçalanmış parlak mavi olarak görüldü.

Hücre kültürü üç tekrarla yapıldı ve standart sapma değerleri hesaplandı.

3.8 İstatistiksel Analiz

Bulunan verilere ait ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplandı. Verilerin sunumu için çeşitli tablo ve grafik türleri kullanıldı. Çalışmada kullanılan deney grupları arasındaki farkın anlamlı olup olmadığını test etmek için Tek Yönlü ANOVA yöntemi Tukey–Kramer post hoc testiyle birlikte kullanıldı.

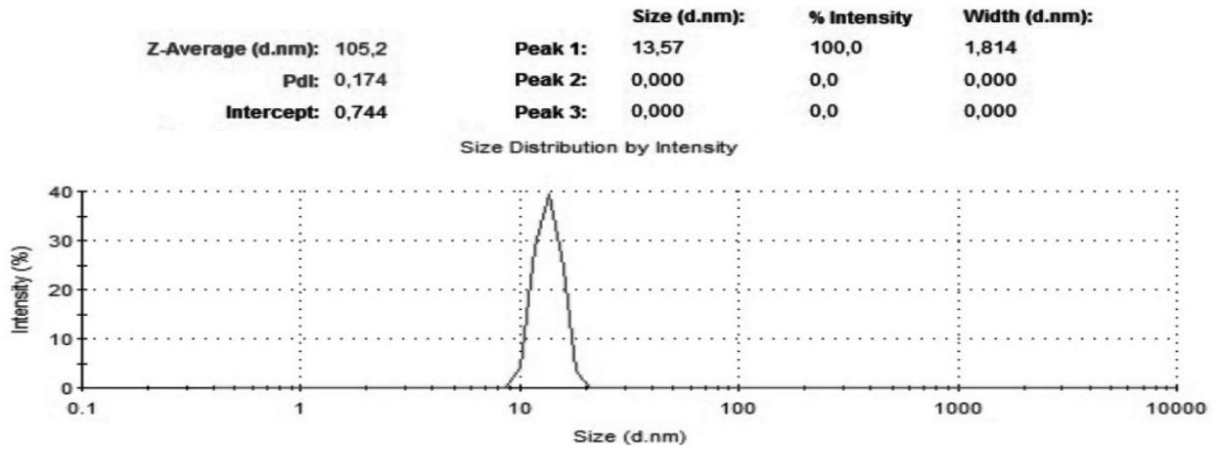
İstatistik analizler sonucunda bulunan P-değeri küçüldükçe istatistiksel olarak anlamlı olan farklılığın kanıtı artar. P-değeri, $0,01 < P \leq 0,05$ aralığında olduğunda ortamlar arasındaki farklılığın 0,05 (%5) düzeyinde olduğunu ifade eder ve bu durumda istatistiksel olarak anlamlı fark vardır denir. P-değeri $P \leq 0,01$ ise ortamlar arasındaki farklılığın 0,001 (%1) düzeyinde önemli olduğu anlamına gelir ve bu yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı fark vardır demektir[157].

Tek Yönlü ANOVA yöntemi Tukey–Kramer post hoc testiyle birlikte P-değerleri hesaplandı. Bulunan P değerleri karşılaştırıldı. P-değerinin 0.05'den az olduğu ($P < 0,05$) durumlar anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1 Sentezlenen altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenmiş altın nanopartiküllerin büyüklüğünü ölçmek için Zeta-sizer cihazı kullanıldı. Bu amaçla küvetinin içindeki 1 ml saf suya 10 µl sentezlenmiş GNP eklendi ve sonra cihaza yerleştirilip ölçüm yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



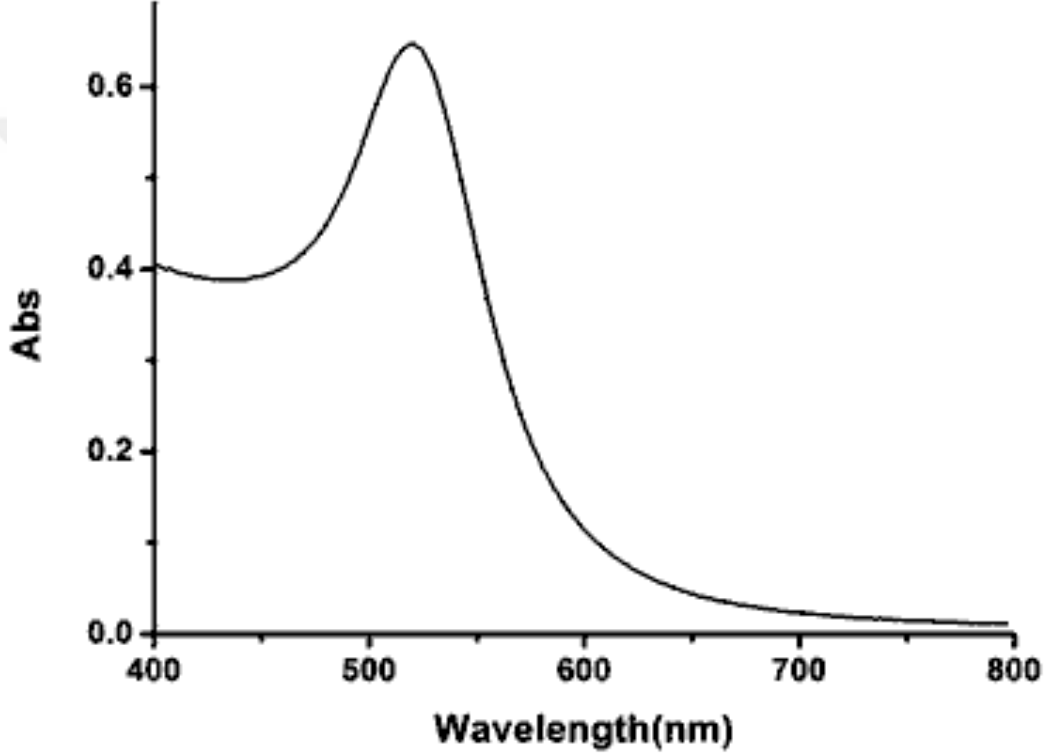
Şekil 4. 1. Zeta-sizer cihazında boyut ölçme işleminden çıkan sonuçlar ve GNP'lerin boyutu

Yapılan bu ölçümde 13,57 nm boyutunda nanopartikülün olduğu tespit edildi. Birçok biyomedikal uygulamada 10 -20 nm arasındaki altın nanopartiküller kullanılmıştır [101,158]. Bu yüzden elde ettiğimiz nanopartiküllerin boyutunun kabul edilebilir düzeyde olduğu görüldü.

PDI değerine bakıldığında Şekil 4.1'de bu deneydeki PDI değerinin (0,174) orta derecede dağılım (polidispers) olduğu gözlemlendi.

4.1.2 UV Spektrofotometri Çalışması

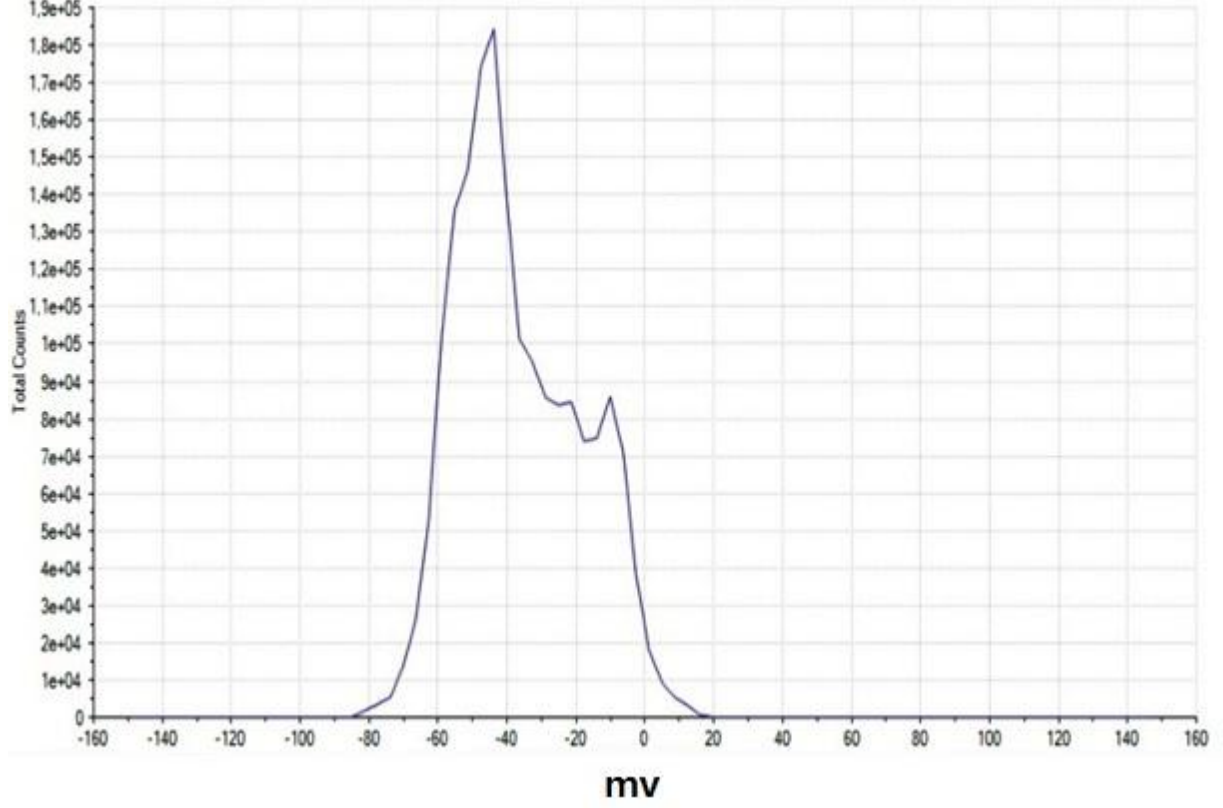
Hazırlanan altın nanopartiküllerinden 1 ml alınıp küvette ölçüm yapıldı. Ölçüm sonucu Şekil 4.2'de görüldüğü gibi 13 nm nanopartiküllerin karakteristik özelliğini göstermektedir. Burada 520 nm dalga boyu değerinde kırılma olduğu gözlemlendi [155,159,160].



Şekil 4. 2. Sentezlenen altın nanopartiküllerin UV spektrofotometrisi

4.1.3 Zeta Potansiyel Değerlendirilmesi

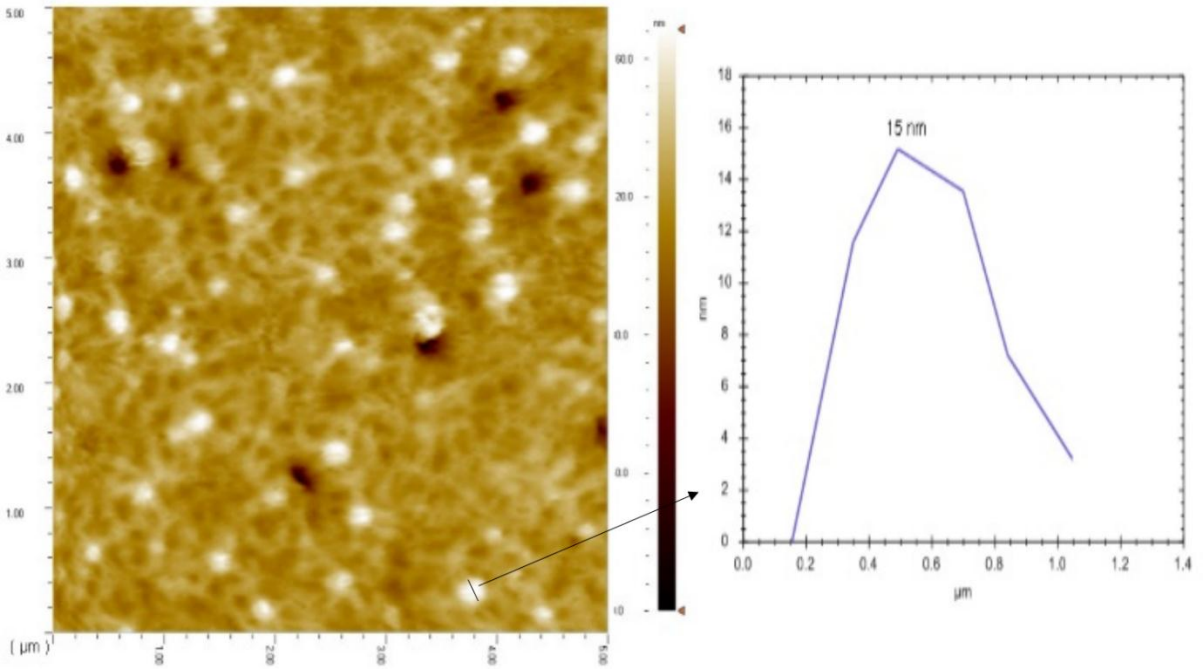
Şekil 4.3'te Zeta potansiyel ölçüm sonucu gösterilmiştir. Yapılan ölçümde elde edilen Zeta potansiyel değeri -46.5 mv olarak belirlendi ve bu sonuç yapılan nanopartiküllerin kararlı olduklarını göstermektedir.



