

## Araştırma Makalesi

Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg 2019;12(2):328-340

doi: 10.26559/mersinsbd.594531

### Modifiye altın nanoparçacıkların fare hipokampal kesitlerindeki nöronal fonksiyonlar üzerine etkileri

**Bilge Guvenc Tuna<sup>1</sup>, Yavuz Yavuz<sup>2</sup>, Gamze Kuku<sup>3</sup>, Akif Maharramov<sup>4</sup>, Bayram Yılmaz<sup>5</sup>, Melike Saricam<sup>6</sup>, Merve Ercan<sup>7</sup>, Mustafa Culha<sup>8</sup>, Soner Dogan<sup>9</sup>**

<sup>1</sup>Dr. Ogrt. Uyesi, Yeditepe Üniversitesi, Biyofizik Anabilim Dalı

<sup>2</sup>MSc., Yeditepe Üniversitesi, Biyofizik Anabilim Dalı

<sup>3</sup>Dr., Yeditepe Üniversitesi, Genetik Mühendisliği Bölümü

<sup>4</sup>Dr. Ogrt. Uyesi, Yeditepe Üniversitesi, Biyofizik Anabilim Dalı

<sup>5</sup>Prof. Dr. Yeditepe Üniversitesi, Fizyoloji Anabilim Dalı

<sup>6</sup>Dr., Yeditepe Üniversitesi, Genetik Mühendisliği Bölümü

<sup>7</sup>MSc., Yeditepe Üniversitesi, Genetik Mühendisliği Bölümü

<sup>8</sup>Prof. Dr. Yeditepe Üniversitesi, Genetik Mühendisliği Bölümü,

<sup>9</sup>Doc. Dr., Yeditepe Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

#### Öz

**Amaç:** Altın nanoparçacık (AuNP) modifikasyonlarının sinir sistemi fonksiyonunu nasıl etkileyebileceği tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada, AuNP'lerin glikoz (GlikozAuNP), oligonükleotid (15 baz, d(A)15AuNP) veya peptid (negatif amino asit içeren, AspAuNP) ile işlevselleştirilmiş formlarının fare hipokampal nöronları üzerindeki biyoelektriksel etkisinin *ex vivo* olarak araştırılması amaçlanmıştır. **Yöntem:** AuNP modifikasyonları UV/Vis spektroskopisi, Dinamik Işık Saçılması (DLS) ve Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) ile karakterize edildi ve *ex vivo* olarak 4-6 haftalık Balb-c erkek farelerin beyin hipokampus bölgelerinden alınan kesitlere eklendi, spontan ve uyarılmış aksiyon potansiyelleri (AP) yama kısıncı, tüm hücre tekniği ile kaydedildi. Spontan AP'lerinin en büyük genlik değeri, yükselen eğimi, yarı genişliği, iki pik arasında geçen süre ve ateşleme hızı analiz edildi. **Bulgular:** Karakterizasyon sonuçları AuNP'lerin yüzey modifikasyonlarının 5-7 nm çapında ve koloidal olduğunu gösterdi. Spontan AP'lerin ateşleme hızı GlikozAuNP (n=9) grubunda, kontrol (n=9), AspAuNP (n=6) ve d(A)15AuNP (n=9) eklenen gruplara göre en fazla olarak ölçüldü (sırasıyla 10.1±5.5 4.4±3.2 9.5±3.8 ve 6.2±3.0 pik/s, p>0.05).

**Yazının geliş tarihi:**22.07.2019

**Yazının kabul tarihi:**09.08.2019

**Sorumlu yazar:** Bilge Guvenc Tuna, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı İnönü Mah. Kayışdağı Cad. 26 Ağustos Yerleşimi, Atasehir, 34755, İstanbul, Türkiye, Tlf: 02165780000-2600, bilge.tuna@yeditepe.edu.tr/bilgeguv@gmail.com,

**Not:** Bu çalışma TUBITAK (215S052) tarafından desteklenmiştir. Yazarlar, TUBITAK'a katkılarından dolayı teşekkür eder.

Ek olarak, uyarılmış AP'lerin özelliklerini yansıtan akım voltaj (I-V) analizinde, GlikozAuNp (n=8) gurubunun akım uyarılarına ((-150)-(+150 pA)) cevaben oluşturdukları membran potansiyelleri kontrol (n=8) ve d(A)15AuNP (n=9) gruplarının cevabına göre negatif akım bölgesinde negatife, pozitif akım uyarısı bölgesinde pozitif kaydı. **Sonuç:** Medikal uygulamalarda kullanılacak AuNP'lerin yüzey modifikasyonlarının hipokampal nöronların AP'lerinin ateşleme hızını arttırarak, patolojik koşulları tetikleyebilecekleri ve daha biyouyumlu formların belirlenmesi gerektiği önerilebilir.

**Anahtar kelimeler:** Altın nanoparçacıklar, aksiyon potansiyeli, yüzey modifikasyonları

## The effect of modified gold nanoparticles on the function of neurons of mice hippocampal brain slices

### Abstract

**Aim:** It is still unclear whether modifications of gold nanoparticles (AuNp) affect the function of the nervous system. Aim of this study was to investigate the bioelectrical effect of glucose (GlucoseAuNp), oligonükleotide (d(A)15AuNP) or peptide (AspAuNp) modified AuNp, on hippocampal mouse neurons after ex vivo administration. **Methods:** AuNP modifications were characterized by UV/Vis spectroscopy, Dynamic Light Scattering (DLS) and Transmission Electron Microscopy (TEM). Subsequently, AuNP modifications were added ex vivo to sections of hippocampal regions obtained from the brains of 4-6 week old male Balb-c mice, and then spontaneous and stimulated action potentials (AP) were recorded by patch clamp with whole-cell technique. The Peak amplitude, rising slope, half width and firing rate of Aps were analyzed. **Results:** Characterization results showed that AuNp modifications have 5-7 nm size and colloidal shape. The firing rate of the APs measured in the GlucoseAuNp (n=9) group was higher compared to the AspAuNp (n=7), d(A)15AuNP (n=9), and control (n=9) groups (respectively  $10.1 \pm 5.5$ ,  $9.5 \pm 3.8$ ,  $6.2 \pm 3.0$  pic/s, and  $4.4 \pm 3.2$ , pic/s,  $p > 0.05$ ). In addition, current voltage (I-V) analysis showed that the membrane potential in response to current stimuli ((-150)-(150 pA)) of the GlucoseAuNp (n=8) shifted negative for negative current stimulations and positive for positive current stimulations compared to the control (n=8) and d(A)15AuNP (n=9) groups. **Conclusion:** The surface AuNp modifications will be used in medical applications might increase the firing rate of Aps and stimulate neurological pathologies in hippocampal neurons and it may be suggested that more biocompatible AuNp forms should be identified.

