

Kanser Öntanısı için Hücre dışı Veziküller Kullanılarak Plazmonik Temelli Metodoloji Geliştirme

Extracellular Vesicle Capture Assay by Plasmonic Methodology for Cancer Early Detection

Duygu Erdoğan¹, Yeşim Alduran², Ümit Hakan Yıldız², Ahu Arslan Yıldız¹

¹ Biyomühendislik Bölümü, ² Kimya Bölümü, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye
{duyguerdogan, hakanyildiz, ahuarslan}@iyte.edu.tr

Özetçe— Son yıllarda, vücut sıvılarında bulunan hücre dışı veziküller kanserde tanı biyobelirteci olarak kullanılmaktadır. Veziküllerin içeriği kanserin türünü ve seviyesini belirlemede rol oynayabilmektedir. Bu vezikülleri yakalama işlemi, genel olarak, Akış Sitometrisi (Flow cytometry), Western Blot, Enzime-bağlı İmmunosorbent Deneyi (ELISA) ve Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR) metodolojileri kullanılmaktadır. Bu çalışmada vezikülleri yakalamaya yönelik plazmon temelli bir deney platformu üretilmesi önerilmiştir. Bu plazmonik platform, yüzeyde yapılacak modifikasyonlarla, yüksek hassasiyet oluşturabileceğimiz Lokalize Yüzey Plazmon Rezonansı temellidir.

Anahtar Kelimeler — altın nanoparçacık, nanoplazmonik biyosensör, hücre dışı veziküller.

Abstract— Extracellular vesicles in the body fluids recently has been used as a diagnostic biomarker in cancer. The contain of vesicles can play a role to determine the type and level of a cancer. In general, Flow Cytometry, Western Blot, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve Surface Plasmon Resonance (SPR) methodologies have been used to capture the vesicles. In these project, an experimental platform based on plasmon will be tried to produce to capture the vesicles. This plasmonic platform is based on Localized Surface Plasmon Resonance, where can produce high sensitivity with modifications on the surface.

Keywords — gold nanoparticle, nanoplasmonic biosensor, extracellular vesicles.

I. GİRİŞ

Kanser ölümle sonuçlanan hastalıkların en başında yer almaktadır. Kanser erken teşhisi ve tedavisi, kanser ölümlerini azaltabilmektedir[1]. Bu da kanserde ön tanının önemini birkez daha göstermektedir. Bu amaç

doğrultusunda, son zamanlarda, hücre dışı veziküllerin yakalanmasına dayalı metodolojiler geliştirilmeye başlanmıştır.

Hücre dışı veziküller, küçük hücre parçacıklarıdır ve ayrıldıkları hücrelerle benzer kompozisyonlara sahiptirler. Bu veziküller ayrılma mekanizmalarına ve boyutlarına göre temel olarak apoptotik badiler (50 - 500 nm), ekzozomlar (50 - 100 nm) ve mikroveziküller (MVs) (100 - 1000 nm) olarak sınıflandırılırlar[2]. Veziküller ayrıldıkları hücrelerin protein ve lipid yapısını ve genetik bilgilerini taşımanın yanı sıra hücreler arasındaki iletişimde de rol oynamaktadır. Kan, idrar gibi çoğu vücut sıvısında bulunabilen bu veziküllerin, kanser gibi çeşitli hastalıkların türünü ve seviyesini belirlemede biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörülmektedir[3].

Western Blot, ELISA gibi geleneksel metotlar düşük konsantrasyonlardaki veziküllerin tayininde çoğunlukla kullanışlı değildir[4]. Diğer bir taraftan, Yüzey Plazmon Rezonans (SPR), klinik analizlerde uygun ve güvenilir bir platform olarak son yirmi yıldır ortaya çıkan, biyomoleküler etkileşimler için bir algılama yöntemidir. Bu biyoalgılama tekniği, biyomoleküllerin bağlanma afinitesini gösteren en güçlü yaklaşımlardan biri olarak görülmektedir[5]. Bu optik teknik, ince metal (altın, gümüş, alüminyum filmler vs.) katmanların kırılma indeksi değişikliklerini ölçmektedir[5, 6]. SPR'nin, hassasiyeti, taşınabilirliği, örnek sarfiyatını önlemesi ve çoklamalı saptama yeteneği sayesinde biyobelirteç tanısında yararlı olduğu kanıtlanmıştır[5].