Şekil 4. 3. Sentezlenen altın nanopartiküllerin Zeta potansiyel değeri (mv)

4.1.4 Atomik Kuvvet Mikroskobu Değerlendirmesi

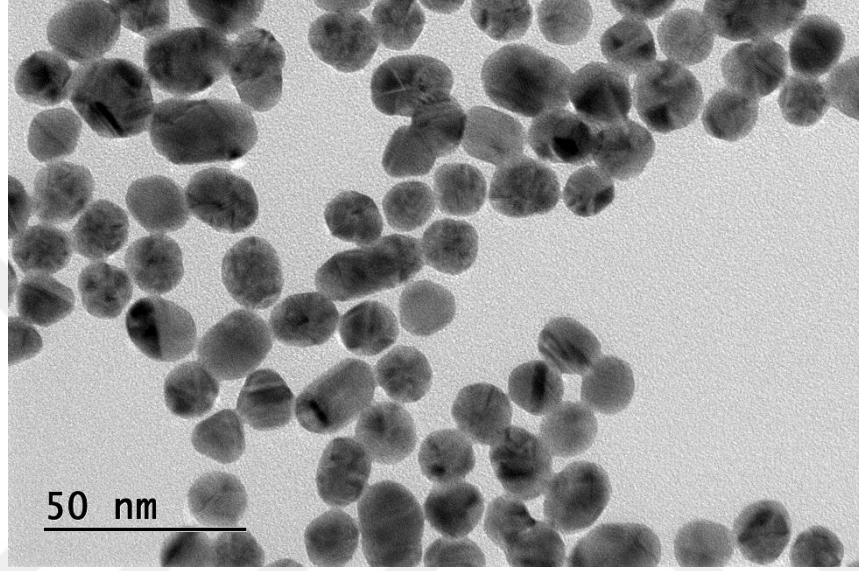
Sentezlenen GNP'ler AFM ile görüntülendi. Tez kapsamında üretilen nanopartiküllerin küresel oldukları ve dar boy dağılımına sahip oldukları belirlendi. Şekil 4.4'de gösterildiği gibi Partikül büyüklüklerinin ortalama çapı 15 nm olarak saptandı. Yapılan GNP'lerin esas boyutları zeta-sizer cihazı ile ölçüldü ve 13,57 nm boyutunda oldukları gösterildi. AFM değeri de yaklaşık aynı değeri göstermektedir.



Şekil 4. 4. Sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutunu gösteren AFM görüntüsü.

4.1.5 Geçirmeli Elektron Mikroshopu Fotoğrafi

Tem mikroskop ile yapılan ölçümler sonucu nanopartiküllerin ortalama boyutu 10-15 nm arasında olduğu görüldü.



Şekil 4. 5. Sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutunu gösteren TEM görüntüsü.

4.2 Altın Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonları

Sistamin kaplı altın nanopartiküllerin karakterizasyonu için Zeta potansiyel ve UV spektrofotometri kullanıldı.

4.2.1 S-GNP Zeta Potansiyeli

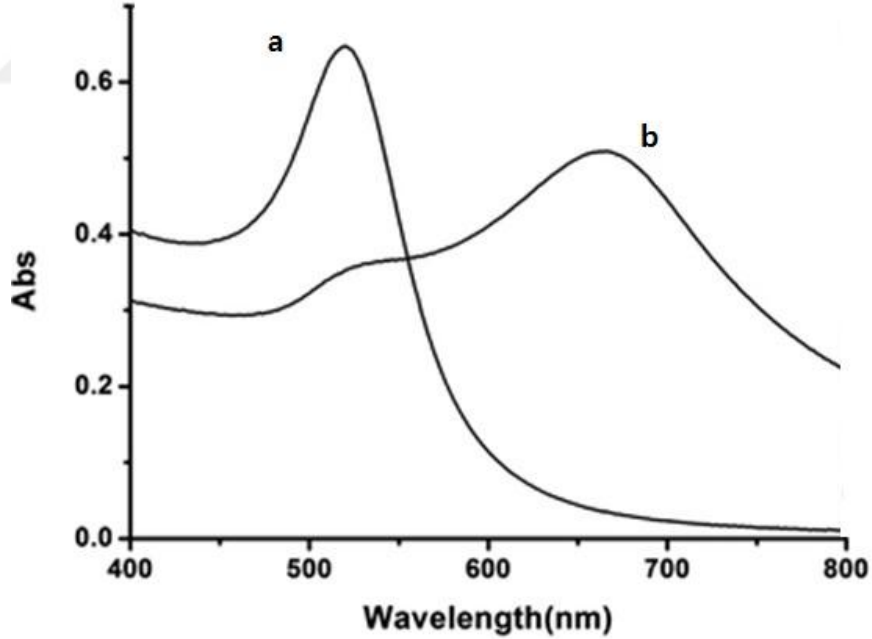
Yapılan Zeta potansiyel deney sonucunda görüldüğü gibi sistaminle kaplanan altın nanopartiküllerin Zeta potansiyel değeri -31.5 mV olarak saptandı. Bu sonuç, sitrat kaplı altın nanopartiküllerinde sistamin moleküllerinin sitratları yerlerinden söktüğünü ve modifikasyonun başarılı olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.1’de nanopartikül türüne bağlı Zeta potansiyel değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4. 1. Altın nanopartikülleri ve sistamin kaplı altın nanopartiküllerin Zeta potansiyelleri.

Nanopartikül Türü	Zeta Potansiyeli (mv)
Altın nanopartikül	-46,5
Sistamin kaplı altın nanopartikül	-31,5

4.2.2 UV Spektrofotometri Değerlendirilmesi

Sentezlenen ve yüzeyleri sistamin molekülleriyle modifiye olan altın nanopartiküllerinin karakterizasyonu için UV spektrofotometrisi kullanıldı. Çizelge 4.6'de beklenildiği gibi altın nanopartiküllerinin 520 dalga boyundaki kırılmalarının yer değişmesi (680 dalga boyu) gösterilmiştir.



Şekil 4. 6. UV-VIS spektrofotometrisi. a altın nanopartikülleri. b modifiye altın nanopartikülleri.

Şekil 4'6'da absorbansın dalga boyuna göre olan grafikte a eğrisi altın nanopartiküllerin 520 dalga boyunda kırılım yaptığını gösterirken b eğrisi sistaminle kaplı altın nanopartiküllerin 680 dalga boyunda kırılım yaptığını göstermektedir.

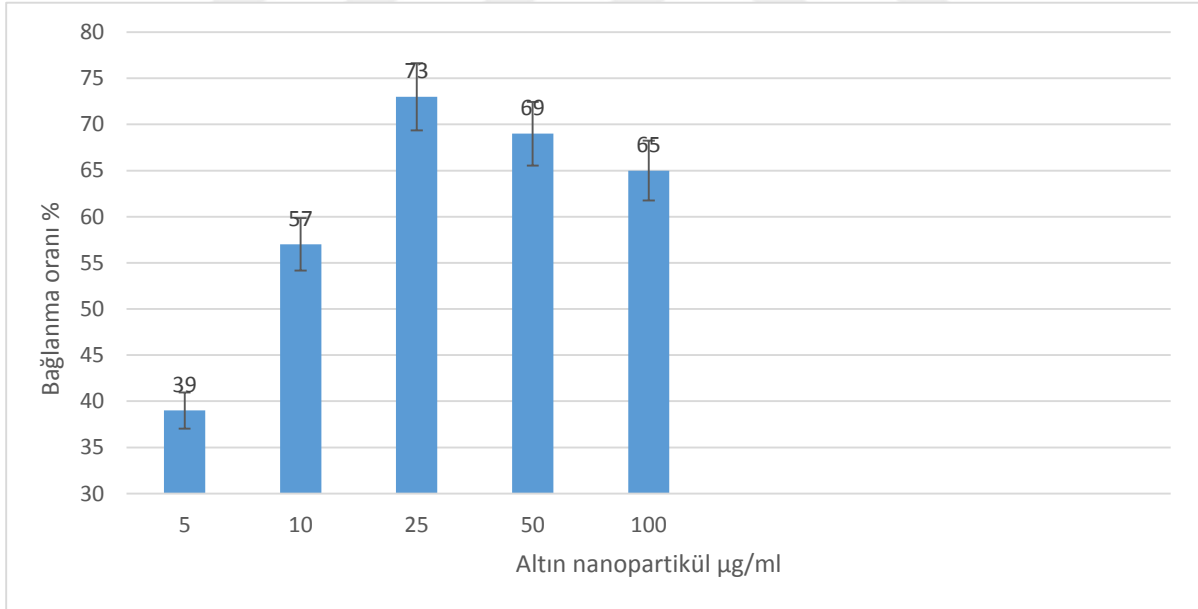


4.3 Modifiye Altın Nanopartiküllerin, Antikora Bağlanması

4.3.1 mAb-GNP Bağlanma Oranı

Bu amaçla 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/ ml olmak üzere 5 farklı altın nanopartikül konsantrasyonu hazırlandı. Hazırlanan her bir altın nanopartikül sistemin molekülü ile kaplandı ve 10 µg/ ml oranında Anti Wnt-1 monoklonal antikor ile etkileştirildi. Etkileştirme sonucu oluşan örnekler santrifuj yapılarak yıkandı ve elde edilen modifiye nanopartiküller 1 ml DI su içerisinde dağıtıldı.

Süpernatantlar bağlanma oranını ölçmek için denetlendi ve Süpernatant'da protein miktarı Roche Cobas Integra 400 Plus cihazı ile ölçüldü. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'de verilmiştir. Şekil 4.7'de elde edilen sonuçlar % olarak ifade edilmiş ve ölçülen mAb-GNP bağlanma oranları gösterilmiştir.

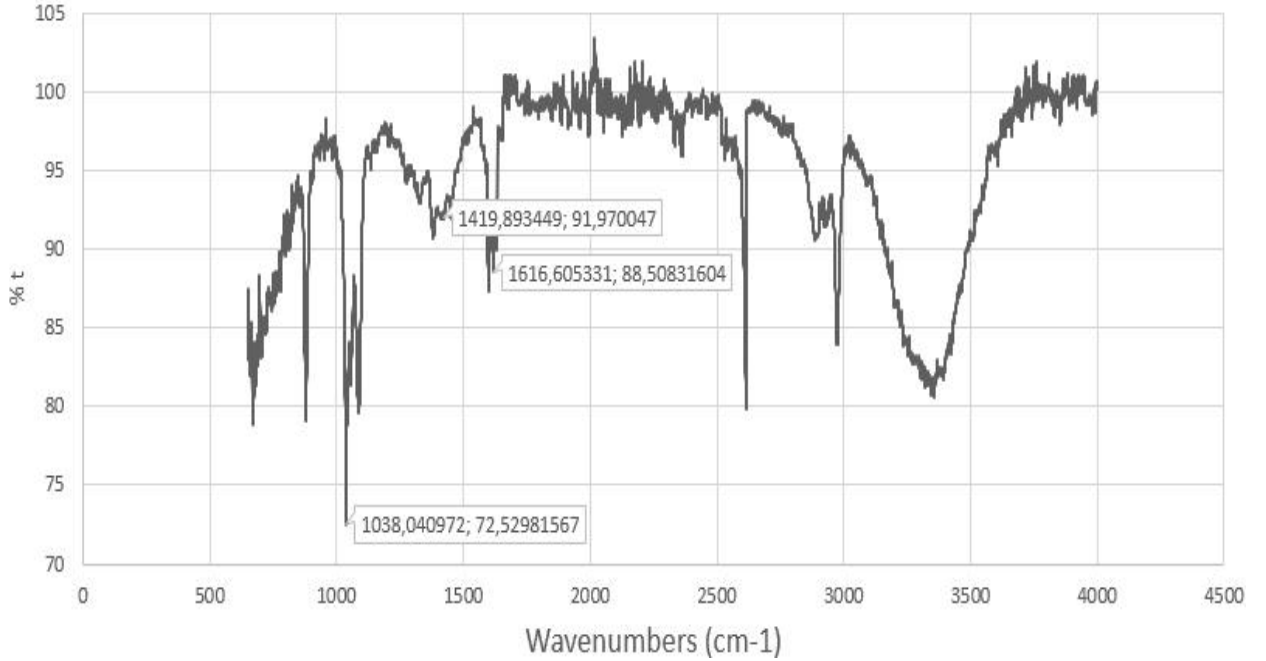


Şekil 4. 7. Roche Cobas Integra 400 plus cihazı ile ölçülen mAb-GNP bağlanma oranları.

4.4 Monoklonal Antikor Bağlı Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.4.1 Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi

mAb-GNP bağlanıp bağlanmadığının karakterizasyonu için FTIR cihazı kullanıldı. Bu amaçla önce sistamin kaplı altın nanopartiküllerin FTIR analizi ve sonra monoklonal bağlı altın nanopartiküllerinin FTIR analizleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8'te ve Şekil 4.9'te verilmiştir. Spektrumlarda görülen karakteristik piklerin literatürlerde elde edilen sonuçlarla uyumluluk içerisinde olduğu görülmektedir [137].