**Keywords:** Gold nanoparticles, Action potential, Surface modifications

### Giriş

Altın nanoparçacıklar (AuNP) toksik özelliklerinin az oluşu, yük ve hidrofilik/hidrofobik gibi yüzey özelliklerinin tek katmanda değiştirilebilir olması, kolaylıkla biyokompleks yapılar oluşturabilmesi nedeniyle son yıllarda tıp alanında öne çıkan nano malzemelerdendir. Son derece farklı kümeleşme davranışları, kolay optik, elektronik ve biyouyumluluk gibi özellikleri nedeniyle biyosensör uygulamaları, dokulara ilaç ve gen taşınması,<sup>1</sup> bilgisayarlı tomografi görüntüleme kontrast ajanı olarak

kullanılması<sup>2</sup> ve kanser tedavilerinin geliştirilmesi (fototermal terapi) gibi birçok alanda geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir.<sup>3</sup> Ayrıca nöron davranışının ve hücre farklılaşmasının manipülasyonu için yeni ve etkili bir araç olarak önerilmektedirler.<sup>4</sup> Ancak, yakın zamanda gümüş, çinko oksit ve altın gibi nanoparçacıkların nöronlarda sinyal iletimini ve aksiyon potansiyeli (AP) özelliklerini değiştirdiği gösterilmiştir.<sup>5,6</sup> Bu

parçacıkların yüzey kimyalarını değiştirerek sinir iletimini ve AP'yi nasıl etkilediklerini belirlemek altın nanoparçacıklarının tıp alanında kullanılması açısından büyük önem teşkil etmektedir.

Literatürdeki, AuNP'lerin *in vitro* sitotoksitesiyle ilgili çalışmalar parçacıkların büyüklük, yük ve yüzey kimyalarına bağlı olarak toksik olmayabileceği konusunda ikna edicidir. AuNP'lerin büyüklüklerine (<50nm) bağlı olarak endositozisle hücrelere girebildiği gösterilmiştir.<sup>7</sup> Örneğin, Connor ve Schmid<sup>8</sup> 3 gün boyunca AuNP'ye (18 nm) maruz kalan insan lösemi hücreleri içerisine bu parçacıkların girdiğini ve hücrelerin canlılığının korunduğunu göstermiştir. AuNP'ler diğer ağır metal nano parçacıklara göre dokuya daha kolay nüfuz edebilmekte, immün sistemi daha az uyarmakta ve hücrede daha az toksik özellik göstermektedir.<sup>9,10</sup> Kan-beyin bariyerini geçerek beyine ulaşabildiklerinden nörolojik birçok hastalığın tedavisinde ve teşhisinde potansiyel taşıyıcılar olarak görülmektedirler.<sup>11,12,13</sup> Özellikle 12 nm'den küçük AuNP'ler hücre zarı, plasenta, kan-beyin ve kan-testis bariyeri gibi seçici geçirgen özellikteki yapıları rahatlıkla geçebilmektedir.<sup>11,12,14</sup> AuNP'lerin hücre düzeyinde toksikolojisiyle ilgili birçok çalışma bulunmasına ve kıyasla diğer ağır metallere göre daha az toksik oldukları bilinmesine rağmen nöronların hücre fonksiyonunun nasıl etkilediği ile ilgili çalışmalar literatürde çıplak AuNP'ler ile sınırlıdır.

AuNP'lerin yüzey özellikleri hücre içine geçebilme özelliklerini, kan dolaşımında kalma sürelerinin etkileyebilmekte, özellikli ligantları tanıyarak ilgili reseptörlere bağlanacak şekilde değiştirilebilmektedir. Zengin yüzey özelliklerinde farklı boyut ve şekillerde oluşturulabilen AuNP'ler farklı yöntemlerle hidrofilik (suyu seven) ve hidrofobik (suyu sevmeyen) karakterlerde oluşturulabilmekte ve iyon yükleri değiştirilebilmektedir.<sup>15</sup> Çeşitli yüzey aktif maddeler kullanılarak farklı yüzey fonksiyonelliğine sahip AuNP'ler sentezlenebilmekte AuNP'lerin toksisitesi

azaltılabilmektedir. Örneğin, katyonik nanoparçacıkların hücre zarı geçirgenliğini değiştirerek hücre içine daha fazla nüfuz edebildikleri gösterilmiştir.<sup>16</sup> Yüzeyine negatif yüklü karbonil grupları bağlı AuNP'lerin pozitif yüklü amin grupları bağlı olanlara göre daha az toksik olduğu gösterilmiştir.<sup>17</sup> Glikoz kaplı AuNP'ler (4nm) insan beyin endotelinden çıplak AuNP'lere göre daha hızlı geçebildikleri ve astrositlere yerleşebildikleri gözlenmiştir.<sup>18</sup> Bildiğimiz kadarıyla, literatürde AuNP'lerin yüzey kimyalarındaki değişimlerin nöronlarda oluşan AP özelliklerini nasıl etkilediği ile ilgili bir çalışma mevcut değildir. Ancak gümüş, silikon dioksit gibi nanoparçacıkların yüzey kimyalarının fonksiyonel toksisitelerinde farklılıklar olduğu gösterilmiştir.<sup>19</sup> Stampfl ve arkadaşları<sup>19</sup> silikon dioksit nanoparçacıklarının kalp atış hızını arttırdığını ve aritmi oluşturduğunu gözlerken, hidrofobik özellikli silikon dioksit nanoparçacıkların kalp atım hızında, aritmi oluşumunda ya da benzer her hangi bir kalp fonksiyonunda değişikliğe neden olmadıklarını göstermişlerdir.

Bu çalışmalardan yola çıkarak biyo-uygunluk ve yüklerinden dolayı sinir hücreleri üzerinde farklı biyolojik etkileri olabilecek glikoz, peptid (negatif aminoasit içeren) ve oligonükleotit (15 baz) ile modifiye edilen AuNP'lerin fare hipokampal beyin kesitlerine *ex vivo* olarak eklenmesiyle aksiyon potansiyellerinin özelliklerinde meydana gelen olası değişikliklerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

## Yöntem

### *AuNP'lerin glikoz, peptid ve oligonükleotid ile modifikasyonu*

Glikoz modifikasyonu için eppendorf tüp içinde 1 ml AuNP koloidine 100 mg/ml sıvı formdaki tiyollenmiş glikozdan 45 µL eklendi ve oda sıcaklığında gece boyu çalkalanarak karıştırıldı.