Kullanılacak olan Lokalize Yüzey Plazmon Rezonansı (LSPR), SPR'nin farklı bir modu olup, yüzeydeki hassasiyeti arttırmak için metal nanoparçacıklar kullanılmaktadır. Metalin boyutu, arasındaki uzaklığı gibi

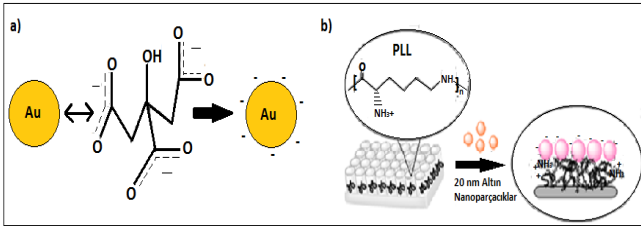
özelliklerinin ve dielektrik çevrenin değiştirilmesi ile sistemin ölçüm aralığı değiştirilebilmektedir[7, 8].

Bu çalışmada, duyarlılığı yüksek LSPR deney platformu oluşturularak, biyomimetik bir yapı olarak üretilecek olan mikroveziküller, üzerinde bulunan kanser biyobelirteçleri sayesinde yakalanacaktır. Metodolojinin kanser erken teşhisinde kullanılıp, kullanılmayacağına gerçek kanser biyobelirteçlerinin kullanılmasıyla yanıt aranacaktır.

II. BULGULAR

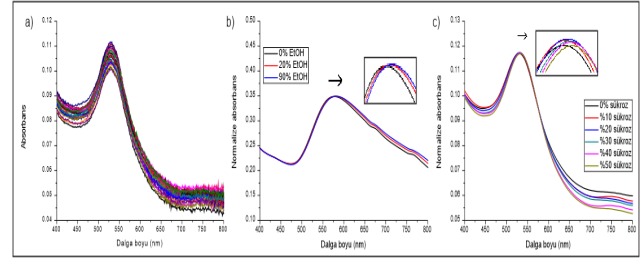
Deney platformu, -COOH ve -OH grupları ile fonksiyonlanmış polysitiren yüzeyine Au nanoparçacıkları (Au NP) poly-L-lysine (PLL) sayesinde tutturulması ile hazırlanmış ve validasyonu, MQ su dışında, sükröz ve etanol ile yapılmıştır.

Türkevic Metodu[9] ile üretilen yaklaşık 22 nm olan altın nanoparçacıkları (Au NP), -NH₂ grubu içeren (katyonik) PLL çözeltisi ile polistiren yüzeye immobilize edilmiştir (Şekil 1). Sentezlenen Au nanoparçacıkların boyut dağılımı Malvern Zetasizer ile ve optik ölçümleri de mikroplaka spektrofotometre (Thermo, Multiskan Go) ile (max dalga boyu: 523±1nm) yapılarak karakterize edilmiştir.



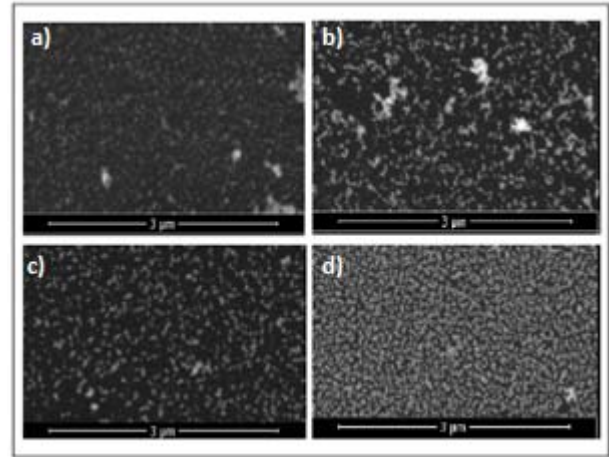
Şekil 1. a) Sitrat molekülleri ile stabilize olan Au nanoparçacıkları b) Poly-L-Lysine (PLL) yardımı ile Au Nanoparçacıkların yüzeye immobilizasyonu