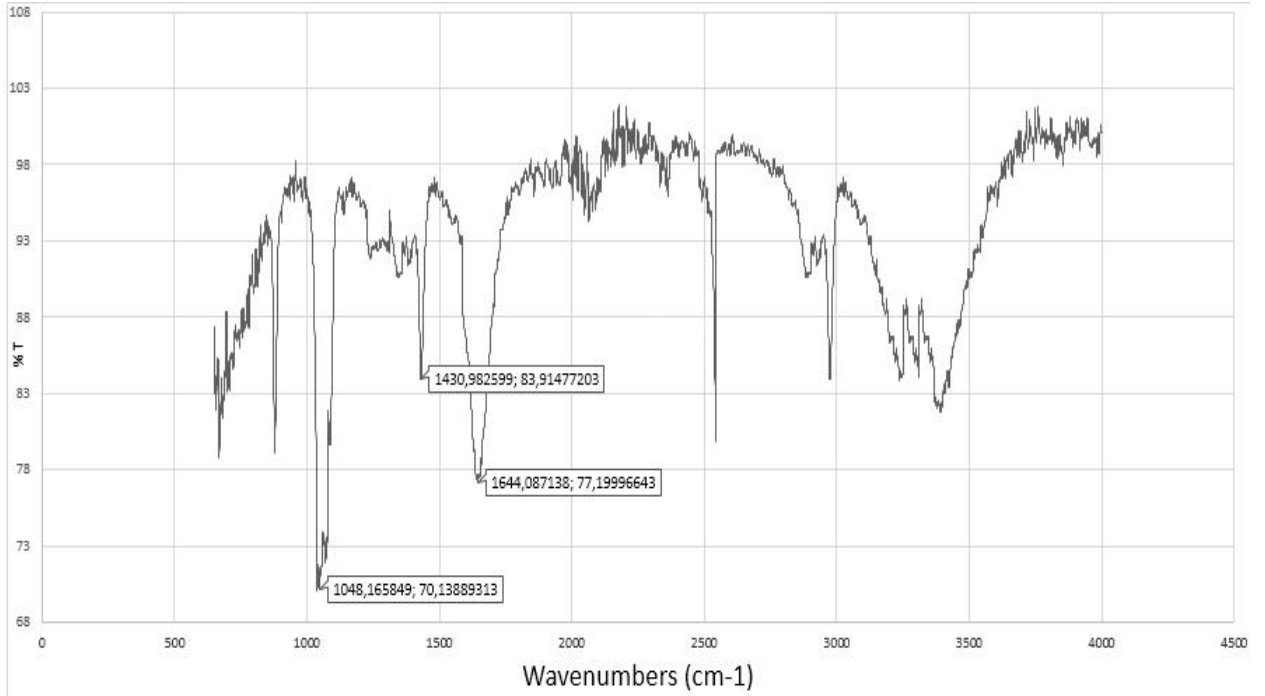


Şekil 4. 8. Sistamin kaplı altın nanopartiküllerin FTIR-ATR analizi.

1616 cm^{-1} deki pik NH_2 bükülme titreşiminden kaynaklanmaktadır. Bu bükülmenin nedeni sistamin ucundaki NH_2 'dir. Gözlenen bu sonuç sistaminin altın nanopartikül üzerine bağlandığını gösterir.

1419 cm^{-1} deki pik CH_2 bükülme titreşimi, 2900 cm^{-1} ve 2975 cm^{-1} deki pikler CH_2 asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Gözlenen bu titreşimler sistamin molekülündeki CH_2 gruplarından kaynaklanmaktadır.

1038 cm^{-1} deki pik C-S bağının olduğunu göstermektedir. Bu durum sistamin molekülünün altına bağlandığı uçtaki C-S grubundan kaynaklanmaktadır.



Şekil 4. 9. Antikor bağlı altın nanopartiküllerin FTIR-ATR analizi.

1644 cm^{-1} deki pik antikorun amid bağlarındaki C=O gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. Pikin nedeni antikordaki C=O grubundan ileri gelmektedir. Elde edilen bu sonuç antikorun yüzeye başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir.

1430 cm^{-1} deki pik CH₂ bükülme titreşimi, 2900 cm^{-1} ve 2975 cm^{-1} deki pikler CH₂ asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Bu duruma sistamin molekülündeki CH₂ grupları neden olmaktadır.

1048 cm^{-1} deki pik C-S bağının olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu pikin nedeni sistamin molekülünün altına bağlandığı uçtaki C-S grubudur.

4.5 Sitotoksisite Testi

Yapılan hücre kültürü sonucu ve MCF-7 hücrelerin örneklerle MTT test sonucu, Çizelge 4.2'de ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

Sonuçlara göre mAb konsantrasyonu arttığı zaman (7 µg/ml) hücrelerde az da olsa canlılık oranının azaldığı gözlemlendi. Bunun nedeni hücrelerdeki apoptoz oranı arttığına hücre canlılığının azalmasından kaynaklanmaktadır.

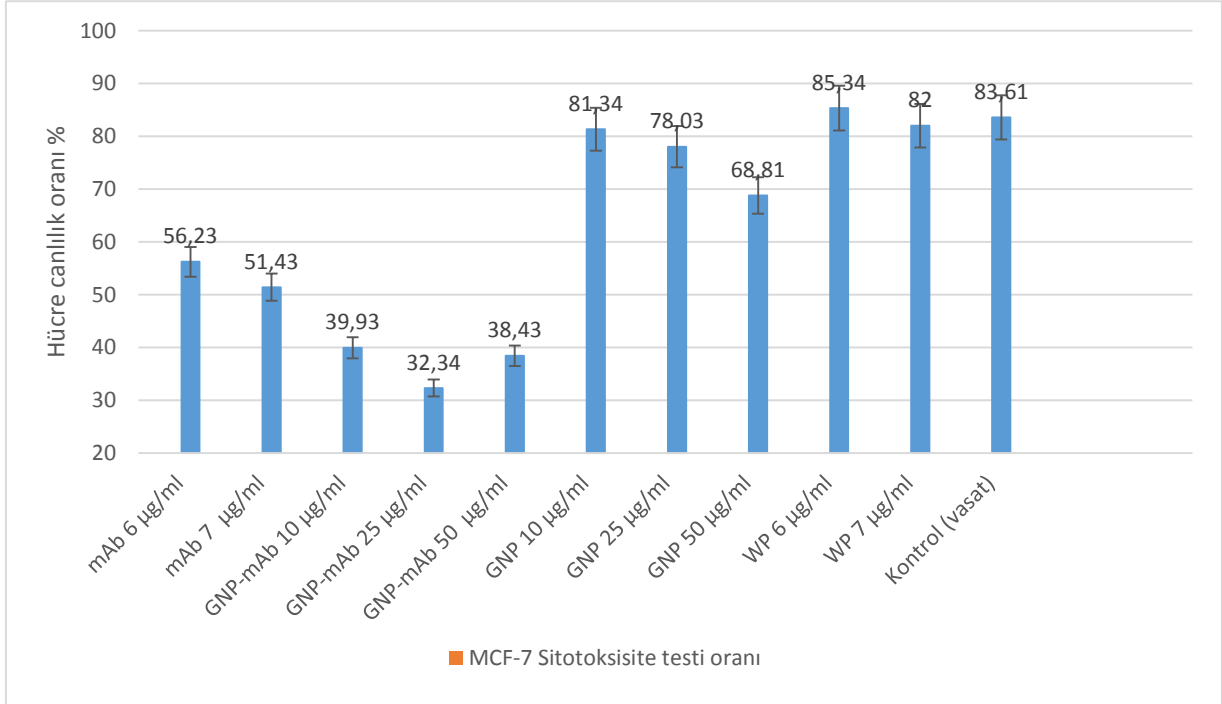
Çizelge 4. 2. . MTT test sonucu ve MCF-7 hücre canlılık oranları.

Örnekler	MCF-7 Sitotoksisite testi oranı (%)	STD
mAb 6 µg/ml	56,23	1,45
mAb 7 µg/ml	51,43	1,91
GNP-mAb 10 µg/ml	39,93	0,75
GNP-mAb 25 µg/ml	32,34	1,01
GNP-mAb 50 µg/ml	38,43	0,98
GNP 10 µg/ml	81,34	1,25
GNP 25 µg/ml	78,03	2,59
GNP 50 µg/ml	68,81	1,86
WP 6 µg/ml	85,34	1,58
WP 7 µg/ml	82	0,59
Kontrol (vasat)	83,61	0,25

Sonuçlara göre GNP-mAb'lerin altın nanopartiküllerdeki konsantrasyon artışı hücrelerde farklı oranlarda apoptoza sebep olmaktadır. Altın nanopartiküllerin konsantrasyonundaki artışta 25 µg/ml'de hücre canlılık oranı en az iken GNP konsantrasyonu 50 µg/ml olduğu zaman bir şekilde mAb'lerin etkisi düşmektedir.

Yapılan çalışmada GNP'lerin konsantrasyon artışları hücrelerde canlılığın azalmasına ve apoptozdan ziyade nekroza sebep olmaktadır. Buda altın nanopartiküllerinin yüksek konsantrasyonlardaki toksik etkisinden kaynaklanmaktadır.

Ama WP'lerde hücreler arasındaki sinyalleşme kolaylıkla sağlandığından hücrelerin canlılığını etkilememektedir ve az da olsa canlılık oranının artmakta olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 10. MTT test sonucu ve MCF-7 hücre canlılık oranları

4.6 Yapılan hücre kültürü apoptoz oranları

Tez kapsamında yapılan hücre kültüründe MCF-7 meme kanser hücrelerinin hazırlanan örneklerle etkileşiminin sonucu Çizelge 4.3'te ve şekil 4.11'de verilmiştir.

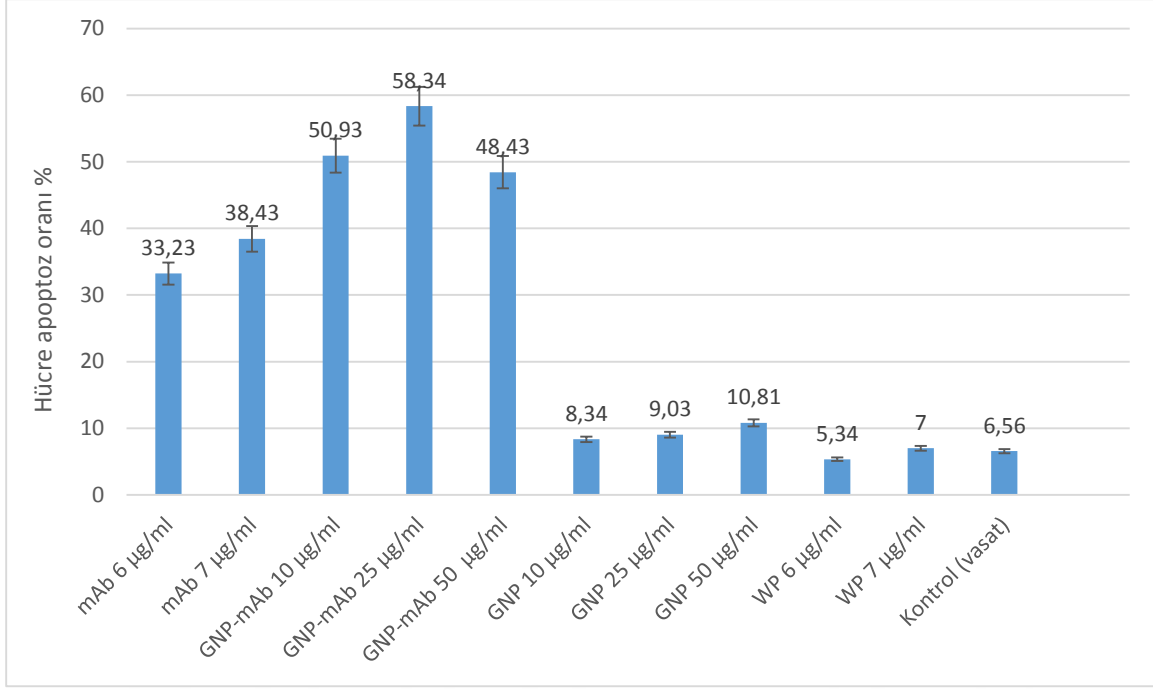
Çizelge 4. 3. Hücre kültürü deneylerinden elde edilen apoptoz ve standart sapma değerleri.

Örnekler	MCF-7 Hücre Kültürü Apoptoz Oranları(%)	STD
mAb 6 µg/ml	33,23	1,12
mAb 7 µg/ml	38,43	0,71
GNP-mAb 10 µg/ml	50,93	0,79
GNP-mAb 25 µg/ml	58,34	1,61
GNP-mAb 50 µg/ml	48,43	0,85
GNP 10 µg/ml	8,34	1,24
GNP 25 µg/ml	9,03	0,92
GNP 50 µg/ml	10,81	1,54
WP 6 µg/ml	5,34	0,99
WP 7 µg/ml	7	1,01
Kontrol (vasat)	6,56	0,79

Sonuçlara göre 7 µg/ml mAb konsantrasyonundaki artış 6 µg/ml mAb ye göre % 5'lik bir apoptoz oranının artışına neden olmaktadır. Bunu nedeni mAb'nin daha fazla Wnt-1 proteinine bağlanarak hücreler arasındaki sinyalleşmeyi engellemesinden kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmada GNP-mAb'lerdeki altın nanopartiküllerin konsantrasyonundaki artış ilk kademedede 10 µg/ml'den dan 25 µg/ml'ye yükselirken apoptozda da belirgin bir artışın olduğu gözlenmiştir. Bu 25 µg/ml altının mAb'ler üzerindeki etkiyi arttırdığı sonucunu vermektedir. Ama ikinci kademedede 50 µg/ml altın konsantrasyonunda altının toksik etkisinden dolayı mAb'nin etkisinin azaldığı ve apoptoz oranın % ~10'luk bir düşüğe sebep olduğu sonucu görülmektedir.