Oligonükleotid ve peptid ile modifikasyon için ise hızlı tuz yaşılandırma yöntemi (fast

salt-aging process) kullanıldı.<sup>22</sup> Tüm oligonükleotid (10 µM) ve oligopeptid (100 µM) modifikasyonları %0.01 SDS ve 0.01 M fosfat tamponu ile tuzun 3 seferde eklenmesiyle gerçekleştirildi ve sentez tamamlandı.

#### *Modifiye edilen AuNP'lerin karakterizasyonu*

Sentezlenen ve yüzeyleri modifiye edilen AuNP'lerin karakterizasyonunda bu çeşit modifikasyonların gösterilmesinde standart olarak kullanılmıģ olan UV/VIS spektrofotometrik ölçümleri, DLS ve zeta potansiyeli ölçümleri kullanıldı.<sup>11,23</sup> AuNP'lerin UV-Vis spektrumları (Lambda 25, Perkin Elmer) spektrofotometre cihazı kullanılarak elde edildi. Sentezlenmiş ve işlevselleştirilmiş olan AuNP'lerin hidrodinamik boyutları 25 °C'de örnekler ddH<sub>2</sub>O ile seyreltilerek DLS (Nanozetasizer, Malvern) ile belirlendi. Aynı cihazda zeta potansiyeli ölçümleri de gerçekleştirildi. TEM görüntülemeleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda yapıldı. Nanoparçacıkların ortalama çapları Image J (Fiji) programı kullanılarak ölçüldü.

#### *Fare beyin kesitlerinin hazırlanması*

Bu çalışma, Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı (15/06/2015, Karar No 474). Deneyler sırasında farelerin yaşamsal konforları hayvan haklarının (<http://www.nap.edu/catalog/5140.html>) prensipleri doğrultusunda korundu ve tüm etik kurallara uyuldu. Elektrofizyolojik kayıtlar 4-6 haftalık erkek farelerden (Balb-c) alındı. Etik kurul protokolüne ve literatüre<sup>5,6</sup> uygun olarak fareler solunum yolu ile verilen isoflurane anestezisi altında sersemletilerek giyotin ile dekapite edildi. Beyinleri 1 dakika içinde izole edilerek, vibratomla (Campden instrument 5100 MHz) yatay olarak hipokampusün bulunduğu bölgeyi içeren 250-300 mikrometrelik kesitler hazırlandı. Kesitler oksijenlenen (%95 O<sub>2</sub>, %5 CO<sub>2</sub>), 37° de yapay serebrospinal sıvı içinde 1 saat inkübe edildi. Daha sonra doku ve solüsyon mikroskop altındaki hazneye yerleştirildi. Haznedeki solüsyon 2mL/dakika hızla deney boyunca perfüze edildi. Yapay

serebrospinal sıvı (mM); 119 Sodyum klorür, 25 sodyum bikarbonat, 11 D(+) glikoz, 2.5 potasyum klorür, 1.25 magnezyum klorür, 2 kalsiyum klorür, 1.25 monobazik sodyum fosfat bileşenlerini içermekteydi.

#### *Spontan aksiyon potansiyellerinin kaydedilmesi*

Hücrede intrasellüler olarak oluşan spontan AP'ler yama kısıkcı yöntemiyle MultiClamp 700 B bilgisayar kontrollü mikroelektrot amplifikatörü (Axon Instruments, Inc, USA) kullanılarak kaydedildi. Kısaca, filamentli cam pipetler (borosilikat kapiler) mikroelektrot çekici (P-2000, Sutter Instruments, USA) ile çekildi, elektrotlar pipet solüsyonuyla doldurulduğunda pipet ucu direnci 3-5 MΩ'du. Pipet solüsyonu (mM); 125 Potasyum D Glukonat, 5 Na<sub>2</sub>-Fosfokreatin, 20 Potasyum Klorür, 5 Sodyum Klorür, 10<sup>-4</sup> EGTA, HEPES 99x10<sup>-3</sup> bileşenlerini içermekteydi. Daha sonra mikropipetlerin içerisi intrasellüler solüsyon çözeltisi ile doldurularak hücre membranında giga mühür pipet direnci oluşturuldu. Mikroskop altındaki haznede, hücreye mühürlenmiş bir pipet görüntüsü örnek olarak (Şekil 1A)'da sunulmuştur. Hücre membranının yırtılmasından sonra bütün hücre (whole cell) akım kısıkcı konfigürasyonunda kayıtlar alındı. Sinyal 1-2 kHz alçak geçiren filtre ile filtrelendi ve örnekleme hızı en az 10 kHz olarak ayarlandı. Kontrol gurubunda (n=9), tekrarlayan spontan AP'lerin oluşumu gözlenen hücreler seçilerek, spontan AP'ler kaydedildi (Şekil 1B). Deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi (21-24 °C). Hipokampal beyin kesitlerinin olduğu banyo konsantrasyonu 0.01 mM olacak şekilde, GlikozAuNP (n=9), peptid (AspAuNP) (n=7) ve ya oligonükleotit (d(A)<sub>15</sub>AuNP, n=9) modifiyeli AuNP'ler perfüzyon sıvısına eklendi. 0.01 mM'lik konsantrasyon AuNP'lerin elektrofizyolojik etkilerini gösteren Jung ve arkadaşlarının çalışmasına dayanarak belirlendi.<sup>5</sup> Kayıtlara modifiye parçacıklar banyoya eklendikten 5 dakika sonra başlandı ve en fazla 45. dakikaya kadar devam edildi. Kayıt sinyalleri Clampfit 7.0 yazılımı ile kaydedildi ve analiz edildi.