Yüzeyde immobilize edilen Au nanoparçacıkların Milli Q su ortamındaki absorpsiyon spektrasi Şekil 2a'da gösterilmektedir (max dalga boyu: 530±1 nm). Deney düzeneğinin validasyonu ise etanol-su ve sükröz-su ortamlarında yapılmıştır (Fig. 2b,c). Farklı solüsyonlara farklı cevap alınabildiği ve aynı solüsyonun farklı konsantrasyonlarını ayırt edebildiği bir deney platformu geliştirilmiştir.



Şekil 2. Yüze immobilize edilmiş Au nanoparçacıkların a) su ortamındaki absorpsiyon spektrasi ($\lambda_{max}=530\pm 1$ nm) b) etanol-su ortamındaki absorpsiyon spektrasi (0, 20, 90 % v/v) c) sükröz-su ortamındaki absorpsiyon spektrasi (0-50% w/w)

Şekil 3, cam yüzeydeki Au nanoparçacıkların konsantrasyona bağlı bağlanma profilini gösteren Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM, FEI QUANTA 250 FEG) imajlarıdır.



Şekil 3. Altın nanoparçacıkların konsantrasyona bağlı cam yüzeye bağlanma profilinin SEM imajları

Yapılan çalışmalar sonucunda, üretilen LSPR deney platformunun kırılma indeks değişimlerine cevap verebildiği sonucuna varılmıştır..

III. SONUÇ & İLERİ ÇALIŞMALAR

Biyobelirteçleri yüksek hassasiyette tayin edebileceğimiz LSPR deney platformu geliştirilmiştir ve bu platformun hücre dışı vezikül tayininde kullanılabileceği ortaya çıkmıştır.

Bir sonraki aşamada, metodolojinin kanser öntanısı için kullanılıp, kullanılmayacağına yanıt aranacaktır.

IV. TEŞEKKÜR

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü'ne ve Malzeme Araştırma Merkezi'ne analizlerimize yardımcı oldukları için teşekkür ederiz. Bu

proje İYTE Bilimsel Araştırma Proje Fonu (İYTE BAP 2015-05) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] W. H. Organization, "Cancer (2013)," cited 2013-10-30. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en>, 2014.
- [2] B. György, T. G. Szabó, M. Pásztói, Z. Pál, P. Misják, B. Aradi, V. László, E. Pállinger, E. Pap, and A. Kittel, "Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles," *Cellular and molecular life sciences*, vol. 68, no. 16, pp. 2667-2688, 2011.
- [3] L. Grasso, R. Wyss, L. Weidenauer, A. Thampi, D. Demurtas, M. Prudent, N. Lion, and H. Vogel, "Molecular screening of cancer-derived exosomes by surface plasmon resonance spectroscopy," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 407, no. 18, pp. 5425-5432, 2015.
- [4] H. Im, H. Shao, Y. I. Park, V. M. Peterson, C. M. Castro, R. Weissleder, and H. Lee, "Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor," *Nature biotechnology*, vol. 32, no. 5, pp. 490, 2014.
- [5] H. H. Nguyen, J. Park, S. Kang, and M. Kim, "Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications," *Sensors*, vol. 15, no. 5, pp. 10481-10510, 2015.
- [6] Y. Yanase, T. Hiragun, K. Ishii, T. Kawaguchi, T. Yanase, M. Kawai, K. Sakamoto, and M. Hide, "Surface plasmon resonance for cell-based clinical diagnosis," *Sensors*, vol. 14, no. 3, pp. 4948-4959, 2014.
- [7] E. Petryayeva, and U. J. Krull, "Localized surface plasmon resonance: nanostructures, bioassays and biosensing—a review," *Analytica chimica acta*, vol. 706, no. 1, pp. 8-24, 2011.
- [8] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, and G. C. Schatz, "The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, no. 3, pp. 668-677, 2003.
- [9] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold," *Discussions of the Faraday Society*, vol. 11, pp. 55-75, 1951.