Altın nanopartiküllerin konsantrasyondaki artış ne kadar az da olsa hücrelerde bir apoptoz oranının yükselmesine sebep olur ama apoptozdan daha fazla nekroza sebep

olurlar. Bu apoptoz değeri WP ve vasattaki apoptoz oranı ile karşılaştırıldığında bu değerin önemsiz olduğu ispatlanmaktadır.



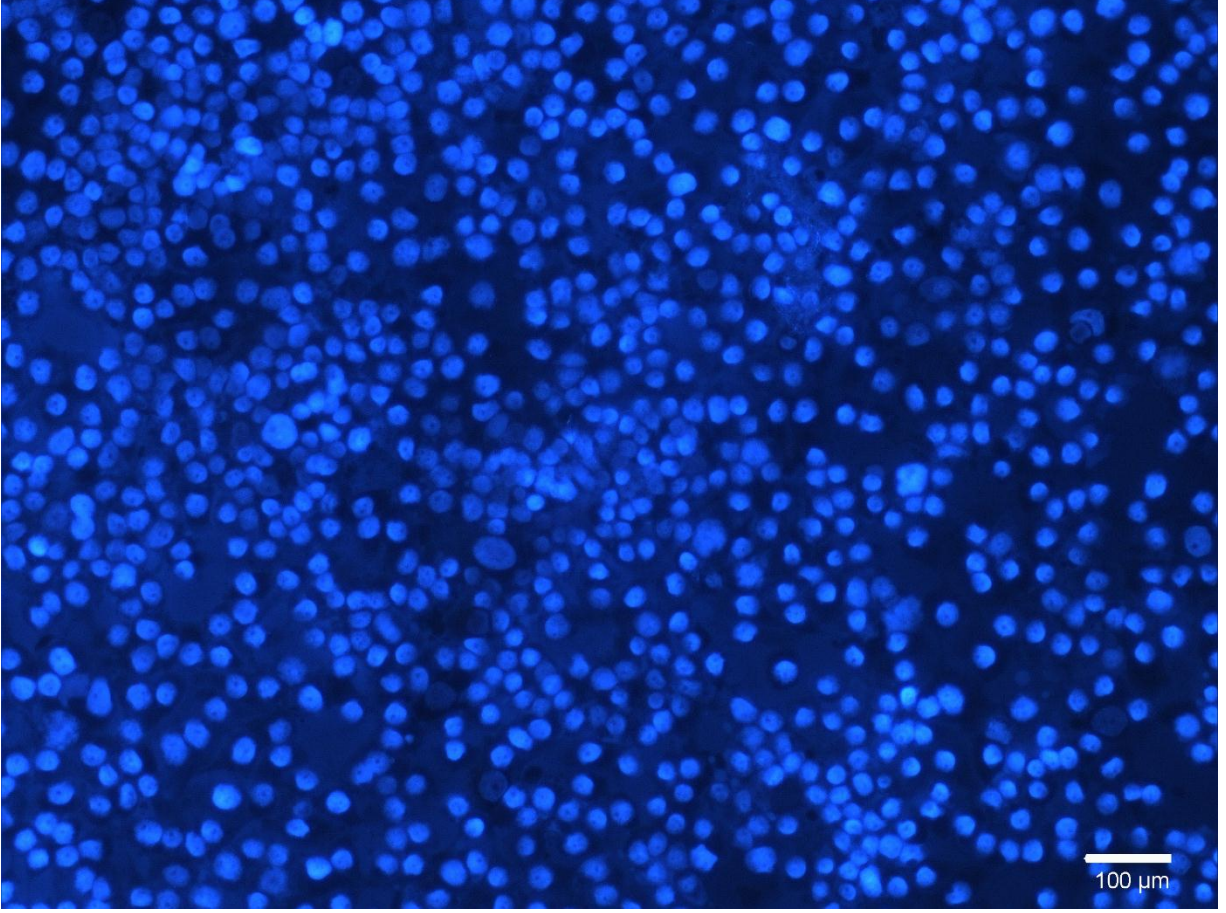
Şekil 4. 11. Yapılan hücre kültürü deneylerinden elde edilen apoptoz ve standart sapma değerleri.

4.6.1 Hücre Kültürü alışmalarından Elde Edilen Sonuçlar

Tez kapsamında elde edilen sonuçlara göre en yüksek apoptoz oranına sahip altın nanopartikül konsantrasyonu ve antikor miktarı göz önüne alınarak, sadece 25 µg/ml altın nanopartiküle bağlı antikor (GNP-mAb 25 µg/ml) rneği ve buna eş değer antikor, WNT-1 proteini ve GNP'lerin hücre kültürü fotoğrafları teze eklendi ve istatistiksel analizleri yapıldı.

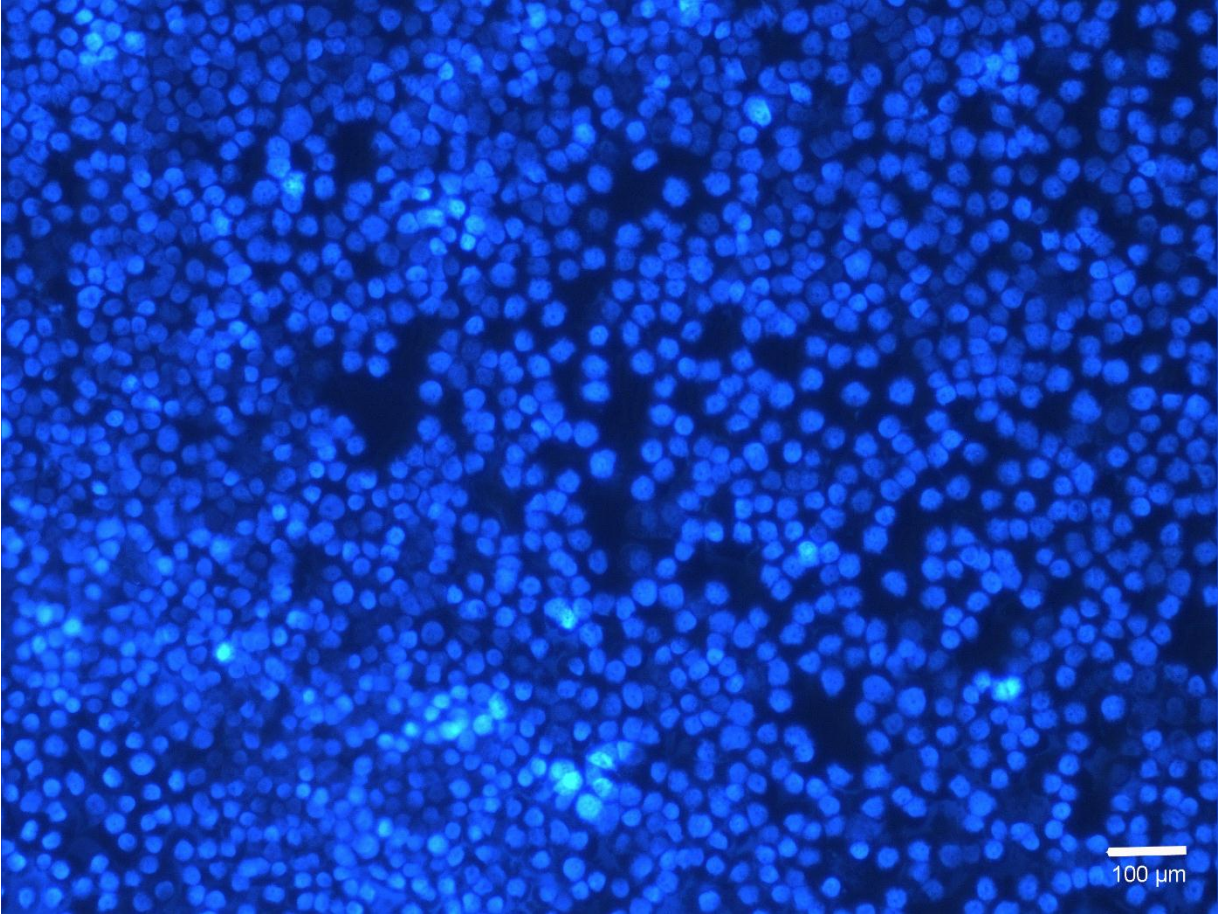
Çalışmanın bu kısmında boyaması yapılan MCF-7 hücrelerinin apoptoz oranını değerlendirmek için hücre kültürü fotoğrafları Floresan Mikroskopu DAPI filtresi kullanılarak 10x5 büyütme oranıyla çekildi. Tez kapsamında kullanılan fotoğraflar çekilen tüm fotoğraflar içerisinden en iyileri seçilerek değerlendirildi. Tüm fotoğrafların değerlendirilmesinde 10 farklı alan (yaklaşık 1000 hücre) sayılarak apoptoz ortalaması alındı.

Kontrol grubunda Şekil 4.12’de gösterildiği gibi kontrol hücrelerinin canlılık ve apoptoz oranının hesaplanması 10 farklı alanda yaklaşık 1000 hücre sayılarak yapıldı. Canlılık indeksi yüzde (%) olarak ifade edildi ve indeks değeri %83,61 olarak tespit edildi. Yapılan hücre kültüründe apoptoz oranı da % olarak hesaplandı ve bu oran $6.56 \pm 0,79$ olarak ölçüldü. Bu oran hücrelerin sağlıklı olduklarına işaret etmektedir.



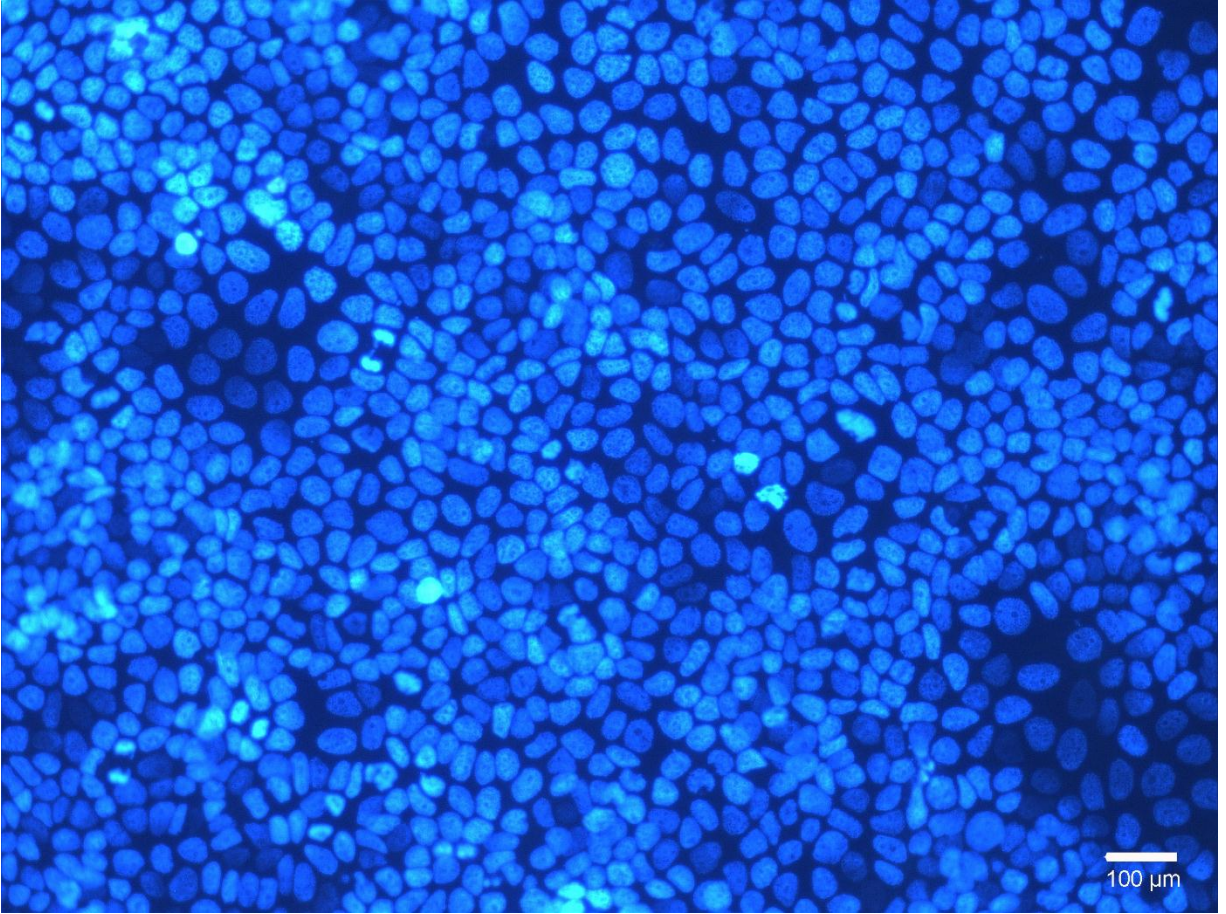
Şekil 4.12. Kontrol grubunda Floresan Mikroskopta (10x5 büyütme ile) DAPI filtresi kullanılarak çekilen hücre kültürü fotoğrafları.