### Uyarılmış aksiyon potansiyellerinin kaydedilmesi

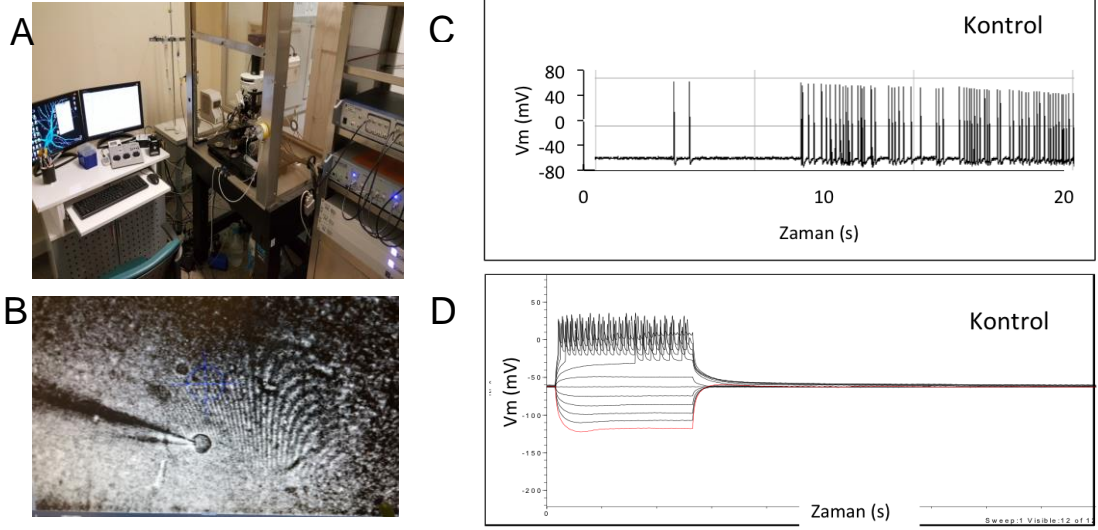
Spontan aktivite kayıtları için tarif edildiği şekilde hazırlanan beyin kesitlerinden bütün hücre, akım kısıkaçı konfigürasyonunda -150pA ve +150 pA arasında 50 pA'lık adım şeklinde değişimlerle 500ms süreli uyarılar verildi ve hücre potansiyelinde meydana gelen değişiklikler kontrol (n=8), GlikozAuNP (n=8) ve ya d(A)<sub>15</sub>AuNP (n=9) grupları için ölçüldü. Şekil 1C'de bu protokolden alınan bir kontrol kayıt örneği görülmektedir. Enjekte edilen uyarı akımı (I, pA) sonucunda kaydedilen membran potansiyeli değişimleri (voltaj cevapları V, mV) analiz edilerek gruplar karşılaştırıldı. Uyarı sonrası hücrede oluşan AP'ler akım-voltaj (I-V) grafikleri ile değerlendirildi.

### İstatistiksel analiz

Veriler aksi belirtilmedikçe ortalama değer  $\pm$  standart sapma olarak gösterildi. UV/VIS, DLS ve zeta potansiyel ölçümleri üçlü tekrarlar şeklinde yapıldı, standart sapmalar her bir değer için verildi. Çalışılan örnek sayılarını belirlemek için çalışma öncesinde güç 0.95, etki büyüklüğü 0.8 ve istatistiksel farklılık 0.05 olarak belirlenerek her grup için n=9 örnek sayısı hesaplandı (GPower 3.1).<sup>5</sup> Verilerin, Shapiro-Wilk testi ile normallik gösterip göstermediği kontrol edildi ve Levene testi ile varyans homojenliği kontrolü yapıldı. İstatistiksel farkı belirlemek için grupların homojenlik gösterdiği durumlarda tek yönlü varyans analizi ve Bonferroni posthoc analizi yapıldı. Grupların homojenlik göstermediği durumlarda non-parametrik testlerden Kruskal Wallis testi yapıldı ve gruplar arasındaki istatistiksel fark Dunn testi ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak belirlendi. n her bir gruptaki örnek sayısını belirtmektedir. İstatistiksel anlamlılık \* ile gösterildi.

**Tablo 1:** Çalışmada kullanılan biyolojik moleküler yapılar

Yüzey Molekülü	Kimyasal Yapı
Glikoz	
Tiyollenmiş oligonükleotid	HS-(AAAAA) <sub>3</sub>
Peptid (negatif yüklü a.a. den oluşan)	Cys-Asp-Asp-Glu-Glu



**Şekil 1 (A)** Yama kısıncı kayıt sisteminin genel görüntüsü. **(B)** Kayıt alınan nöronal hücrenin cam pipet ile mühürlenmiş mikroskop görüntüsü **(C)** Yama kısıncı yöntemi ile bütün hücre akım kısıncı tekniği konfigürasyonu kullanılarak kaydedilmiş örnek spontan aksiyon potansiyelleri. **(D)** Yama kısıncı yöntemi ile bütün hücre akım kısıncı tekniği konfigürasyonunda -150pA ve +150 pA arasında 50 pA'lık değişimlerle 500ms süreli uyarılara verilen yanıtlar için kontrol örneği.

## Bulgular

### Altın parçacıkların sentezi ve karakterizasyonu

UV/Vis spektrumlarına bakıldığında 5 nm AuNP için tepe noktası 516 nm literatür ile uyumluydu (24). GlikozAuNP, peptid (AspAuNP, 100  $\mu$ M) ve ya d(A)<sub>15</sub>AuNP (10  $\mu$ M) ile modifiye edilen AuNP'lerde ise bu gözlemlenen tepe noktasına (sırasıyla 530 nm, 513 nm, 520 nm) ek olarak daha yukarı dalga boyunda bir omuz oluşumuna da rastlandı (sırasıyla 568 nm ve 576 nm). Glikoz modifikasyonunda ise omuz oluşumu gözlemlenmemiştir. DLS analizlerinde GlikozAuNP 10.99 $\pm$ 0.75 nm, AspAuNP 5.73 $\pm$ 2.18 nm ve d(A)<sub>15</sub>AuNP 3.40 $\pm$ 1.90 nm olarak belirlendi. Zeta potansiyeli GlikozAuNP için -40 $\pm$ 3.25 mV, AspAuNP için -17.1 $\pm$ 1.43 mV ve d(A)<sub>15</sub>AuNP için -18.6 $\pm$ 4.48 mV olarak ölçüldü. TEM analizleri sonucu GlikozAuNP, AspAuNP ve d(A)<sub>15</sub>AuNP'lerin şekillerinde bir bozulma gözlemlenmedi (Şekil 2A-C). GlikozAuNP'lerin ortalama çapı 5.68 $\pm$ 0.87 nm (n=35),

AspAuNP'lerin ortalama çapı 5.70 $\pm$ 1.01 nm (n=36) ve d(A)<sub>15</sub>AuNP'lerin ortalama çapı 5.98 $\pm$ 0.93 nm (n=27) olarak ölçüldü. Tiyollenmiş glikoz ürünü FTIR ile karakterize edildi ve tiyollemeyi işaret eden pik (1653 cm<sup>-1</sup>) gözlemlendi (Şekil 3).

### Aksiyon potansiyellerinin özellikleri

AuNP'lerin fonksiyonel toksitesini belirlemek için 4-6 haftalık erkek farelerin beyin kesitleri hazırlanarak hipokampusun CA1 bölgesindeki nöronlardan spontan ve uyarılmış AP'leri kaydedildi. Spontan AP'lerin en büyük genlik değeri (peak amplitude), yükselen eğimi (rise slope), yarı genişliği (half width), iki pik arasında geçen süre ve ateşleme hızı gibi parametreler analiz edilerek deney grupları arasında karşılaştırılma yapıldı. Yüzey modifikasyonlarından GlikozAuNP ve d(A)<sub>15</sub>AuNP eklenen gruplarda, oluşan spontan AP'lerin genliği kontrol grubuna kıyasla %32 ve %33 azaldı, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi (p>0.05). AspAuNP eklenen grupta oluşan spontan AP'lerin genliği istatistiksel anlamlı olarak kontrol grubundan farklı değildi

(Tablo 2). Spontan AP'nin ateşleme hızında (saniyede oluşan spontan AP pik sayısı) GlikozAuNP ve AspAuNP guruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Tablo 2). Uygulanan guruplardan spontan AP'nin ateşleme hızını kontrol gurubuna göre en çok etkileyen ve artışa neden olan glikoz modifikasyonu (2.3 kat artış). Ayrıca, ateşleme hızıyla ilişkili olan iki pik arasında geçen süre istatistiksel anlamlı olarak GlikozAuNP gurubunda kontrol gurubuna göre daha azdı ( $p<0.05$ ) (Tablo 2). İki pik arasında geçen sürenin kısa olması, GlikozAuNP etkisi ile oluşan ateşleme hızının frekansındaki artış bulgusunu destekler nitelikteydi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, modifiye AuNP etkisiyle nöronlardan kaydedilen AP'nin yarı genişlik,

yükselen eğim ve alanında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

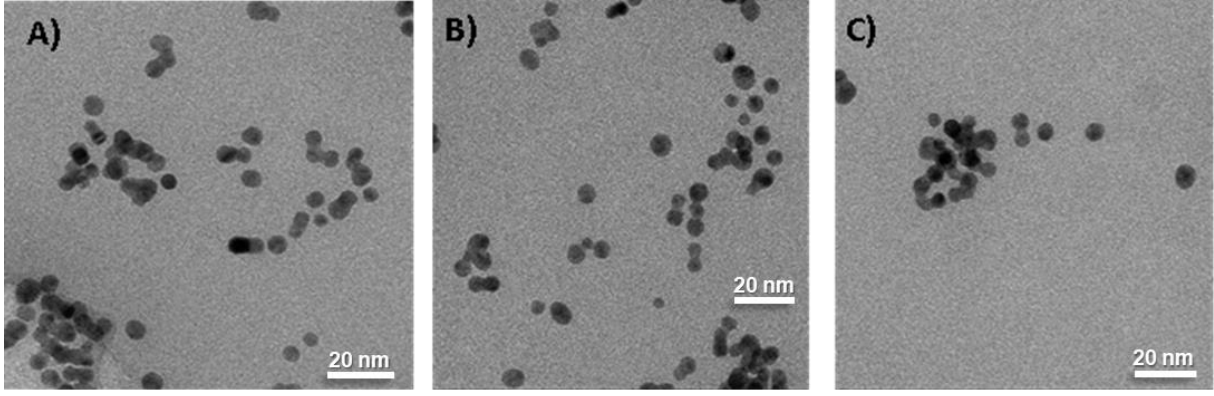
#### *Uyarılmış aksiyon potansiyellerinin özellikleri*

Negatif akımlar için hem GlikozAuNP modifikasyonu hem de  $d(A)_{15}AuNP$  modifikasyonu eklenen gurubunun I-V ilişkisi kontrol gurubu ile -150mV cevabı dışında benzerdi ( $p<0.05$ ) (Şekil 4). Ancak, pozitif akımlar için GlikozAuNP modifikasyonu eklenen gurubunun I-V ilişkisi  $d(A)_{15}AuNP$  modifikasyonu gurubuna göre istatistiksel anlamlı olarak pozitif değerlere kaydı, artış gözlenmesine rağmen kontrol gurubuna kıyasla istatistiksel anlamlı farklılık yoktu (Şekil 4).

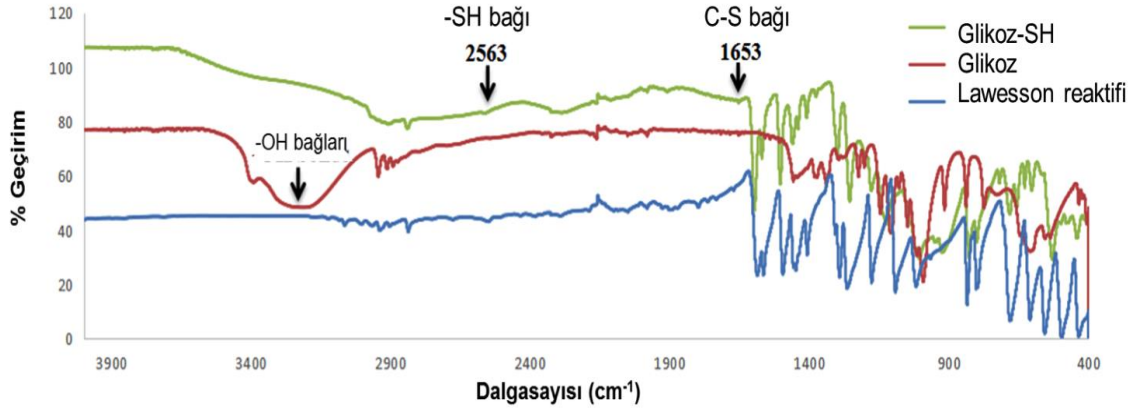
**Tablo 2.** Bütün hücre akım kenetleme tekniği kullanılarak kaydedilmiş spontan aksiyon potansiyellerinin özellikleri. Kontrol (n=9), GlikozAuNP (n=9), AspAuNP (n=7),  $d(A)_{15}AuNP$  (n=9). Veriler ortalama değer ve standart sapmayı temsil etmektedir. \* $p<0.05$ .