Bu tez kapsamında Wnt-1 proteini MCF-7 hücreleri üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğunu göstermek için kullanıldı. Bu amaçla 7 µg/ml Wnt-1 proteininin hücreler üzerindeki etkisi gözlemlendi. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi hücrelerin canlılık oranı ve apoptoz değerleri 10 farklı alan (yaklaşık 1000 hücre) sayılarak hesaplandı. Canlılık indeks yüzde (%) olarak ifade edildi ve % 82 olarak tespit edildi. Apoptoz oranı da aynı şekilde hesaplandı ve % olarak ifade edildi. Sonuç $7 \pm 1,01$ olarak hesaplandı. Bu değerlere göre Wnt-1 proteinin hücreler üzerinde toksik veya apoptoz etkisinin olmadığı gözlemlendi.



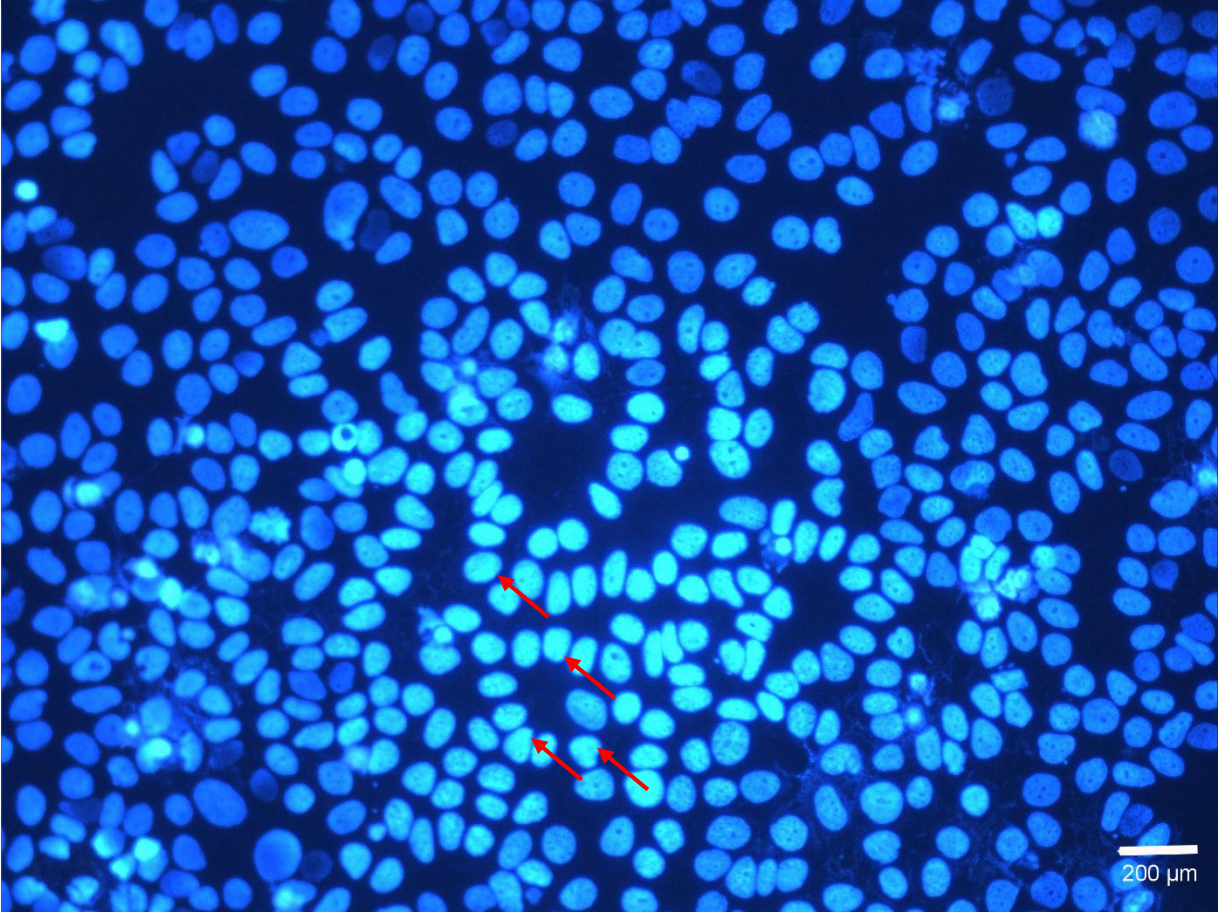
Şekil 4. 13. MCF-7 hücrelerinin WNT-1 proteini ile etkileşimini gösteren Floresan Mikroskopta (10x5 büyütme ile) DAPI filtresi kullanılarak çekilen hücre kültürü fotoğrafları.

Altın nanopartiküllerin MCF-7 hücre üzerindeki etkilerini gözlemlemek için, bu nanopartiküller 25 µg/ml GNP hücrelerle etkileştirildi. Şekil 4.14'de verilen hücre fotoğraflarından görüldüğü üzere hücrelerin canlılık oranı ve apoptoz oranı yaklaşık 1000 hücre olmak üzere 10 farklı alan sayılarak hesaplandı. Canlılık indeks yüzde (%) olarak ifade edildi ve %78,03 olarak tespit edildi. Aynı şekilde apoptoz oranı da %9,03±0,92 olarak hesaplandı. Bu değerleri kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda altın nanopartiküllerin MCF-7 hücreler üzerindeki toksik etkiye göstermektedir.



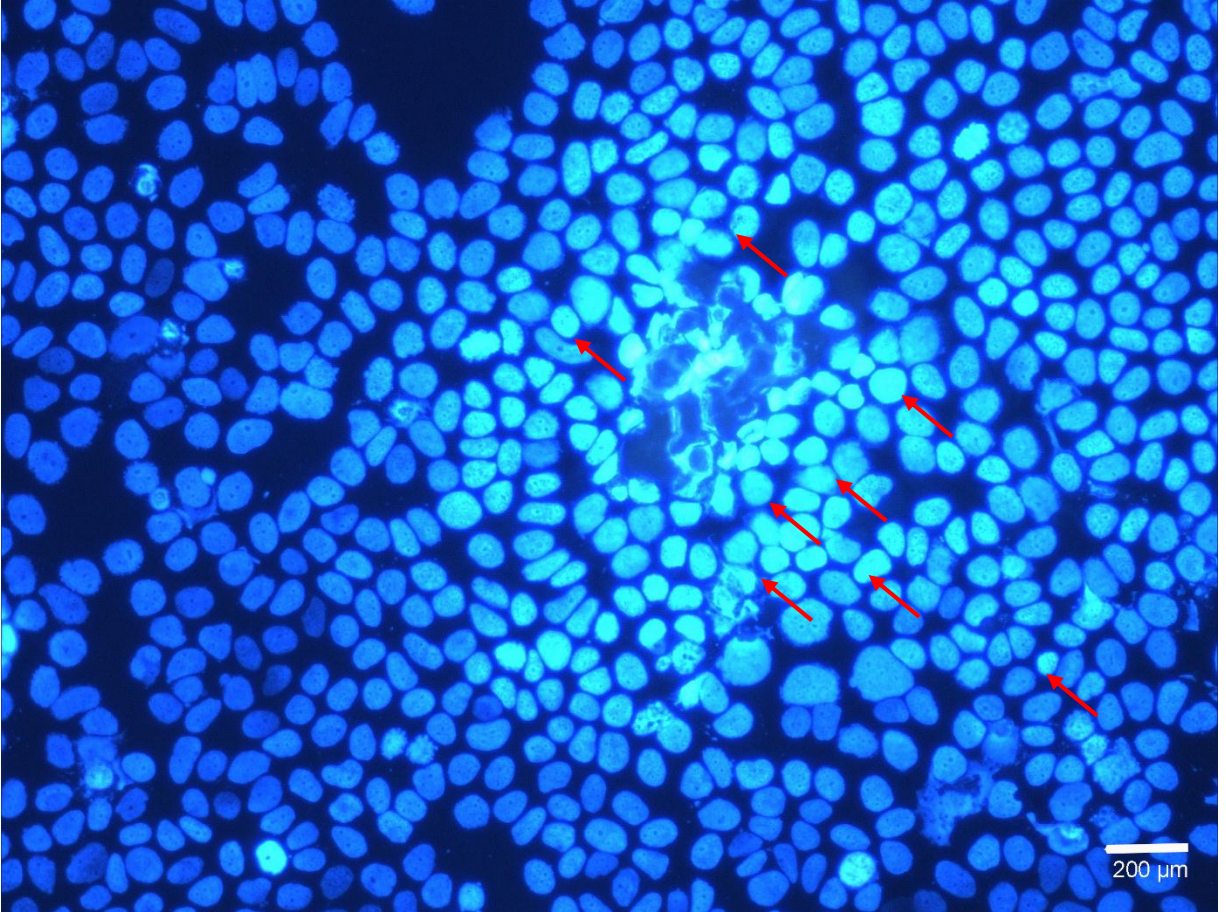
Şekil 4. 14. Altın nanopartiküllerin MCF-7 hücreleriyle etkileşimini gösteren Floresan Mikroskopta (10x5 büyütme ile) DAPI filtresi kullanılarak çekilen fotoğrafları.

Anti Wnt-1 monoklonal antikorların MCF-7 hücre üzerindeki etkilerini gözlemlemek için 7 µg/ml mAb hücrelerle etkileştirildi. Şekil 4.15’de görüldüğü gibi hücrelerin canlılık oranı yaklaşık 1000 hücre sayılarak 10 farklı alan için ortalaması alındı. Canlılık indeks yüzde (%) olarak ifade edildi ve 51,43 % olarak hesaplandı. Apoptoz oranı ise aynı şekilde %38,43±0,71 olarak hesaplandı. Canlılık oranındaki düşüş hücrelerin apoptoza uğramasından kaynaklanmaktadır ve bu sonuç antikorun hücreler üzerindeki apoptoz etkisini göstermektedir.



Şekil 4. 15. Anti WNT-1 monoklonal antikorla MCF-7 hücrelerin etkileşimlerini gösteren Floresan Mikroskopta (10x5 büyütme ile) DAPI filtresi kullanılarak çekilen fotoğraflar.

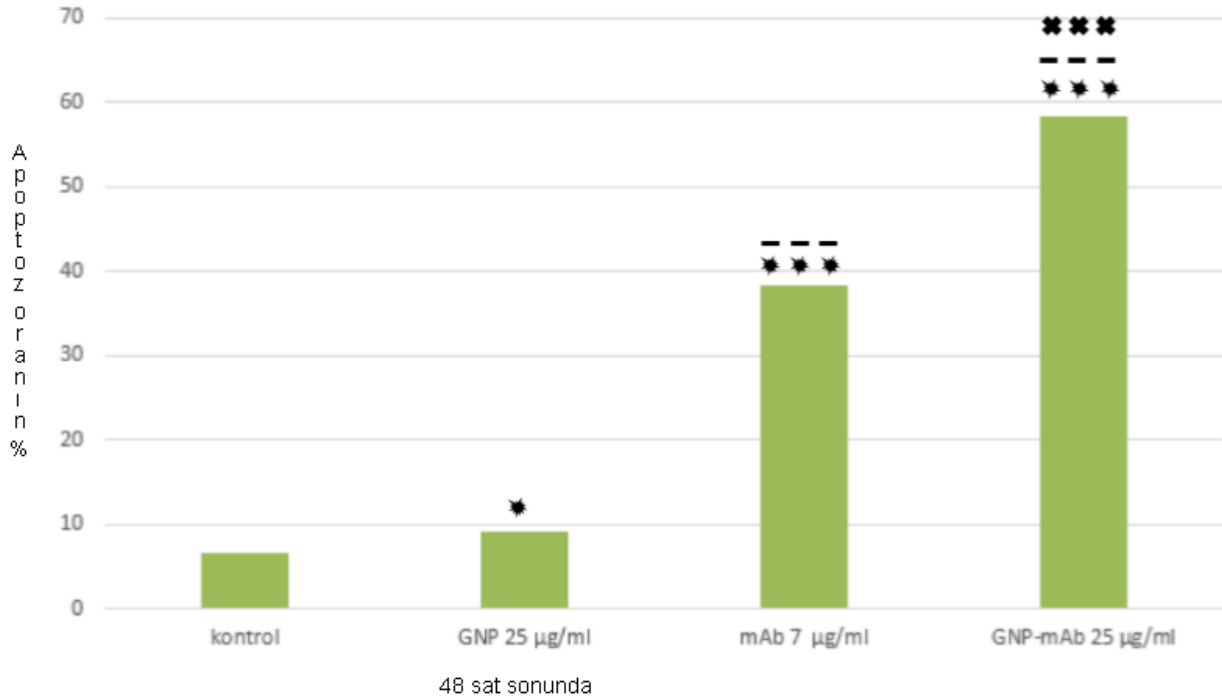
Bu aşamada mAb-GNP'ler MCF-7 hücreleri ile etkileştirildi. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi hücrelerin canlılık oranı 10 farklı alan (yaklaşık 1000 hücre) sayılarak hesaplandı. Canlılık indeks yüzde (%) olarak ifade edildi ve sonuç 32,34 % olarak bulundu. Apoptoz oranı da aynı şekilde hesaplandı ve % olarak ifade edildi. Hesaplanan değer $58,34 \pm 1,61$ olarak bulundu. Hesaplanan değerler hücrelerin canlılık oranının düştüğünü ve apoptozun arttığını göstermektedir. Bu sonuca göre antikor bağlı nanopartiküllerin başarılı bir şekilde apoptozu indüklediği gözlemlendi.