	Kontrol	GlikozAuNP	AuNPAsp	$d(A)_{15}AuNP$	
En Büyük Genlik (mV)	50,3±14,7	34,1±13,3	46,9±19,4	33,7±23,0	Tek yönlü varyans analizi, Bonferroni post hoc $p>0,05$
Yarı Genişlik (ms)	4,9±2,8	4,5±3,4	4,8±2,2	5,5±4,0	Tek yönlü varyans analizi, Bonferroni post hoc $p>0,05$
Yükselen Eğim (mV/ms)	10,9±9,4	3,8±6,7	9,7±7,1	2,7±5,3	Kruskal Wallis, $p>0,05$
Alan (mV · ms)	288,5±138,4	210,4±142,5	323,5±168,0	282,2±234,7	Tek yönlü varyans analizi, Bonferroni post hoc $p>0,05$
İki pik arasında geçen süre (ms)	703,5±567,7	156,2±120,6*	211,9±205,1	214,6±135,2	Kruskal Wallis, Bonferroni düzeltmesi ile Dunn testi, *Kontrol ve GlikozAuNP, $p<0,05$
Ateşleme hızı (pik sayısı /s)	4,3±3,4	10,1±5,9	9,5±4,1	6,1±3,2	Kruskal Wallis, $p>0,05$

\*  $p<0.05$ , Kontrol ve GlikozAuNP

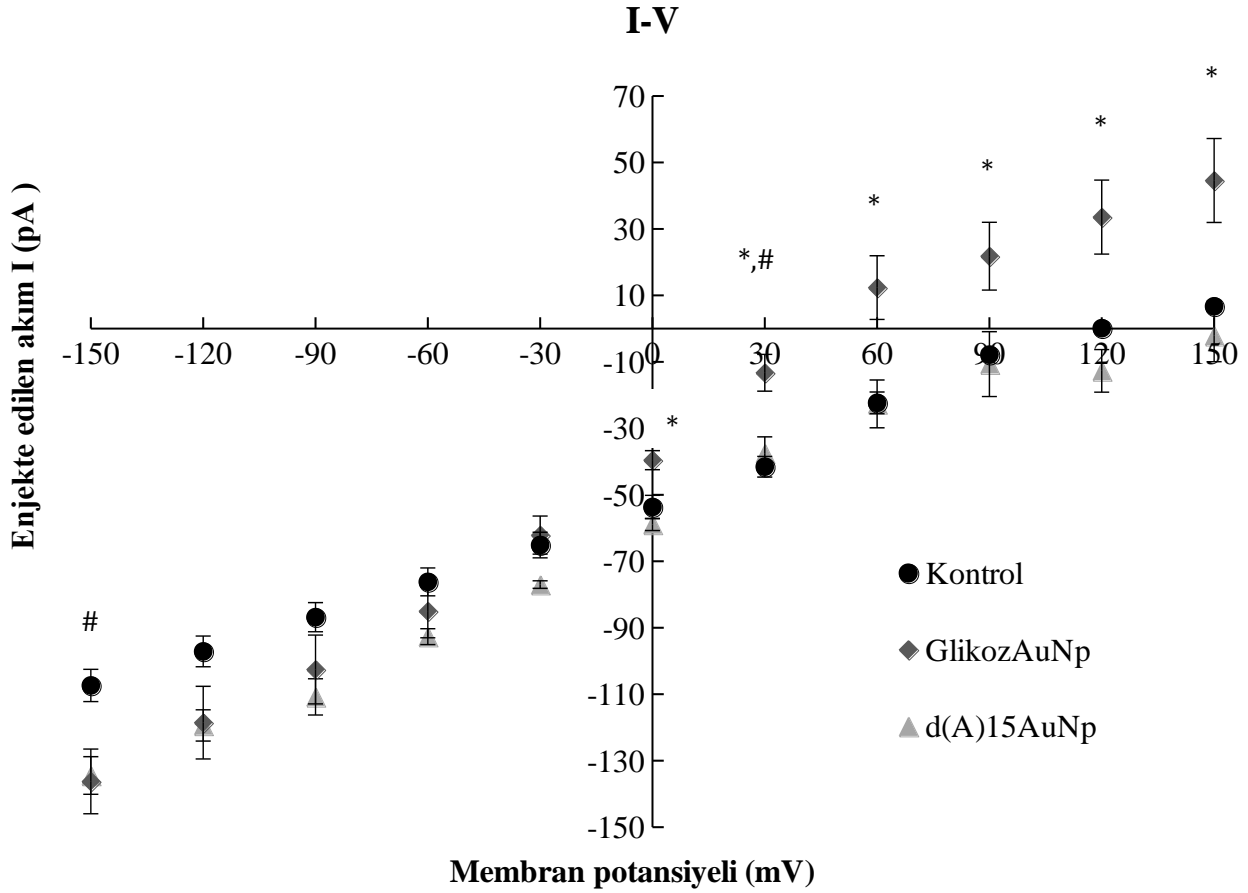


**Şekil 2** (A) Glikoz, (B) peptid (Asp) ya da (C) d(A)<sub>15</sub> ve ile modifiye edilmiş AuNP'lere ait TEM görüntüleri. Ölçü çizgileri 20 nm'yi göstermektedir.



**Şekil 3** Glikoz tiyollenmesinin FTIR ile gözlemlenmesi. Tiyollemeyi işaret eden pik (1653 cm<sup>-1</sup>) gözlemlenmiştir





**Şekil 4** Yama kıskacı yöntemi ile bütün hücre akım kıskacı tekniği kullanılarak kaydedilmiş uyarılmış aksiyon potansiyellerinin enjekte edilen akım membran potansiyeli (I-V) ilişkisi. -150pA ve +150 pA arasında 50 pA'lık değişimlerle 500 ms süreli uyarılar uygulandı. Kontrol (n=8), GlikozAuNp (n=8), d(A)<sub>15</sub> AuNp (n=9). Veriler ortalama değer ve standart hatayı temsil etmektedir. \*p<0.05.

## Tartışma

Elektriksel iletkenliği olan AuNp'lerin kan beyin bariyerini geçerek organizmada nöronlarla etkileşime girebildiği bilinmektedir.<sup>11,12,13</sup> Nöronların elektriksel aktivitesindeki değişimlerin fonksiyon ve davranışa etkileri olabileceğinden nöronların uyarılabilirliğini etkileyip etkilemediklerinin bilinmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada, farklı yüzey

kimyalarına sahip AuNP'lerin *ex vivo* olarak nöronlara uygulandığında, hipokampal nöronların oluşturduğu AP'nin özelliklerindeki olası değişimler araştırıldı. Bu amacı gerçekleştirmek için öncelikle sentezlenen nanoparçacıklar karakterize edildi. Glikoz, d(A)<sub>15</sub> veya Asp ile işlevselleştirilen parçacıkların karakterizasyonu için kullanılan UV/Vis spektroskopisi ve DLS yöntemleri ile parçacıkların çapının 5nm civarında olduğu gösterildi. TEM analizleri de beklenildiği

gibi hidrodinamik büyüklüklerinin 5-7 nm aralığında ve küre benzeri şekiller olduğunu gösterdi. FTIR ölçümleri ise glikoz sentezinde tiyollenmenin gerçekleştirildiğini gösterdi. Bütün bu ölçümler AuNp modifikasyonların sentezinin başarılı olduğunu kanıtlamıştır.