Şekil 4. 16. Antikor bağlı altın nanopartiküllerin MCF-7 hücreler üzerindeki etkisini gösteren Floresan Mikroskopta (10x5 büyütme ile) DAPI filtresi kullanılarak çekilen fotoğraflar.

4.7 İstatistiksel Analiz

En yüksek bağlanma oranı 25 µg/ml konsantrasyonunda GNP ile 10 µg/ml konsantrasyonunda mAb arasında olduğundan burada bu örneklere eş değer GNP ve mAb ele alındı. Bağlanma oranı %70 olduğundan antikor 7 µg/ml oranında ve GNP 25 µg/ml oranında değerlendirildi. Bu örneklerin P-değeri hesaplandı ve P-değerinin 0.05'den az olduğu ($p < 0,05$) durumlar anlamlı kabul edildi (Şekil 4.17.).



Şekil 4. 17. Apoptoz oranının 48 saat sonunda p değerinin istatistiksel olarak hesaplanması

P-değerinin analizindeki sonuçlarda (Şekil 4.17) 0.05'den az olduğu ($p < 0,05$) durumlar anlamlı ve üç karakterle, P-değerinin anlamsız olduğu durum ise tek karakterle gösterilmiştir. Şekil 4.17'ye göre * apoptoz oranının yeterli olmadığına *** ve --- apoptoz oranındaki artışın anlamlı olduğuna işaret etmektedir.

Kontrol grubu ile 25 µg/ml konsantrasyonunda GNP arasındaki P-değeri $P > 0.05$ olarak hesaplandı. Bu değere göre apoptoz oranındaki artışın anlamlı olmadığı görüldü.

Yapılan bu değerlendirmede altın nanopartiküllerinin MCF-7 hücreler üzerinde apoptoz etkilerinin olmadığı sonucuna varıldı.

Kontrol grubu ile 7 µg/ml konsantrasyonunda mAb arasındaki P-değeri $P < 0.001$ olarak hesaplandı ve apoptoz oranındaki artışın anlamlı düzeyde olduğu tespit edildi. Bu sonuca göre antikorun MCF-7 hücrelerini apoptoza itmiş olduğu açıkça görüldü.

Kontrol grubu ile 25 µg/ml konsantrasyonunda GNP-mAb arasındaki P-değeri $P < 0.001$ olarak hesaplandı ve bu apoptozdaki artışın istatistiksel olarak kabul edilebilir düzeyde olduğu görüldü. Bu artış altın nanopartikülün antikorun etkisinin azaltmadığını gösterdi.

25 µg/ml konsantrasyonunda GNP ile 7 µg/ml konsantrasyonunda mAb arasındaki P-değeri $P < 0.001$ olarak hesaplandı ve bu apoptozdaki artışın istatistiksel olarak kabul edilebilir düzeyde olduğu görüldü. Hesaplanan P-değeri mAb'nin GNP'lere göre apoptoza teşvik oranının çok fazla olduğunu göstermektedir.

25 µg/ml konsantrasyonunda GNP ile 25 µg/ml konsantrasyonunda GNP-mAb P-değeri $P < 0.001$ olarak hesaplandı ve bu apoptozdaki artışın istatistiksel olarak kabul edilebilir düzeyde olduğu tespit edildi. Apoptozun artışı mAb-GNP'2lerin sadece GNP'lere göre apoptoz oranının anlamlı bir şekilde arttırdığını göstermektedir.

Ve en son olarak 7 µg/ml konsantrasyonunda mAb ile 25 µg/ml konsantrasyonunda GNP-mAb arasındaki P değeri $P < 0.001$ olarak hesaplandı ve bu apoptozdaki artışın istatistiksel olarak kabul edilebilir düzeyde olduğu tespit edildi. Buradaki apoptoz artışı altın nanopartiküllerinin antikorun apoptoz etkisini arttırdığının göstermektedir.

5.SONUÇLAR

Kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Sık görülmesi ve ölüm oranının yüksek olması sebebiyle de bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Türkiye sağlık bakanlığının 2012-2014 yılları arasında elde ettiği bulgulara göre meme kanseri en sık görülen kanser türü olmakta ve insanın hayat kalitesini düşürmektedir.

Kanser nanoteknolojisi günümüzde en çok çalışılan konulardan biridir. Kanser çalışmalarında birçok yöntemle kanserli hücreler hedeflenerek kanserin çoğalması ve yayılması engellenmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla, kanserli hücrelerde özellikle aktif olan yollar tercih edilmektedir.

Nanoteknolojik çalışmalarda birçok nano yapı kullanılmaktadır. Bunlardan biri de altın nanopartikülleridir. Altının toksik olmaması ve oksidasyona uğramaması bu metalin nanoteknolojik çalışmalarda önemli bir rol oynamasına olanak sağlamaktadır.

Tez kapsamında, Wnt/ β katenin yolağı kullanılarak Anti Wnt-1 monoklonal antikor (mAb) ile ekstraselüler matrikste bulunan Wnt-1 proteini hedeflenmiştir. Wnt-1 proteini birçok solid tümörde (meme kanseri, akciğer kanseri, sarkoma) hücreler arasında yüksek miktarda üretilir ve bu proteinin inhibisyonunun solid tümörün baskılanmasında, hücrelerin metastazının önlenmesinde ve apoptozun indüklenmesinde önemli rol oynadığı araştırmalarla ispatlanmıştır[74].

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Çalışmanın ilk aşamasında altın nanopartiküllerin sentezi, Turkevich metodu kullanılarak yapıldı [148]. Zeta-sizer, TEM, AFM ve UV spektrofotometri ile yapılan karakterizasyon sonuçlarına göre, sentezlenen altın nanopartiküllerin ortalama boyutlarının 10-15 nm arasında oldukları, 520 nm dalga boyunda kırılma yaptığı ve yüzey yüklerinin -46.5 mv olduğu tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1- 4.5 te verildi. Rochelle Arvizo ve arkadaşları, S Jain ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda altın nanopartikülleri aynı yöntemle sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen altın nanopartiküllerin boyutu ve anlatılan özellikleri literatürlerde karşılaştırıldı ve birçok biyomedikal uygulamada kullanılan altın nanopartiküllerle aynı özelliklere sahip oldukları

belirlendi ve böylece sentezlenen nanopartiküllerin deney için uygun olduğuna karar verildi [161,162].

- Çalışmanın ikinci kısmında, sentezlenen GNP'lerin yüzeyine antikor bağlanabilmesi için modifikasyon yapılması hedeflendi. Bu amaçla sistamin molekülü seçildi. Sistamin molekülünün bir ucunda tiyol ve diğer ucunda amin gruplarının olması bu molekülü, altın nanopartiküllerin antikora bağlanabilmesi için uygun hale getirmektedir. Bunun nedeni, sistamin tiyol grubu ile altın nanopartiküle bağlanırken amin grubu ile de antikora bağlanabilme özelliğine sahiptir. Yüzeyleri sistamin molekülü ile modifiye olan altın nanopartiküllerin karakterizasyonu için zeta potansiyel ve UV spektrofotometrisi kullanıldı. Modifiye nanopartiküllerin yüzey yüklerinin -31,5 olması ve UV spektrofotometrisinde de 680 nm dalga boyunda kırılma yapması GNP'lerin sistaminle kaplandığını göstermektedir. Yapılan çalışmaların sonucu Çizelge 4.1 ve Şekil 4.6 da verildi. Aditya Sharma ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada altın nanopartiküller aynı şekilde sistamin molekülü ile modifiye edilip ve sonular elde edilmiştir, bizim elde ettiğimiz sonuçlar ve yapılan bu çalışmadaki sonuçlar karşılaştırıldı ve altın nanopartiküllerinin modifikasyonunun doğru olduğu gözlemlenmiştir [137].
- Üçüncü aşamada yüzeyi modifiye olan GNP'lerin anti Wnt-1 monoklonal antikorla bağlanması hedeflendi. Bu adımda EDC/NHS yöntemi kullanılarak antikorların nanopartiküller üzerine bağlanması sağlandı [153]. Buradaki en önemli aşama antikorların GNP'lere bağlanma oranıdır. Bu aşamada 5 farklı GNP konsantrasyonu (5, 10, 25, 50 ve 100 µg/ ml) ele alındı ve her bir konsantrasyon 10 µg/ml Anti Wnt-1 monoklonal antikor ile etkileştirildi. Böylece en yüksek antikor nanopartikül bağlanma oranının bulunması hedeflendi. Daha sonra Roche Cobas Integra 400 Plus cihazı kullanarak antikorun bağlanma oranı hesaplandı. Bu deneylerin sonucunda en yüksek antikor bağlanma oranının 25 µg/ ml konsantrasyonunda GNP'e bağlı mAb konsantrasyonunda gerçekleştiği görüldü. Aditya Sharma ve arkadaşları tarafından yapılan yapılan

çalışmada yüzeyi modifiye edilen altın nanopartiküller anti-aflatoxin B1 mouse monoclonal antibody ile bağlanıp farklı bir amaç için kullanılmıştır ama yapılan bu işlem bizim yaptığımız karakterizasyon yöntemleriyle aynı ve FTIR değerlendirilmesi kullanılmıştır[137]. Yaptığımız FTIR analizinde kovalent bağlanmadan kaynaklı amid C=O bağındaki gerilme pikler gözükmemektedir.

Deneylerden daha değerli veriler elde etmek için ve GNP'lerin antikolarlar üzerindeki etkisini daha iyi göstermek amacıyla deneyin devamında mAb'ye bağlı 10, 25, 50 µg/ml konsantrasyonlarında GNP ile devam edildi.

Antikor bağlı altın nanopartiküllerin karakterizasyonu FTIR kullanarak yapıldı ve antikorun sistamin molekülüne bağlanmasında oluşan bağların titreşiminden kaynaklanan değerler elde edildi. Elde edilen değerler, antikoların GNP'ler üzerine kovalent bağı ile bağlandığının bir göstergesi olarak kabul edildi ve literatür çalışmaları ile de karşılaştırılıp yapılan işlemin doğruluğu tespit edildi [137]. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7-4.9 de verildi.

- Tezin in vitro kısmında tüm hücre kültürü çalışmaları en az üç tekrar olacak şekilde yapıldı. Önce hazırlanan örneklerin MCF-7 meme kanser hücreleri üzerindeki toksisitesini ölçmek için MTT testi yapıldı. Çalışmada hazırlanan örneklerde antikor ve altın oranlarının hep sabit tutulması hedeflendi. Yapılan sitotoksosite testindeki sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.10'da gösterildi.
- Sitotoksosite testinden sonraki aşama, hazırlanan örneklerle MCF-7 hücrelerin etkileşiminin sonucunun ne olduğunun incelenmesiyle ilgilidir. Bu adımda önceden hücre kültürü koşullarına uygun bir şekilde hazırlanmış MCF-7 hücrelerle örnekler (Çizelge 3.2) etkileştirildi ve hücreler üzerindeki etkilerini görmek için 48 saat inkübatörde bekletildi. Süre sonunda hücreler ikili apoptoz-nekroz boyama yöntemiyle boyandı ve Floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak görüntüleri alındı. Elde edilen apoptoz oranları Çizelge 4.3'te ve Şekil 4.7 ve 4.11'de gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek apoptoz oranı 25 µg/ml oranında GNP-mAb konsantrasyonuna ait olup apoptoz oranı %58,34±1,61 değerinde hesaplandı.

- Tezin son kısmında istatistiksel analiz için elde edilen verilere ait ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplandı. Verilerin sunumu için çeşitli tablo ve grafik türleri kullanıldı. Çalışmada kullanılan deney grupları arasındaki farkın anlamlı olup olmadığını test etmek için Tek Yönlü ANOVA yöntemi, Tukey–Kramer post hoc testiyle birlikte kullanıldı. Bulunan P değerleri karşılaştırıldı. P-değerinin 0.05'den az olduğu ($P < 0,05$) durumlar anlamlı kabul edildi.
- Çizelge 4.3'te elde edilen sonuçlara göre 6 µg/ml mAb konsantrasyonunda %33,23±1,12 oranında apoptoz hesaplandı. Bu antikora eş değer 10 µg/ml GNP-mAb konsantrasyonunda ise %50,93±0,79 oranında apoptoz görüldü. Bu iki değer karşılaştırıldığında apoptoz oranında %~17'lik bir artış olduğu gözlemlendi. Bu sonuç altın nanopartikülün antikor etkisini arttırdığını göstermektedir.
- 7 µg/ml mAb konsantrasyonunda %38,43±0,71 oranında apoptoz elde edilirken 25 µg/ml GNP-mAb konsantrasyonunda elde edilen apoptoz oranının %58,34±1,61 olduğu görüldü. Apoptoz oranındaki artış miktarı %~20 olarak hesaplandı. Bu sonuç GNP'lerin antikorun etkisini artırdığını göstermektedir.
- 7 µg/ml mAb konsantrasyonunda %38,43±0,71 apoptoz oranı görülürken 50 µg/ml GNP-mAb konsantrasyonunda %48,43±0,85 oranında apoptoz görüldü. Apotoz oranındaki bu değişimle örnekteki altın nanopartiküllerin antikor üzerindeki etkisini azalttığı gözlemlendi. Sonuçlar altının yüksek konsantrasyonlarda toksik etkisinin olabileceğini göstermektedir. GNP'lerin konsantrasyonu ve toksisitesi arasındaki etki çalışmalarımızda MTT testinde açıkça belirtildi.