Modifiyeli AuNP'ler akut ve ekstrasellüler olarak beyin kesitlerine eklendikten sonra kaydedilen spontan AP'lerin ateşleme hızında kontrole göre GlikozAuNP gurubunda 2.3 kat artış gözlemlendi. Bu bulgu, daha önce literatürde sunulan çıplak AuNP'lerin nöronların oluşturduğu AP'lerin özelliklerine olan etkileri ile paralellik göstermekteydi. Jung ve arkadaşları, CA1 hipokampus bölgesindeki piramidal nöron hücreleri içine (intraselellüler) gönderilen AuNP'lerin, nöron hücrelerinin giriş direncini, spike sayısını ve spontan ateşleme hızını arttırdığını gösterilmişti.<sup>5</sup> Ayrıca, AuNP'lerin düşük Mg ile indüklenen epilepsi formundaki aktiviteyi kötüleştirebileceği gösterilmiştir.<sup>5</sup> Yine Salinas ve arkadaşları,<sup>6</sup> nöron hücrelerinin dışına (ekstrasellüler) uygulanan yıldız şeklindeki AuNP'lerin ateşleme hızını arttırdığını göstermiş ve AuNP'lerin potasyum kanallarını bloke ettiğini önermişti. Bu bilgilere ek olarak sunduğumuz çalışmada glikoz modifikasyonlu AuNP'lerin de benzer şekilde ekstrasellüler olarak nöronlara uygulandığında, nöronların spontan ateşleme hızını arttırdığı gösterilmiş oldu. Ayrıca, bu çalışmada, negatif yüklü aminoasitlerden oluşan peptid modifikasyonu (AspAuNp) kontrol grubuna kıyasla spontan ateşleme hızında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber kontrol gurubuna göre 2.2 kat artışa neden oldu. Bu sonuç, negatif yüklü AuNP'lerin nöronların içine daha fazla nüfuz edebildiklerinden,<sup>12,16,17</sup> AP'de artışa neden oluyor olabileceğini düşündürdü. Daha önce literatürde iyon yükleri farklı AuNP'lerin hücre içine daha fazla nüfuz edebildikleri,<sup>12</sup> negatif yüklü karbonil grupları ile modifiye edilmiş AuNP'lerin pozitif yüklü amin grupları ile modifiye edilmiş AuNP'lere göre daha az toksik olduğu bildirilmiştir.<sup>17</sup> Ayrıca, spontan AP'lerin genliğinde kontrole göre GlikozAuNP gurubunda gözlenen %33

artış, voltaj kapılı sodyum kanallarının etkilenmiş olabileceğine işaret etmektedir. Ancak, sodyum kapılarının büyüklüğü ve uygulanan nanoparçacıkların büyüklüğü düşünüldüğünde, bu etkinin fiziksel değil dolaylı olacağı düşünülebilir. Bu konunun açıklığa kavuşması için daha fazla çalışma yapılmalıdır.

Uyarılmış AP'lerin özellikleri değerlendirildiğinde AuNp uygulanan gruplarda Jung ve arkadaşlarının bulgularıyla paralel olarak 50 pA'lık akım kısıncında 500 ms' de oluşan AP sayısı kontrole göre daha fazlaydı.<sup>5</sup> Enjekte edilen akım ile hücre membranındaki değişimin grafiği olan I-V eğrileri karşılaştırıldığında; GlikozAuNp grubundan ölçülen I-V ilişkisinde eğrinin pozitif akım uygulanan bölgesinde, membran potansiyelinin kontrol grubuna göre pozitive kaydığı belirlendi. Membran potansiyelindeki artışlar sodyum-potasyum akımlarının etkilendiği ve nöronların uyarılabilirliğinin arttığı şeklinde yorumlanabilir. Eğri negatif akımlar için aşağı, pozitif akımlar için yukarı kaydı. Bu bulgu, Jung ve arkadaşlarının AuNp uygulanan grupta negatif akımlar için aşağıya kaymış I-V eğrisi bulgusu ile benzerdi. Bu çalışmada, glikoz ve peptid modifikasyonları spontan ateşleme hızında 2 kattan fazla artışa neden olduğundan, en biyoyumlu yüzey modifikasyonunun oligonükleotid olduğu düşünülmektedir.

Nanoparçacıkların yüzey yüklerini temsil eden zeta potansiyel ölçümünün nöronlar ile nanoparçacıklar arasındaki etkileşimi belirledikleri düşünülmektedir.<sup>25</sup> Dante ve arkadaşları<sup>25</sup> negatif yüzey yüküne sahip nanoparçacıkların nöronlarla etkileşime girdiğini, nötr ya da pozitif nanoparçacıkların nöronlarla daha az etkileşime girdiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada kullanılan modifiye AuNP'lerin hepsinin yüzey yükü negatif olduğundan hepsinin nöronlarla etkileşime girdiği düşünülmektedir. Bu parçacıkların membran potansiyelini ve sodyum/potasyum akımlarını hangi mekanizma ile etkilediğinin açıklanması için daha fazla çalışma yapmak gereklidir. Ayrıca, GlikozAuNp gurubunun yüzey yükünden bağımsız olarak glikozun hücre.

ile ilişkisinden kaynaklı nöronlar üzerinde diğer guruplara göre daha fazla etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu durum glikoz modifikasyonu sayesinde daha fazla parçacığın hücre içine girmiş olmasından kaynaklanıyor olabilir. Literatürde AuNp'lerin hücre içine alındıkları, canlı hayvana enjekte edildiğinde hayvan beynine ulaştığı ve nöronların içine alındıkları ile ilgili TEM görüntülerine dayanan birçok çalışma mevcuttur. <sup>26</sup> Ancak, bu çalışmada GlikozAuNp, d(A)<sub>15</sub> AuNp veya AspAuNp'lerin beyin kesitlerindeki nöron hücrelerine girerek etki gösterdiği varsayılmıştır. Elektrofizyolojik değişikliklere neden olan AuNp modifikasyonlarının hücre içine alınıp alınmadığı ve subsellüler değişikliklere yol açıp açmadığı ilerideki çalışmalarda belirlenebilir.

Memeli sinir sistemindeki uyarılabilir hücrelerin en temel özelliği olan AP'deki değişikliklerin epilepsi, ağrı ve psikiyatrik bozukluklar gibi birçok nörolojik hastalığa yol açabileceği düşünülmektedir.<sup>25,27,28</sup> Sonuç olarak bu projede uygulanan gruplar arasında nöronların biyoelektriksel özelliklerinde en az değişikliğe sebep olan oligonükleotid ile işlevselleştirilmiş AuNp'lerdi. Projenin sonuçları tıpta özellikle nöral hastalıklarda hedefe ilaç/gen taşınması ve görüntüleme tekniklerinin iyileştirilmesinde kullanılacak güvenli nanoparçacık seçimlerine kaynak teşkil edebilir. İleriki çalışmalarda membran kanalı inhibitörleri kullanılarak AuNp'lerin fare beyin kesitlerine *ex vivo* uygulanması sonrasında nöronlardan kaydedilen AP'lerin özelliklerinde oluşturdukları değişikliklerin mekanizmasını ve detaylarını araştırmak amacıyla membrandaki sodyum ve potasyum akımları ayrı ayrı ölçülebilir ve modellemeler yapılabilir. Aynı şekilde AuNp'lerin farelere *in vivo* enjeksiyonu sonrasında spontan ateşleme hızında değişiklik oluşturup oluşturmayacakları araştırılabilir.

## Teşekkürler

Çalışmacılar TUBITAK'a desteklerinden dolayı teşekkür eder. Yazarların herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Yazarların katkıları:** Çalışma fikrinin ve hipotezinin oluşumunda BGT, makalenin yazılmasında BGT, çalışmanın tasarımında BGT, BY, MC ve SD, deneylerin gerçekleştirilmesinde ve analizlerinde BGT, YY, GK, MS, MK, MC, AM, SD, ve eleştirel incelemede bütün yazarlar makaleye katkı sağlamıştır.

**Çıkar çatışması:** Herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## Kaynaklar

- 1) Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:1307e15.
- 2) Feng G, Kong B, Xing J, Chen J. Enhancing multimodality functional and molecular imaging using glucose-coated gold nanoparticles. *Clin Radiol.* 2014; 69(11):1105-11.
- 3) Sperling, RA, Gil PR, Zhang F, Zanella M, Parak WJ. Biological Applications of Gold Nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2008 Sep;37(9):1896-908.
- 4) Polak P, Shefi O. Nanometric agents in the service of neuroscience: Manipulation of neuronal growth and activity using nanoparticles. *Nanomedicine* 2015 Aug;11(6):1467-79.
- 5) Jung S, Bang M, Kim BS, Lee S, Kotov NA, Kim B, Jeon D. Intracellular gold nanoparticles increase neuronal excitability and aggravate seizure activity in the mouse brain. *PLoS One* 2014;13;9(3):e91360.
- 6) Salinas K, Kereselidze Z, DeLuna F, Peralta XG, Santamaria F. Transient extracellular application of gold nanostars increases hippocampal neuronal activity. *J Nanobiotechnology* 2014; 20;12(1):31.
- 7) Chithrani BD, Chan WC. Elucidating the

mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* 2007 Jun;7(6):1542-50.

8) Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003;422:37-44.

9) Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir.* 2005; 21: 10644-10654.

10) Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev.* 2009; 38: 1759-1782.

11) Sonavane G, Tomoda K, Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008; 66:274-280.

12) Chen YS, Hung YC, Liao I, Huang GS. Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett.* 2009; 4;4(8):858-864.

13) Chen YS, Hung YC, Lin LW, Liao I, Hong MY, Huang GS. Size-dependent impairment of cognition in mice caused by the injection of gold nanoparticles. *Nanotechnology.* 2010.3;21(48):485102.

14) Kim JH, Kim KW, Kim MH, Yu YS. Intravenously administered gold nanoparticles pass through the blood-retinal barrier depending on the particle size, and induce no retinal toxicity. *Nanotechnology.* 2009. 20:505101.

15) Sur I, Cam D, Kahraman M, Baysal A, Culha M. Interaction of multi-functional silver nanoparticles with living cells. *Nanotechnology.* 2010. 21, 175104.

16) Chen J, Hessler JA, Putschakayala K, Panama BK, Khan DP, Hong S, Mullen DG, Dimaggio SC, Som A, Tew GN. Cationic

nanoparticles induce nanoscale disruption in living cell plasma membranes. *The Journal of Physical Chemistry B.* 2009; 113:11179-11185.

17) Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem.* 2004; 15:897e900.

18) Gromnicova R, Davies HA, Sreekanthreddy P, Romero IA, Lund T, Roitt IM, Phillips JB, Male DK. Glucose-coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes in vitro. *PLoS One.* 2013 Dec 5;8(12):e81043.

19) Stampfl A, Maier M, Radykewicz R, Reitmeir P, Göttlicher M, Nieser R. Langendorff Heart: a model system to study cardiovascular effects of engineered nanoparticles. *ACS Nano.* 2011;5:5345-5353.

20) Piella J, Bastus NG, Puntero V. Size-Controlled Synthesis of Sub-10-nanometer Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles and Related Optical Properties. *Chem. Mater.* 2016; 20162841066-1075.

21) Bernardes GJ, Gamblin DP, Davis BG. The direct formation of glycosyl thiols from reducing sugars allows one-pot protein glycoconjugation. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006; 45(24):4007-11.

22) Hurst SJ, Hill HD, Mirkin CA. Three-dimensional hybridization with polyvalent DNA-gold nanoparticle conjugates. *J Am Chem Soc.* 2008 Sep 10;130(36):12192-200.

23) Spadavecchia, J, Movia D, Moore C, Maguire CM, Moustouli H, Casale, S. Targeted polyethylene glycol gold nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer: from synthesis to proof-of-concept in vitro studies. *Int J Nanomedicine* 2016; 11, 791-822.

24) Haiss W, Thanh NT, Aveyard J, Fernig DG. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Anal Chem.* 2007 Jun 1;79(11):4215-21.

25) Dante S, Petrelli A, Petrini EM, Marotta R, Maccione A, Alabastri A, Quarta A, De Donato F, Ravasenga T, Sathya A, Cingolani R, Proietti Zaccaria R, Berdondini L, Barberis A, Pellegrino T. Selective Targeting of Neurons with Inorganic Nanoparticles: Revealing the Crucial Role of Nanoparticle Surface Charge. *ACS Nano*. 2017; 11(7): 6630-6640.

26) Gromnicova R, Yilmaz CU, Orhan N, Kaya M, Davies H, Williams P, Romero IA, Sharrack B, Male D. Localization and mobility of glucose-coated gold nanoparticles within the brain.

*Nanomedicine (Lond)*. 2016; 11(6):617-25.

27) Guo F, Yu N, Cai JQ, Quinn T, Zong ZH, Zeng YJ & Hao LY. Voltage-gated sodium channels Nav1.1, Nav1.3 and b1 subunit were up-regulated in the hippocampus of spontaneously epileptic rat. *Brain Res. Bull*. 2008; 75, 179–187.

28) Meisler MH, Kearney JA. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J. Clin. Invest*. 2005; 115, 2010–2017.