Sonuç olarak yapılan tez kapsamındaki deneylerde mAb'nin hücreler üzerindeki etkisi vurgulandı. mAb antikorunun Wnt-1 proteinini ekstrasellular matrikste inhibe etmesi

sonucu hücrelerin apoptoza uğramaları araştırmalarca ispatlandı ve in vitro testlerinde yapılan bu çalışmaların sonucu fotoğraflar ve şekillerle gösterildi.

GNP'lerin üzerine bağlanan mAb'ler ve bu bağlanma oranının en yüksek konsantrasyonu hesaplanarak en fazla sayıda mAb'nin hücre ile dolayısıyla Wnt-1 proteini ile etkileşime girilmesi sağlandı. Bu sayede daha fazla WP'ye bağlayarak bu proteinin kendi hücre üzerindeki reseptörüne bağlanması engellendi. Sonuç olarak, dolaylı şekilde hücreler arasındaki sinyalleşme ve haberleşme kesilerek hücrelerin apoptoza gitmeleri sağlandı.

Bu çalışmanın en önemli özgülüğü altın nanopartiküllerin kullanılması ve altın nanopartiküllerin mAb'ler üzerindeki etkisinin gözlenmesidir. Yapılan çalışmada farklı GNP konsantrasyonları kullanılarak mAb üzerindeki etkileri denetlendi ve in vitro ortamında çalışıldı. Sonuçlara göre GNP'ler mAb üzerine olumlu bir etki oluşturduğu ve mAb-GNP'lerin eş konsantrasyondaki çıplak antikorlara göre daha fazla apoptoza sebep olduğu görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak hesaplanıp doğrulandı.

6.KAYNAKLAR

1. Kolb G: Cancer in the elderly, epidemiology and other basics. - Part of symposium 'geriatric oncology'. *Zeitschrift Fur Gerontologie Und Geriatrie* 1999, 32:294-294.
2. Fox BL: Breast cancer basics and beyond: Treatments, resources, self-help, good news, updates. *Library Journal* 2005, 130:173-173.
3. Torpy JM, Lynn C, Glass RM: JAMA patient page. Cancer: the basics. *JAMA* 2010, 303:1108.
4. Yıllara göre en sık görülen kanserler <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html> Haziran 2016.
5. Gültekin M, Boztaş, G: Türkiye Kanser İstatistikleri. 2014.
6. Vücutta sağlıklı hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve tümör oluşumu. <http://www.celldiagram.net/> Mayıs 2016.
7. Jurisic V, Perisic M: Doppler Perfusion Index in Colorectal Cancer Patients with Liver Metastasis. *Annals of Oncology* 2012, 23:47-47.
8. Maxwell GP, Gabriel A: The evolution of breast implants. *Plast Reconstr Surg* 2014, 134:12S-17S.
9. Jong B Kim caMJOH, 1 and Robert Stein2: Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? *Breast Cancer Res* ; 6(1): 22–30. 2004.
10. Vilcoq JR CR, Ferme F, et al: Conservative treatment of axillaryadenopathy due to probable subclinical breast cancer. *Arch Surg* . 117:1136–8. 1982.
11. Vidal JPCB, Felix SP, Chaves CBP, Patury P, Franco VF, de Morais EA, de Carvalho NA, Carvalho ACL, Neto OFA, Vieira LMTM, et al.: Genetic diversity of HPV16 and HPV18 in Brazilian patients with invasive cervical cancer. *Journal of Medical Virology* 2016, 88:1279-1287.
12. King E, Patel G, Toth S, Sandbach J: The Role of Oncology Advanced Practice Providers in Genetic Cancer Risk Assessment. *Oncology Nursing Forum* 2016, 43:E87-E88.
13. Gabriel A, Maxwell GP: The Evolution of Breast Implants. *Clin Plast Surg* 2015, 42:399-404.
14. Hudis CA: Biology before Anatomy in Early Breast Cancer--Precisely the Point. *N Engl J Med* 2015, 373:2079-2080.
15. Huang J, Li X, Hilf R, Bambara RA, Muyan M: Molecular basis of therapeutic strategies for breast cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005, 5:379-396.
16. Howell A, Sims AH, Ong KR, Harvie MN, Evans DG, Clarke RB: Mechanisms of Disease: prediction and prevention of breast cancer--cellular and molecular interactions. *Nat Clin Pract Oncol* 2005, 2:635-646.
17. Memenin yapısı. <http://www.cancer.ca/en/?region=on> Mart 2016.
18. Daling JR, Malone KE, Voigt LF, White E, Weiss NS: Risk of breast cancer among young women: relationship to induced abortion. *J Natl Cancer Inst* 1994, 86:1584-1592.
19. Leung JWT: Screening mammography reduces morbidity of breast cancer treatment. *American Journal of Roentgenology* 2005, 184:1508-1509.
20. Mahesh M: AAPM/RSNA physics tutorial for residents - Digital mammography: An overview. *Radiographics* 2004, 24:1747-1760.
21. Sarı O, serdengeçti: meme kanserinde sintimamografinin yeri. . *genel tip dergis* 2001, 11, 1, 45*42.
22. Taşkın F, Ünsal, A., Meteöglu, İ., Akdilli, A.: Memenin Benign Lezyonlarında Sonografik Arka Akustik Gölgeleme Bulgusu. *The Journal*

- of *Breast Health* 2007, 3, 1, 19-25, .
23. Van Goethem M, Tjalma W, Schelfout K, Verslegers I, Biltjes I, Parizel P: Magnetic resonance imaging in breast cancer. *Ejso* 2006, 32:901-910.
 24. Koning JL, Davenport KP, Poole PS, Kruk PG, Grabowski JE: Breast Imaging-Reporting and Data System (BI-RADS) classification in 51 excised palpable pediatric breast masses. *Journal of Pediatric Surgery* 2015, 50:1746-1750.
 25. But-Hadzic J, Bilban-Jakopin C, Hadzic V: The Role of Radiation Therapy in Locally Advanced Breast Cancer. *Breast Journal* 2010, 16:183-188.
 26. Coelho RC, Da Silva FDML, Do Carmo IML, Bonaccorsi BV, Faroni LD: Neoadjuvant radiotherapy in locally advanced breast cancer refractory to chemotherapy - a single institution experience in Brazil. *Annals of Oncology* 2015, 26:30-31.
 27. Amankwah EK, Lin HY, Tyrer JP, Lawrenson K, Dennis J, Chornokur G, Aben KKH, Anton-Culver H, Antonenkova N, Bruinsma F, et al.: Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Gene Variants and Epithelial Ovarian Cancer (EOC) Risk. *Genetic Epidemiology* 2015, 39:689-697.
 28. Radisky DC: Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2005, 118:4325-4326.
 29. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009, 139:871-890.
 30. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM: Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010, 12:R68.
 31. Polyak K, Weinberg RA: Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009, 9:265-273.
 32. McDermott SP, Wicha MS: Targeting breast cancer stem cells. *Mol Oncol* 2010, 4:404-419.
 33. Abraham BK FP, McClellan M, Hauptvogel P, Athelougou M, Brauch H: Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res* 2005, 11:1154-1159.
 34. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:3983-3988.
 35. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, et al.: ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007, 1:555-567.
 36. Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, Hoey T, Sherlock G, Lewicki J, Shedden K, Clarke MF: The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med* 2007, 356:217-226.
 37. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R, Jr., Badve S, Nakshatri H: CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 2006, 8:R59.
 38. Epitelyal Mezenkimal Geçişin ve kök hücrelerinin meme kanserinin oluşumundaki rolü. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Mayıs 2016.
 39. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, et al.: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008, 133:704-715.
 40. Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, Hartwell K, Onder TT, Gupta PB, Evans KW, et al.: Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107:15449-15454.

41. Wnt/ β -katenin yolağında aktif ara moleküller. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Mayıs 2016.
42. van Amerongen R, Nusse R: Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 2009, 136:3205-3214.
43. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT: A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 2003, 5:367-377.
44. Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT: The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 2000, 16:279-283.
45. Kikuchi A, Yamamoto H: Tumor formation due to abnormalities in the beta-catenin-independent pathway of Wnt signaling. *Cancer Sci* 2008, 99:202-208.
46. Lustig B, Behrens J: The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003, 129:199-221.
47. Kaldis P, Pagano M: Wnt Signaling in Mitosis. *Developmental Cell* 2009, 17:749-750.
48. Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ: Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 2005, 123:889-901.
49. Lustig B, Behrens J: The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2003, 129:199-221.
50. Hu J, Dong AW, Fernandez-Ruiz V, Shan JJ, Kawa M, Martinez-Anso E, Prieto J, Qian C: Blockade of Wnt Signaling Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 2009, 69:6951-6959.
51. Nusse R, Varmus HE: Wnt Genes. *Cell* 1992, 69:1073-1087.
52. Lorenowicz MJ, Korswagen HC: Sailing with the Wnt: Charting the Wnt processing and secretion route. *Experimental Cell Research* 2009, 315:2683-2689.
53. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu CM, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X: LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 2000, 407:530-535.
54. Cadigan KM, Liu YI: Wnt signaling: complexity at the surface. *Journal of Cell Science* 2006, 119:395-402.
55. Ching W, Nusse R: A dedicated Wnt secretion factor. *Cell* 2006, 125:432-433.
56. Nusse R, Varmus HE: Many Tumors Induced by the Mouse Mammary-Tumor Virus Contain a Provirus Integrated in the Same Region of the Host Genome. *Cell* 1982, 31:99-109.
57. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackelford G, McMahon A, Moon R, Varmus H: A New Nomenclature for Int-1 and Related Genes - the Wnt Gene Family. *Cell* 1991, 64:231-231.
58. Adell T, Thakur AN, Muller WEG: Isolation and characterization of Wnt pathway-related genes from Porifera. *Cell Biology International* 2007, 31:939-949.
59. Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hroudá M, Lentfer J, Schmidt HA, Technau U, von Haeseler A, Hobmayer B, Martindale MQ, et al.: Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 2005, 433:156-160.
60. Li JM, Nam KH: Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* 2002, 295:1299-1301.
61. Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong FX, Chory J: Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2005, 21:177-201.
62. Salinas PC: Wnt factors in axonal remodelling and synaptogenesis. *Biochem Soc Symp* 1999, 65:101-109.
63. Patapoutian A, Reichardt LF: Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Current Opinion in Neurobiology* 2000, 10:392-399.
64. Brennan KR, Brown AMC: Wnt proteins in mammary development and cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2004, 9:119-131.
65. Miller JR: The Wnts. *Genome Biol* 2002, 3:REVIEWS3001.

66. Cadigan KM, Nusse R: Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997, 11:3286-3305.
67. Henkemeyer MJ, Gertler FB, Goodman W, Hoffmann FM: The Drosophila Abelson proto-oncogene homolog: identification of mutant alleles that have pleiotropic effects late in development. *Cell* 1987, 51:821-828.
68. Polakis P: Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000, 14:1837-1851.
69. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang YS, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R: A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996, 382:225-230.
70. Gordon MD, Nusse R: Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006, 281:22429-22433.
71. Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH, Wainwright BJ: Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Development* 1996, 122:3343-3353.
72. Wieczorek M, Paczkowska A, Guzenda P, Majorek M, Bednarek AK, Lamparska-Przybysz M: Silencing of Wnt-1 by siRNA induces apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2008, 7:268-274.
73. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R: The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 1987, 50:649-657.
74. He B, You L, Uematsu K, Xu Z, Lee AY, Matsangou M, McCormick F, Jablons DM: A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. *Neoplasia* 2004, 6:7-14.
75. Veeck J, Niederacher D, An H, Klopocki E, Wiesmann F, Betz B, Galm O, Camara O, Durst M, Kristiansen G, et al.: Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene* 2006, 25:3479-3488.
76. Chim CS, Pang R, Fung TK, Choi CL, Liang R: Epigenetic dysregulation of Wnt signaling pathway in multiple myeloma. *Leukemia* 2007, 21:2527-2536.
77. Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, Kristiansen G, Hsieh JC, Hofstaedter F, Hartmann A, et al.: WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol* 2003, 201:204-212.
78. Malinauskas T: Docking of fatty acids into the WIF domain of the human Wnt inhibitory factor-1. *Lipids* 2008, 43:227-230.
79. Alexis F, Rhee JW, Richie JP, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC: New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol Oncol* 2008, 26:74-85.
80. Ferrari M: Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 2005, 5:161-171.
81. Whitesides GM: The 'right' size in nanobiotechnology. *Nat Biotechnol* 2003, 21:1161-1165.
82. LaVan DA, McGuire T, Langer R: Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nat Biotechnol* 2003, 21:1184-1191.
83. Farokhzad OC, Karp JM, Langer R: Nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer targeting. *Expert Opin Drug Deliv* 2006, 3:311-324.
84. Sapro P, Tyagi P, Allen TM: Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. *Curr Drug Deliv* 2005, 2:369-381.
85. Li KC, Pandit SD, Guccione S, Bednarski MD: Molecular imaging applications in nanomedicine. *Biomed Microdevices* 2004, 6:113-116.
86. Igaru A, Masamed R, Keesara S, Conti PS: Breast MRI and 18F FDG PET/CT in the management of breast cancer. *Ann Nucl Med* 2007, 21:33-38.

87. A. K: Molecular imaging of cancer using PET and SPECT. *Adv Exp Med Biol* 2006, 587:277–284
88. Montet X, Montet-Abou K, Reynolds F, Weissleder R, Josephson L: Nanoparticle imaging of integrins on tumor cells. *Neoplasia* 2006, 8:214-222.
89. Gambhir SS: Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:683-693.
90. Schambony A, Kunz M, Gradl D: Cross-regulation of Wnt signaling and cell adhesion. *Differentiation* 2004, 72:307-318.
91. Atri M: New technologies and directed agents for applications of cancer imaging. *J Clin Oncol* 2006, 24:3299-3308.
92. Wang X, Yang L, Chen ZG, Shin DM: Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA Cancer J Clin* 2008, 58:97-110.
93. Bae Y, Jang WD, Nishiyama N, Fukushima S, Kataoka K: Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Mol Biosyst* 2005, 1:242-250.
94. Nasongkla N, Bey E, Ren J, Ai H, Khemtong C, Guthi JS, Chin SF, Sherry AD, Boothman DA, Gao J: Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. *Nano Lett* 2006, 6:2427-2430.
95. Torchilin VP: Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4:145-160.
96. Green MR, Manikhas GM, Orlov S, Afanasyev B, Makhson AM, Bhar P, Hawkins MJ: Abraxane, a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2006, 17:1263-1268.
97. Ellerhorst JA, Bedikian A, Ring S, Buzaid AC, Eton O, Legha SS: Phase II trial of doxil for patients with metastatic melanoma refractory to frontline therapy. *Oncol Rep* 1999, 6:1097-1099.
98. Fassas A, Anagnostopoulos A: The use of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2005, 46:795-802.
99. Wang YX, Hussain SM, Krestin GP: Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol* 2001, 11:2319-2331.
100. El-Ansary A, Al-Daihan S: On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: an overview. *J Toxicol* 2009, 2009:754810.
101. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD: Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 2005, 1:325-327.
102. Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM: Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60:1307-1315.
103. Pissuwan D, Niidome T, Cortie MB: The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *J Control Release* 2011, 149:65-71.
104. Daniel MC, Astruc D: Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev* 2004, 104:293-346.
105. Tan G, Onur MA, Saglam N: Utilization of gold nanostructures in biomedical applications. *Turkish Journal of Biology* 2012, 36:607-621.
106. Tan G, Onur MA, Saglam N: Nano Gold and Biomedicine: Scientific Letter. *Turkiye Klinikleri Tip Bilimleri Dergisi* 2012, 32:499-506.
107. Delehanty JB, Boeneman K, Bradburne CE, Robertson K, Bongard JE, Medintz IL: Peptides for specific intracellular delivery and targeting of nanoparticles: implications for developing nanoparticle-mediated drug delivery. *Ther Deliv* 2010, 1:411-433.

108. Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA: Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chem Int Ed Engl* 2010, 49:3280-3294.
109. Petros RA, DeSimone JM: Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 2010, 9:615-627.
110. Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R: Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett* 2010, 10:3223-3230.
111. Mathias Brust MW, Donald Bethell, David J. Schiffrin and Robin Whyman Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System *J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN.*, Published on 01 January 1994. Downloaded on 15/02/2016 09:06:29. .
112. Mandal SS, P.R.; Phadtare, S.; Pasricha, R.; Sastry, M.: Synthesis of a stable gold hydrosol by the reduction of chloroaurate ions by the amino acid, aspartic acid. *Proc. Indian Acad. Sci. Chem. Sci* 2002, 114, 513–520
113. Bhattacharya S, Srivastava A: Synthesis of gold nanoparticles stabilised by metal-chelator and the controlled formation of close-packed aggregates by them. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences* 2003, 115:613-619.
114. Hung LL, A.P: Microfluidic devices for the synthesis of nanoparticles and biomaterials. *J. Med. Biol. Eng* 2007, 27, 1–6
115. Akbarzadeh AZ, D.; Farhangi, A.; Mehrabi, M.R.; Norouzi, D.; Tangestaninejad, S.; Moghadam MB, N: Synthesis and characterization of gold nanoparticles by tryptophane. *Am. J. Appl. Sci* 2009, 6, 691–695.
116. Ramezani N, Ehsanfar Z, Shamsa F, Amin G, Shahverdi HR, Esfahani HRM, Shamsaie A, Bazaz RD, Shahverdi AR: Screening of medicinal plant methanol extracts for the synthesis of gold nanoparticles by their reducing potential. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-a Journal of Chemical Sciences* 2008, 63:903-908.
117. Ravindra P: Protein-mediated synthesis of gold nanoparticles. *Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials* 2009, 163:93-98.
118. Hu MH, Qian LP, Brinas RP, Lyman ES, Kuznetsova L, Hainfeld JF: Gold nanoparticle-protein arrays improve resolution for cryo-electron microscopy. *Journal of Structural Biology* 2008, 161:83-91.
119. Huang YZ, Yu FQ, Park YS, Wang JX, Shin MC, Chung HS, Yang VC: Co-administration of protein drugs with gold nanoparticles to enable percutaneous delivery. *Biomaterials* 2010, 31:9086-9091.
120. Lipka J, Semmler-Behnke M, Sperling RA, Wenk A, Takenaka S, Schleh C, Kissel T, Parak WJ, Kreyline WG: Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials* 2010, 31:6574-6581.
121. Cho WS, Cho M, Jeong J, Choi M, Han BS, Shin HS, Hong J, Chung BH, Jeong J, Cho MH: Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010, 245:116-123.
122. Takae S, Akiyama Y, Otsuka H, Nakamura T, Nagasaki Y, Kataoka K: Ligand density effect on biorecognition by PEGylated gold nanoparticles: Regulated interaction of RCA(120) lectin with lactose installed to the distal end of tethered PEG strands on gold surface. *Biomacromolecules* 2005, 6:818-824.

123. Ishii T, Otsuka H, Kataoka K, Nagasaki Y: Preparation of functionally PEGylated gold nanoparticles with narrow distribution through autoreduction of auric cation by alpha-biotinyl-PEG-block-[poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate)]. *Langmuir* 2004, 20:561-564.
124. Khalil H, Mahajan D, Rafailovich M, Gelfer M, Pandya K: Synthesis of zerovalent nanophase metal particles stabilized with poly(ethylene glycol). *Langmuir* 2004, 20:6896-6903.
125. Lee SH, Bae KH, Kim SH, Lee KR, Park TG: Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers. *International Journal of Pharmaceutics* 2008, 364:94-101.
126. Wangoo N, Bhasin KK, Mehta SK, Suri CR: Synthesis and capping of water-dispersed gold nanoparticles by an amino acid: Bioconjugation and binding studies. *Journal of Colloid and Interface Science* 2008, 323:247-254.
127. Tkachenko AG, Xie H, Liu Y, Coleman D, Ryan J, Glomm WR, Shipton MK, Franzen S, Feldheim DL: Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjug Chem* 2004, 15:482-490.
128. Bastus NG, Sanchez-Tillo E, Pujals S, Farrera C, Kogan MJ, Giralt E, Celada A, Lloberas J, Puntès V: Peptides conjugated to gold nanoparticles induce macrophage activation. *Mol Immunol* 2009, 46:743-748.
129. Rayavarapu RG, Petersen W, Ungureanu C, Post JN, van Leeuwen TG, Manohar S: Synthesis and bioconjugation of gold nanoparticles as potential molecular probes for light-based imaging techniques. *Int J Biomed Imaging* 2007, 2007:29817.
130. Surujpaul PP, Gutierrez-Wing C, Ocampo-Garcia B, Ramirez Fde M, Arteaga de Murphy C, Pedraza-Lopez M, Camacho-Lopez MA, Ferro-Flores G: Gold nanoparticles conjugated to [Tyr3]octreotide peptide. *Biophys Chem* 2008, 138:83-90.
131. Javier DJ, Nitin N, Levy M, Ellington A, Richards-Kortum R: Aptamer-targeted gold nanoparticles as molecular-specific contrast agents for reflectance imaging. *Bioconjug Chem* 2008, 19:1309-1312.
132. Kim JH, Jang HH, Ryou SM, Kim S, Bae J, Lee K, Han MS: A functionalized gold nanoparticles-assisted universal carrier for antisense DNA. *Chem Commun (Camb)* 2010, 46:4151-4153.
133. Rink JS, McMahon KM, Chen XJ, Mirkin CA, Thaxton CS, Kaufman DB: Transfection of pancreatic islets using polyvalent DNA-functionalized gold nanoparticles. *Surgery* 2010, 148:335-345.
134. Giljohann DA, Seferos DS, Prigodich AE, Patel PC, Mirkin CA: Gene Regulation with Polyvalent siRNA-Nanoparticle Conjugates. *Journal of the American Chemical Society* 2009, 131:2072-+.
135. Liu Y, Liu Y, Mernaugh RL, Zeng XQ: Single chain fragment variable recombinant antibody functionalized gold nanoparticles for a highly sensitive colorimetric immunoassay. *Biosensors & Bioelectronics* 2009, 24:2853-2857.
136. Shen ZH, Yan HP, Zhang Y, Mernaugh RL, Zeng XQ: Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. *Analytical Chemistry* 2008, 80:1910-1917.
137. Sharma A, Matharu Z, Sumana G, Solanki PR, Kim CG, Malhotra BD: Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection. *Thin Solid Films* 2010, 519:1213-1218.
138. Waldner M, Schimanski CC, Neurath MF: Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells. *World J Gastroenterol* 2006, 12:7233-7238.
139. Wang S, Yang J, Qian J, Wezeman M, Kwak LW, Yi Q: Tumor evasion of the immune system: inhibiting p38 MAPK signaling restores the function of dendritic cells in multiple myeloma. *Blood* 2006, 107:2432-2439.

140. Idoba GV, Cheido MA, Devoino LV: [IgM and IgG rosette formation in the primary and secondary immune response in the system of syngeneic transfer of spleen cells]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1976:57-60.
141. Takahashi T, Old LJ, McIntire KR, Boyse EA: Immunoglobulin and other surface antigens of cells of the immune system. *J Exp Med* 1971, 134:815-832.
142. Geng SB, Cheung JK, Narasimhan C, Shameem M, Tessier PM: Improving monoclonal antibody selection and engineering using measurements of colloidal protein interactions. *J Pharm Sci* 2014, 103:3356-3363.
143. Antikorların (IgG) yapısı. <http://bitesized.immunology.org/> Mart 2016.
144. Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975, 256:495-497.
145. Binnig G, Rohrer H: Scanning Tunneling Microscopy. *Helvetica Physica Acta* 1982, 55:726-735.
146. Binnig G, Quate CF, Gerber C: Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 1986, 56:930-933.
147. Sivaraman SK, Kumar S, Santhanam V: Monodisperse sub-10 nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method - The role of chloroauric acid. *Journal of Colloid and Interface Science* 2011, 361:543-547.
148. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J: A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discussions of the Faraday Society* 1951:55-&.
149. Macdonald WE: More parts per million. *Science* 1972, 178:934.
150. Knarr R, Rappaport SM: Determination of methanethiol at parts-per-million air concentrations by gas chromatography. *Anal Chem* 1980, 52:733-736.
151. Clogston JD, Patri AK: Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol* 2011, 697:63-70.
152. Losurdo M, Wu PC, Kim TH, Bruno G, Brown AS: Cysteamine-based functionalization of InAs surfaces: revealing the critical role of oxide interactions in biasing attachment. *Langmuir* 2012, 28:1235-1245.
153. Vrana NE, Builles N, Kocak H, Gulay P, Justin V, Malbouyres A, Ruggiero F, Damour O, Hasirci V: EDC/NHS cross-linked collagen foams as scaffolds for artificial corneal stroma. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 2007, 18:1527-1545.
154. Arya G, Vandana M, Acharya S, Sahoo SK: Enhanced antiproliferative activity of Herceptin (HER2)-conjugated gemcitabine-loaded chitosan nanoparticle in pancreatic cancer therapy. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 2011, 7:859-870.
155. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC: Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* 2006, 6:662-668.
156. Mosmann T: Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 1983, 65:55-63.
157. Bilimsel Çalışmalarda P-Değerinin Rapor Edilmesi *TARIM BİLİMLERİ DERGİSİ* 2005, 11 (4) 359-363 Mehmet MENDEŞ, Serkan SUBAŞI, Ensar BAŞPINAR.
158. Jain S1 HD, O'Sullivan JM.: Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br J Radiol* 2012 Feb.
159. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A: Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B* 2006, 110:15700-15707.
160. Burda C, Chen XB, Narayanan R, El-Sayed MA: Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Reviews* 2005, 105:1025-1102.
161. Arvizo R, Bhattacharya R, Mukherjee P: Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2010, 7:753-763.
162. Jain S, Hirst DG, O'Sullivan JM: Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *British Journal of Radiology* 2012, 85:101-113.

Özgeçmiş

Adı Soyadı : Mehdi Tayybi Azar

Doğum Yeri : İran Oroumieh

Medeni Hali : Evli

E-posta : tayybiazar@gmail.com

Adresi : beştepe meriç sokak yenimahalle

Eğitim

Lise : Dehkhoda

Lisans : --

Yüksek Lisans : Azad university of urmia

Doktora : Hacettepe university

Yabancı Dil ve Düzeyi İngilizce iyi

İş Deneyimi --

Deneyim Alanları --

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi --

Tezden Üretilmiş Yayınlar --

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar--