



**FARKLI PASAJ NUMARALARINDAKİ HÜCRE
HATLARINDA FARKLILAŞMANIN YÜZEY
ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ
(SERS) YAKLAŞIMI İLE ARAŞTIRILMASI**

Nazlı ÖNCER

Danışman: Doç. Dr. Aşlı YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

2023

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**FARKLI PASAJ NUMARALARINDAKİ HÜCRE HATLARINDA
FARKLILAŞMANIN YÜZEY ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ
(SERS) YAKLAŞIMI İLE ARAŞTIRILMASI**

(The Investigation of Differentiation of Cell Lines with Different Passage Numbers
through Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) Approach)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nazlı ÖNCER

Danışman: Doç. Dr. Aslı YILMAZ
İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mehmet YILMAZ

Erzurum
Ocak, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Nazlı ÖNCER tarafından hazırlanan “Farklı Pasaj Numaralarındaki Hücre Hatlarında Farklılaşmanın Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) Yaklaşımı ile Araştırılması” başlıklı çalışması 12/01/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Harun BUDAK Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Doç. Dr. Aslı YILMAZ Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Yağmur ÜNVER Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç Dr. Berna KAVAKCIOĞLU YARDIMCI Pamukkale Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
İkinci Tez Danışmanı	Doç. Dr. Mehmet YILMAZ Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan Ceyhun

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma TÜBİTAK 119Z740 projesi ve TÜBİTAK 2210/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 119Z740

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiri, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Doç. Dr. Aslı YILMAZ danışmanlığında sunulan “Farklı Pasaj Numaralarındaki Hücre Hatlarında Farklılaşmanın Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) Yaklaşımı ile Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	%7	30
Kuramsal Temeller	%5	30
Materyal ve Metot	%5	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	%7	20
Sonuçlar ve Öneriler	%0	20
Tezin Geneli	%7	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Nazlı ÖNCER	Doç Dr. Aslı YILMAZ
İmza:	İmza:
Aslı Islak İmzalıdır	Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması TÜBİTAK 119Z740 projesi ve 2210/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir. Bu vesileyle Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) ve Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığına (BİDEB) teşekkür ederim.

Yüksek lisans yaptığım süre boyunca bana yol gösteren ve tez çalışmalarında bana yardımcı olup bilmediklerimi öğreten değerli danışman hocalarım Sayın Doç. Dr. Aslı YILMAZ'a ve Sayın Doç. Dr. Mehmet YILMAZ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın hücre kültürü aşamasında bilgi birikimi ve deneyimini eksik etmeyen, beni eğiten Sayın hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Ferhunde AYSİN, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK'e teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmalarımın nihai aşaması olan analizler kısmında tüm birikimiyle bana yardımcı olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK'e ayrıca teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarımı yürüttüğüm Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) ailesine ve kütüphane arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ve beni maddi ve manevi her anlamda destekleyen, her daim yanımda olan annem, babam ve abilerime teşekkür ederim. Son olarak bu tezi, vefatı beni derinden etkileyen 2021 Eylül ayında aniden kaybettiğim ananeme adıyorum.

Nazlı ÖNCER

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI PASAJ NUMARALARINDAKİ HÜCRE HATLARINDA FARKLILAŞMANIN YÜZEY ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ (SERS) YAKLAŞIMI İLE ARAŞTIRILMASI

Nazlı ÖNCER

Danışmanı: Doç. Dr. Aslı YILMAZ

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mehmet YILMAZ

Amaç: Bu tez çalışmasında etiketsiz altın nanoçubuk dizin (gold nanorod array, GNA) SERS platformunu üreterek farklı pasaj numaralarına sahip sağlıklı (MRC 5 ve MCF 10A) ve kanserli (A549 ve MCF 7) olmak üzere 12 farklı hücre hattının bu platform ile birleştirilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca platformdan alınan SERS sinyalleri doğrultusunda farklı pasaj numaralarına sahip hücre hatlarının birbirinden ayrılması ve farklılaşan hücre hatlarındaki bant değişimlerinin hücresel yaşlanma ile ilişkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: GNA SERS substratı, fiziksel buhar birikimi (physical vapor deposition, PVD) yöntemi ile eğik açı birikimi (oblique angle deposition, OAD) tekniği kullanılarak üretilmiştir. 12 hücre hattının (4 hücre hattının her birinden üç pasaj olmak üzere) her biri uygun besiyeri ortamında kültürlenerek çoğaltılmıştır. Hücrelerden alınan SERS sinyalleri önce ön işleme aşamalarından geçirilmiş daha sonra gözetimsiz (PCA, HCA) ve gözetimli (LDA, SIMCA, SVM) istatistiksel analizlere tabi tutulmuştur. Ayrıca elde edilen verilerin, hücresel yaşlanma ile bağlantılı biyomoleküler değişimi niceliksel olarak belirlemek ve anlamlılığını tespit etmek amacıyla one-way ANOVA testi yapılmıştır.

Bulgular: Anizotropik yapıya sahip GNA SERS substratı başarıyla sentezlenmiştir. GNA yüzeyi ile bir araya gelen hücrelerden alınan sinyallerin istatistiksel analizlere tabi tutulmasından sonra hücrelerin birbirinden ayrıldığı doğruluk değerleri ile gösterilmiştir. Ayrılan hücrelere ait bantlar yorumlanmış ve elde edilen biyomoleküler değişikliklerin hücresel yaşlanma ile ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir.

Sonuç: Farklı pasaj numaralarına sahip hücre hatlarının ayrımı, yapılan beş farklı analiz ile gösterilmiştir. Ayrılan hücrelere ait bant değerleri yorumlanmış ve bu bantlardaki biyokimyasal değişikliklerin, hücresel yaşlanmayla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: pasaj numarası, replikatif hücre yaşlanması, altın nanoçubuk dizinler, yüzey-zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS), kemometrik analizler.

OCAK 2023, 103 Sayfa

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION

THE INVESTIGATION OF DIFFERENTIATION OF CELL LINES WITH DIFFERENT PASSAGE NUMBERS THROUGH SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY (SERS) APPROACH

Nazlı ÖNCER

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aslı YILMAZ

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet YILMAZ

Purpose: In this thesis study, healthy and cancerous neuron (MRC 5 and A549) healthy and cancerous breast (MCF 10A and MCF 7) cell lines with different passage numbers were cultured and combined with the gold nanorod array (gold nanorod array, GNA) SERS platform. In line with the SERS signals received from the platform, it is aimed to separate cell lines with different passage numbers from each other and to show the relationship of band changes in differentiated cell lines with cellular senescence.

Method: The GNA as SERS platform was produced via the physical vapor deposition (PVD) method and the oblique angle deposition (OAD) technique. Each of the 12 cell lines (three passages from each of the 4 cell lines) were cultured in the appropriate medium and propagated. SERS signals from cells were first preprocessed and then subjected to unsupervised (PCA, HCA) and supervised (LDA, SIMCA, SVM) statistical analysis. In addition, one-way ANOVA test was performed to quantitatively determine the biomolecular change associated with cellular aging and to determine the significance of the obtained data.

Findings: GNA SERS substrate with anisotropic structure has been successfully synthesized. After the statistical analysis of the signals received from the cells coming together with the GNA surface, the separation of the cells from each other was shown with accuracy values. The bands of the separated cells were interpreted and it was evaluated that the obtained biomolecular changes could be related to cellular senescence.

Results: Differentiation of cell lines with different passage numbers was demonstrated by five different analyzes. The band values of the separated cells were interpreted and it was concluded that the biochemical changes in these bands are associated with cellular senescence.

Keywords: passage number, replicative cell senescence, gold nanorod arrays, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), chemometric analysis.

January 2023, 103 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	3
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	x
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	4
Pasaj Sayısı ile Hücre Yaşlanması Arasındaki İlişki.....	4
Hücre Yaşlanmasındaki Mekanizmalar.....	4
Hücre Yaşlanmasında Değişken Parametreler ve Belirleme Yöntemleri.....	5
<i>In vitro</i> Hücresel Yaşlanma	6
<i>In vivo</i> Hücresel Yaşlanma	9
Klasik Raman Spektroskopisi.....	9
Tarihçesi ve Temel Teorisi	9
Yüzey-zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface-enhanced Raman Spectroscopy SERS)	11
SERS ile Yapılan Biyolojik Uygulamalar	15
Etiketli SERS tespit yöntemleri ve biyolojik uygulamaları	16
Etiketsiz SERS tespit yöntemleri ve biyolojik uygulamaları	18
SERS Verilerin Ön İşlenmesi	21
SERS Verilerinin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	22
Gözetimsiz Kemometrik Analizler	23
Temel bileşen analizi (principal component analysis, PCA).....	23
Hiyerarşik kümeleme analizi (hierarchical cluster analysis, HCA)	24
Gözetimli Kemometrik Analizler	24
Lineer diskriminant analizi (linear discriminant analysis, LDA)	25
Sınıf analojisiyle yumuşak bağımsız modelleme (soft independent modeling of class analogies, SIMCA)	25
Destek vektör makinesi (support vector machine, SVM)	25
MATERYAL VE METOT.....	27
Kullanılan Hücreler	27
Kullanılan Kimyasallar.....	27
Kullanılan Materyal ve Cihazlar.....	28

GNA Platformlarının Üretimi.....	29
Hücrelerin Çözdürülmesi ve Pasajlanması	30
Besiyerlerinin Hazırlanması	31
Hücrelerin Kültüre Alınması	31
Hücrelerin Pasajlanması	32
Farklı Pasaj Numaralarındaki Hücrelerden SERS sinyallerinin eldesi ve İşlenmesi	33
SERS Spektrumlarına Spektral Öncül İşlemler, Kemometrik Analizler, Kalitatif ve Kantitatif Spektral Analizlerin Uygulanması.....	35
Spektral Öncül-İşlemler.....	35
Kemometrik Analizler	35
Gözetimsiz kemometrik analizler	35
Gözetimli kemometrik analizler	35
Kalitatif ve Kantitatif Spektral Analizler.....	36
İstatistiksel Analizler	36
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	38
GNA Platformlarının Üretimi.....	38
Farklı Pasaj Numaralarına Sahip Hücrelerden SERS Sinyallerinin Alınması	39
Farklı Pasaj Numaralarındaki Hücrelerden Elde Edilen SERS Verilerinin Kemometrik Analizleri	42
Gözetimsiz Kemometrik Analizler: PCA-HCA Analizi	42
Gözetimli Kemometrik Analizler: LDA, SIMCA, SVM Analizi.....	44
Kalitatif, Kantitatif Analizler ile Biyokimyasal Değişikliklerin Belirlenmesi ve Bu Biyokimyasal Değişikliklerin Yaşlanma ile İlişkisinin Değerlendirilmesi	54
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	60
KAYNAKÇA	61
EKLER	86
Ek-1. Gözetimli Analizlere Ait Tablolar	86
ÖZGEÇMİŞ.....	103

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Yaşlanmayı tetikleyen faktörlerin bazıları ve neden oldukları süreçler	4
Tablo 2. Farklı araştırma gruplarının <i>in vivo</i> yaşlanma üzerine yaptıkları çalışmalar.....	9
Tablo 3. Raman raportör molekülleri ve özellikleri.....	17
Tablo 4. Tez kapsamında kullanılan hücreler.	27
Tablo 5. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar.	27
Tablo 6. Tez kapsamında kullanılan materyaller.	28
Tablo 7. Tez kapsamında kullanılan cihazlar.	28
Tablo 8. Tez kapsamında hazırlanan besiyerleri.....	31
Tablo 9. A549 hücrelerine ait toplam PC skorları, PC yükleme (loading) grafiklerine atanan pikler ve bu piklere karşılık gelen biyomoleküller.	57
Tablo 10. MRC 5 hücrelerine ait toplam PC skorları, PC yükleme (loading) grafiklerine atanan pikler ve bu piklere karşılık gelen biyomoleküller.	58
Tablo 11. MCF 7 hücrelerine ait toplam PC skorları, PC yükleme (loading) grafiklerine atanan pikler ve bu piklere karşılık gelen biyomoleküller.	58
Tablo 12. MCF 10A hücrelerine ait toplam PC skorları, PC yükleme (loading) grafiklerine atanan pikler ve bu piklere karşılık gelen biyomoleküller.	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hücresel yaşlanmanın gelişimi	4
Şekil 2. Hücre yaşlanmasında görülen fenotipik değişiklikler.....	8
Şekil 3. Molekülün ışık ile uyarılması sonucu meydana gelen enerji değişimleri.....	10
Şekil 4. Raman spektroskopisinin tarihsel gelişimi.	11
Şekil 5. Yüzey güçlendirilmiş Raman saçılmasının şematik gösterimi.	12
Şekil 6. Lokalize yüzey plazmon rezonans etkisi.....	12
Şekil 7. Altın metal küre üzerindeki elektrik alan dağılımı ve çekirdeğe yaklaştıkça oluşan SERS etkisi.....	13
Şekil 8. Kimyasal zenginleştirmede tasvir edilen metal ile molekülün enerji seviyesi diyagramı.	13
Şekil 9. SERS ile yapılan araştırmaların yıllara göre değişimi. Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Şekil 10. SERS ile yapılan araştırmaların alanlara göre değişimi. Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Şekil 11. Biyomedikal uygulamalarda SERS ve farklı boyut ve morfolojide üretilen SERS platformları.....	16
Şekil 12. Etiketli SERS tespit yöntemi.....	17
Şekil 13. Etiketsiz SERS tespit yöntemi.	19
Şekil 14. Veri ön işleme basamakları.....	22
Şekil 15. Çok değişkenli kemometrik analizlerin şematik gösterimi.....	23
Şekil 16. 2D boyutlu örnek PCA. Ayrımın olmadığı PCA grafiği.	24
Şekil 17. Örnek HCA dendogramı	24
Şekil 18. SVM analizinin önceden belirlenmiş deney gruplarına uygulanma süreci.....	26
Şekil 19. GNA yüzeylerin hazırlanmasında kullanılan (a) plazma cihazı ve (b) PVD cihazı .	30
Şekil 20. İnce filmlerin OAD yaklaşımı ile üretimi.	30
Şekil 21. Farklı pasaj numaralarına sahip dört farklı hücre hattının mikroskop görüntüleri ...	33
Şekil 22. Boş GNA SERS substratı (a), GNA yüzey üzerindeki damlatılan ve kuruyan hücrelerin görünümü (b).....	34
Şekil 23. Raman Spektroskopisi.....	34
Şekil 24. GNA SERS platformunun üretimi, pasaj sayısına bağlı olarak yaşlanan hücreler, hücrelerin SERS sistemi ile birleştirilerek sinyallerin elde edilmesi ve yapılan kemometrik analizler.	37
Şekil 25. GNA SERS substratı için farklı büyütme ölçeklerinde alınan SEM görüntüleri	38

Şekil 26. GNA SERS substratı için UV-vis absorpsiyon spektrumu.	39
Şekil 27. A549 P6 hücre hattının GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 886 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri	40
Şekil 28. A549 P14 hücre hattının GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1.225 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri	41
Şekil 29. A549 P28 hücre hattının GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1.505 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri	41
Şekil 30. A549 hücreleri için kemometrik analiz sonuçları.	43
Şekil 31. MRC 5 hücreleri için kemometrik analiz sonuçları.	43
Şekil 32. MCF 7 hücreleri için kemometrik analiz sonuçları..	43
Şekil 33. MCF 10A hücreleri için kemometrik analiz sonuçları.....	44
Şekil 34. A549 hücreleri için yapılan LDA analizi.	45
Şekil 35. MRC 5 hücreleri için yapılan LDA analizi.	45
Şekil 36. MCF 7 hücreleri için yapılan LDA analizi.	46
Şekil 37. MCF 10A hücreleri için yapılan LDA analizi.....	46
Şekil 38. A549 hücreleri için yapılan SIMCA analizi.	48
Şekil 39. MRC 5 hücreleri için yapılan SIMCA analizi.	49
Şekil 40. MCF 7 hücreleri için yapılan SIMCA analizi.	50
Şekil 41. MCF 10A hücreleri için yapılan SIMCA analizi.	51
Şekil 42. A549 hücreleri için yapılan SVM analizi.	52
Şekil 43. MRC 5 hücreleri için yapılan SVM analizi.	53
Şekil 44. MCF 7 hücreleri için yapılan SVM analizi.	53
Şekil 45. MCF 10A hücreleri için yapılan SVM analizi.	54
Şekil 46. A549 hücreleri için yapılan tepe noktası atamaları, atamalara karşılık gelen biyomoleküller ve one-way ANOVA Testi.....	56
Şekil 47. MRC 5 hücreleri için yapılan tepe noktası atamaları, atamalara karşılık gelen biyomoleküller ve one-way ANOVA Testi.....	56
Şekil 48. MCF 7 hücreleri için yapılan tepe noktası atamaları, atamalara karşılık gelen biyomoleküller ve one-way ANOVA Testi.....	56
Şekil 49. MCF 10A hücreleri için yapılan tepe noktası atamaları, atamalara karşılık gelen biyomoleküller ve one-way ANOVA Testi.....	57

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AFM	: Atomik Kuvvet Spektroskopisi (Atomic Force Spectroscopy)
Arb. Units	: Rastgele Birim (Arbitrary Units)
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyon (American Type Culture Collection)
CCD	: Yük Bağlı Dedektör (Charged-Coupled Detector)
CHEM	: Kimyasal Zenginleştirme (Chemical Enhancement)
DSB	: Çift Sarmal Yapısındaki Hasar (Double-Strand Breaks)
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
EF	: Zenginleştirme Faktörü (Enhancement Factor)
(E_F)	: Fermi Seviyesi (Fermi Level)
EM	: Elektromanyetik Zenginleştirme (Electromagnetic Enhancement)
FBS	: Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)
GNA	: Altın Nanoçubuk Yüzey (Gold Nanorod Array)
GFP	: Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein)
HCA	: Hiyerarşik Kümeleme Analizi (Hierarchical Cluster Analysis)
HOMO	: En Yüksek Dolu Molekül Orbitali (Highest Occupied Molecular Orbital)
HDF	: İnsan Deri Hücresi (Primary Dermal Fibroblast)
LDA	: Lineer Diskriminant Analizi (Linear Discriminant Analysis)
LUMO	: En düşük Dolmamış Molekül Orbitali (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
MAMs	: Çok Değişkenli Analiz Yöntemleri (Multivariate Analysis Methods)
MVA	: Çok Değişkenli Veri Analizleri (Multivariate Data Analysis)
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans (Nuclear Magnetic Resonance)
OAD	: Eğik Açılı Birikimi (Oblique Angle Deposition)
PCA	: Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis)
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)
PVD	: Fiziksel Buhar Birikimi (Physical Vapor Deposition)
RS	: Replikatif Yaşlanma (Replicative Senescence, RS)
RS	: Raman Spektroskopisi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
N/I	: Molekül Sayısı/ Raman Sinyal Şiddeti
NIR	: Kızılötesine Yakın Bölge (Near Infrared Reflectance)
SA-β-gal	: Yaşlanma ile Bağlantılı β-galaktosidaz (Senescence-Associated-Beta-galactosidase)
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)

SERS	Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface-enhanced Raman Spectroscopy)
SIMCA	: Sınıf Analjisiyle Yumuşak Bağımsız Modelleme (Soft Independent Modeling of Class Analogies)
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonansı (Surface Plasmon Resonance)
SVM	: Destek Vektör Makinesi (Support Vector Machine)
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscopy)
UV	: Ultraviyole
%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
cm²	: Santimetrekafe
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece

GİRİŞ

İnsanlardan alınarak izole edilen somatik hücreler kültürlendiği zaman büyümeye başlarlar. Ancak belirli bir zaman sonra üreme yetileri aşamalı olarak azalır. Bu durağan büyüme döneminden sonra hücreler, replikatif yaşlanma (replicative senescence, RS) olarak tanımlanan büyümenin duraksaması haline geçerler (Cristofalo *et al.*, 2004; Hayflick, 1965). Üreme yetisinin kaybeden ve yaşlanma sürecine giren hücrelerin fizikokimyasal özelliklerinde birçok değişiklik olur. Bunlardan en bilindik olanlar: düz ve geniş bir hücre morfolojisi, yaşlanma ile bağlantılı β -galaktosidaz (senescence-associated-beta-galactosidase, SA- β -gal) aktivitesinde ve reaktif oksijen türlerinin (reactive oxygen species, ROS) seviyesindeki artıştır (Hwang *et al.*, 2009).

Yaşlanma tespiti için kullanılan bazı biyobelirteçler bulunmaktadır. SA- β -gal aktivitesi, metabolik değişiklikler, lipofusinin birikimi bunlardan sadece birkaçıdır (Rodier & Campisi, 2011). Bu belirteçler, hiçbir zaman tek başına kesin bir anlam ifade etmemekle beraber *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda farklılık gösterir. Şu ana kadar yaşlanan hücreyi tam olarak tanımlayan, diğer hücrelerden ayıran kendine özgü bir belirteç yoktur (Lawless *et al.*, 2010). Bu sebeple yaşlanan hücreleri normal hücrelerden ayırmak, onları teşhis etmek ve farklılaşmasını belirlemek amacıyla immünohistokimya ve immünohistofloresans gibi teknikler birleştirilerek kullanılır.

Hücrelerin yaşlanması, önemli bir hücre programıdır ve bazı hastalıklarla ilişkili olduğu için tıbbi teşhiste kullanılır. Yaşlanmayı *in vitro* seviyede tespit etmek için etiketsiz ve non-invaziv bir yöntem gereklidir. Titreşimli spektroskopik teknikler hızlı, kolay, etiketsiz, ucuz, yüksek hassasiyette ve tek molekül tayini bile yapabilir. Bu tekniklerden biri olan Raman spektroskopisi, molekülün titreşimsel bilgisini vererek molekülün tanımlanmasını sağlar ancak zayıf sinyal şiddeti, biyolojik sistemlerin luminesans etki oluşturmaları gibi dezavantajlara sahiptir. Bu dezavantajlar, yüzey zenginleştirilmiş Raman spektroskopisinin (surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) keşfedilmesiyle beraber ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır.

Tıpkı Raman spektroskopisi gibi SERS'te molekülün titreşimsel bilgisini verir ve inelastik saçılma kuramına dayanır (Chaturvedi *et al.*, 2016). SERS'te amaç plazmonik malzemeleri (altın, gümüş, bakır, alüminyum) kullanarak Raman sinyal şiddetini artırmaktır. SERS; DNA metilasyonu ve buna sebebiyet veren gen ekspresyonu seviyesinin izlenmesinde (Ganesh *et al.*, 2020), farklı kanser türlerini teşhiste (Haldavnekar *et al.*, 2018) ve farklılaşan hücreleri belirlemek (El-Said *et al.*, 2015; Huefner *et al.*, 2013) amacıyla kullanılmıştır.

SERS ile yapılan biyolojik çalışmalarda etiketli (dolaylı) ve etiketsiz (doğrudan) algılama olmak üzere iki farklı yol, analitlerin tespitinde kullanılmaktadır. Etiketli sistemler plazmonik çekirdek, Raman raportör ve hedefleme parçalarıyla işlevselleştirilmiş koruyucu bir kabuktan oluşur (Lane *et al.*, 2015). Bu etiket sistemleri Raman aktif bir raportör molekülü içerir ve ilgili molekülün bağlanması ana mekanizmayı oluşturur. Tespiti yapılmak istenen ilgili molekül, Raman raportörün spektrumu sayesinde tespit edilir. Etiketsiz sistemlerde ise elde edilen Raman spektrumlarıyla molekülün tayini doğrudan sağlanır. Burada substrat olarak yapılandırılmamış nanopartiküller (gümüş, altın koloidal nanopartiküller ve yarı iletkenler), bir yüzeyde birleştirilmiş nanopartiküller, sıralanmış nanopartikül dizileri farklı üretim yöntemleri kullanılarak sentezlenir (Pilot *et al.*, 2019). Etiketsiz sistemlerin numunenin az, hazırlanışının kolay, zenginleştirme faktörünün yüksek olması gibi avantajları bulunmaktadır. Bununla beraber kompleks karmaşık biyolojik sistemlerde alınan spektrumların, ayırt edilememesi gibi dezavantajları da vardır. Bu dezavantajlar çok-değişkenli analiz yöntemlerinin (multivariate analysis methods, MAMs) kullanımı ile ortadan kaldırılabilir. Ayrıca günümüzde yazılımların gelişmesi ile analizlerin çeşitliliği ve güvenilirliği artmaktadır. Temel bileşen analizi (principal component analysis, PCA), hiyerarşik kümeleme analizi (hierarchical cluster analysis, HCA), lineer diskriminant analizi (linear discriminant analysis, LDA), sınıf analojisiyle yumuşak bağımsız modelleme (soft independent modeling of class analogies, SIMCA), destek vektör makinesi (support vector machine, SVM) analizleri ile hücre gibi içerisinde birçok bileşenin bulunduğu karmaşık yapının tespiti mümkün hale gelmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında ilk olarak etiketsiz algılama yöntemi kullanılarak 3-boyutlu (3D) ve anizotropik morfolojide altın nanoçubuk dizinler (gold nanorod arrays, GNAs) bir SERS platformu olarak fiziksel buhar birikimi (physical vapor deposition, PVD) metodu ve eğik açı biriktirme (oblique angle deposition, OAD) tekniği kullanılarak üretilmiştir. Bu platform kolayca üretilmekte ve zenginleştirme faktörü (enhancement factor, EF) muadillerine kıyasla iyi bir avantaj sağlamaktadır (Yılmaz, 2014).

Çalışmada farklı pasaj numaralarına sahip sağlıklı ve kanserli akciğer (MRC 5 P27-P33-P41 ve A549 P6-P14-P28, P: pasaj numaralarını göstermektedir), sağlıklı ve kanserli meme (MCF 10A P11-P17-P22 ve MCF 7 P16-P28-P33, P: pasaj numaralarını göstermektedir) hücre hatları çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücreler GNA platformlar ile kombinlenerek, SERS haritalama (mapping) tekniği ile Raman sinyalleri toplanmıştır. Bu sinyaller içerisinde sinyal şiddeti yüksek spektrumlar seçilerek kapsamlı-güvenilir istatistiksel analizlere (PCA, HCA, LDA, SIMCA, SVM) tabi tutulmuştur. Elde edilen istatistiksel analizler sonucunda farklı pasaj

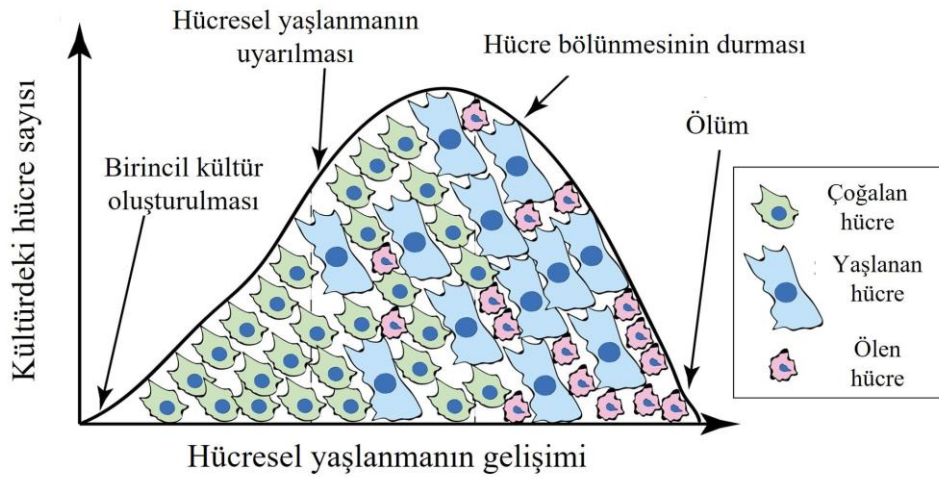
numaralarına sahip olan bu hücre hatlarının, farklılaşma potansiyeli titizlikle incelenmiş ve birbirinden farklılaştığı gösterilmiştir. Bu farklılaşma, pasaj sayısı ile ilişkili hücre yaşlanmasındaki biyokimyasal değişikliklerle ilişkilendirilmiştir.



KURAMSAL TEMELLER

Pasaj Sayısı ile Hücre Yaşlanması Arasındaki İlişki

Primer hücre kültüründe pasaj sayısı, hücrenin yaşını belirlemek için kullanılır (Kwist *et al.*, 2016). Her hücre, popülasyonunu artırmak amacıyla bölünür ve bölündükçe de yaşlanır (Şekil 1). Bu yaşlanma replikatif yaşlanma olarak nitelendirilmiştir. Hayflick'in tanımına göre bir hücrenin yaşlanması, pasaj numarasının artmasının yanı sıra hücre morfolojisinin bozulması ve hücresel atıkların hücre içinde birikmesiyle gerçekleşir (Hayflick & Moorhead, 1961). Sonraki yıllarda ise hücre yaşlanması terimi; hücre döngüsünün durduğu ve hücrelerin ölüme karşı koyduğu direncin azaldığı, hücresel bir süreç olarak açıklanmıştır (Gorgoulis *et al.*, 2019; Van Deursen, 2014).



Şekil 1. Hücre yaşlanmasının gelişimi (Ogrodnik, 2021)'den Türkçe'ye çevrilmiştir.

Hücre Yaşlanmasındaki Mekanizmalar

Yaşlanma sürecine giren hücrelerde; fenotipik değişikliklerin eşlik ettiği hücre yaşlanmasını indükleyen bir dizi olay gerçekleşir (Ogrodnik, 2021). Tablo 1'de bu indükleyici faktörlerin bir kısmı ve neden oldukları süreçlere yer verilmiştir. Hücreler aşamalı olarak bölünme yeteneğini yitirir, S fazına girme hızı yavaşlar ve hücre döngüsü uzar (Absher *et al.*, 1974; Macieira-Coelho & Azzarone, 1982; Nassrally *et al.*, 2019; Pontén *et al.*, 1983; Smith & Whitney, 1980). Belirli bir noktadan sonra hücre döngüsü durur ve yaşlanma başlar.

Tablo 1. Yaşlanmayı tetikleyen faktörlerin bazıları ve neden oldukları süreçler (Gorgoulis *et al.*, 2019)'den Türkçe'ye çevrilmiştir.

İndükleyiciler	Süreç
Telomerlerin yıpranması	Yaşlanma, Kanser
UV ve diğer ışınlara maruziyet	Kanser tedavisi ve yan etkileri
Mitokondrinin az çalışması	Yaşlanma

Tablo 1. (devamı)

Oksidatif stres	Doku hasarı, Yaşlanma
TGF- β Sitokini	Yaşlanma
Epigenetik modifikasyonlar (metilasyon)	Kanser tedavisi, Yaşlanma
Protein kinaz C aktivatörleri	Yaşlanma

Araştırmacılar uzun yıllar yaşlanmanın nasıl belirleneceği üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu araştırmalar yaşlanmayı tespit edebilecek belirteçlerin bulunmasıyla önem kazanmıştır (Gorgoulis *et al.*, 2019; Van Deursen, 2014). Fakat bu belirteçler kendine has değildir. Ancak beraber kullanıldığı takdirde anlamlı sonuçlar elde edilebilmektedir (Gorgoulis *et al.*, 2019). Belirteçlerin özgüllüğü ise hücre tipine, dokuya ve kültürün büyüme sürecine göre değişkenlik göstermektedir (Gorgoulis *et al.*, 2019).

Yaşlanma belirteçleri ve dezavantajlarını daha iyi anlamak adına konuyu daha detaylı bir şekilde açıklamak anlamlı olacaktır.

Hücre Yaşlanmasında Değişken Parametreler ve Belirleme Yöntemleri

Sağlıklı hücreler yaşlandıkça ömürleri kısalırken, kanserli hücreler sınırsız bir ömre sahip olmaktadır (Kwist *et al.*, 2016). Bununla beraber her iki modelde de yaşlanma süreci, farklılık göstermektedir. Ayrıca doku türü, kökeni ve kültür şartları farklı olan hücre hatlarının yaşlanma süreçlerinin de farklılık göstereceği ve aynı yaşta olsalar dahi hücre hatlarının birbirinden çok farklı özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Hughes *et al.*, 2007; Langelier *et al.*, 1993; Sambuy *et al.*, 2005; Wenger *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 1997).

Replikatif olarak yaşlanan (pasaj sayısının artışı ile) hücre hatlarında, ilk pasajda sahip olduğu özgün fonksiyonel özellikleri değiştiren mutasyonlar ortaya çıkabilir (Yu *et al.*, 1997). Ayrıca hücre pasajlandıkça fiziksel özelliklerinde, morfolojisinde, gen ekspresyon seviyesinde ve metabolik aktivitelerinde değişiklikler olmaktadır (Briske-Anderson *et al.*, 1997; Woloschak, 1997). Ayrıca hücredeki pasaj numarasının artışı, hücre zarı geçirgenliğini azaltarak hücreyi kolayca enfekte olabilecek hale getirdiği de keşfedilmiştir (Jensen & Norrild, 2000). Kwist ve ark. pasaj numarası artışı üzerine yaptığı çalışmada, osteojenik özelliklerin pasaj numarası arttıkça değiştiği ayrıca bu özelliğin, devamlı bir artış veya azalışta göstermediği sonucuna varmışlardır (Kwist *et al.*, 2016). Bu sonuç yaşlanan hücrelerde, değişen bazı özelliklerin, belli bir eğilimde olmadığını düşündürür. Bu arada pasaj numarasının artışı her hücre hattında aynı etkiyi de göstermeyebilir. Örneğin pasaj sayısı yüksek olan Caco-2 ve MCF 7 hücre hatlarında yapılan bir transfeksiyon işleminden sonra, yeşil floresan protein (green fluorescent protein, GFP) raportör geninin ekspresyon profili Caco-2 hücre hattında artarken, MCF 7 hücre hattında ise bir azalış göstermiştir (Hughes *et al.*, 2007).

Bu kapsamda hücre yaşlanmasında değişken parametreler ve belirleme yöntemleri, araştırmalarda iki farklı şekilde incelenme fırsatı bulmuştur. Bunlardan biri *in vitro* hücresel yaşlanma diğeri ise *in vivo* hücresel yaşlanmadır.

***In vitro* Hücresel Yaşlanma**

Hücre döngüsünün uzaması, hücre dokusunun aşırı gelişmesi, metabolik değişimler, telomerlerin kısalması, hücre içinde gerçekleşen yıkımlar *in vitro* hücre yaşlanmasının belirteçleri olarak kullanılır (Ogrodnik, 2021). Kim ve ark., insan deri hücresinde (primary dermal fibroblast, HDF) pasaj sayısı artışına bağlı yaşlanma sürecini araştırmak için yaptıkları çalışmada, hücre döngüsünün P40'tan P90'a kadar iki katına çıktığı ve artış eğilimin diğer pasajlarda da devam ettiğini bulmuşlardır. Bu sonuç yaşlanan hücrelerde hücre döngüsündeki sürenin artma eğilimini doğrulamaktadır (Y. M. Kim *et al.*, 2013).

Yaşlanan hücreler üzerine yapılan başka bir çalışmada ise uzun süre kültürlenmiş hücrelerde, hücre görüntülemesi kullanılarak yaşlanma süreci izlenmiş ve süreç canlı olarak takip edilmiştir (Absher *et al.*, 1974; Nassrally *et al.*, 2019). Yaşlanmaya giden süreçte hücre döngüsündeki sürenin uzaması, hücre büyümesinin yavaşlayarak hücre boyutunun büyümesine sebebiyet verir. Aksine hızlı büyüyen hücrelerde ise hücre boyutu küçülür (Angello *et al.*, 1989; Ginzberg *et al.*, 2015). Bu bağlamda yüksek oranda serum içeren besi ortamlarında büyüyen hücrelerin, hızlıca büyümesine bağlı olarak hücre boyutlarının küçülmesini beklemek olasıdır.

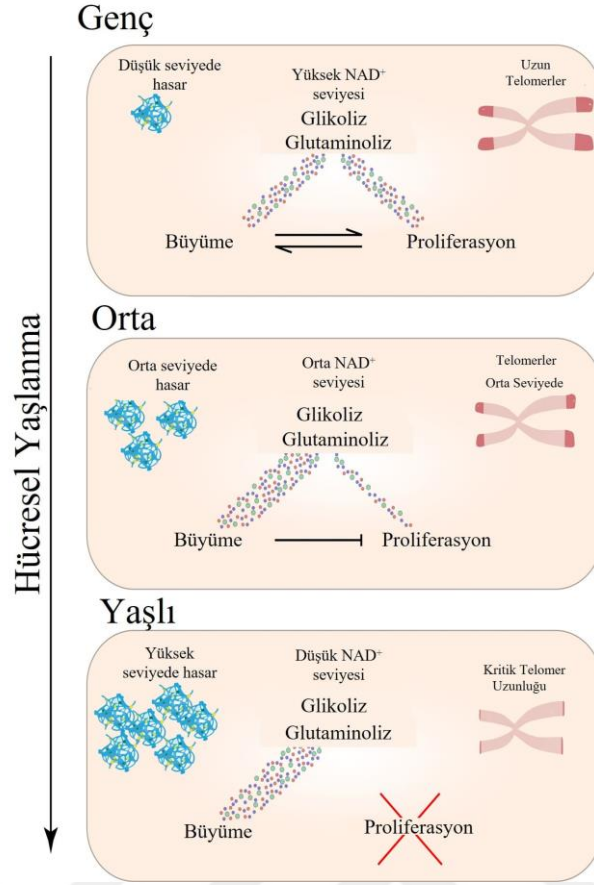
Angelo ve ark., yaşlanan hücreleri belirlemek için yaptıkları diğer bir çalışmada, G1 süresi ile replikasyon süresinin birbirinin tam tersi olduğunu akış sitometrisi kullanarak göstermişlerdir (Angello *et al.*, 1989). Yine Yuan ve ark., yaptığı bir çalışmada yaşlandırılmış farelerden elde ettikleri hücrelerde, replikasyon süresiyle büyüme süresi arasında ters bir ilişki olduğunu açıklamışlardır (Yuan *et al.*, 2006). Ayrıca, sodyum bütirat, afidikolin gibi ajanların varlığı hücre döngüsünü kısıtlayarak süreyi uzatır ve hücre boyutunun büyümesine sebebiyet verir (Neurohr *et al.*, 2019). Özetle, *in vitro* hücresel yaşlanma, hücre büyüme süresinin değiştirilerek hücre boyutunun farklılaşmasını sağlar.

Hücre büyüyüp geliştikçe metabolik aktivitesi artar (Ogrodnik, 2021). Yi ve ark., bu konu üzerine yaptıkları bir çalışmada ise endotel hücrelerindeki yaşlanma, nükleer manyetik rezonans (nuclear magnetic resonance, NMR) kullanılarak incelenmiştir (Yi *et al.*, 2020). Bu çalışmada glikoliz seviyesi aynı kalırken glutamat seviyesinde artış görülmüştür. Burada yaşlanmış hücreler, büyümek ve çoğalmak için glikoliz, glutaminolizin yerine glikozu kullanan metabolik bir yola girmişlerdir. Bu arada hücrelerde glutaminolizin varlığı, yaşlanmayı durdurarak yaşa bağlı semptomların azalmasına neden olmaktadır (Johmura *et al.*, 2021). Bu bağlamda yaşlanan hücrelerin proliferasyonda glutaminolizi kullanmamaları beklenen bir

sonuçtur. Endotel hücre hattı üzerine yapılan diğer bir çalışmada ise atomik kuvvet spektroskopisi (atomic force spectroscopy, AFM) kullanılarak yaşlanan hücrelerde oluşan fenotipik değişimler belirlenmiştir (Kolodziejczyk *et al.*, 2020). Burada farklı pasaj numaralarına sahip yaşlanan endotel hücreleri, farklı konsantrasyonlardaki gümüş nanopartiküllere, farklı zamanlarda maruz bırakılarak izlenmiş ve aktin, miyozin liflerinde azalma gözlemlenmiştir. Bu değişimler, yaşlanan hücrelerin morfolojik görünümündeki değişimlere atfedilmiştir.

Yaşlanan hücrelerin diğer metabolik belirteçleri ise ATP oranında düşme, AMP/ATP oranının yükselmesi, oksidatif fosforilasyonda düşüş ve laktat sentezinde azalmadır (Unterluggauer *et al.*, 2008; W. Wang *et al.*, 2003; Zwerschke *et al.*, 2003). Ek olarak yaşlanmış hücrelerde lipit seviyesinin arttığı da bilinmektedir (Ogrodnik *et al.*, 2017, 2019).

Hem birincil kültürde hem de kanserli yaşlanan hücrelerde bir diğer bulgu ise NAD^+ seviyesinin azalması ve buna bağlı olarak $NAD^+/NADH$ oranının düşmesidir (Chini *et al.*, 2014; Nassrally *et al.*, 2019; Van Der Veer *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2002) (Şekil 2). Fakat kanserli yaşlanan hücrelerin bazılarında metabolik farklılıklar görülebilir. Anti-warburg etkisi olarak adlandırılan bu etki, kanserli yaşlanan hücrelerin bazılarındaki bu metabolik farklılıkları açıklayarak onkogen kaynaklı yaşlanmayı tanımlar (Ogrodnik, 2021). Onkogen temelli yaşlanma ile pasaj sayısı ile ilişkili yaşlanma sürecinde bazı farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin onkogen temelli yaşlanmada glikoliz seviyesi azalırken, pasaj sayısı ile ilişkili yaşlanmada bu seviye artar (M. Li, Durbin, *et al.*, 2013). Yine oksidatif fosforilasyonda artış ve yüksek NAD^+ seviyesi onkogen kaynaklı yaşlanmayı, pasaj sayısı ile ilişkili yaşlanmadan ayıran diğer özelliklerdendir (Kaplon *et al.*, 2013).



Şekil 2. Hücre yaşlanmasında görülen fenotipik değişiklikler (Ogrodnik, 2021)'den Türkçe'ye çevrilmiştir.

Yaşlanmaya bağlı olarak hücrelerde görülen değişimlerden biri de telomeraz aktivitesinin azalmasıyla telomerlerin kısalmasıdır (Bernadotte *et al.*, 2016). Nassrally ve ark. yaptığı bir çalışmada yaşlanan hücrelerde, hücre döngüsünün artışıyla paralel olarak telomerlerin de kısaldığı sonucuna varılmıştır. Telomer uzunluğunun kritik seviyede olması hücrenin yaşlandığını gösterir ve herhangi bir hücrede telomerler kritik bir boyutta değilse genç olarak nitelendirilirler. Orta seviyede bir telomer uzunluğu ise artan pasaj sayısı ile ilişkili yaşlanmanın, bir süreci olarak kabul edilir (Bernadotte *et al.*, 2016).

Yaşlanmayla bağlantılı hücre içi hasarlardan en iyi bilineni DNA'nın çift sarmal yapısındaki hasar (double-strand breaks, DSB) ve lipofusindir. Özellikle primer kültürdeki hücrelerde DNA'nın çift sarmal yapısındaki hasar geri dönüşümü olmayan hatalara sebebiyet vererek yaşlanmayı indükler (Carroll *et al.*, 2017). Lipofusin hücre içinde biriken otofloresans özelliği olan oksitlenmiş ve değiştirilmiş lipid ve proteinlerden oluşur (Terman & Brunk, 2004). Bu molekülün seviyesi, artan pasaj sayısı ile pozitif yönde bir eğilim göstermiştir (Ksiazek *et al.*, 2009; Sitte *et al.*, 2001). Bununla beraber, insan fibroblast hücrelerindeki yaşlanmayı belirlemek için kullanılan Raman, İnfrared (Kızılötesi) spektroskopisi ve akış sitometrisi gibi teknikler, pasaj sayısı ile ilişkili yaşlanmada lipofusin molekülündeki artışın yaşlanmayla bağlantılı olduğunu göstermek için kullanılmışlardır (Eberhardt *et al.*, 2017).

***In vivo* Hücresel Yaşlanma**

In vivo yaşlanma süreci, günümüzde yeni belirteçlerin bulunarak immünohistokimya ve immünohistofloresans gibi yöntemlerin kullanılmasıyla artış göstermiştir (D. J. Baker *et al.*, 2011). Ayrıca yaşlanan fare modellerinin oluşturulması, *in vivo* yaşlanma sürecinin bir model organizma üzerinde izlenmesini sağlamıştır (Demaria *et al.*, 2014; J. Y. Liu *et al.*, 2019). Ancak hala hayvan dokularındaki yaşlanma seviyesini tespit etmek zordur. Çünkü belirteçler tek bir noktaya odaklanarak hücreye özgü tespit yapar. Aşağıdaki tablo birkaç farklı araştırma grubunun buldukları sonuçlar doğrultusunda yaşlanma seviyelerindeki farklılıkları göstermektedir (Tablo 2). Tablo, aynı belirteçler kullanılsa bile farklı dokulardaki yaşlanma seviyesinin değişmesi bakımından önemlidir.

Tablo 2. Farklı araştırma gruplarının *in vivo* yaşlanma üzerine yaptıkları çalışmalar (Ogrodnik, 2021)'den Türkçe'ye çevrilmiştir.

Araştırma grupları	Yaşlanma belirteci	Doku tipi	Yaşlanma oranı
(Iske <i>et al.</i> , 2020)	p16/p21	Deri	%8
(Iske <i>et al.</i> , 2020)	p16/p21	Kalp	%9-10
(D. J. Baker <i>et al.</i> , 2016)	SA- β -gal	Böbrek	%2
(D. J. Baker <i>et al.</i> , 2016)	SA- β -gal	Kalp	%10
(Ogrodnik <i>et al.</i> , 2017)	DSB	Karaciğer	%15
(Ogrodnik <i>et al.</i> , 2017)	Telomer ile bağlantılı DSB	Karaciğer	%15

Hücresel yaşlanmada bir diğer zorluk ise *in vitro* ve *in vivo* hücre ortam şartlarının farklılığından kaynaklanır (Ogrodnik, 2021). *In vivo* ortamda kimi hücreler yaşlanma sürecine girerken diğer hücreler yaşlanmadan kalabilirler. Bu, hücre içi ortamı etkileyeceği için tüm organizmanın yaşlanma sürecini de etkiler (Sun *et al.*, 2014). Bu bağlamda deney sürecinde genç model organizmadan alınan doku ile yaşlandırılmış model organizmadan alınan doku arasında beklenen yaşlılık farkı görülemeyebilir. Bu da *in vivo* ortamlarda dokulardaki yaşlanmanın ayırt edilememesine yol açar. Tüm bu zorluklar, yaşlanmayı *in vitro* ortamda çalışmanın daha akılcı ve avantajlı olduğunu göstermektedir.

Klasik Raman Spektroskopisi

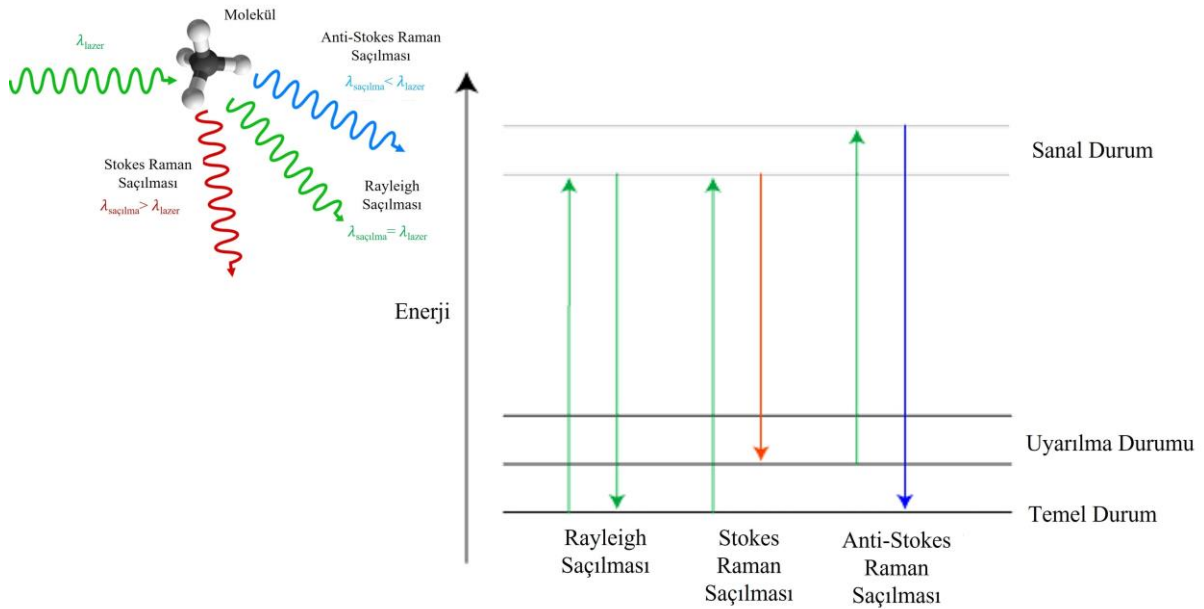
Tarihçesi ve Temel Teorisi

Molekül tek bir dalga boyuna sahip (monokromatik) ışıkla uyarıldığında zaman iki tür saçılma gerçekleşir: Elastik ve Elastik olmayan saçılma (inelastik). Molekül, ışık ile etkileşime girdiğinde zaman çoğunlukla, gelen ile saçılan ışığın enerjisi eşit kalır, bu Rayleigh saçılması başka bir deyişle elastik saçılma değildir. Bu saçılma kuramında ne fotonun enerjisinde ne de fotonun dalga

boyunda herhangi bir değişiklik olmazken inelastik saçılmada fotonun enerjisinde artış veya azalış ile beraber buna eşlik eden fotonun dalga boyunda kayma olur (Das & Agrawal, 2011).

Işığın esnek olmayan (inelastik) saçılımı olarak bilinen Raman etkisi Hintli fizikçi Chandrasekhara Venkata Raman tarafından 1928 yılında keşfedilmiştir (Raman & Krishnan, 1928). Kendisi, bu buluşundan dolayı Nobel Fizik ödölüne layık görülmüştür (Krishnan & Shankar, 1981). Bu etki kısaca, gelen ışığın enerjisi ile saçılan ışığın enerjisi arasındaki farklılıktan kaynaklanır.

Inelastik saçılma kendi arasında ikiye ayrılır. Işık, molekülden titreşim enerjisi kazanabiliyorsa bu anti-Stokes saçılması, tam tersi molekül ışıktan titreşim enerjisi kazanabiliyorsa Stokes saçılması olarak tanımlanır (Şekil 3).



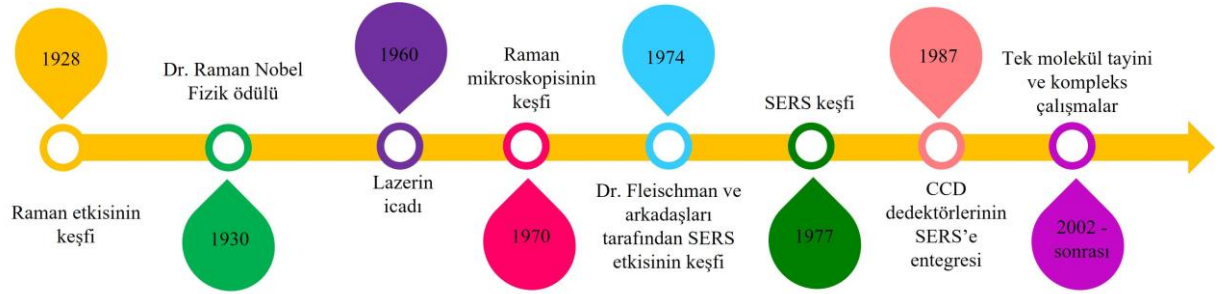
Şekil 3. Molekülün ışık ile uyarılması sonucu meydana gelen enerji değişimleri (Leito, 2022; S. Gorelik, 2002)'den Türkçe'ye çevrilmiştir.

Raman spektroskopisi ise molekülün titreşimsel bilgisini vermek amacıyla inelastik saçılma kuramını kullanan spektroskopi tekniğidir. Molekül ile etkileşen ışığın dalga boyuna göre saçılan ışığın dalga boyunda oluşan farklar Raman kayması (Raman shift) olarak adlandırılır. Molekülün kimyasal yapısı saçılmadan sorumludur, aynı zamanda dalga boyundaki kaymanın da temel sebebidir. Bir Raman spektrumu, cm^{-1} (dalga boyu) dalga sayısındaki Raman saçılmasına karşılık gelen sinyal şiddet (rastgele birim, arbitrary units) grafiği çizilerek elde edilir (Gaba *et al.*, 2022).

Raman spektroskopisinde uyarma kaynağı olarak argon iyonu (488,0 ve 514,5 nm), kripton iyonu (530,9 ve 647,1 nm), He-Ne (632,8 nm) ve diyot (830 ve 785 nm) lazerleri gibi lazerler hâlihazırda kullanılmaktadır. Bu lazerlerin dalga boyu kısa olanları dalga boyu uzun olanlara kıyasla daha yoğun bir Raman saçılması oluşturma potansiyeline sahiptir. Ayrıca bahsi

geçen lazerlerin uygulama alanları da farklılık göstermektedir (Z. Li *et al.*, 2014). Örneğin 785 nm dalga boyuna sahip lazer biyolojik örneklerin ve polimerlerin analizinde kullanılıyorken argon iyon (488,0 ve 514,5 nm) lazeri sanat, arkeoloji ve adli tıp gibi alanların çalışmalarında kullanılmaktadır.

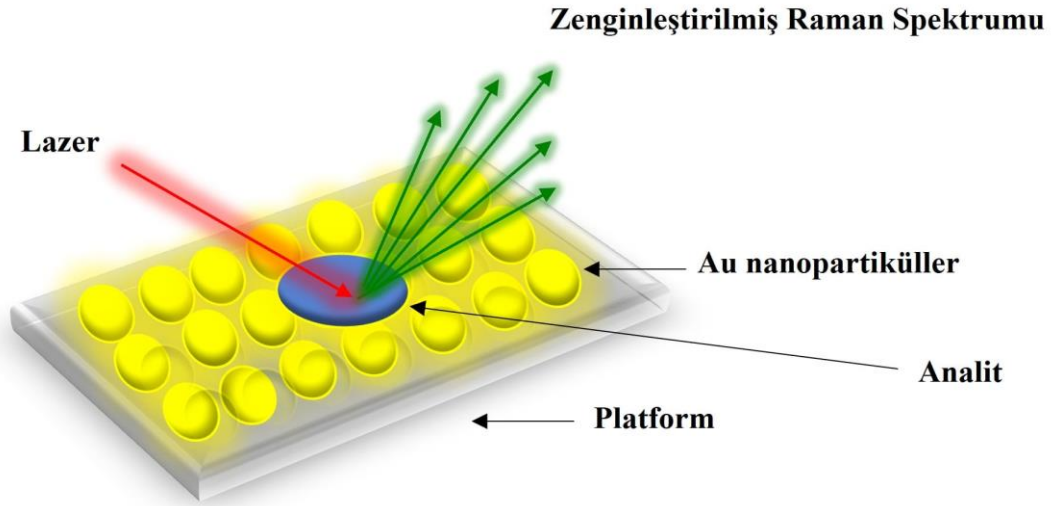
Raman spektroskopisi zamanla büyük gelişim ve değişim göstermiştir (Şekil 4). Bu teknikteki dönüm noktası 1960'lı yıllarda lazerin icadıyla başlamıştır. Mikroskopinin Raman cihazına entegrasyonu ile beraber mikroskopik Raman ortaya çıkmıştır. İlerleyen yıllarda 10^8 fotondan sadece 1'ini oluşturan Raman saçılmasını artırmak için SERS yaklaşımı keşfedilmiştir. Bu keşifle beraber çalışmaların sayısı artmış, kameralarda kullanılan yük bağlı cihazların (Charged-coupled detector, CCD) bu sisteme entegrasyonu ile büyük bir ilerleme kaydedilmiş, ölçüm süresi kısalmış ve hassasiyet artmıştır.



Şekil 4. Raman spektroskopisinin tarihsel gelişimi.

Yüzey-zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface-enhanced Raman Spectroscopy SERS)

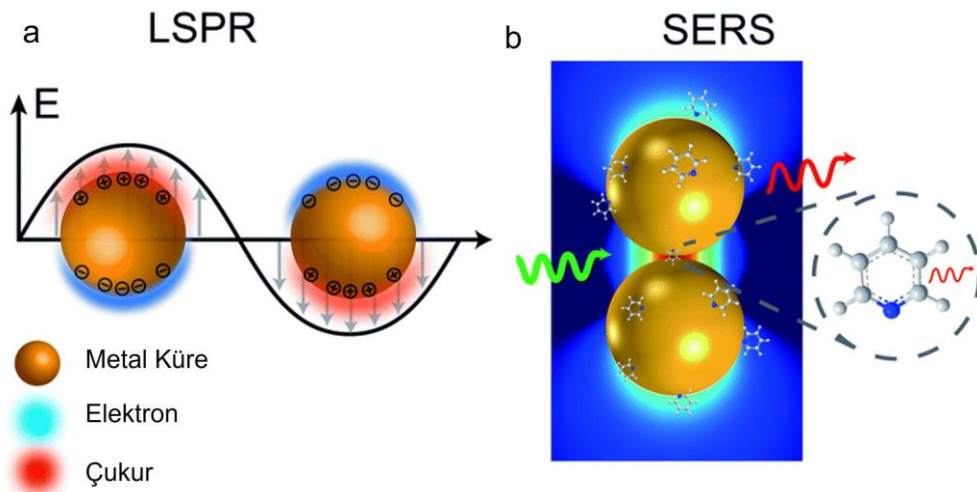
Geleneksel Raman spektroskopisi, zayıf sinyal şiddeti (saçılan 10^8 fotondan sadece ~ 1 'i Raman etkisi oluşturması) ve özellikle bazı biyolojik örneklerin lazer ile uyarıldığında çok fazla emisyon (lüminesans) yapması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu dezavantajlar SERS'in keşfiyle birlikte önemli ölçüde ortadan kaldırılmıştır. SERS plazmonik yapıdaki nanoparçacıkların (özellikle 100 nm'den küçük olanlar) kullanılarak Raman sinyal şiddetinin artırılmasına dayanan bir tekniktir (Şekil 5). Artırılan Raman sinyal şiddetinin değeri zenginleştirme faktörü (enhancement factor, EF) olarak nitelendirilir. Bu değer molekül sayısının (N), elde edilen Raman sinyal şiddetine (I) bölünmesiyle hesaplanır.



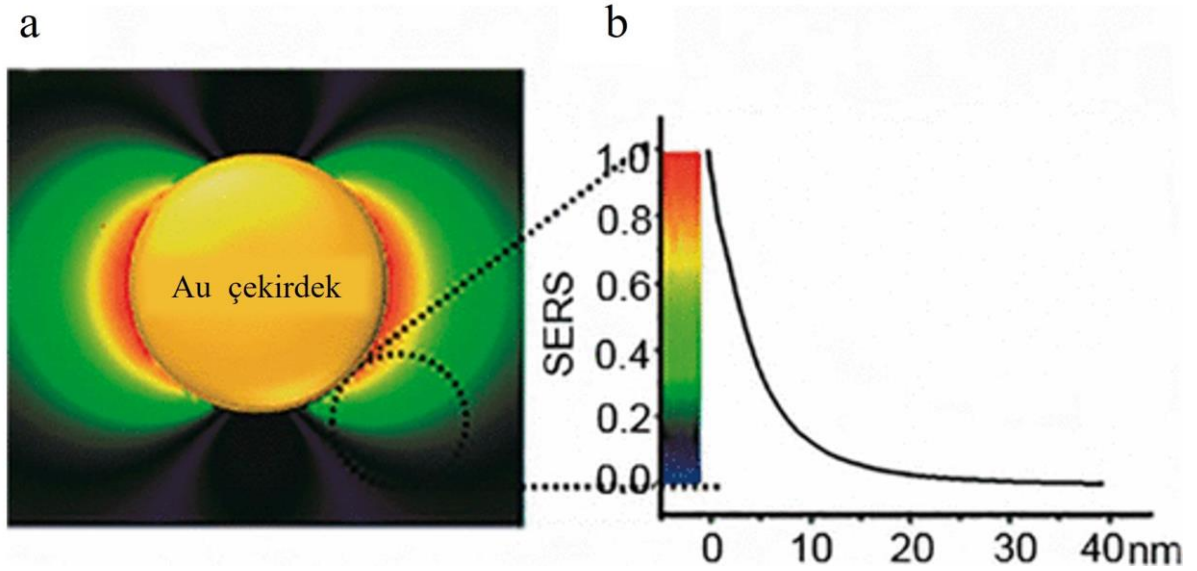
Şekil 5. Yüzey güçlendirilmiş Raman saçılmasının şematik gösterimi.

Burada rol alan mekanizmalar hala tartışılmakta olup iki önemli mekanizma öne çıkmaktadır. Bunlardan ilki elektromanyetik zenginleştirme (Electromagnetic enhancement, EM), ikincisi kimyasal zenginleştirmedir (Chemical enhancement, CHEM).

Işık ile uyarılan metal küre elektrik alanının yönüne bağlı olarak elektron bulutu oluşturur. Oluşan elektron bulutu yoğun plazmonik etkiyi tetikler. Bu plazmonik etki yüzeyde de oluşabilir (surface plasmon resonance, SPR) veya sadece belli bir alanda (localized surface plasmon resonance, LSPR) etkileyebilir (Şekil 6). Bu sistem ile elektronlar salınım yaparak elektromanyetik zenginleştirmeyi oluşturur ve zenginleştirme faktörünü 10^{12} kat artırır (Pérez-Jiménez *et al.*, 2020). Metal küre etrafında oluşan elektrik alan dağılımı ve oluşan SERS etkisi Şekil 7’de gösterilmiştir.

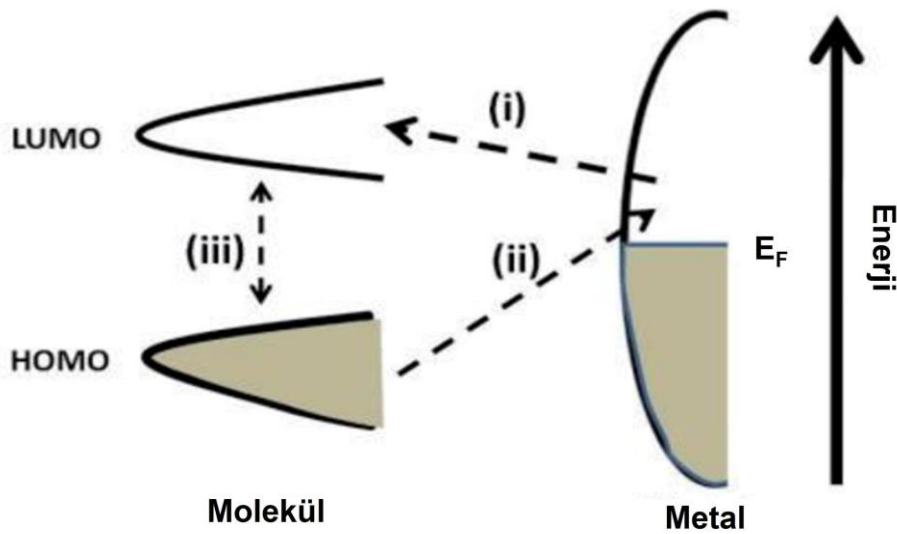


Şekil 6. Lokalize yüzey plazmon rezonans etkisi (a), metalik nanopartikül yüzeyi üzerinde oluşan sıcak bölgelerin (hot-spot) gösterimi (b) (Ding *et al.*, 2016; Pérez-Jiménez *et al.*, 2020)’den Türkçe’ye çevrilmiştir.



Şekil 7. Altın metal küre üzerindeki elektrik alan dağılımı ve çekirdeğe yaklaştıkça oluşan SERS etkisi (a, b) (Zong *et al.*, 2018)’den Türkçe’ye çevrilmiştir.

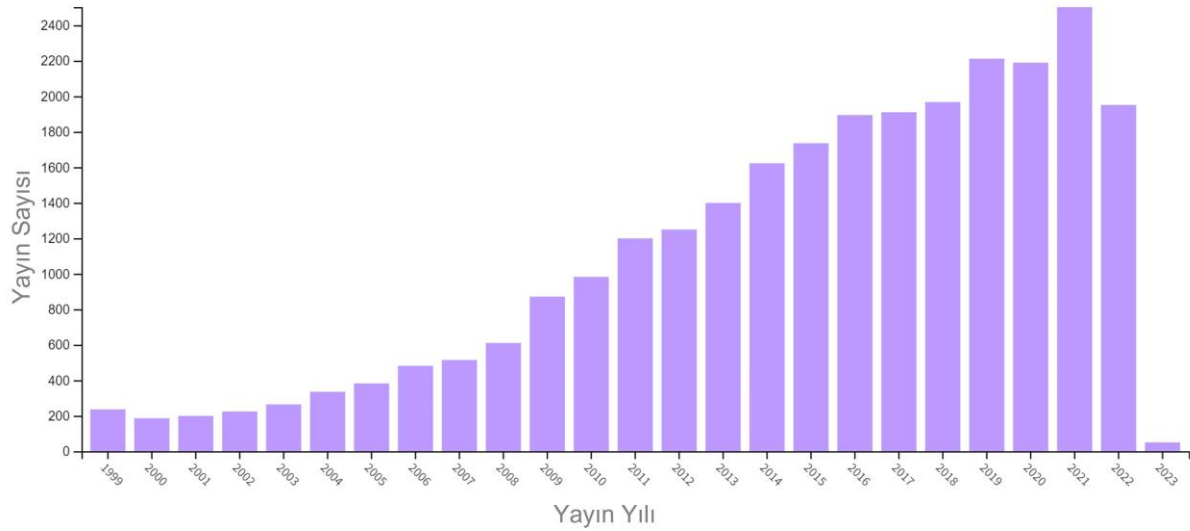
Kimyasal zenginleştirme, analit ile metalin yük transferi mekanizmasına dayanır ve zenginleştirme faktörünü 10^2 - 10^4 kat artırır (Pilot *et al.*, 2019). Yük transferinde metal ile molekül birbirleri arasında elektronik olarak eşleşirler, eşleşme lazerin dalga boyuna bağlı olarak gerçekleşir. Bu işlemi kısaca özetlemek gerekirse metalin Fermi seviyesine (E_F) göre molekülün en düşük boş moleküler orbitali (lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) ile en yüksek dolu moleküler orbitali (highest occupied molecular orbital, HOMO) arasında elektron değişimi meydana gelir. Bu, molekülden metale ya da metalden moleküle olabilir (Şekil 8). Tüm bunlar kimyasal zenginleştirme mekanizmasını oluşturarak Raman etkisi ile saçılmanın artışına sebebiyet verir (Cardona & Giintherodt, 1984).



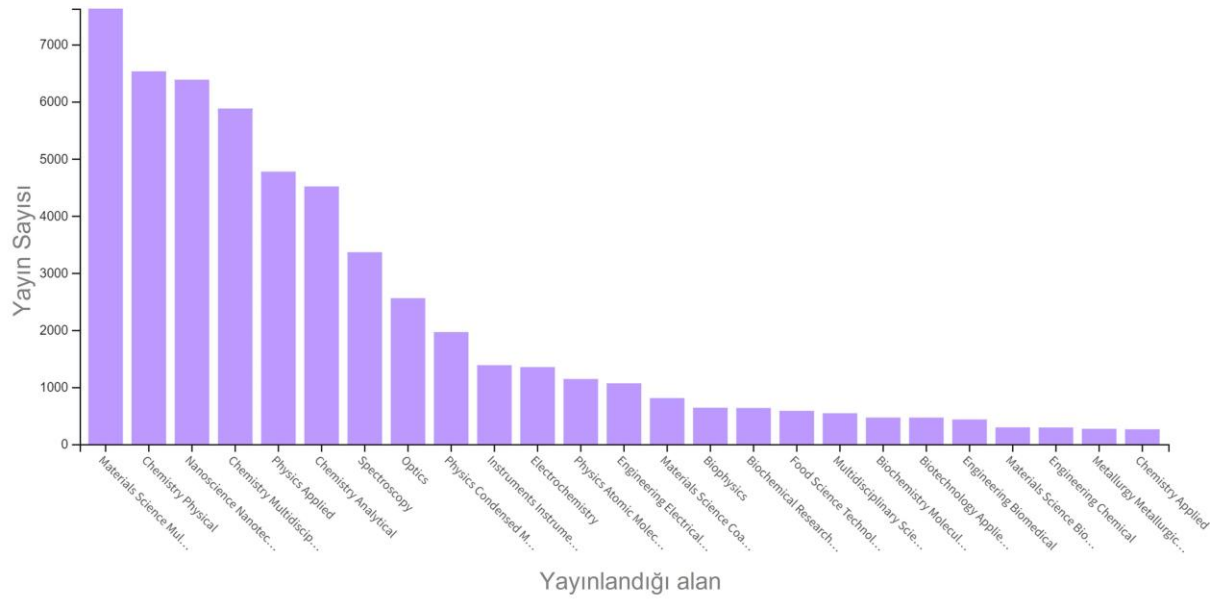
Şekil 8. Kimyasal zenginleştirmede tasvir edilen metal ile molekülün enerji seviyesi diyagramı. Kesikli oklarla yük transferi gösterilmiştir (Pfukwa, 2016)’dan Türkçe’ye çevrilmiştir.

SERS temelli araştırmalarda en çok kullanılan plazmonik soy metaller altın (Au), gümüştür (Ag). Gümüş nanopartiküller bütün görünür bölge spektrumunda (380-750 nm) plazmon rezonans oluşturarak güçlü SERS sinyali geliştirir. Fakat bu ilgi çekici özelliklerine rağmen yüksek toksisite oluştırmaları *in vivo* alışmalarda kullanımını zorlaştırmıştır. Altın nanopartiküller ise yüksek biyouyumluluğu, toksisite oranının dūřukluėu, kolay işlenebilmesi, kararlı ve inert olması gibi avantajları sebebiyle biyomedikal uygulamalarda en çok kullanılan SERS substratı olmuştur (Ganesh *et al.*, 2020; Shan *et al.*, 2018; Zhong Xiao *et al.*, 2010).

SERS; çok küçük miktarda analit ile çok kısa sürede tespit yeteneği, suyun spektrumu oldukça zayıf olduğu için biyolojik sıvılarda kullanımı, kolayca hazırlanabilen örneklerin tespiti, farklı komponentlerin aynı anda tespiti hatta bazı durumlarda zenginleştirme faktörü artırılarak üretilen alt taşlarla tek molekül tespitine bile izin veren bir tekniktir (Etchegoin & Le Ru, 2008; K. Kneipp *et al.*, 1997; Nie & Emory, 1997; Zrimsek *et al.*, 2016). Bu sebepten dolayı gıda, kimya, yaşam bilimleri, fizik, evre, malzeme, adli bilimler, uzay, sanat dahil olmak üzere çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (şekil 9-şekil 10).



şekil 9. SERS ile yapılan araştırmaların yıllara göre değişimi (Web of Science (22.11.2022), anahtar kelime SERS olarak taranmıştır).

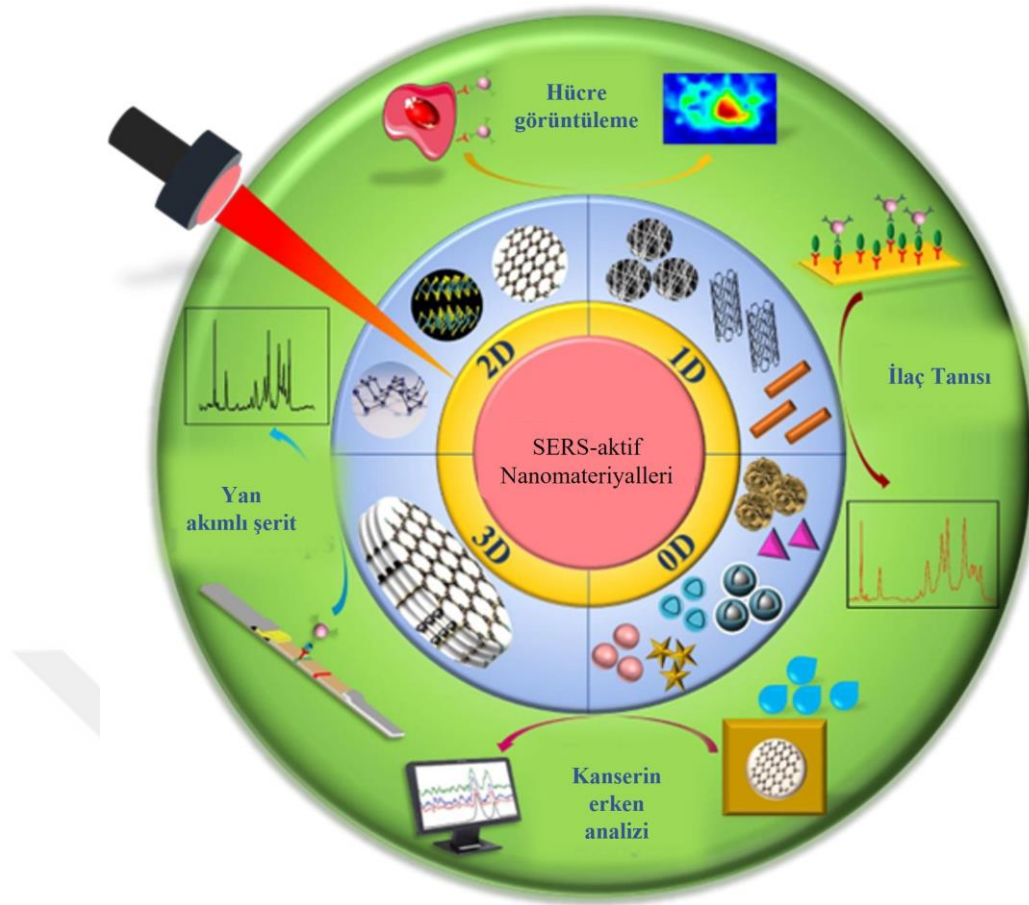


Şekil 10. SERS ile yapılan araştırmaların alanlara göre değişimi (Web of Science (22.11.2022), anahtar kelime SERS olarak taranmıştır).

SERS ile Yapılan Biyolojik Uygulamalar

Sağlık alanında ortaya çıkan sorunlar yeni teknolojilerin kullanılmasını gerektirmektedir. Hızlı, yerinde, ucuz, kolay, hassas sensör sistemleri günümüzde olduğu gibi gelecekte de en çok ihtiyaç duyacağımız ve geliştirmek için çaba harcayacağımız yapılar olacaktır. Sensör sistemlerin en pratik olanları (glikoz sensörü, gebelik test kitleri) hâlihazırda kullanılmakta olup yeni nesil ekipmanlarla donatılmış sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sistemlere en büyük katkı ve yararı sağlayan SERS sistemleri biyogörüntüleme ve biyosensör olarak kullanılmaktadır (Şekil 11).

SERS biyosensörleri, ilaç izleme (Fu *et al.*, 2014; Lorén *et al.*, 2001; McLaughlin *et al.*, 2002; Vicario *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2009; L. Yang *et al.*, 2015), hastalık ve patojen tespiti (F. Chen *et al.*, 2016; Driskell *et al.*, 2010; C. Y. Liu *et al.*, 2016; Negri *et al.*, 2014; Norouz Dizaji *et al.*, 2021; Tripp *et al.*, 2008; X. Wu *et al.*, 2013, 2015), biyobelirteçlerin tespitinde (Driskell *et al.*, 2008; M. Li, Cushing, *et al.*, 2013; G. Wang *et al.*, 2011; H. N. Wang *et al.*, 2016; L. P. Ye *et al.*, 2014; W. Zhou *et al.*, 2017), hücre görüntüleme ve *in vivo* tümör tespiti (Harmsen *et al.*, 2015; Z. Huang *et al.*, 2016; Jokerst *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2015; J. Li *et al.*, 2016; Oseledchik *et al.*, 2017; Qian *et al.*, 2008; S. Ye *et al.*, 2017) gibi birçok alanda yapılan çalışmalar vardır ve hâlihazırda devam etmektedir.



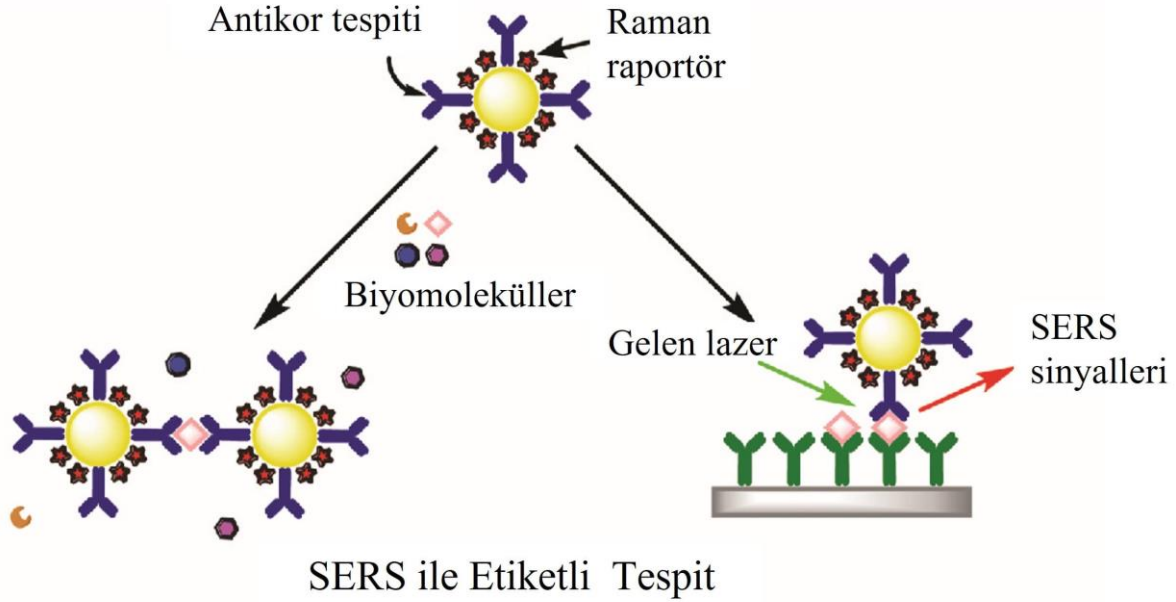
Şekil 11. Biyomedikal uygulamalarda SERS ile farklı boyut ve morfolojide üretilen SERS platformları (Z. Huang *et al.*, 2019)’dan Türkçe’ye çevrilmiştir.

Yapılan tüm bu çalışmalardaki moleküllerin, SERS ile tespitinde iki önemli yol kullanılmaktadır.

Etiketli SERS tespit yöntemleri ve biyolojik uygulamaları

Etiketsiz SERS tespitinde, spektrum sayısında artış ile anlamlı ve verimli bilgiler çıkarmak zorlaşır ve karmaşık veriler ortaya çıkar. Ayrıca bazı moleküllerin sinyalleri çok zayıf olduğu gibi bu moleküllerin diğer moleküller tarafından kapatılma ihtimalide vardır. Ek olarak SERS ile elde edilen spektrum bilgisi analitin varlığı ile fiziksel veya kimyasal özelliklerini de gösterir. Örneğin pH ve sıcaklık gibi fiziksel özellikler etiketsiz SERS tespit yöntemleriyle izlenemez. Bu durumda daha etkili bir tespit sağlanması adına etiketli SERS tespit yöntemleri kullanılmıştır (Zong *et al.*, 2018). Etiketli tespit yöntemi dolaylı tespit yöntemi olarak da adlandırılır. Ana yapı plazmonik malzeme, Raman raportör molekül ve hedef ligantlardan oluşur (Şekil 12). Nanoyıldız, nanoçiçek, nanoküp gibi yapılar ana yapının morfolojisini oluşturabilir. Plazmonik malzeme olarak altın-gümüş kolloidal nanoparçacıklar kullanılıp SERS sinyali de bu malzemeler tarafından üretilir (Shan *et al.*, 2018). Burada kullanılan SERS etiketleri, floresan etiketlere benzetilir. Fakat floresan etiketleri, SERS etiketlerinin sahip olduğu ışıkla ağarmama, tek tip dalga boyu ile uyarılan molekülde çok yönlü bilgi, kızılötesine

yakın bölgede (near infrared reflectance, NIR) uyarılan molekülün düşük otofloresans oluşturması gibi avantajlara sahip değildir (Zong *et al.*, 2018). Etiketli tespitte en önemli nokta yüksek duyarlılık, özgünlük ve seçiciliğe sahip olan SERS etiketlerini üretmek ve iyileştirmektir. Bu sebeple SERS etiket yapısı her geçen gün yeni bakış açılarıyla zenginleşmektedir.



Şekil 12. Etiketli SERS tespit yöntemi (Nguyen *et al.*, 2017)’den Türkçe’ye çevrilmiştir.

SERS etiketlerinde kullanılan Raman raportörleri, kendine özgü bir Raman pikine sahip olmalı, değişen-karmaşık hücre içi ortamında stabilitesini koruyabilmeli ve plazmonik malzemelerle iyi derecede birleşme eğilimine sahip olmalıdır (Z. Wang *et al.*, 2017). Bu raportörlerin fonksiyonel grupları tiyoller, izotiyosiyanatlar ve aminlerden oluşur. Tablo 3 SERS için kullanılan bazı Raman raportörlerini göstermektedir.

Tablo 3. Raman raportör molekülleri ve özellikleri (Shan *et al.*, 2018)’den Türkçe’ye çevrilmiştir.

Raman raportör molekülleri	Özellikleri
Malahit yeşili	Absorbsiyon dalga boyu 616 nm, floresan değil, suda çözünürlüğü zayıf
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik) (DTNB)	Absorbsiyon dalga boyu 305 nm, floresan değil, suda çözünürlüğü iyi
Rodamin 6G	Floresan
Kristal viyole	Ucuz
Metilen mavisi	Ucuz, floresans değil

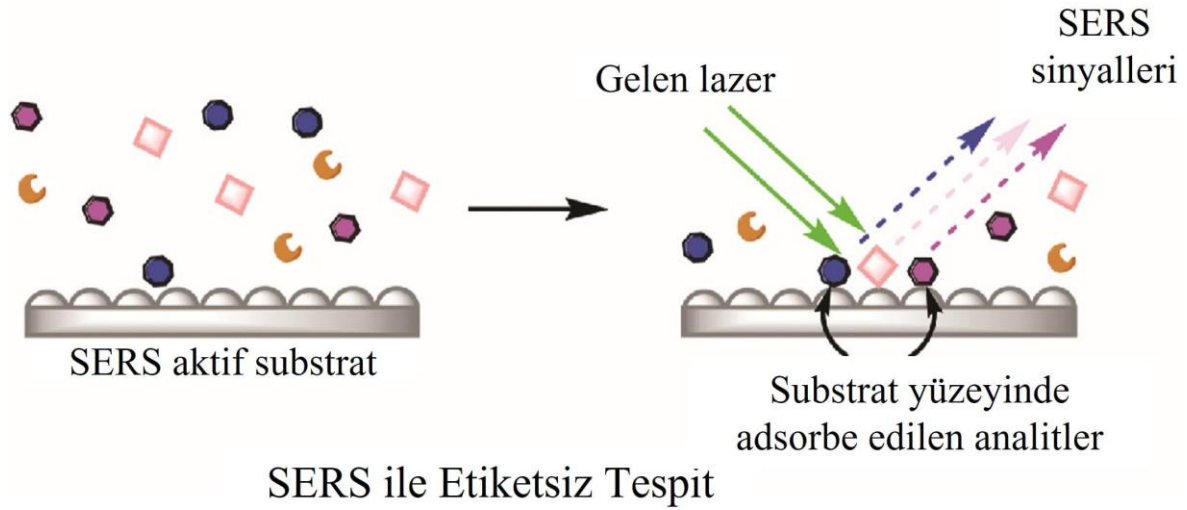
SERS ile tespitte plazmonik yapı ve Raman raportör ne kadar iyi tasarlanırsa teşhis o derece hassas olacaktır. *In vivo* ve *in vitro* her iki uygulamada da kullanılan SERS etiketli tespit yöntemi için daha hassas ve daha karalı bir yapı oluşturmak amacıyla literatürde kabuk sistemi önerilmiştir. Plazmonik nanoyapıyı ve Raman raportör molekülü bir katman halinde saracak yapı deabsorbsiyonu ortadan kaldırır, istikrarlı SERS sinyalleri sağlar ve hedef moleküle entegrasyonu kolaylaştırır (Shan *et al.*, 2018). Antikorlar, polietilen glikol (PEG), polimerler, silika ve biyolojik türev benzeri malzemeler bu etiketlerde koruyucu bir katman oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır (M. Li *et al.*, 2012, 2014; Truong *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2008). Bu malzemeler kolayca elde edilebilir, ucuz, biyouyumlu ve hidrofilik yapıdadırlar (Mulvaney *et al.*, 2003; Selvan *et al.*, 2005). Etiketli SERS tespit yöntemi, hücre görüntüleme, protein, DNA tespiti ve kanser teşhisinde yaygın olarak uygulanmaktadır. Bu teşhiste süreklilik dezavantajlardan biridir ve özellikle kanserin teşhisinde kullanılan biyobelirteçler düşük algılamayla sonuçlanabilir. Aynı zamanda floresans boyalar-kuantum noktalarla kıyaslandığında boyutları daha büyük olduğu için hücresel alımı etkileyerek algılama ve teşhis oranını düşürmektedir.

Cao ve ark., yaptığı çalışmada Ag nanoyapı Raman boyası ile etiketlenmiş, antikor koruyucu kabuk ile hedef proteine özel yapı tasarlanarak protein tespiti yapılmıştır (Cao *et al.*, 2003). Diğer bir çalışmada Ag yüzey üzerine DNA oligonükleotitleri sabitlenmiş, Raman raportör olan Rodamin türevleri kullanılarak kanser geni (BRCA1 ve BAX geni) tespiti başarıyla gösterilmiştir (Vo-Dinh *et al.*, 2002). Farelerde tümör tespitini göstermek adına yapılan diğer çalışmada altın nanoçubuklar SERS aktif molekül ile etiketlenerek gerçekleştirilmiş olup koruyucu kapsül olarak PEG polimeri kullanılmıştır (Von Maltzahn *et al.*, 2009). Kneipp ve ark., altın nanopartikülleri iki farklı SERS aktif molekülü ile etiketleyerek canlı hücreleri görüntülemiştir (J. Kneipp *et al.*, 2009). Ag nanopartiküllerin kullanıldığı çalışmada ise yapı SERS noktacılarla etiketlenerek antikor ile işlevselleştirilmiş, kanser biyobelirteçleri tespit edilmiştir (J. H. Kim *et al.*, 2006). Prostat dokularındaki proteini tespit etmek için yapılan çalışmada Lutz ve ark., Ag nanopartikülleri bir Raman molekülü ile etiketlemiştir. Antikor ile işlevli hale getirilen etiket, dokulardaki proteini saptamıştır (Lutz *et al.*, 2008). Shi ve ark., yaptığı dikkate değer çalışmalardan biri de Ag-Au nanopartiküller kullanılarak kolon kanser dokularında ve Hela hücrelerindeki telomeraz aktivitesinin belirlenmesidir (M. Shi *et al.*, 2016).

Etiketsiz SERS tespit yöntemleri ve biyolojik uygulamaları

Aynı zamanda doğrudan tespit yöntemi olarak da adlandırılan etiketsiz SERS tespit sistemi, numuneyi direkt algılama ve tanı yeteneği sunduğu için etiketli tespit yöntemine göre

iyi bir avantaja sahiptir (Zong *et al.*, 2018). DNA ve bazlarının, hücrel bileşenlerin, protein ve biyomoleküllerin, metabolitlerin tespitinde, hücre tanımlama ve sınıflandırmada (patojen, kanser hücreleri), hücrel süreçlerde (hücre döngüsü, apoptoz süreci, farklılaşma), canlı hücrelerin tespitinde etiketsiz SERS tespit sisteminden yararlanılır (Langer *et al.*, 2020) (Şekil 13).



Şekil 13. Etiketsiz SERS tespit yöntemi (Nguyen *et al.*, 2017)'den Türkçe'ye çevrilmiştir.

Bu yöntemde özellikle gümüş, altın, koloidal nanopartiküller ve yarı iletkenler tespiti yapılmak istenen analitin, Raman sinyalini geliştirmek ve artırmak için SERS sistemine entegre edilmiştir (Aroca *et al.*, 2005). Mikro RNA; gen ekspresyon seviyesini düzenleyen ve birçok hastalığın biyobelirtecini tespitinde kullanılan RNA dizileridir. Ag koloidal nanopartiküller, miRNA'lar ile hastalık biyobelirteçlerinin tespitinde, tek zincirli RNA bazlarını belirlemede ve Raman sinyal şiddetini yükseltmek amacıyla sıklıkla kullanılmıştır (Lu & Lipson, 2010). Ag koloidal nanopartiküller ile yapılan diğer bir çalışmada ise prostat kanseri olan kişilerin idrar numunelerinden elde edilen RNA örneklerinin prostat kanserini saptamada oldukça etkili olduğu görülmüştür (J. Wang *et al.*, 2017).

Altın koloidal nanopartiküllerin, biyoyumluluğu ve toksisite oranının düşük olması hücre bileşenlerini belirlemek için yapılan çalışmalarda kullanılmalarını sağlamıştır. Nitekim Kneipp ve ark., yaptığı çalışmada bu parçacıkların boyutu, şekli, yüzey modifikasyonları uygun bir şekilde ayarlanarak kan beyin bariyeri gibi hücre içerisinde bulunan bağışıklık sistemlerinden kaçabilecek bir yapı ile yerinde teşhis için sadece o bölgede etkinlik gösterebilecek yapılar üretilmiştir (K. Kneipp *et al.*, 1997). Kneipp ve ark., yaptığı başka bir çalışmada belli bir boyutta (60 nm) altın koloidal nanoparçacıklar sonikasyon yardımıyla hücrel alımı (cellular uptake) gerçekleştirilmiş, Raman sinyal şiddeti artırılarak HT29 kolon

kanseri hücre hattı kesitinde hücre bileşen bilgisi, DNA ve fenilalanin bantları belirlenmiştir (K. Kneipp *et al.*, 2002). Burada şimdiye kadar hücre dışı ortamda üretilen partiküllerin komponentle etkileşiminden bahsettik. Fakat, partiküllerin hücre içerisinde üretilerek tespit yeteneğinin olduğu çalışmalarda hâlihazırda vardır. Bu çalışmalarda indirgeyici ajanların konumu çoğunlukla sitoplazma ve çekirdek olduğu için nanopartiküllerin büyük bir kısmı da burada toplanır. Ek olarak hücre dışında üretilen nanoparçacıklardan alınan SERS sinyalleri ile burada elde edilen SERS sinyalleri farklılık gösterir (Zong *et al.*, 2018). Jarvis ve ark., Ag-Au tuz çözeltilerini hücre içerisine ekleyerek doğal yoldan nanopartiküller üretmiş ve bunları bakteri tespitinde kullanmıştır (Jarvis *et al.*, 2008). Norouz Dizaji ve ark. yaptığı çalışmada, SERS platformu olarak altın nanorod çubuklar ve kolloidal altın nanopartiküller kullanarak vankomisine dirençli gram pozitif bakterileri tespit etmeye çalışmışlardır. Sonuçlar kemometrik analizler yapılarak başarıyla gösterilmiştir (Norouz Dizaji *et al.*, 2021). Vitol ve ark., yaptığı diğer bir çalışmada pasif algılama sistemlerinden farklı olarak Au nanoparçacıklar kapiler bir nanopipet sistemine veya mikrofiber yüzeylere entegre edilerek aynı zaman diliminde enjekte edilen ilaçların metabolizması izlenmiştir (Vitol *et al.*, 2009). Diğer bir çalışmada ise kapiler nanopipet, karbon nanoelektrotlar ile modifiye edilerek altın nanoelektrot oluşturulup canlı hücrelerdeki DNA hasarı başarıyla tespit edilmiştir. (J. Zhou *et al.*, 2021)

Farklı kanser türlerini belirlemek için Feng ve ark., yaptığı başka bir çalışmada Ag nanopartiküller ile kan plazması karıştırılmış lazerin polarizasyonu kullanılarak mide kanseri kolayca tespit edilmiştir (Feng *et al.*, 2011). Zhu ve ark., yaptığı bir çalışmada altın nanopartiküller meme kanseri hücresinde biriktirilmiş ve altın agregatları geçirimli elektron mikroskobu (transmission electron microscopy, TEM) ile gösterilmiş, haritalama yapılarak fenilalanin biyomolekülünün sahip olduğu C-H bandı gösterilmiştir (Zhu *et al.*, 2013). Sağlıklı hücrelerden kanserli hücreleri ayırt etmek için de bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda hücre içeriğine, nükleik asitler, proteinler, karbonhidrat ve lipid bantlarına bakılarak ayırım gerçekleştirilmiştir. Haldavnekar ve ark., yaptığı plazmonik olmayan 3D ZnO yarı iletken bir substrat üretilerek kanserli- kanserli olmayan hücre ayırımı, DNA-RNA-protein-lipid bant lokasyonlarına bakılarak gerçekleştirilmiştir (Haldavnekar *et al.*, 2018). Pal ve ark., yaptığı diğer bir çalışmada ise gümüş/çinko oksit/altın (Ag/ZnO/Au) 3D süperhidrofobik hibrit yapı oluşturularak DNA tespiti sağlanmıştır (Pal *et al.*, 2019). Kanserli-kanserli olmayan hücre ayırımı için yapılan diğer bir çalışmada çok kuyucuklu PDMS kalıp ile altından üretilen nanotabaka SERS substratı birleştirilerek hücrelerin bu kuyucuklara kültürlenip nanoanten yapılara bağlanması sağlanmıştır. SERS ölçümlerinin yapılması ile ayırım doğrulanmıştır (Ren *et al.*, 2020).

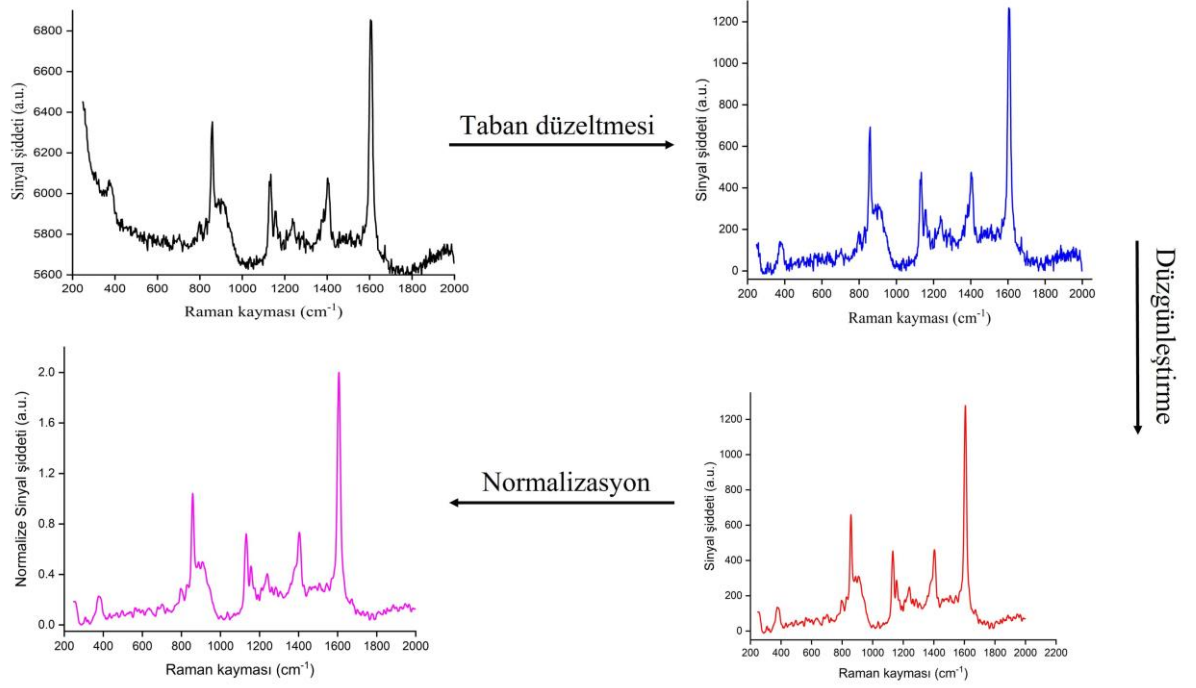
Ganesh ve ark., yaptığı dikkat çekici bir çalışmada kuantum boyutunda yarı iletken bir prob üretilerek kanserli hücrelerin kanserli olmayanlardan ayrımı ile DNA modifikasyonunda kritik rol oynayan kanser kök hücrelerinin biyobelirteci olarak kullanılan iki genin ekspresyonunun farklı kanser hücrelerinde takip edilebilmesini sağlamıştır (Ganesh *et al.*, 2020). Ma ve ark., yaptığı bir çalışmada tıbbi mantarlardan izole edilen anti inflamatuvar bir etkinliğe sahip olan *Cordycepin*'in kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği Ag nanopartiküller kullanılarak gösterilmiştir (Ma *et al.*, 2019). Başka bir çalışmada silikon nanosütun (nanopillar) bir substrat üzerine biriktirilen Au-Ag çekirdek kabuk (core-shell) SERS alt taşı üretilmiş ve yine DNA metilasyonunun iki farklı yolağı değerlendirilip metillenmiş DNA ile metillenmemiş DNA tespiti yapılmıştır (Abid Hasan *et al.*, 2019).

Huefner ve ark., yaptığı bir çalışmada Au nanoparçacıklar, çekirdeğe hedefli bir SERS probuna dönüştürülerek nöronal hücrelerin farklılaşma potansiyeli değerlendirilmiştir. Çekirdekten alınan bilgiler doğrultusunda DNA-RNA oranındaki artış ve proteinler tanımlanarak farklılaşma gösterilmiştir (Huefner *et al.*, 2013). Bu konu ile ilgili diğer bir çalışmada ise farelerin nöronal kök hücreleri üzerinde yapılmıştır. ITO (indiyum kalay oksit) kaplı cam ile altın nanoyıldızlar (nanostars) birleştirilerek oluşturulan SERS platformu ile DNA içeriğindeki artış-azalışlara bakılarak protein miktarı değerlendirilmiş, farklılaşma kanıtlanmıştır (El-Said *et al.*, 2015).

SERS substratları ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda biyotaklitten yararlanılarak arı ve sinek kanadına benzeyen yapılar oluşturulmuş ve bu substratların uygulama potansiyelleri hâlihazırda devam etmektedir (He *et al.*, 2017; G. C. Shi *et al.*, 2018).

SERS Verilerin Ön İşlenmesi

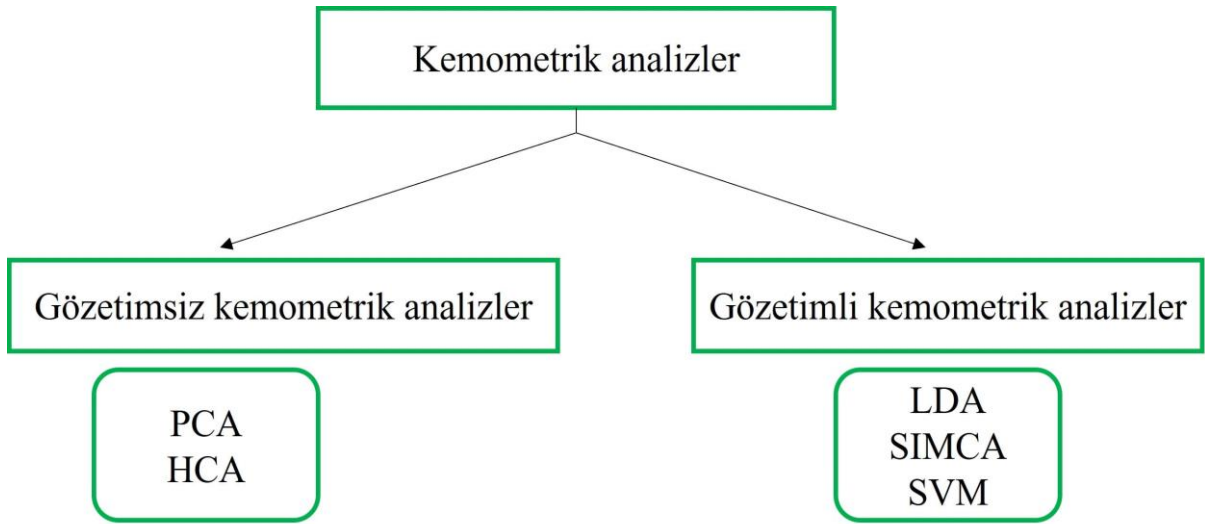
Ham veriler ile yapılan analizlerin, ön işlenen verilere kıyasla anlaşılması zor ve daha kısıtlı bilgi sunduğu bilinen bir gerçektir. Bu yüzden tüm veriler, istatistiksel olarak değerlendirilmeden önce bazı ön işleme süreçlerinden geçmesi gerekir. Ön işleme anlamsız varyasyonları ortadan kaldırır ve gürültüyü (spektrumda istenmeyen bozulma) azaltır (Y. Wu & Chen, 2017). Ek olarak analizlerin güvenilirliğini ve doğruluğunu artırarak hem araştırmacı hem de algoritma tarafından yorumlamayı kolaylaştırır (M. J. Baker *et al.*, 2010; Khanmohammadi *et al.*, 2009; Siqueira & Lima, 2016). Boyutu düşürerek çok fazla sayıdaki verinin sebep olduğu karmaşıklığı da ortadan kaldırır. Ön işleme; taban düzeltmesi (baseline correction), düzgünleştirme (smooth) ve normalizasyon (normalization) dan oluşur (Şekil 14).



Şekil 14. Veri ön işleme basamakları.

SERS Verilerinin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

SERS ile yapılan çalışmalarda elde edilen her bileşenin spektrum bilgisi, kemometrik yöntemler kullanılarak verilir. Kemo kimyasal bileşen, metrik ölçüm sistemleri demektir, ikisinin birleştirilmesiyle ortaya çıkan kemometrik kavramı kimyasal bileşenlerin ölçülebilmesi anlamına gelir. Bu ölçüm yöntemleri, çok değişkenli veri analizlerine (multivariate data analysis, MVA) dayanır ve tek bir spektrum yerine tüm SERS spektrumu kullanılır (Langer *et al.*, 2020). Çok değişkenli analiz yöntemleri sağlık, gıda, kimya, ilaç, sanat gibi birçok alanda kullanılmıştır. Bu analizler ile kompleks ve karmaşık SERS verilerinin boyutları küçültülerek, yorumlanır hale getirilir. Çok değişkenli analiz yöntemleri gözetimsiz kemometrik yöntemler ve gözetimli kemometrik yöntemler olmak üzere iki gruba ayrılır (Şekil 15).



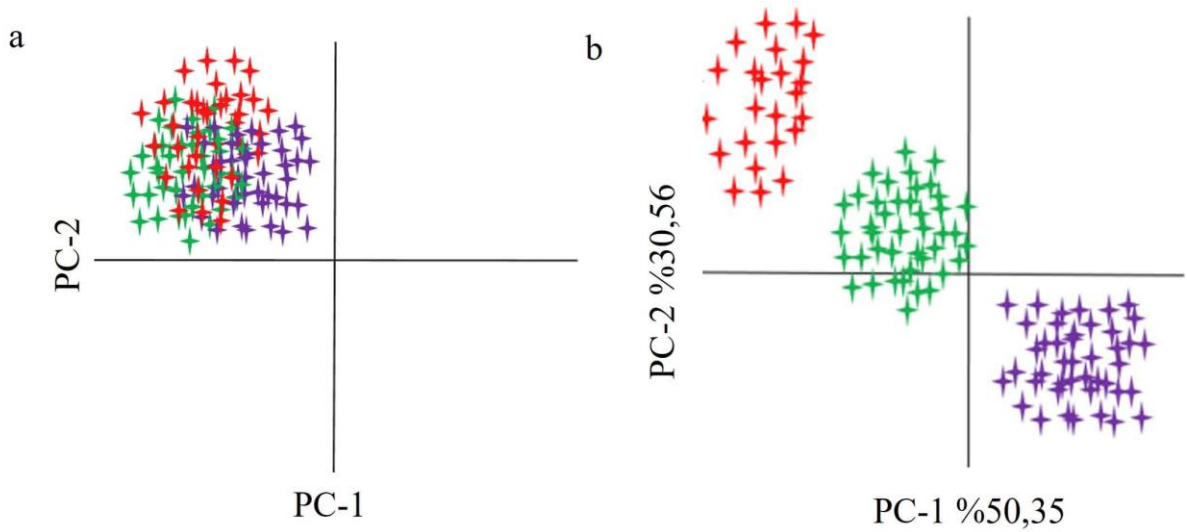
Şekil 15. Çok değişkenli kemometrik analizlerin şematik gösterimi.

Gözetimsiz Kemometrik Analizler

Gözetimsiz kemometrik analiz, örnekler arasındaki bilgileri kullanmadan kümeleme yapmayı amaçlayan, veriler arasındaki bağlantıları sunan ve çok çeşitli bilgiler içeren niteliksel (kalitatif) bir yöntemdir (Garg & Kalai, 2018). Bu yöntem veri setleri arasındaki benzerlikleri bulmak, anlamak ve aykırı değerleri görmek için kullanılır (N. Liu *et al.*, 2018). Çalışmalarda en çok kullanılan gözetimsiz yöntemler temel bileşen analizi (principal component analysis, PCA) ve hiyerarşik kümeleme analizidir (hierarchical cluster analysis, HCA).

Temel bileşen analizi (principal component analysis, PCA)

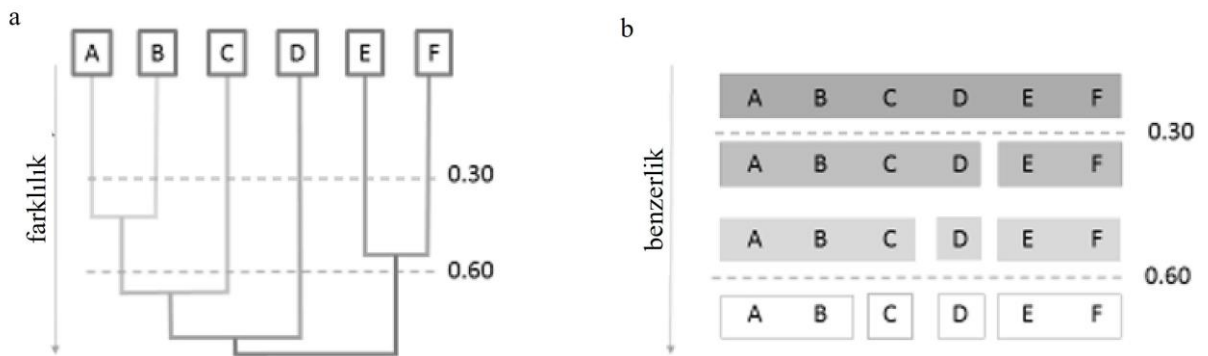
Binlerce satır ve sütundan oluşan değişkenleri bulmak, yorumlamak geçmişte olduğu gibi şimdi de araştırmalardaki en büyük problemlerden biridir. Bu problemi ortadan kaldırmak amacıyla veri setlerinin boyutlarının düşürülmesi ve anlamlı hale getirilmesinde PCA en çok kullanılan yöntemlerdendir. PCA bir takım faktör analizine dayanan matematiksel bir algoritmadır (Granato *et al.*, 2018). Temel bileşenler analizinde veri setindeki x-y-z eksenleri varyasyonu ifade eder ve puan grafiği (score plots) ile verilir. Puan grafikleri 2D puan grafiği (two-dimensional scores plot), 3D puan grafiği (three-dimensional scores plot) şeklinde gösterilir. Burada ortaya çıkan skor değerleri en büyükten en küçüğe doğrudur. Skorlar PC1, PC2, PC3 şeklinde ifade edilir ve toplamı veri setindeki ayrımın derecesini göstermektedir (Şekil 16). Varyasyonun en yoğun olduğu bant aralıkları yükleme grafiği (loading plots) olarak gösterilir (Næs *et al.*, 2010). Her PC skorunun kendine özgü bir PC yükleme grafiği bulunmakla beraber bu skorlar kendi içinde ayrımın en yoğun olduğu bandın, spektrum bilgisini verir.



Şekil 16. 2D boyutlu örnek PCA. Ayrımın olmadığı PCA grafiği (a), ayrımın net bir şekilde gösterildiği PCA grafiği ve skorlar (Granato *et al.*, 2018)’den Türkçe’ye çevrilmiştir.

Hiyerarşik kümeleme analizi (hierarchical cluster analysis, HCA)

Diğer Gözetimsiz yöntemlerden biri de hiyerarşik kümeleme analizidir. HCA, veri setleri arasındaki hiyerarşiyi belirleyen ve aynı veri setlerinin kendi arasında grup oluşturup oluşturmadığını belirleyen bir tekniktir (I. Lee & Yang, 2009). Bu teknik ile gruplar arasındaki benzerlik ve farklılıklar gösterilir (Şekil 17). Ward algoritması, analizde en çok kullanılan algoritmalardan biridir ve örnekler arasındaki uzaklıklar, Öklid uzaklığı değeri ile hesaplanır. HCA analizinden önce PCA analizinin yapılması veri setleri arasındaki ilişkiyi anlamak adına yararlı olabilir. Fakat özellikle örnekler arasında benzerlik vurgulanmak isteniyorsa hiyerarşik kümeleme analizinin yapılması daha verimli olacaktır (Özek, 2015).



Şekil 17. Örnek HCA dendrogramı. Gruplar arası mesafeleri gösteren farklılık (a) ve benzerlikler (b) (Granato *et al.*, 2018)’den Türkçe’ye çevrilmiştir.

Gözetimli Kemometrik Analizler

Gözetimli kemometrik analiz, örnek bilgilerinin kullanılarak sınıflandırmanın yapıldığı nicel (kantitatif) bir yöntemdir (Rácz *et al.*, 2018). Seçilen test örneklerinin bilinen gruplardan

birinde sınıflandırmasını sağlar. Gözetimli yöntemler modelleme ve sınıf ayrımı yöntemlerine dayanır (Rohman & Windarsih, 2020). Bu yöntemlerden LDA ve SVM sınıflandırmaya dayanırken SIMCA modellemeye dayanmaktadır.

Lineer diskriminant analizi (linear discriminant analysis, LDA)

R. Fischer tarafından önerilen LDA, örnek grupları arasındaki mesafeyi artırmaya yönelik bir tekniktir (Xanthopoulos *et al.*, 2013). Gözetimsiz analiz tekniklerinden PCA ile benzer yönleri bulunmaktadır. Ancak PCA tüm verileri kullanarak en büyük varyasyonu hesaplarken LDA iki grup arasındaki varyasyonu hesaplar (Martinez & Kak, 2001).

LDA gruplar arası ayrımın grup içi ayrım oranını artırarak sınıflandırmayı en üst düzeye çıkarır (Pan *et al.*, 2014; Tharwat *et al.*, 2017). İlk adımda farklı örnek grupları arasındaki mesafeyi hesaplar, ikinci adımda her grubun kendi içerisindeki varyansın ortalaması ile o grubun örnekleri arasındaki mesafeyi hesaplar, üçüncü adımda gruplar arası varyansı en üst düzeye çıkararak grup içi varyansı en alt düzeye indirir ve düşük boyutlu bir grafik oluşturulmasını sağlar (Tharwat *et al.*, 2017).

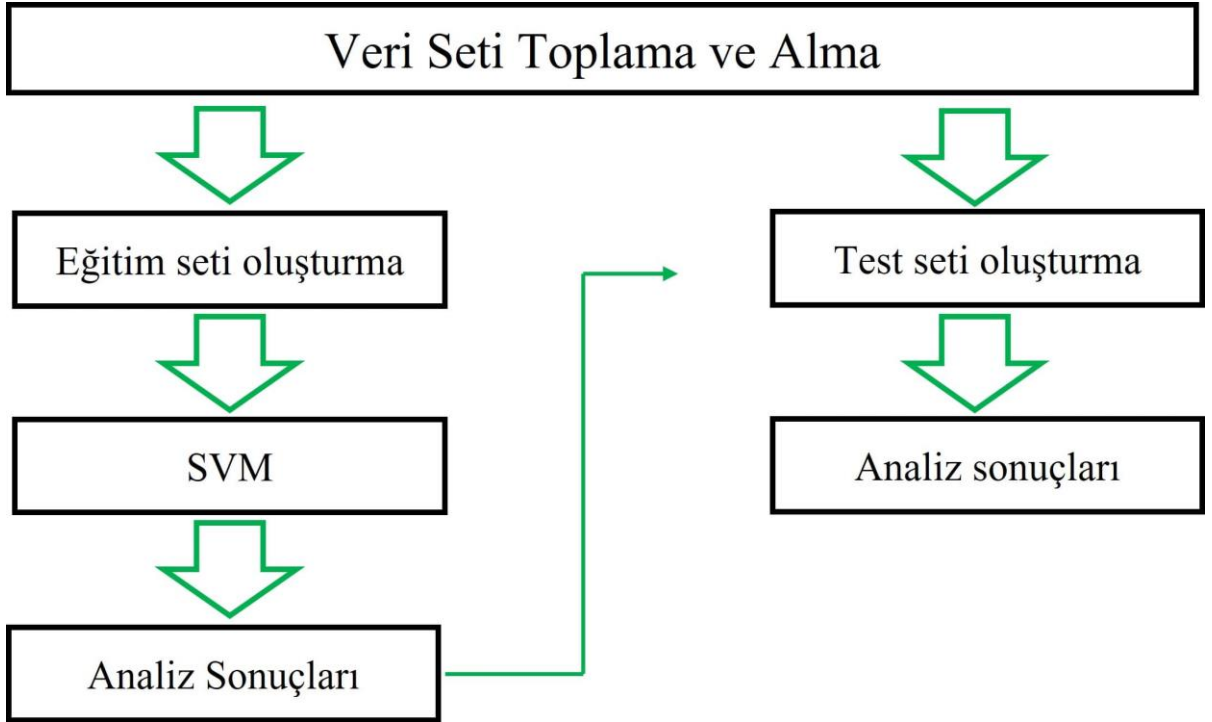
Sınıf analojisiyle yumuşak bağımsız modelleme (soft independent modeling of class analogies, SIMCA)

Wold tarafından ilk kez duyurulan sınıf modelleme yöntemi, SIMCA, en çok kullanılan popüler modelleme yöntemlerinden biridir (WOLD & SJÖSTRÖM, 1977). SIMCA örnek grupları için ayrı ayrı PCA oluşturularak yapılan, kümelemenin olmadığı bir temel bileşen analizidir. Önceden tanımlanmış örnek gruplarından bir eğitim seti seçilir ve bu eğitim setlerine PCA uygulanır (Rácz *et al.*, 2018). Bu analizde seçilen eğitim setinin, oluşturulan hedef sınıfa ait olup olmadığı belirlenir. İki önemli grafik vardır. Bunlardan biri modellerin birbirlerine olan mesafelerin gösterildiği sütun grafiği, diğeri ise birbirine dik çizgilerden oluşan örnek mesafesinin ve test örneklerinin gösterildiği skor grafiğidir (Pomerantsev & Rodionova, 2020).

Destek vektör makinesi (support vector machine, SVM)

İlk olarak Vapnik ve ark., tarafından kullanılan ve kullanımından günümüze kadar çok farklı alanlarda, diğer analizlerin birçoğundan daha avantajlı, daha doğru sonuçlar veren çok yönlü bir sınıflandırma yöntemidir (Andrew, 2001; Sain & Vapnik, 1996). Karmaşık verileri anlamlı hale getiren SVM, yüz belirleme, sahte kartları belirleme, el yazısını algılama gibi birçok alanda kullanılmakta ve biyolojik çalışmalarda da oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir (Aruna, 2011; Noble, 2004). Kullanım alanının artışıyla popüler hale gelen analiz, x-y düzleminde spektral bilgi ışığında sınıflandırma gerçekleştirir (Rüping, 2010). Diğer sınıflandırma yöntemleri en iyi ayrımı bulmaya yöneliktir. Fakat, SVM hem ayrımı hem de

birbirine en çok benzeyen örnekleri bulması bakımından dikkat çekicidir. SVM analizinin daha iyi anlamlandırılması adına çalışma prensibi Şekil 18’de özetlenmiştir.



Şekil 18. SVM analizinin önceden belirlenmiş deney gruplarına uygulanma süreci. Test örnekleri, örnek grupları arasından rastgele seçilmiştir. (Y. Yang *et al.*, 2015)’den örnek alınarak tasarlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Kullanılan Hücreler

Literatürde yaşlanma ile ilgili çalışmalarda en çok kullanılan hücre hattı olması sebebiyle MRC 5 ile akciğer kanserinde en çok görülen hücre hattı A549, kullanılmıştır. Ayrıca yine meme kanserinde en çok görülen hücre hattı MCF 7 ve onun sağlıklı eşleneği MCF 10A hücre hattı kullanılmıştır. Bu kapsamda Tablo 4 tez kapsamında kullanılan hücre hatlarını göstermektedir.

Tablo 4. Tez kapsamında kullanılan hücreler.

Hücre adı	Tipi	Kökeni	ATCC Kodu	Pasaj numarası
A549	Kanserli akciğer	Epitel	ATCC CCL-185	P6
A549	Kanserli akciğer	Epitel	ATCC CCL-185	P14
A549	Kanserli akciğer	Epitel	ATCC CCL-185	P28
MRC 5	Sağlıklı akciğer	Fibroblast	ATCC CCL-171	P27
MRC 5	Sağlıklı akciğer	Fibroblast	ATCC CCL-171	P33
MRC 5	Sağlıklı akciğer	Fibroblast	ATCC CCL-171	P41
MCF 7	Kanserli meme	Epitel	ATCC HTB-22	P16
MCF 7	Kanserli meme	Epitel	ATCC HTB-22	P28
MCF 7	Kanserli meme	Epitel	ATCC HTB-22	P33
MCF 10A	Sağlıklı meme	Epitel	ATCC CRL-10317	P11
MCF 10A	Sağlıklı meme	Epitel	ATCC CRL-10317	P17
MCF 10A	Sağlıklı meme	Epitel	ATCC CRL-10317	P22

Kullanılan Kimyasallar

Tablo 5. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Firma
Aseton	MERCK
Dimetilsülfoksit (DMSO) (BioReagent)	MERCK
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	EcoTech
DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)	Gibco
Etanol %96 (C ₂ H ₅ OH)	Sigma-Aldrich
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	Sigma-Aldrich
FBS (Fetal Sığır Serum)	Sigma-Aldrich
Horse (At) Serum	Gibco
Hidrokortizon	Sigma-Aldrich

Tablo 5. (devamı)

İnsülin	Sigma-Aldrich
Kolera Toksin	MERCK
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific
PBS (Tampon)	Sigma-Aldrich
Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich
RPMI 1640	EcoTech
Trypsin – EDTA	Sigma-Aldrich
N ₂ gazı	

Kullanılan Materyal ve Cihazlar**Tablo 6.** Tez kapsamında kullanılan materyaller.

Materyal	Firma
T-25 ve T-75'lik Flask	Isolab
15 ve 50 mL'lik Santrifüj Tüpü	Isolab
10, 100 ve 1000 µl'lik Pipet Uçları	Isolab
15 ve 50 mL'lik Falcon Tüpler	Isolab
Kriyo Tüp	Isolab
2 mL'lik Mikrofüj Tüp	Isolab
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific™

Tablo 7. Tez kapsamında kullanılan cihazlar.

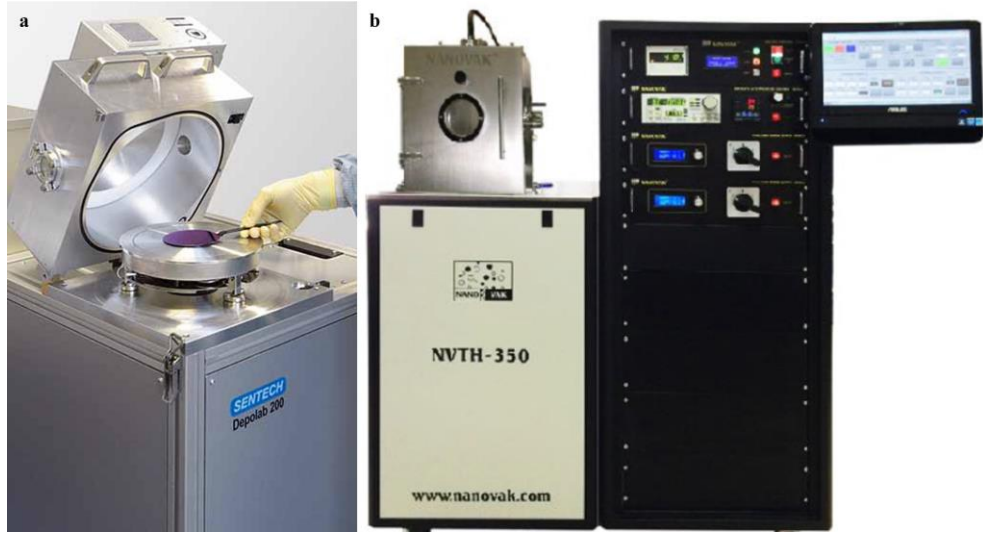
Cihaz	Firma
Steril Kabin	ESCO Class II BSC
Buzdolabı (+4 °C ve -20 °C)	Arçelik
Çeker Ocak	Tolkim
Derin Dondurucu (-80 °C)	Nuaire
Distile Su Üretme Cihazı	Milipore Direct-Q8UV
Etüv	Memmert
CO ₂ 'li İnkübatör	Nuaire
İnvert Mikroskop	Zeiss

Tablo 7. (devamı)

Otoklav Cihazı	Hirayama
Santrifüj	Hettich
Su Banyosu	Memmert
Sıvı Azot Tankı	Taylor-Wharton LS750
UV- VIS Spektrofotometre	Beckman Coulter
Ultrasonik su banyosu	Isolab
SEM (Taramalı elektron mikroskobu)	Zeiss
Raman Spektroskopisi	WITec alpha300 R
PVD Kaplama Cihazı	NANOVAK HV
Plazma Cihazı	SENTECH

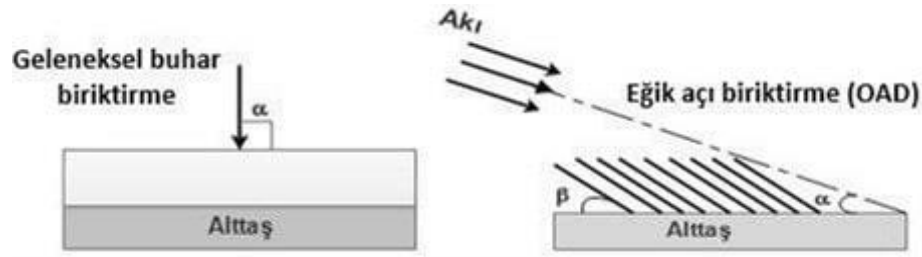
GNA Platformlarının Üretimi

Bu tez çalışmasında kullanılacak olan GNA yüzeyler, Dr. Yılmaz'ın doktora tezi ve yayınlarında yer verdiği tekniklere benzer olarak üretilmiştir (Yılmaz, 2014)(Yılmaz *et al.*, 2014). Kısaca özetlemek gerekirse BK7 cam yüzeyler $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$ ebatında kesilmiştir. Yeterince sabunlu su ile sonike edilen cam yüzeyler 10'ar dakika süre ile sırasıyla deiyonize su, aseton ve etanol ile sonikasyon eşliğinde temizlenmiştir. Kirlilikleri ortadan kaldırmak amacıyla yapılan tüm bu işlemler titizlikle sürdürülmelidir. Buradaki küçük bir kirliliğin bile zenginleştirme faktörünü etkileyeceği ve Raman sinyallerinin ölçümü sırasında yüksek gürültü dediğimiz anlamsız spektrumlara sebep olacağı unutulmamalıdır. Cam yüzeyler kaplama işlemine kadar etanol çözeltisi içinde bekletilmiştir. Yüzeyler etanolden çıkartılmış ve kuruması için N_2 gazına maruz bırakılmıştır. Cam slaytlar üzerindeki organik kirleticilerden uzaklaştırmak için 30 dakika boyunca 100 W oksijen plazması vakum altında bekletilmiştir. Plazma sisteminden alınan cam yüzeylerin, üzerlerinin tekrar kirlenmesini engellemek amacıyla hızlı bir şekilde altın kaplama aparatına yerleştirilmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. GNA yüzeylerin hazırlanmasında kullanılan (a) plazma cihazı ve (b) PVD cihazı (YUTAM, 2022).

Tez çalışması kapsamında kullanılan altın yüzeyler PVD tekniğiyle üretilmiştir. Bu teknikte tungsten pota, %99,9 saflıktaki altının eritilerek buhar fazına geçişi için gereklidir. Cam slaytlara buhar fazına geçen altın atomlarını biriktirmek için eğik açı biriktirme (OAD) metodu kullanılmıştır (Şekil 20). Bu metod aynı zamanda anizotropik yapıda üç boyutlu (3D) altın nanoçubukların oluşumunu da sağlamıştır. Burada biriktirme açısını ayarlamak için basit ve ev yapımı bir ekipman kullanılmıştır. Kaplama 10° biriktirme açısı (α), buhar basıncı 10^{-6} Torr, biriktirme hızı 0.1 Å/sn koşullarında yapılmıştır.



Şekil 20. İnce filmlerin OAD yaklaşımı ile üretimi (α : buhar açısı, β = nanoçubuğun eğim açısı) (Çınar Bam, 2017).

Ek olarak üretilen GNA SERS platformunun karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile yapılmış olup, plazmonik özelliklerini belirlemek için UV-vis absorpsiyon spektroskopisi kullanılmıştır.

Hücrelerin Çözdürülmesi ve Pasajlanması

Çalışmaya başlamadan önce Sınıf II tip steril kabin 15 dakika UV lamba ile steril edilip daha sonra yüzey %70 etanol ile silinmiştir. Ayrıca kullanılacak tüm malzemeler yine %70 etanol ile silinerek kabine alınmıştır.

Besiyerlerinin Hazırlanması

Tablo 8. Tez kapsamında hazırlanan besiyerleri.

DMEM/RPMI-1640 Besiyeri	Hazırlanmak istenen besiyeri miktarının %10'u kadar FBS, %1'i kadar penisilin/streptomisin ve %1'i kadar L-Glutamin bazal DMEM/RPMI-1640 besiyeri içerisine eklenerek hazırlanmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
DMEM/F12 Besiyeri	Hazırlanmak istenen besiyeri miktarının %5'i kadar Horse Serum, %1'i kadar penisilin/streptomisin, %1'i kadar L-Glutamin, 0.1 µg/mL kolera toksin, 10 µg/mL insülin, 0.5 µg/mL hidrokortizon bazal DMEM/F12 besiyeri içerisine eklenerek hazırlanmış ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Hazırlanan besiyerleri (Tablo 8) ile stok besiyerleri +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Hücreler çözündürülmeden önce hazırlanan besiyerleri ve tripsin (-20 °C'de ise çözülmesi için daha fazla bekletilmelidir) 37 °C'de 10 dakika su banyosunda ısıtılmıştır. Burada amaç hücreye büyüme şartlarındaki sıcaklığı sunmak, strese sokmadan büyümelerini sağlamaktır. Ayrıca su banyosu içerisinde besiyerleri bekletilmemeli, fazla ısınan besiyeri içindeki bileşenlerin aktivitesinin düştüğü unutulmamalıdır.

Hücrelerin Kültüre Alınması

Tez çalışması kapsamında Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinden (DAYTAM) temin edilen insan sağlıklı ve kanserli akciğer hücre hattı (A549 ve MRC 5) ile insan sağlıklı ve kanserli meme hücre hatları (MCF 7 ve MCF 10A) kullanılmıştır. Tüm hücre hatları aynı prosedür izlenerek büyütülmüştür. Hücreler:

- -196°C sıcaklığındaki sıvı azottan alınarak Mr. Frosty™ Freezing Container içerisinde -20°C sıcaklığındaki buzdolabına koyulmuştur.
- -20°C'den alınan hücreler dondurma ajanı olarak kullanılan DMSO'yu ortamdan uzaklaştırmak amacıyla Tablo 8'te tarif edildiği gibi hazırlanan 3 ml besiyeri içeren falkon içerisine alınmıştır.
- 1.500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atılmış, hücre pelleti 1 ml besiyeri içerisinde dağıtılmıştır.
- Dağıtılan hücreler önceden 4 ml besiyeri koyularak 37 °C'de, %90 nem ve %5 CO₂ içeren etüvde bekletilen T-25 flaska nazikçe aktararak kültürlenmiştir.

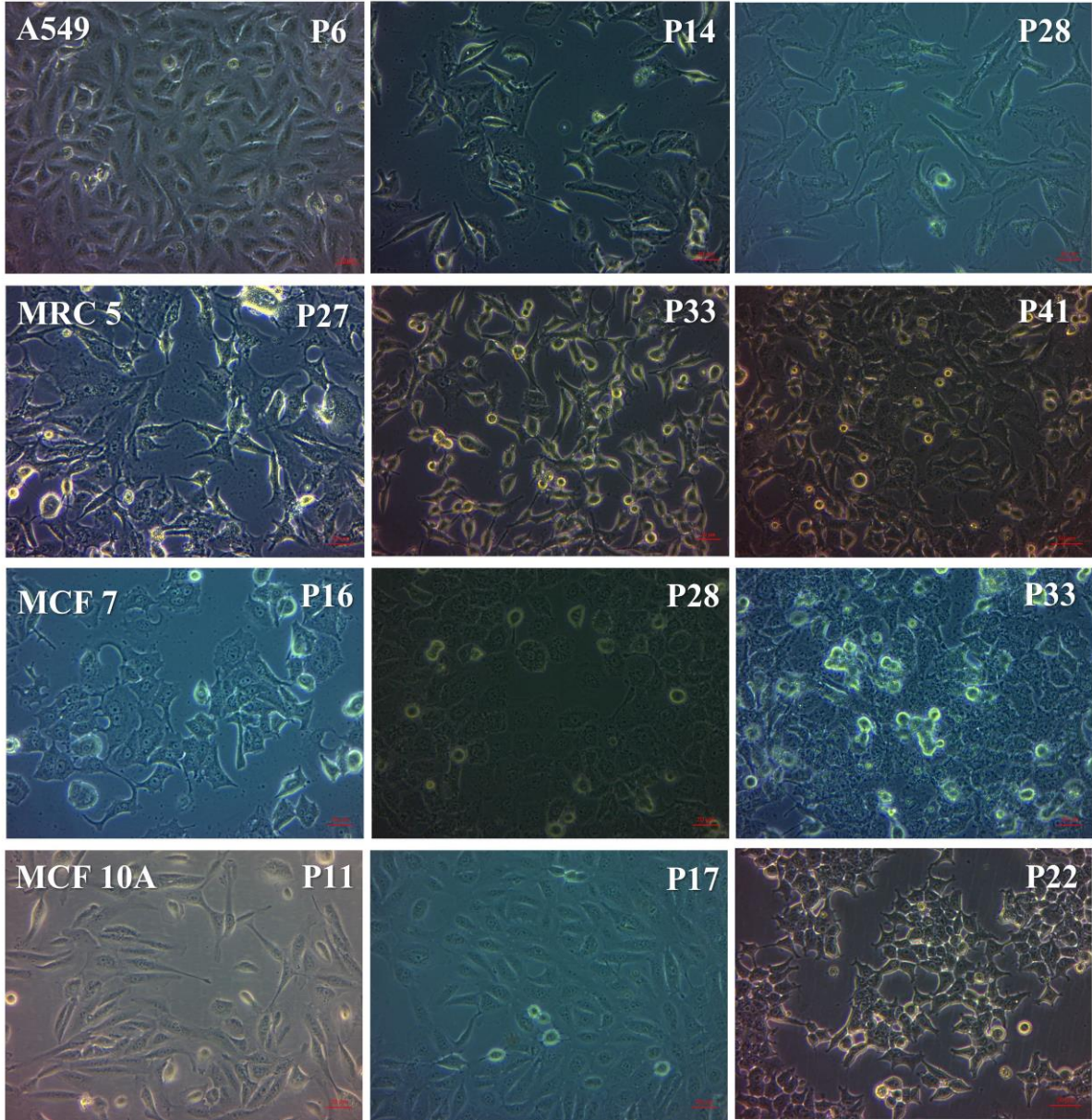
- Kültür ortamındaki hücre yoğunluğu ters mikroskopa izlenerek flask yüzeyi %70-80 doluluğa ulaşıncaya kadar her 2-3 günde bir, hücrelerin besiyeri değiştirilmiştir.
- Flask yüzeyi %70-80 doluluğa ulaşınca pasajlama ya da dondurma işlemlerine geçilmiştir.

Hücrelerin Pasajlanması

Flaskta kültürlenen hücreler belirli bir yoğunluğa ulaşınca yüzeyde hücrelerin uzayıp büyüyeceği alan kalmaz. Hücreler b y yemeyeceği için ölüm başlar. Bu yüzden hücrelerin bölünüp sayıları azaltılarak başka bir kaba ekilmesi gerekir. Bu işlem pasajlama olarak adlandırılır. Pasajlama ile hücrelerin strese girip koful oluşturması önlenir. Ayrıca besiyerinin renginin hafif sarımtırak renge dönüşmesi de hücrenin pasajlanması gerektiğini gösteren bir unsurdur. Bu kapsamda pasajlanarak büyütülen hücrelerin mikroskop görüntüleri şekil 21’de verilmektedir, yapılan işlemler ise şöyle özetlenebilir;

- Flasktaki besiyeri uzaklaştırılır.
- Daha sonra flask yüzeyini tamamen kaplamasına dikkat edilerek 2-3 ml DPBS (Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline) ile yıkama yapılır.
- Yıkama solüsyonu uzaklaştırdıktan sonra tripsin/EDTA  zeltisi eklenir. Tripsinin miktarı ve uygulama süresi, hücrenin tipine ve kültürlenen kaba göre değişiklik göstermektedir. A549 hücre hattı için 2 dakika, MCF 7 hücre hattı için 8 dakika, MRC 5 hücre hattı için 10 dakika ve MCF 10A hücre hattı için 10 dakika 37  C’de tripsine maruz bırakılmıştır. Burada dikkat edilecek nokta tripsinle muamele yaparken inkübasyonu kesmemek ve zamanı dikkatlice kontrol etmektir. Zira, hücrelerin tripsinle fazla muamele olması onları öldürebilir ve morfolojik değişime neden olabilmektedir.
- Kullanılan tripsin miktarının en az 3 katı kadar besiyeri, tripsini inhibe etmek için flaska eklenir ve hücreler 15 ml’lik falkon tüplere alınır.
- Etiketlenen 15 ml’lik falkonlar 1.500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir.

- Süpernatantı alınan hücreler 1 ml besiyerinde dağıtılıp, Thoma lamı kullanılarak sayılır.
- Kullanılmayan hücreler, dondurma (freezing) besiyeri hazırlanarak (%7 DMSO, hücreye ait besiyeri) 1.7-1.8 ml'lik kriyo tüplere aktarılır. Daha sonra kriyo tüpler -20°C'de Mr. Frosty™ Freezing Container'da 30 dakika boyunca bekletildikten sonra -80°C'de bir gece bırakılır. Ardından daha uzun süre muhafaza edilmesi amacıyla hücreler sıvı azot tankına aktarılır.

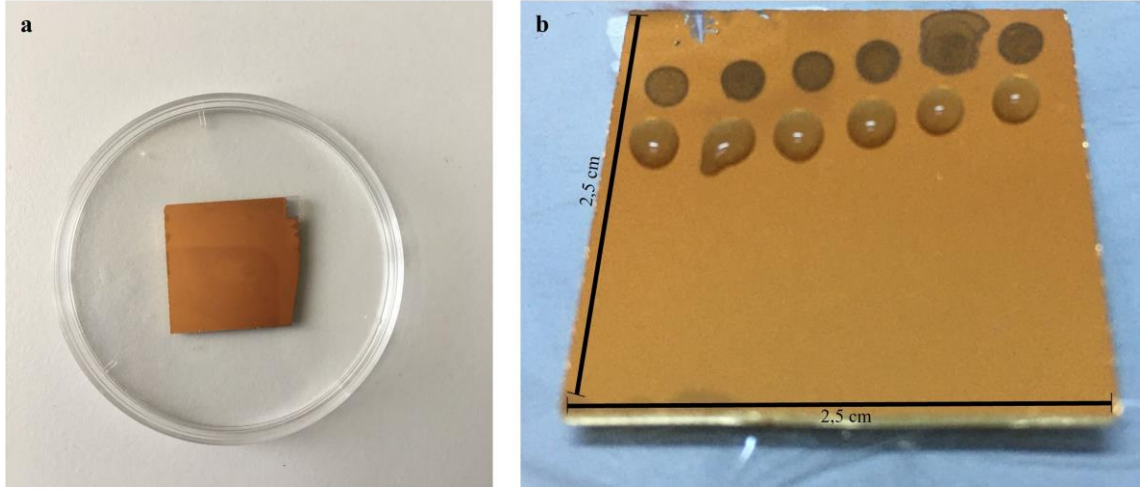


Şekil 21. Farklı pasaj numaralarına sahip dört farklı hücre hattının mikroskop görüntüleri (Ölçek çubuğu: 20 μ m).

Farklı Pasaj Numaralarındaki Hücrelerden SERS sinyallerinin eldesi ve İşlenmesi

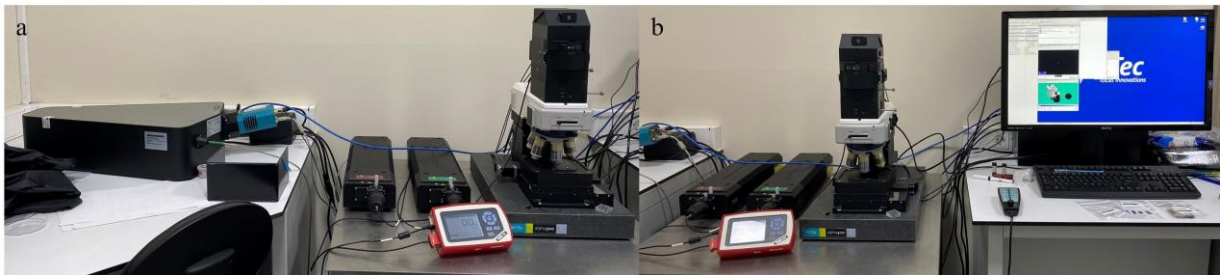
SERS deneyleri için kullanılacak hücreler santrifüj yapıldıktan sonra üst faz alınarak altta kalan pellet 200 μ l saf su ile yeniden süspanse edilmiştir. Her hücre hattından 5 μ l alınarak

GNA yüzey üzerine damlatılmış ve çeker ocak içerisinde kurumaya bırakılmıştır. Üretilen boş GNA, damlatılan ve kuruyan hücrelerin görüntüsü Şekil 22’de gösterilmektedir.



Şekil 22. Boş GNA SERS substratı (a), GNA yüzey üzerindeki damlatılan ve kuruyan hücrelerin görünümü (b).

Raman spektrumları, 785 nm lazer kaynağı kullanılarak WITEC alpha 300R Mikro Raman Mikroskopi sistemi kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 23). Spektral aralık $2000-200\text{ cm}^{-1}$ olarak ayarlanmış ve $\times 50$ objektif kullanılmıştır. Uygulama süresi 5 s ve lazer gücü 10 mW olarak ayarlanmıştır. Farklı pasaj numaralarında kanser ve sağlıklı hücrelere ait Raman spektrumları, çalışılan her hücre hattı için haritalama yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. GNA substratı üzerinde bulunan hücre grupları 10X büyütme objektif ile genel olarak bulunduktan sonra, 50X objektif ile haritalama yapılacak hücreler tek tek belirlenmiş ve Raman sinyalleri haritalama yöntemi ile toplanmıştır. Haritalama yöntemi ile hücrelerin tamamı x-y yönünde taranmış ve haritalanan alandan 2 bölge seçilerek her bölgenin ortalama spektrumları elde edilmiştir.



Şekil 23. Raman Spektroskopisi (WITec alpha300R), DAYTAM, Atatürk Üniversitesi. Uygulanan gücü ve süresini gösteren monitör, CCD, lazer kaynakları (532 nm ve 785 nm) (a), 10X, 50X, 100X konfokal objektif ve sistemin bağlı olduğu bilgisayar (b).

SERS Spektrumlarına Spektral Öncül İşlemler, Kemometrik Analizler, Kalitatif ve Kantitatif Spektral Analizlerin Uygulanması

Spektral Öncül-İşlemler

Elde edilen spektrumlara temel- düzeltme (baseline correction), düzgünleştirme (smoothing) ve normalizasyon (normalization) işlemleri OPUS 5.5 (OPUS, Bruker Optics, Ettlingen, Almanya) yazılımı ile aşağıda belirtilen parametreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- Temel-düzeltilme işlemi: Rubberband correction, baseline points 64
- Düzgünleştirme: Number of smoothing points 15
- Normalleştirme: Min-max normalization

Kemometrik Analizler

SERS ile yapılan çalışmalarda temel darboğaz, analitin karmaşıklığı arttıkça verilerin yorumlanması ve analizin zorlaşmasıdır. Ayrıca verilerin araştırmacı tarafından yorumlanması süreyi uzatmakta ve hata oranını artırmaktadır. Tüm bu zorlukları aşmak ve pratik hale getirmek için çok değişkenli analiz sistemleri kullanılmaya başlanmıştır.

Bu tez kapsamında hücre gibi karmaşık ve yorumunun güç olduğu bir sistemle çalışıldığı için çok değişkenli analiz yöntemleri kullanılmış ve bu bağlamda bir dizi analiz gerçekleştirilmiştir.

Gözetimsiz kemometrik analizler

Farklı pasaj numaralarına sahip hücre hatlarının SERS ile tespitini sağlamak amacıyla Unscrambler 10.4 yazılımı kullanılarak sırasıyla PCA, HCA gerçekleştirilmiştir. Bu analizler için; 2000-200 cm^{-1} aralığında ön-işleme aşamalarından geçmiş spektrumlar kullanılmıştır. PCA’da tam çapraz doğrulama (full cross-validation) metodu kullanılmış olup sonuçlar skor ve yükleme grafikleri olarak sunulmuştur. HCA sonuçları ise dendrogram grafiği şeklinde gösterilmiştir.

Gözetimli kemometrik analizler

PCA-HCA’da elde edilen sonuçlara göre SERS platformunun, farklı pasaj numaralarına sahip hücre hatlarındaki ayrımın etkinliğini belirlemek amacıyla 2000-200 cm^{-1} spektral aralıkta önceden işlenmiş spektrumlara doğrusal gözetimli LDA, SIMCA ve SVM sınıflandırma yöntemleri uygulanmıştır. Bu analizler için de Unscrambler 10.4 yazılımı kullanılmıştır.

Tüm gözetimli kemometrik analizler için ilk olarak eğitim setleri ve bu setlere dayalı sınıflandırma modelleri oluşturulmuştur. Sırasıyla LDA farklı pasaj numaralarına sahip her örnekten, PCA eğitim seti oluşturulup tek bir PCA eğitim modeli elde edilerek yapılmıştır

(Örneğin A549 hücre hattı için oluşturulan eğitim seti şöyledir: P6 training (eğitim)-P14 training-P28 training). SIMCA'da da tıpkı LDA gibi elde edilen PCA sonuçlarına göre her hücre hattının üç farklı pasajından PCA eğitim seti oluşturulmuştur. LDA'dan farklı olarak SIMCA'da bu PCA eğitim setlerinin her biri için PCA uygulanmış ve üç PCA eğitim modeli elde edilmiştir (Örneğin A549 hücre hattı için oluşturulan üç PCA eğitim modeli şöyledir: P6 PCA modeli -P14 PCA modeli -P28 PCA modeli). SVM sınıflandırma yönteminde ise yine bir eğitim seti oluşturulmuştur ve doğrusal metod seçilerek SVM modelleri elde edilmiştir. Modeller oluşturulduktan sonra, her hücre hattı için pasaj numarası bilinmeyen örnekler arasından rastgele iki test seti seçilmiş ve bu test seti oluşturulan PCA eğitim setinin dışında tutulmuştur. Daha sonra test örneklerinin, kendi sınıf modellerinde doğru bir şekilde sınıflandırılıp sınıflandırılmadığını belirlemek için LDA, SIMCA ve SVM sınıflandırması uygulanmıştır.

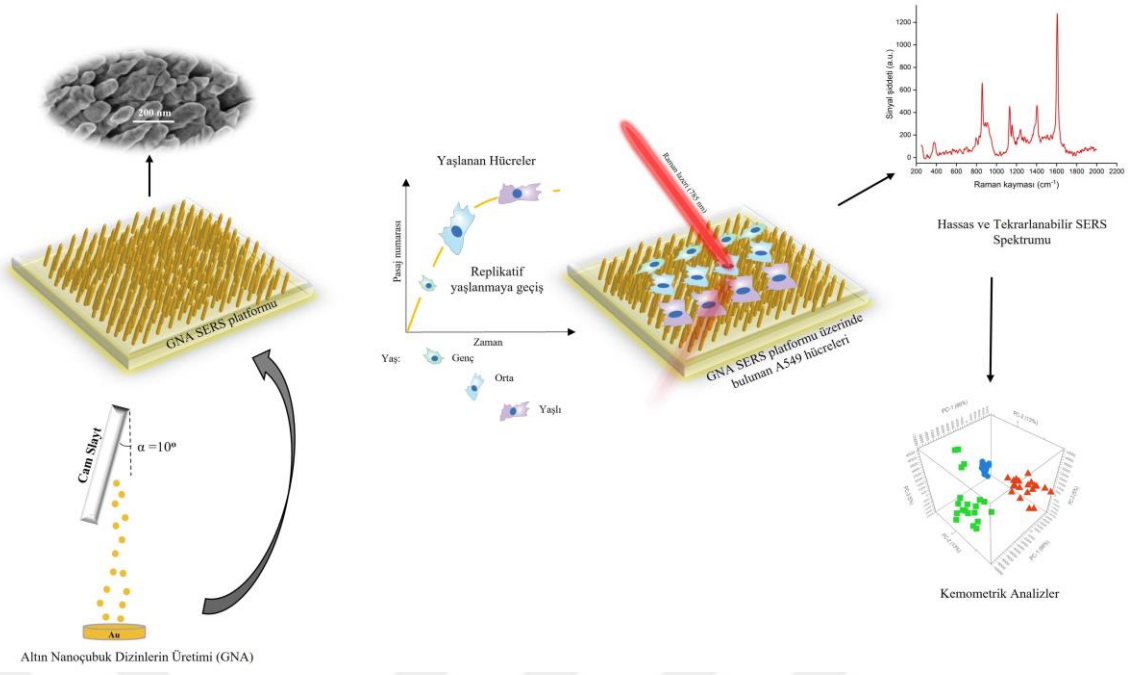
Kalitatif ve Kantitatif Spektral Analizler

Farklılaşmanın en yoğun olduğu bantlara (PC yükleme (loading) grafikleri), pikin hangi noktada olduğunu belirlemek amacıyla OriginPro 2022 programı kullanılarak pik assignment (noktasal tahsis, atama) yapılmıştır. Programda pik analizi (peak analyzer) kısmından pikleri bulma (find peaks) seçeneği seçilerek temel-düzeltilme (baseline) sıfır olarak ayarlanmıştır. Ardından pikin sinyal şiddeti (by height value) otomatik olarak seçilerek nihai aşama olan pik assignment değerleri elde edilmiştir. Ayrıca her hücre hattının pasaj numarasından elde edilen 20 spektrumun ortalaması OPUS 5.5 yazılımı kullanılarak alınmıştır. Bu ortalama spektrumlar için pik assignment değerleri yine aynı prosedür izlenerek gerçekleştirilmiştir. Daha sonra atamalara karşılık gelen bantların hangi biyomoleküle ait olduğu literatürden araştırılarak sunulmuş olup bu piklerin replikatif yaşlanma ilişkisi değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin, biyomoleküler değişimini niceliksel olarak belirlemek ve anlamlılığını tespit etmek amacıyla OriginPro 2022 istatistiksel analiz programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) yapılmıştır. Veriler ortalama+SEM alınarak verilmiş olup $*p<0,05$ olarak gösterilmiştir.

Tüm bu deney süreci ve yapılan analizler kabaca Şekil 24'te özetlenmektedir.

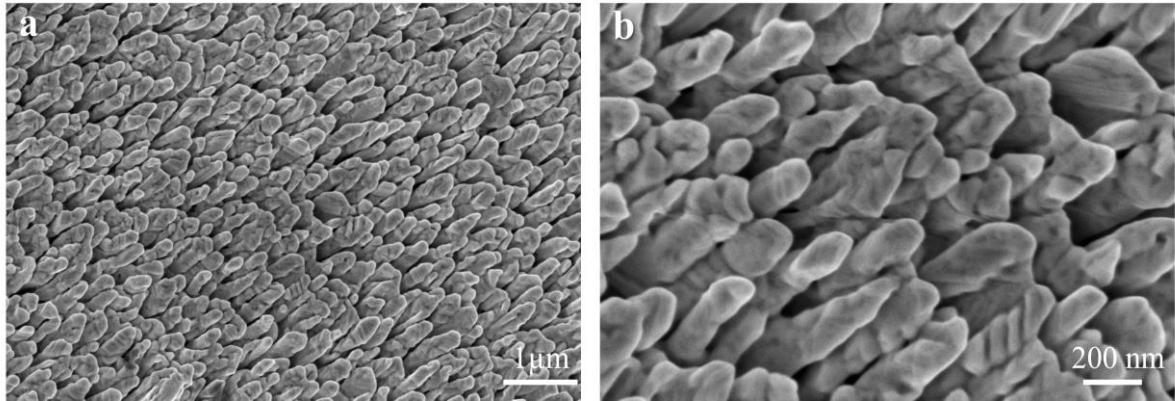


Şekil 24. GNA SERS platformunun üretimi, pasaj sayısına bağlı olarak yaşlanan hücreler, hücrelerin SERS sistemi ile birleştirilerek sinyallerin elde edilmesi ve yapılan kemometrik analizler.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

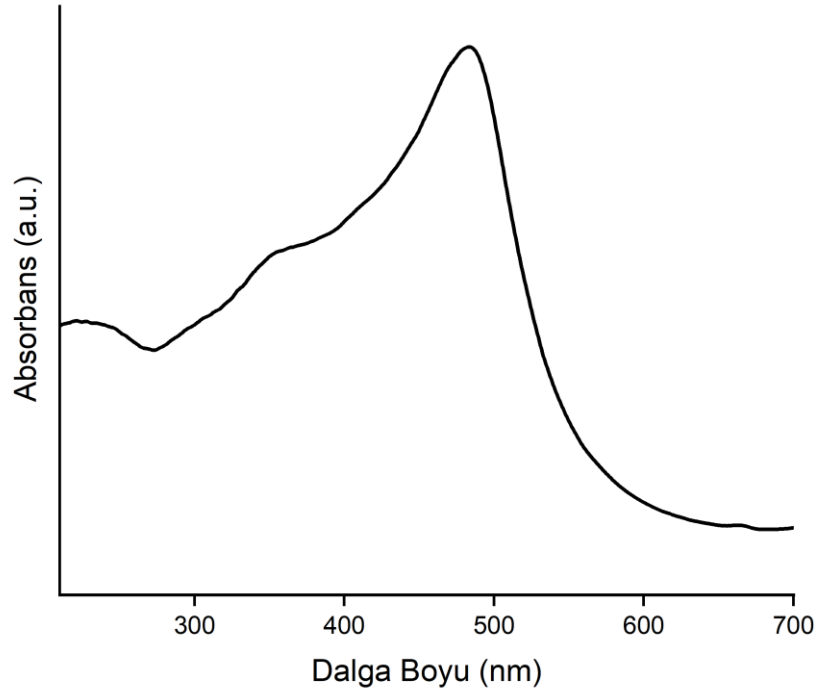
GNA Platformlarının Üretimi

Anizotropik yapıya sahip GNA yüzey, cam slaytlar üzerine altının OAD yöntemi ve PVD tekniğinin kullanılması ile üretilmiştir. Bu yapıya ait SEM görüntüleri Şekil 25'te sunulmuştur. Önceki çalışmalarda biriktirme açısı (α) değiştirilerek farklı eğim açısına sahip GNA yüzeyler üretilmiştir (Yilmaz *et al.*, 2014). Bu çalışmada biriktirme açısı 10° olarak ayarlandığında paketlenmiş ve bir yöne doğru yönelen altın nanoçubuk dizinlerin elde edildiği görülmüştür. Nanoçubukların birim alandaki miktarı ImageJ yazılımı kullanılarak hesaplanmış ve $3,9 \times 10^8$ nanoçubuk / cm^2 olarak bulunmuştur. Ayrıca nanoçubukların çaplarının 100-200 nm aralığında, ortalama 140 nm olduğu hesaplanmıştır. Bu platform 1D ve 2D benzer yapılara kıyasla çok sayıda avantaj sağlamıştır. Bu avantajlardan bazıları; yapının 3D olması, yüzey alanındaki artış sebebiyle de analit molekülünün kolayca yakalanabiliyor olmasıdır. Diğer bir avantaj ise platformun uç-fokuslanma (tip-focusing) ve nano-anten etkilerinin (nano-antenna effect) elektromanyetik zenginleştirmeyi oluşturabilmesidir (Yilmaz *et al.*, 2014)(Yilmaz, 2019).



Şekil 25. GNA SERS substratı için farklı büyütme ölçeklerinde alınan SEM görüntüleri (a, b).

SEM ile karakterizasyon işlemleri yapılan GNA platformunun, yüzey plazmon özellikleri UV-vis absorpsiyon spektroskopisi kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 26). Elde edilen spektrum 400-600 nm arasında geniş bir absorpsiyon pikine sahiptir. Bu pikin, nanoçubukların uç kısmına gelen ışığın soğurulmasından kaynaklı olabileceği literatürde belirtilmiştir (Z. Huang *et al.*, 2016; Yilmaz, 2019; Yilmaz *et al.*, 2014, 2015, 2020).



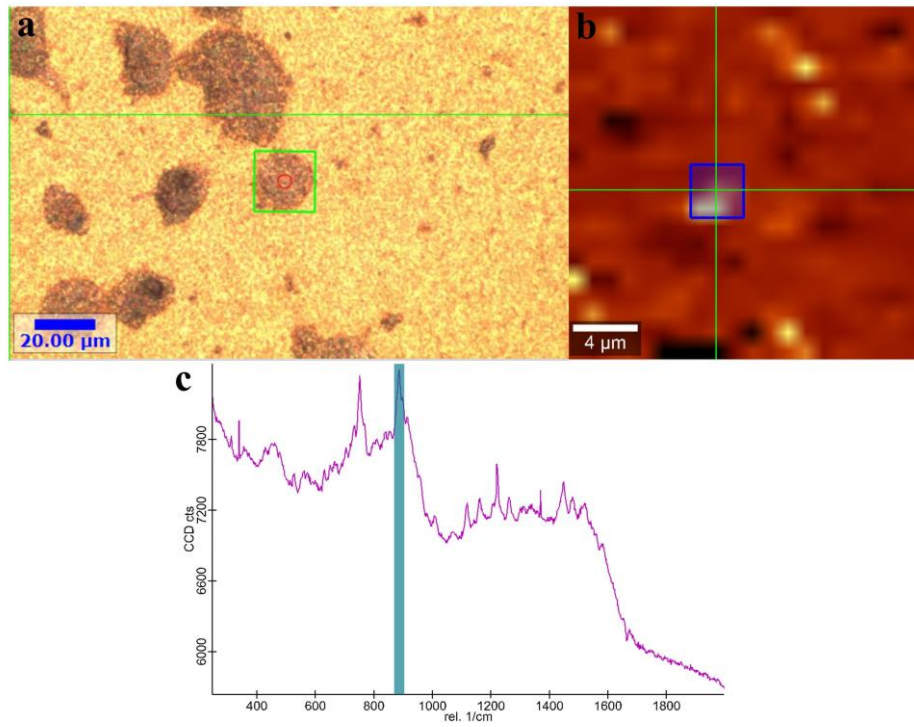
Şekil 26. GNA SERS substratı için UV-vis absorpsiyon spektrumu.

Üretilen substratın morfolojik ve plazmonik özellikleri belirlendikten sonra elektromanyetik zenginleşmenin varlığını kanıtlamak adına birtakım analizler yapılmıştır. Bu kapsamda biriktirme açısı $\alpha = 10^\circ$ olan nanoçubuk yapıların, ışığın farklı yön ve açısına göre elipsometrik parametrelerdeki değişimine bakılmıştır. Parametrelerdeki değişimler, hassas bir SERS substratı üretildiğini belgeler niteliktedir (Yılmaz *et al.*, 2015, 2020). Ayrıca, üretilen altın nanoçubuk yapıların uçlarının, SERS etkisi için sıcak nokta oluşumunda etkili olduğu belirlenmiştir. GNA anizotropik yapı, izotropik yapıya göre yüksek oranda SPR oluşturmuştur. Bu oluşumun elektromanyetik zenginleştirmeyi etkileyerek SERS etkisini sağladığı açıkça görülmüştür (Yılmaz, 2019). Bu bağlamda tez araştırmasında $\alpha = 10^\circ$ ayarlanarak üretilen GNA anizotropik yapıların kullanılmasına karar verilmiştir.

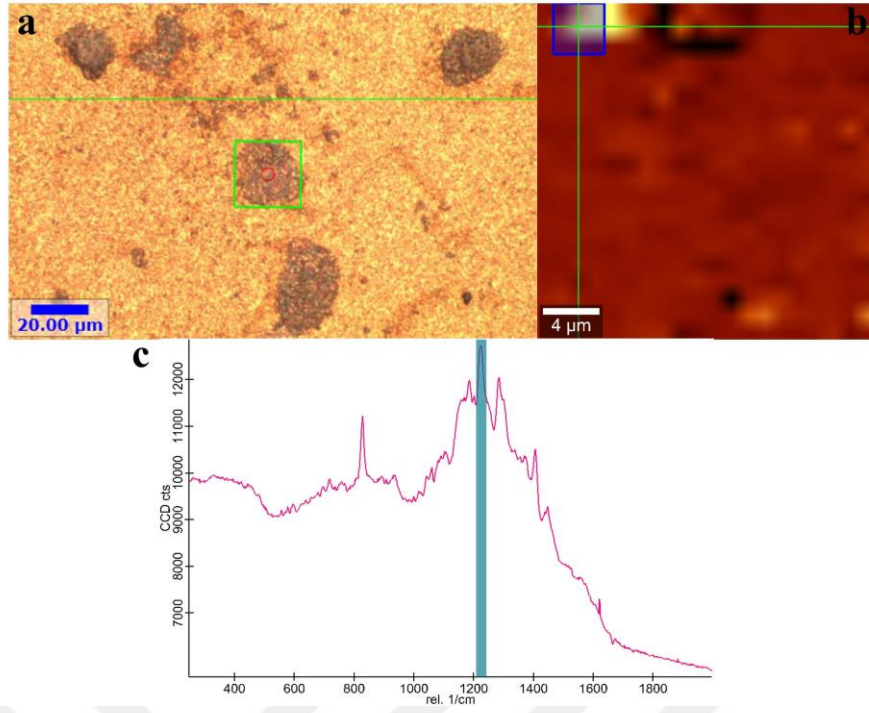
Farklı Pasaj Numaralarına Sahip Hücrelerden SERS Sinyallerinin Alınması

Farklı pasaj numaralarında kanser ve sağlıklı hücelere ait Raman spektrumları; hücrelerin tamamı x-y yönünde haritalama yöntemi kullanılarak taranmış ve haritalanan alandan iki ayrı bölge seçilerek her bölgenin ortalama spektrumları alınması ile elde edilmiştir. GNA substratı üzerinde bulunan hücre grupları 10X büyütme objektif ile genel olarak bulunduktan sonra, 50X objektif ile haritalama yapılacak tek tek hücreler belirlenmiş ve Raman sinyalleri toplanmıştır. A549 akciğer kanser hücre hattının, 6. pasajı için haritalaması yapılan tek hücreye ait 50X objektifteki mikroskop görüntüsü Şekil 27a’da, hücrenin SERS haritası

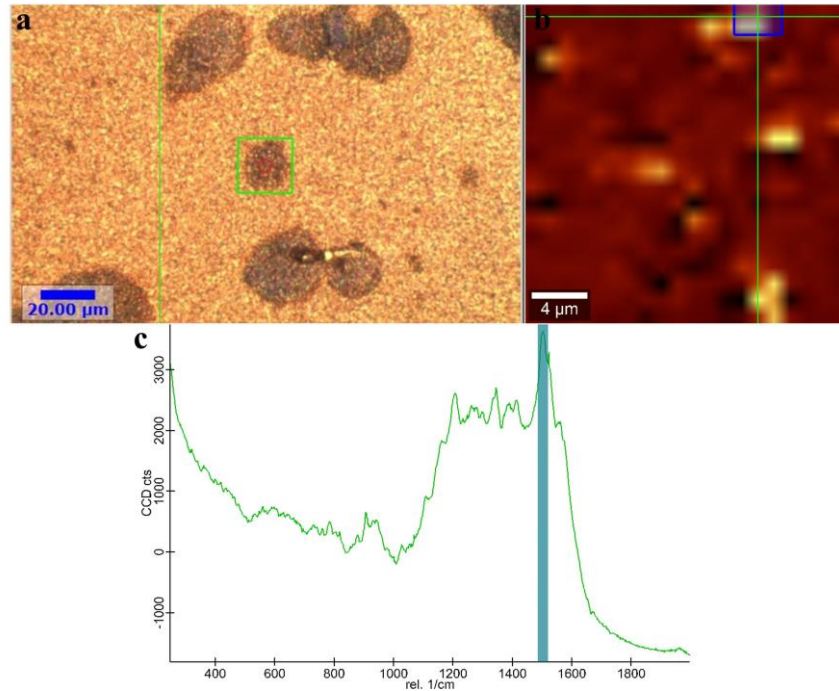
Şekil 27b’de ve Şekil 27b’de + işaretine karşılık gelen hücre spektrumu Şekil 27c’de gösterilmektedir. A549 hücresinde 14.ve 28. pasajlar için elde edilen veriler Şekil 28-Şekil 29’da verilmektedir. Haritalama verilerinde altın rengine benzer parlayan alanlar sinyal şiddetinin yüksek olduğu yerleri, koyu kısımlar ise şiddetin düşük olduğu yerleri ifade etmektedir (Şekil 27b-Şekil 29b). Her hücre hattı için elde edilen temsili veriler, Şekil 27c-Şekil 29c’de görüleceği üzere çok sayıda spesifik bant içermektedir. Bu bantların analizi uzun zaman ve uzmanlık gerektirmektedir. Bu sebeple analizlerin hem zaman hem de uzmanlık açısından etkinliğini arttırmak için çok değişkenli kemometrik analizlere gereksinim duyulmuştur.



Şekil 27. A549 P6 hücre hattının GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 886 cm^{-1} piki için elde edilen haritalama verileri (P6, P: pasaj numarasını göstermektedir). (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (mavi dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve(c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu.



Şekil 28. A549 P14 hücre hattının GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1.225 cm^{-1} piki için elde edilen haritalama verileri (P14, P: pasaj numarasını göstermektedir). (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (mavi dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu.



Şekil 29. A549 P28 hücre hattının GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1.505 cm^{-1} piki için elde edilen haritalama verileri (P28, P: pasaj numarasını göstermektedir). (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (mavi dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu.

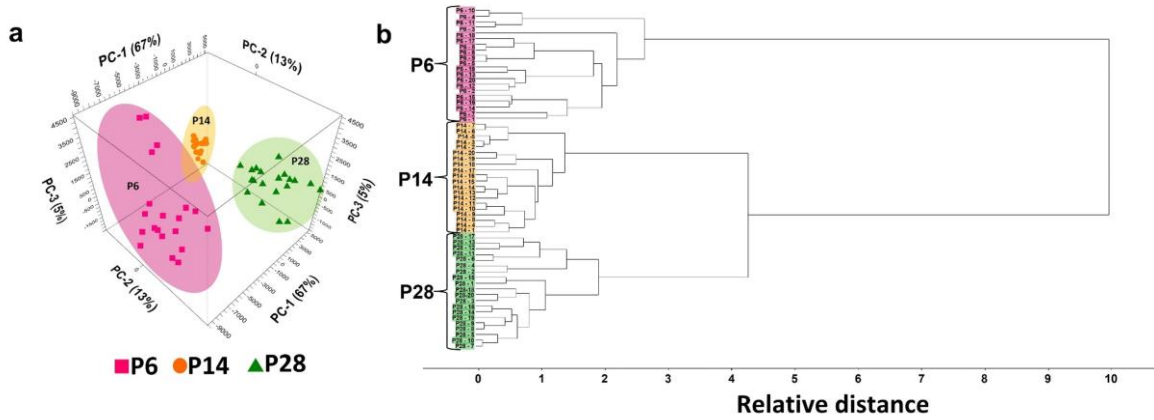
Farklı Pasaj Numaralarındaki Hücrelerden Elde Edilen SERS Verilerinin Kemometrik Analizleri

Kemometrik analizler için, haritalanan hücrenin iki ayrı bölgesi seçilerek her bölgenin ortalama spektrumları alınmış ve çalışılan her hücrenin, her pasaj numarası için ön işlem aşamalarından geçmiş sinyal şiddeti yüksek toplam 20 adet spektrum kullanılmıştır. Kanseri ve sağlıklı hücrelerde, gruplar arasındaki ilişkileri saptamak ve pasaj numarası ile ilişkili replikatif yaşlanmadan kaynaklı biyokimyasal kompozisyon değişimlerini belirlemek amacıyla önce gözetimsiz, daha sonra gözetimli kemometrik analiz yöntemleri uygulanmıştır.

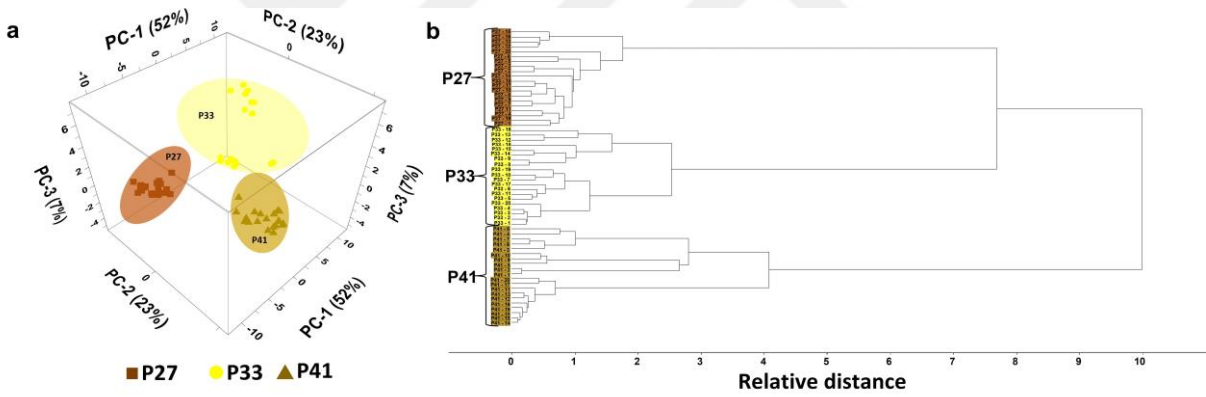
Gözetimsiz Kemometrik Analizler: PCA-HCA Analizi

Gözetimsiz kemometrik analiz metotları, çalışılan örnekler açısından herhangi bir ön bilgiye ihtiyaç duymayan, birden fazla analit tespitini sağlayarak örnekler arasındaki bağıntıları tespit edebilen analizlerdir. Bu nedenle spektral analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gözetimsiz analiz yöntemleri arasında en yaygın kullanılanı PCA'dır. Çünkü PCA spektral veri boyutunu düşürerek ayırt edici spektral belirteçlerin bulunmasını sağlar. Bu analizin verimliliği literatürdeki birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Dizaji *et al.*, 2021; Norouz Dizaji *et al.*, 2021). Bu kapsamda her hücre hattının pasaj numaraları arasındaki benzerlikleri, farklılıkları ve spektral varyasyonları belirlemek için sinyal şiddeti yüksek, ön işlem aşamalarından geçmiş spektrumlara PCA uygulanmıştır. PCA analizinde birbiriyle benzeşen örnekler aynı grupta yer alırken farklılaşan örnekler diğer grupta yer almaktadır ve gruplaşmalar PCA skor grafikleri olarak gösterilmektedir. Çalışılan hücrelere ait 3D puan grafikleri Şekil 30a-Şekil 33a'da verilmiştir ve bu grafikler tam çapraz doğrulama (full cross-validation) metodu ile PC1, PC2 ve PC3 kullanılarak elde edilmiştir. PC'ler ya da temel bileşenler örnekler arasındaki varyasyonları göstermektedir. Birinci temel bileşen (PC1) toplam değişkenliği en çok açıklayan, ikinci temel bileşen (PC2) ise kalan değişkenlikleri en çok açıklayan değişkendir. Şekil 30a-Şekil 33a'daki skor grafiklerinden de görüleceği üzere tüm hücreler, pasaj numarasına bağlı olarak birbirinden yüksek varyasyon değeri ile ayrılmaktadır. A549 için PC1 + PC2 + PC3'ün toplam değeri %85, MRC 5 için %82, MCF 7 için %75 ve MCF 10A için %68 varyasyon değerleri elde edilmiştir (Şekil 30a-Şekil 33a) ve bu, deney grupları arasındaki farklılaşmanın olduğunu göstermektedir. Bir diğer gözetimsiz analizlerden olan HCA, PCA'da elde edilen gruplar arasındaki ayrımı doğrulamak amacıyla uygulanmıştır. Farklı ve benzer grupların birbirine yakınlıkları veya uzaklıkları Ward algoritması kullanılarak hesaplanır ve soyağacına benzer bir dendrogram grafiği ile gösterilir. Bu doğrultuda, dendrogram grafiğinin aynı dalında olan; aynı pasaj numarasına sahip hücreler benzerdir, aralarındaki mesafe azdır ve birbirleri ile kümelenmiştir. Farklı pasaj numaralarına sahip hücreler birbirine uzak ve farklı dallarda bulunmaktadır (Şekil 30b-Şekil 33b). Gruplar arası mesafenin artışı, hücrelerin pasaj

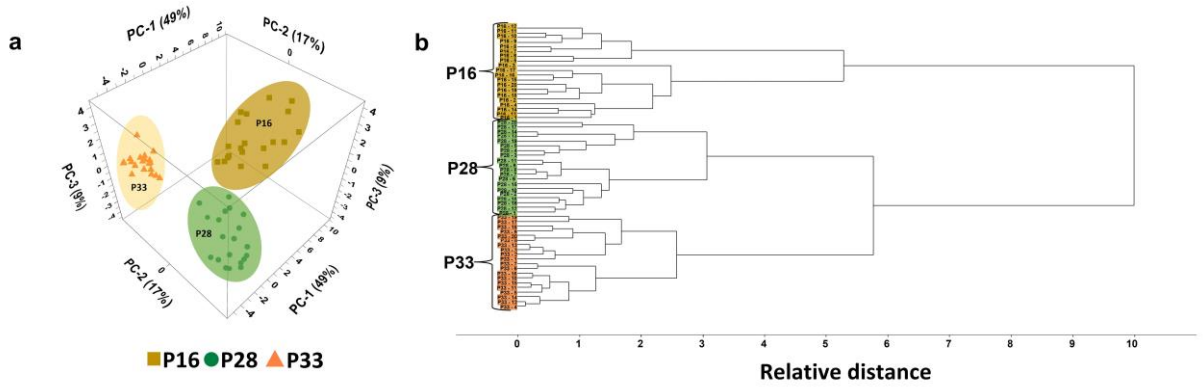
numaralarına göre farklılaştığını kanıtlar niteliktedir. PCA ve HCA sonucunda elde edilen veriler; dört farklı hücre hattının, pasaj numarası değiştikçe farklılaştığını etkin ve doğru bir biçimde göstermiştir.



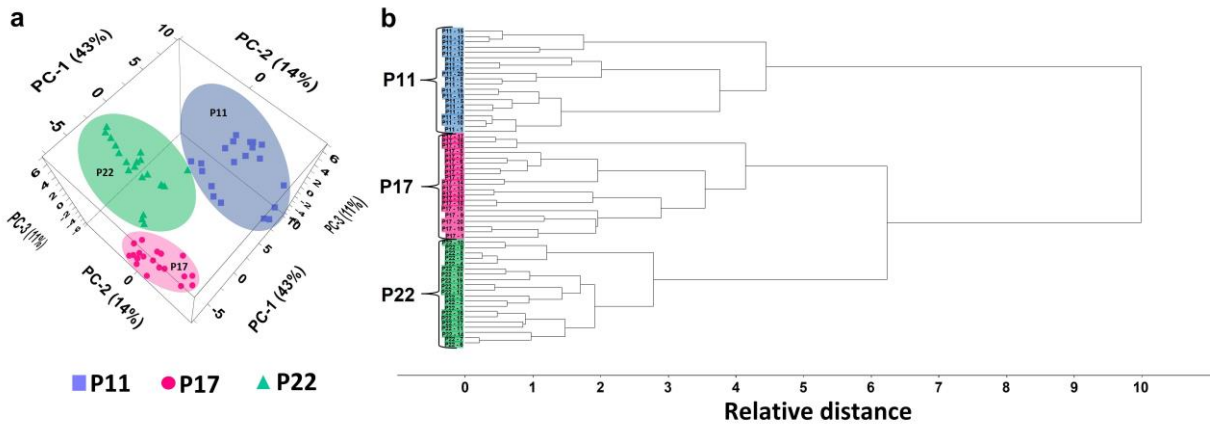
Şekil 30. A549 hücreleri için kemometrik analiz sonuçları. (a) P6, P14, P28 pasaj numaraları için PCA skor çizimi, (b) HCA dendrogramı (P: pasaj numarasını, P6-1 “1” spektrum sayısını göstermektedir).



Şekil 31. MRC 5 hücreleri için kemometrik analiz sonuçları. (a) P27, P33, P41 pasaj numaraları için PCA skor çizimi, (b) HCA dendrogramı (P: pasaj numarasını, P27-1 “1” spektrum sayısını göstermektedir).



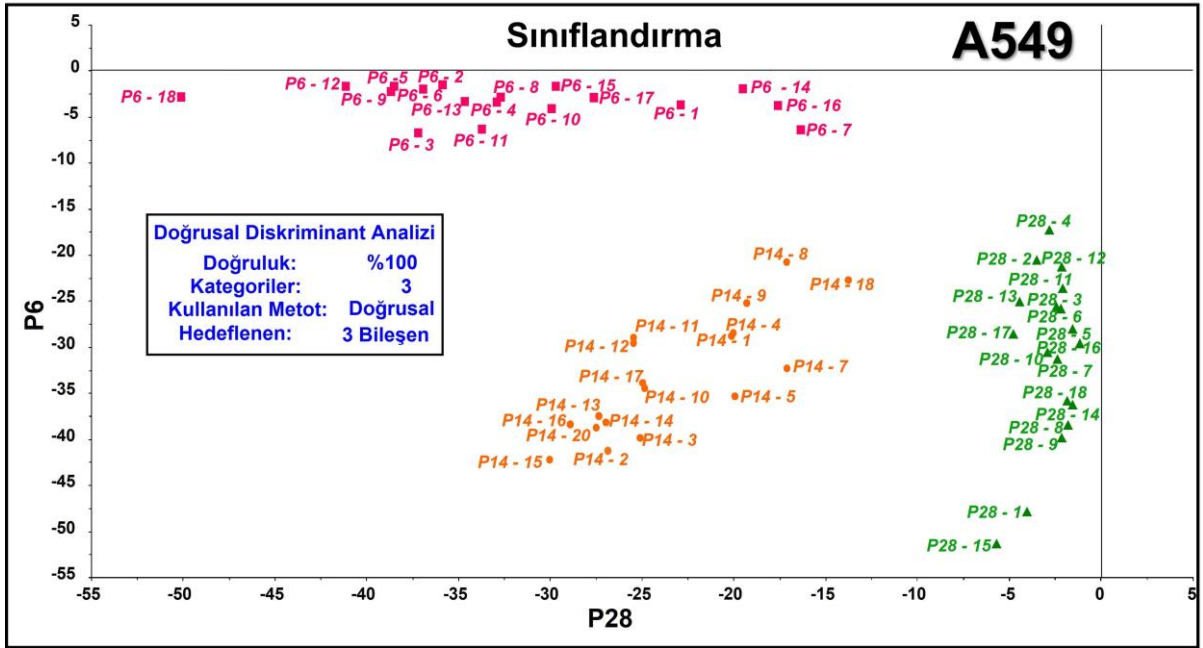
Şekil 32. MCF 7 hücreleri için kemometrik analiz sonuçları. (a) P16, P28, P33 pasaj numaraları için PCA skor çizimi, (b) HCA dendogramı (P: pasaj numarasını, P16-1 “1” spektrum sayısını göstermektedir).



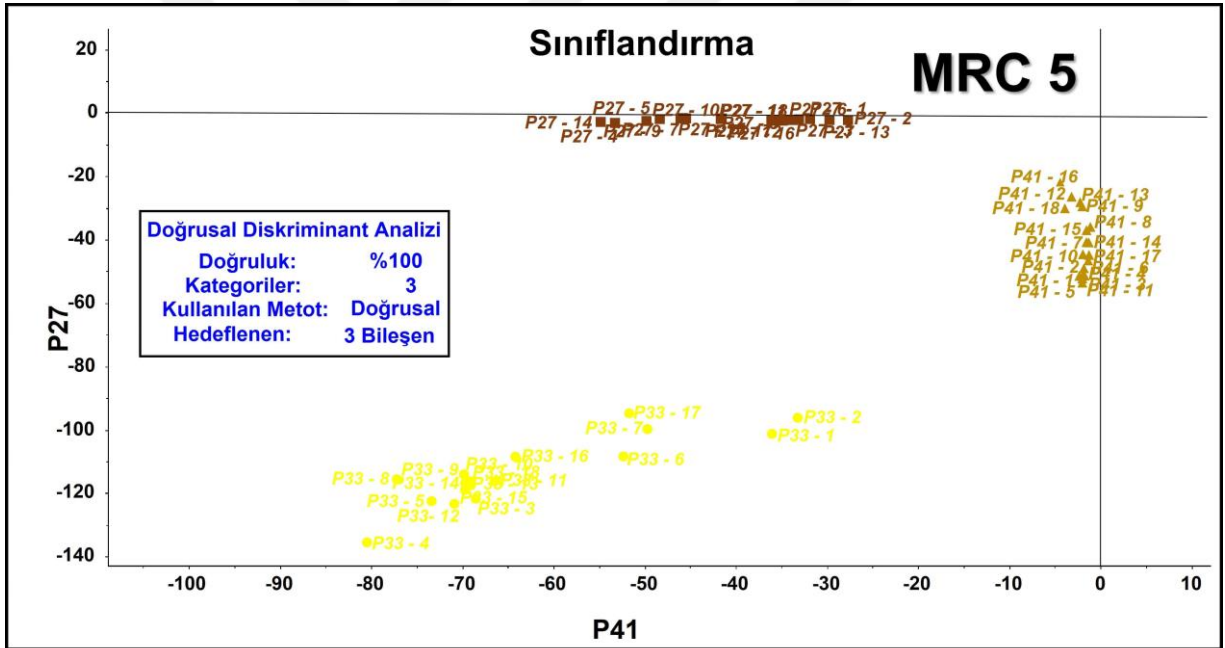
Şekil 33. MCF 10A hücreleri için kemometrik analiz sonuçları. (a) P11, P17, P22 pasaj numaraları için PCA skor çizimi, (b) HCA dendogramı (P: pasaj numarasını, P11-1 “1” spektrum sayısını göstermektedir).

Gözetimli Kemometrik Analizler: LDA, SIMCA, SVM Analizi

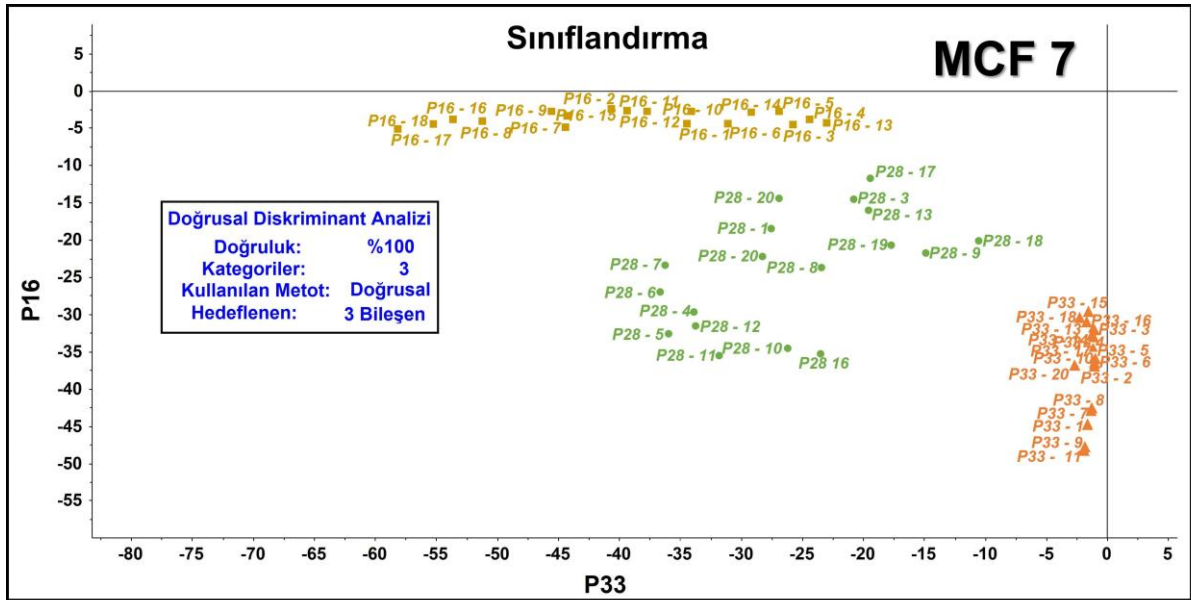
PCA-HCA gözetimsiz kemometrik analizlerinden elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak örnek grupları arasındaki PCA skorlarına dayalı, sınıflandırmayı tespit etmek ve doğrulamak amacıyla doğrusal, doğrusal olmayan gözetimli analiz yöntemleri kullanılmıştır. Bu bağlamda tüm gözetimli kemometrik analizler için oluşturulan eğitim setleri ve bu setlere dayalı sınıflandırma modelleri Ek 1 Tablo 1-4’ de gösterilmektedir. Pasaj numarası bilinmeyen örnekler arasından rastgele oluşturulan test seti örneklerinin, hangi grupta yer aldığı sınıflandırma modelleri kullanılarak belirlenmiştir (Ek 1 Tablo 5-8). Bu kapsamda Şekil 34Şekil 37, her pasaj numarası için oluşturulan 18 spektruma sahip eğitim setini (toplam 54 SERS spektrumu) ve LDA sınıflandırma grafiğini göstermektedir. Sınıflandırma; her hücre hattının, üç pasaj numarası için (A549 P6-P14-P28, MRC 5 P27-P33-P41, MCF 7 P16-P28-P33 ve MCF 10A P11-P17-P22, P: pasaj numaralarını göstermektedir) %100 doğrulukla elde edilmiştir.



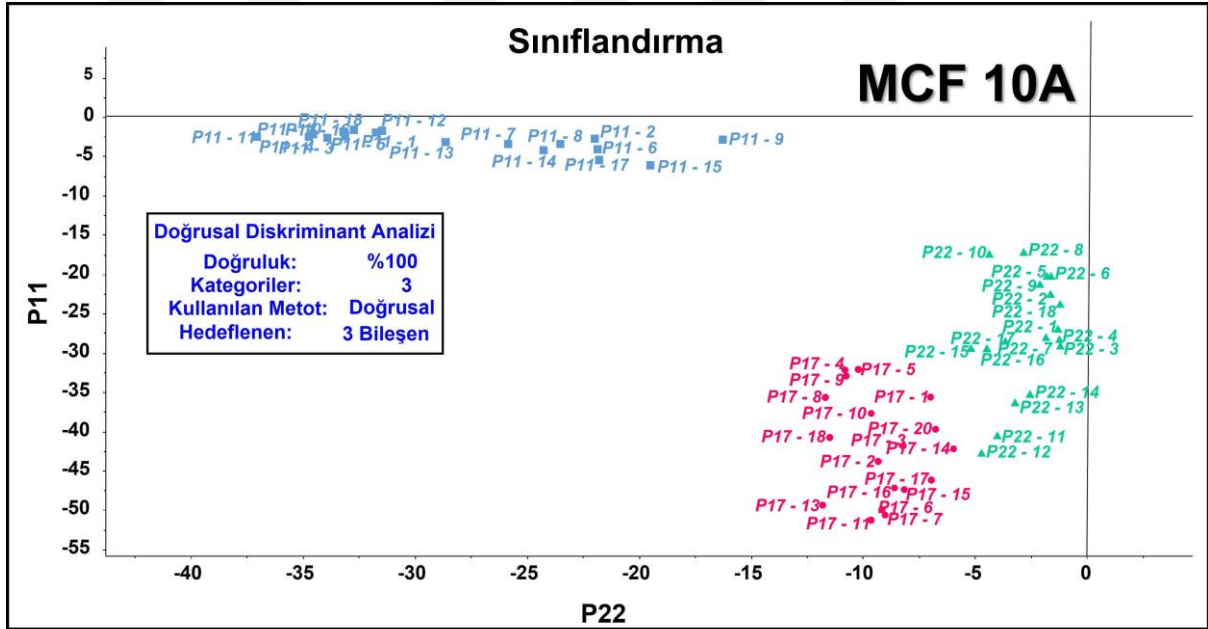
Şekil 34. A549 hücreleri için yapılan LDA analizi (P: pasaj numarasını, P6-1 “1” spektrum sayısını göstermektedir).



Şekil 35. MRC 5 hücreleri için yapılan LDA analizi (P: pasaj numarasını, P27-1 “1” spektrum sayısını göstermektedir).



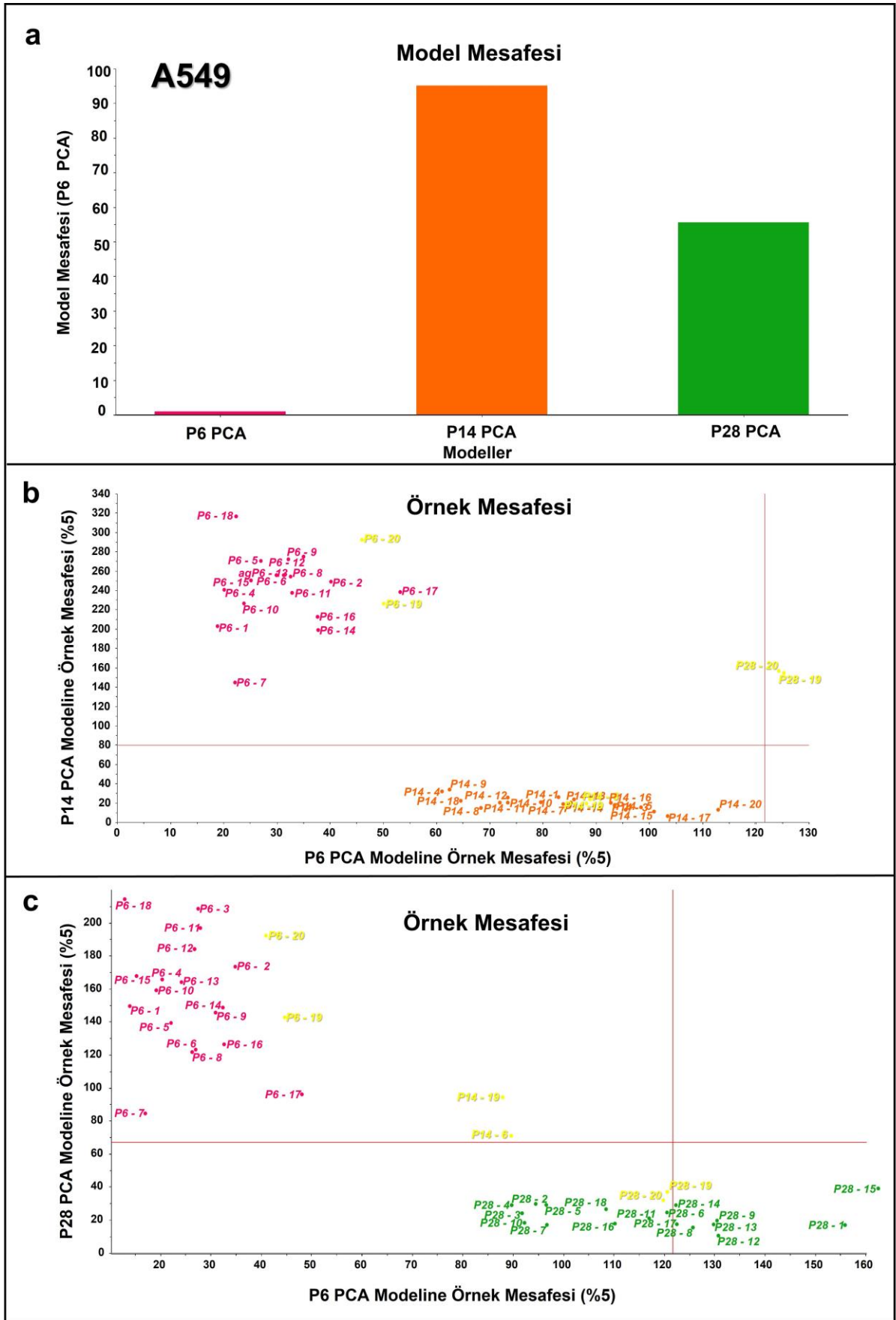
Şekil 36. MCF 7 hücreleri için yapılan LDA analizi (P: pasaj numarasını, P16-1 “1” spektrum sayısını göstermektedir).



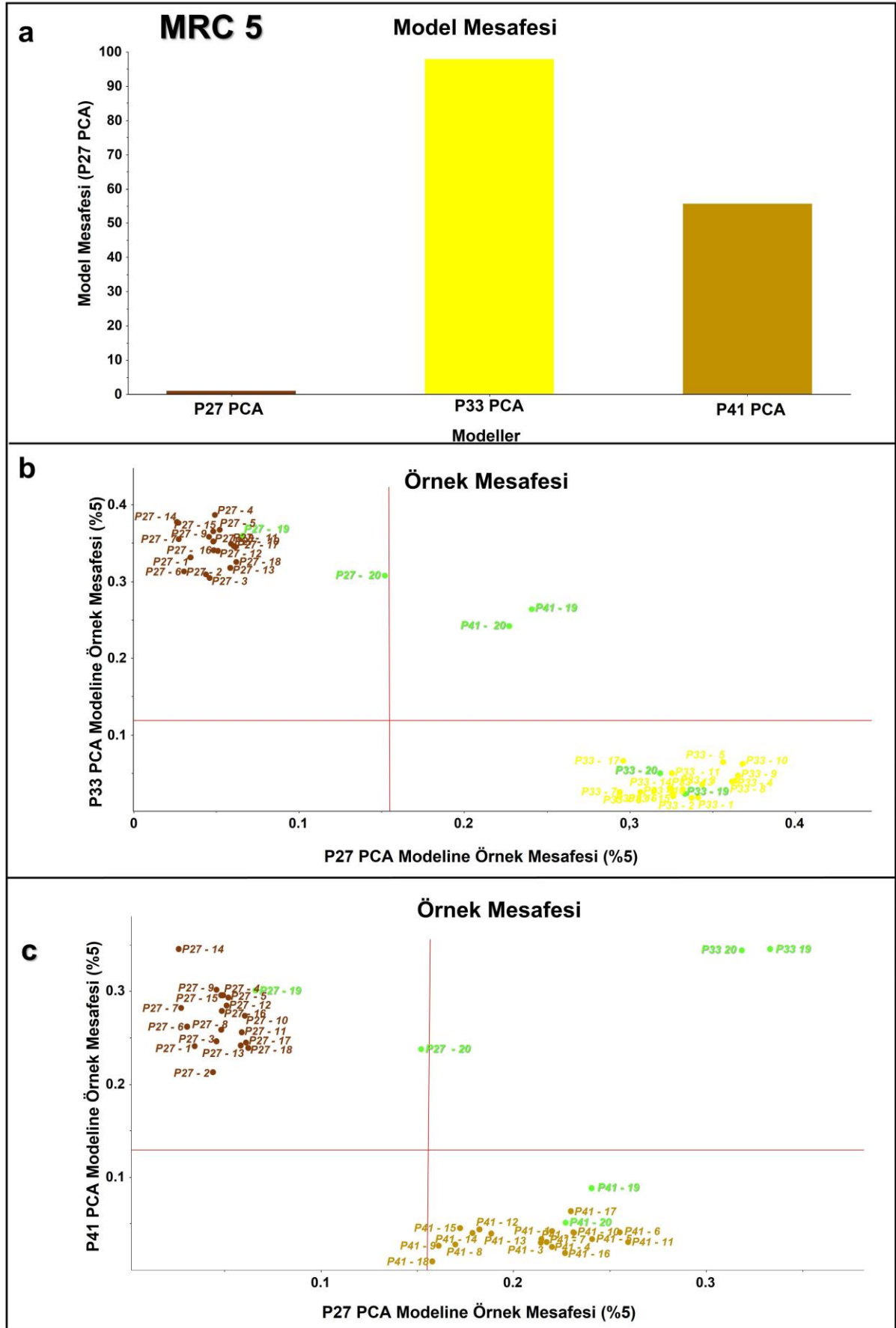
Şekil 37. MCF 10A hücreleri için yapılan LDA analizi (P: pasaj numarasını, P11-1 “1” spektrum sayısını göstermektedir).

Gözetimli kemometrik analizlerden bir diğeri SIMCA, yüksek varyasyona sahip örneklerin birbiriyle olan uzaklığı ve örneklerin kendi aralarındaki benzerliği gösterir. Hücrelerin pasaj numaralarına göre farklılaşmasını belirlemek ve test etmek amacıyla yapılmıştır. Bu yöntem LDA’dan farklı olarak gruplar arası ayırmadan çok grup içi benzerlik ve gruplar arası mesafelere odaklanır. Elde edilen PCA sonuçlarına göre oluşturulan her hücre hattının üç farklı pasajından PCA eğitim modeli Şekil 38’de gösterilmektedir. Şekil 38a’da görülen mesafe grafiği, P14 ve P28 PCA modellerinin P6 PCA modeline olan mesafesini göstermektedir. Y ekseninde bulunan mesafe değerinin, 3’ten büyük olması deney gruplarının birbirlerinden farklı ve iyi ayrıldığını açıklamaktadır. P14 ve P28 için bu değerler sırasıyla 97

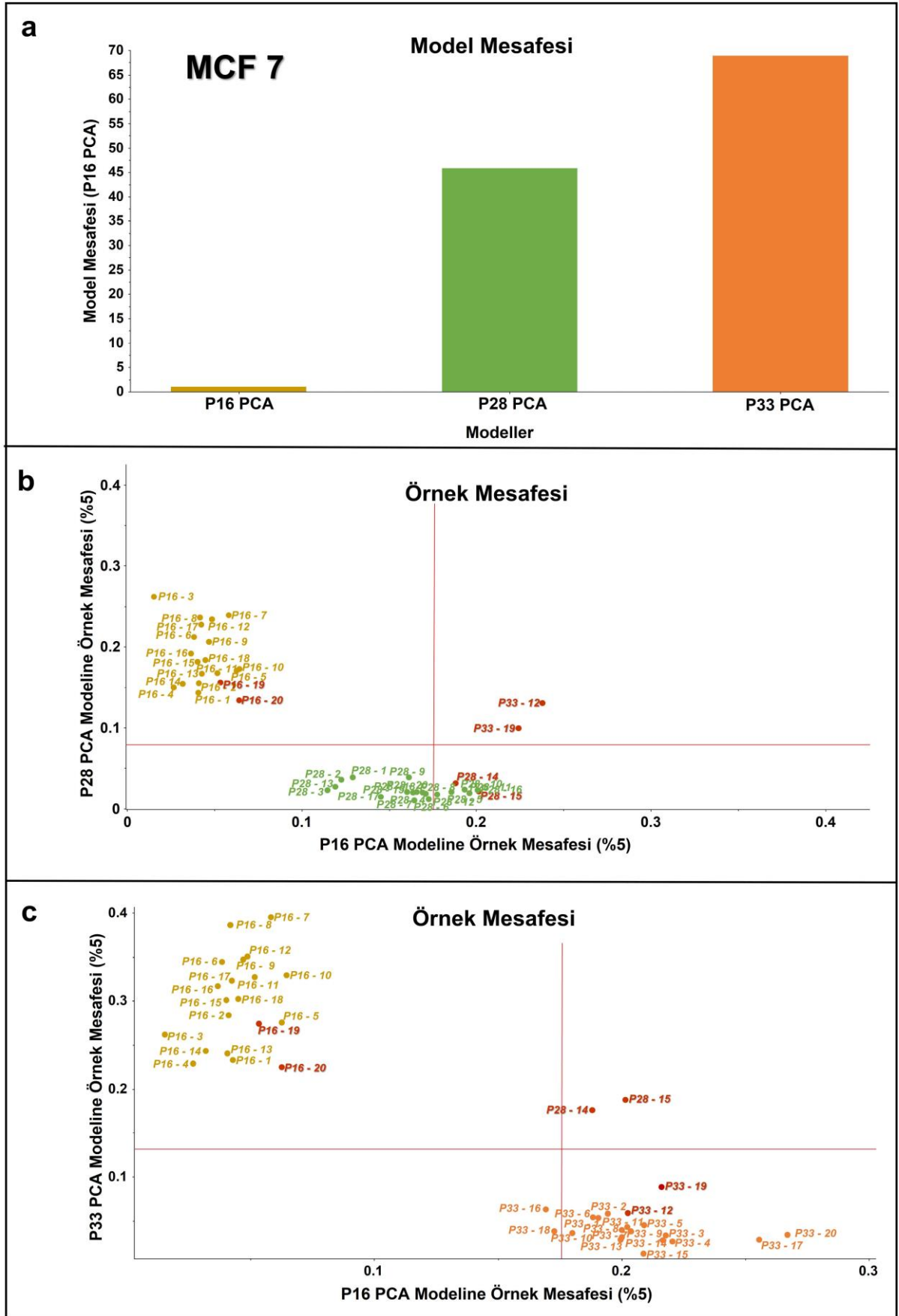
ve 52'dir. Bu grafik, A549 hücre hattı için P6-P14-P28'in birbirinden ayrıldığını ve bu yöntemin başarılı olduğunu ortaya koymaktadır. Şekil 38b-Şekil 38c'de grupların sınıflandırma potansiyelini kanıtlamak için test örnekleri (sarı renk test örneklerini ifade etmek için kullanılmıştır), eğitim modeli içerisinde yer almayan spektrumlardan her pasajdan iki spektrum olmak üzere rastgele (hangi gruba ait olduğu bilinmeyen) seçilmiştir. Buradaki %5 değeri istatistiksel olarak anlamlıdır ve sonuçlar Cooman grafikleri kullanılarak verilmiştir. Test örnekleri, ait olduğu pasaj numarası içinde yer almış (Ek 1 Tablo 9-12) ve sınıflandırmanın %100 doğrulukla yapıldığı görülmüştür. Şekil 39Şekil 41'de elde edilen sonuçları benzer şekilde yorumlamak mümkündür. Kısaca özetlemek gerekirse Şekil 39a'da görülen model mesafe grafiği; MRC hücre hattı için, P27'nin P33 ve P41 PCA modeline olan mesafesini göstermektedir. Bu değerler P33 için 99 ve P41 için 50'dir. Bu hücrenin Şekil 39b-Şekil 39c Cooman grafikleri, pasaj numaralarının birbirlerine olan uzaklığını ve test örneklerinin (yeşil renk test örneklerini ifade etmek için kullanılmıştır) kendi grupları içerisinde yer aldığını göstermektedir. MCF 7 hücre hattına ait olan Şekil 40a'da, P16'nın P28 ve P33 PCA modeline mesafesi sırasıyla 47, 70'tir. Yine bu hücre hattına ait olan Şekil 40bŞekil 40c Cooman grafikleri, test örneklerinin (açık kırmızı renk test örneklerini ifade etmek için kullanılmıştır) kendi grupları içerisinde yer aldığı ve benzer şekilde farklı pasajların birbirlerinden uzak mesafelerde olduğunu göstermektedir. MCF 10A'ya ait mesafe grafiği ise Şekil 41a'da gösterilmektedir. P11'in P17 ve P22 PCA modeline uzaklıkları 102, 55'tir. Bu hücre hattına ait Şekil 41bŞekil 41c Cooman grafikleri, test örneklerinin (toz pembe renk test örneklerini ifade etmek için kullanılmıştır) kendi gruplarına ait olduğunu, pasaj numarası farklılaştıkça mesafelerin arttığını başarıyla göstermiştir. Sonuç olarak tüm hücre hatlarındaki pasaj numaralarının değişimi hücreler arası mesafe değerini değiştirmekte ve pasaj numarasına bağlı ayrımı kanıtlamaktadır. Ayrıca bu sonuçlar, diğer analizlerden elde edilen sonuçları desteklemekte ve sınıflandırma işlemini %100 doğrulukla göstermektedir.



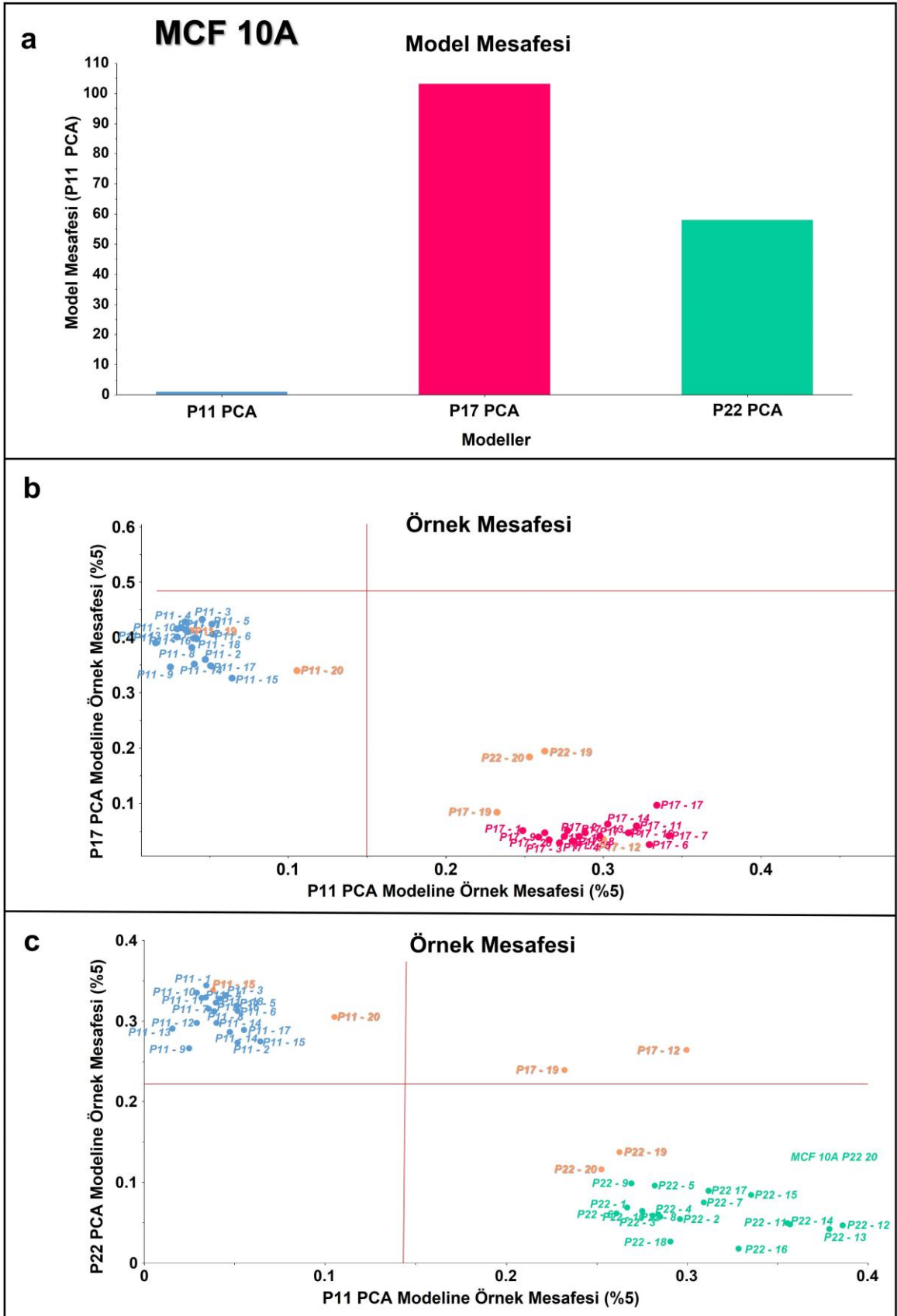
Şekil 38. A549 hücreleri için yapılan SIMCA analizi. (a) model mesafesi, (b, c) örnek mesafeleri (P: pasaj numarasını, P6-1 “1” spektrum sayısını ve sarı renk test örneklerini göstermektedir).



Şekil 39. MRC 5 hücreleri için yapılan SIMCA analizi. (a) model mesafesi, (b, c) örnek mesafeleri (P: pasaj numarasını, P27-1 “1” spektrum sayısını ve yeşil renk test örneklerini göstermektedir).

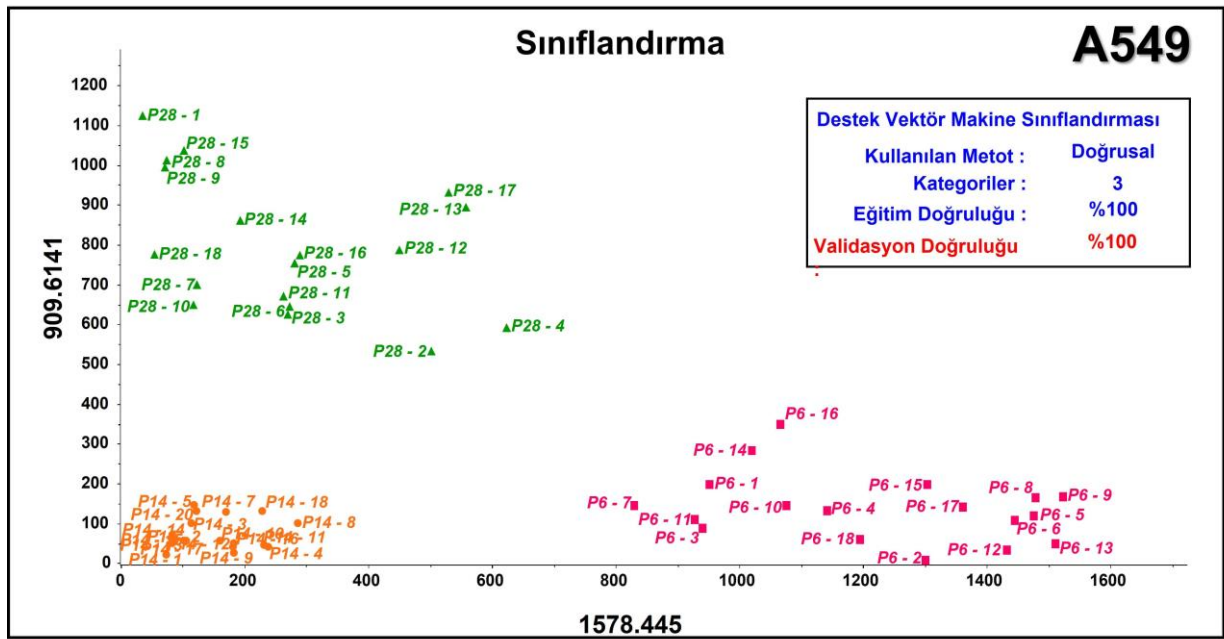


Şekil 40. MCF 7 hücreleri için yapılan SIMCA analizi. (a) model mesafesi, (b, c) örnek mesafeleri (P: pasaj numarasını, P16-1 “1” spektrum sayısını ve açık kırmızı renk test örneklerini göstermektedir).

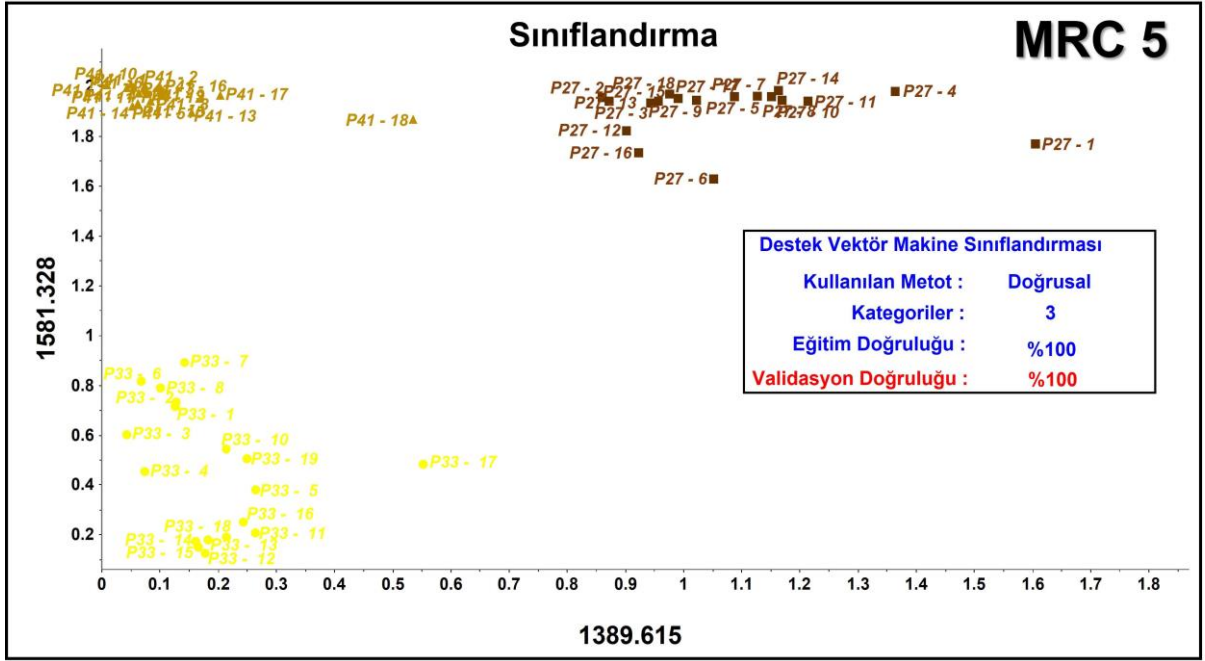


Şekil 41. MCF 10A hücreleri için yapılan SIMCA analizi. (a) model mesafesi, (b, c) örnek mesafeleri (P: pasaj numarasını, P11-1 “1” spektrum sayısını ve toz pembe renk test örneklerini göstermektedir).

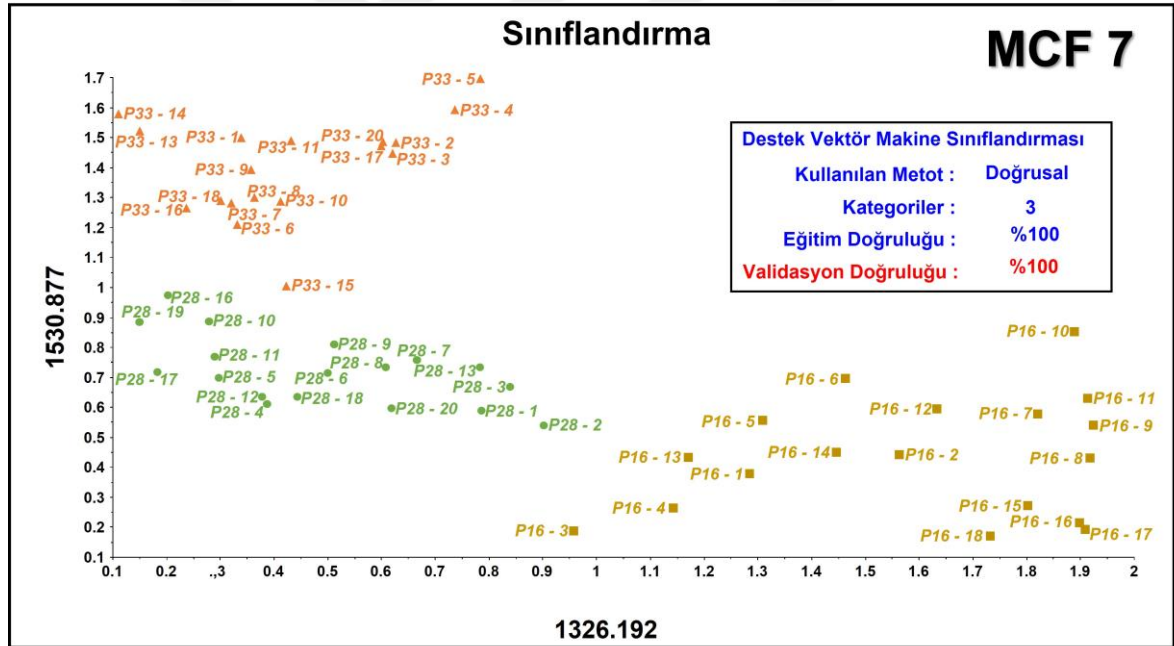
LDA, SIMCA'ya ek olarak; iki spektral alanda SVM sınıflandırma analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz doğrultusunda doğrusal ve doğrusal olmayan yöntemler kullanılmıştır, ayrımın en net gösterildiği yöntem doğrusal olduğu için bu yöntem seçilmiştir. Şekil 42-Şekil 45, A549 için 1.578 ve 909 cm^{-1} , MRC 5 için 1.389 ve 1.581 cm^{-1} , MCF 7 için 1.326 ve 1.530 cm^{-1} , MCF 10A için 882 ve 1.525 cm^{-1} spektral alanlardaki PCA eğitim seti (ya da model), SVM sınıflandırma modelini göstermektedir. LDA ve SIMCA grafikleri gibi SVM analizinde de oluşturulan PCA modellerinin (Ek 1 Tablo 13-16) kendi sınıflarında yer aldığı %100 doğrulukla gösterilmektedir (Ek 1 Tablo 17-20). Ayrıca SVM sonuçlarındaki spektral aralıklar, yükleme spektrumlarındaki (Şekil 46a-Şekil 49a) ayrımın en yoğun olduğu bant bilgileri ile de eşleşmektedir.



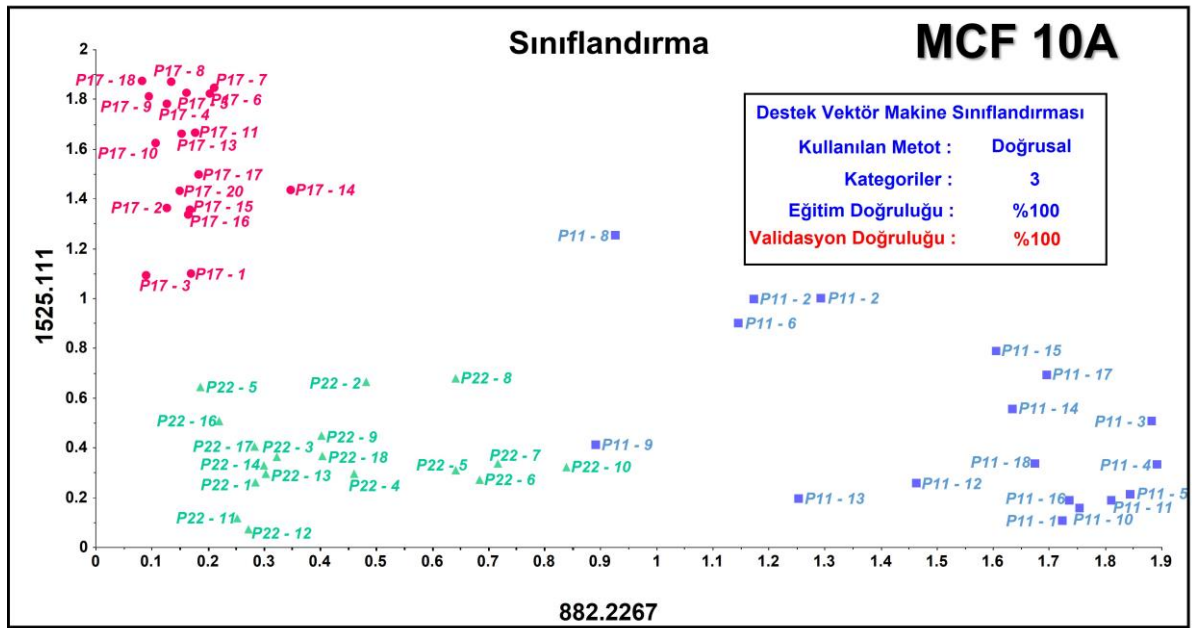
Şekil 42. A549 hücreleri için yapılan SVM analizi (P: pasaj numarasını, P6-1 “1” spektrum sayısını göstermektedir).



Şekil 43. MRC 5 hücreleri için yapılan SVM analizi (P: pasaj numarasını, P27-1 “1” spektrum sayısını göstermektedir).



Şekil 44. MCF 7 hücreleri için yapılan SVM analizi (P: pasaj numarasını, P16-1 “1” spektrum sayısını göstermektedir).



Şekil 45. MCF 10A hücreleri için yapılan SVM analizi (P: pasaj numarasını, P11-1 “1” spektrum sayısını göstermektedir).

Yapılan tüm gözetimli analizler, (LDA, SIMCA, SVM) farklı pasaj numaralarına sahip hücrelerin sınıflandırıldığını başarıyla göstermiştir. Ayrıca, %100 doğrulukla yapılan bu işlemler, farklı pasaj numaralarına sahip hücre hatlarının ayırımında SERS’in etkinliğini göstermesi bakımından önemlidir.

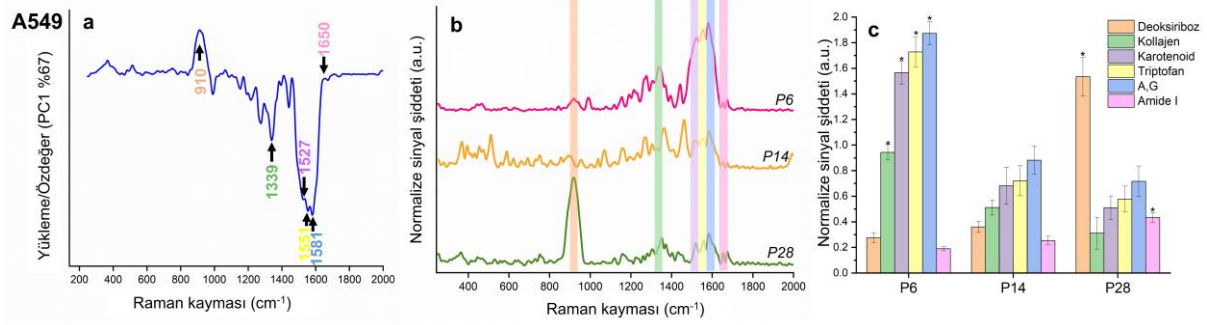
Kalitatif, Kantatif Analizler ile Biyokimyasal Değişikliklerin Belirlenmesi ve Bu Biyokimyasal Değişikliklerin Yaşlanma ile İlişkisinin Değerlendirilmesi

Bu bölümde amaç; farklı pasaj numaralarına göre ayrılan hücre hatlarında, kalitatif analizler ile biyokimyasal değişiklikleri belirlemek ve bu biyokimyasal değişikliklerin yaşlanma ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmaktır. Bu bağlamda farklılaşmanın en yoğun olduğu bantların (PC yükleme (loading) grafikleri), hangi noktada olduğu OriginPro 2022 programı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 46a-Şekil 49a). Bu bantlara karşılık gelen biyomoleküller, literatürde araştırılarak Tablo 9-Tablo 12’de verilmiştir. Ayrıca Tablo 9-Tablo 12; analizler sonucunda elde edilen toplam PC değerlerini de göstermektedir. Bahsi geçen bantların farklı pasaj numaralarına sahip hücre hatlarından alınan ortalama spektrumlardaki lokasyonları, farklı renkler kullanılarak Şekil 46b-Şekil 49b’de gösterilmektedir. Her hücre hattına ait pasaj numarası için ortalaması alınan 20 spektrum kullanılarak one-way ANOVA testi yapılmıştır (Şekil 46c-Şekil 49c). Bu test; biyomoleküllerin pasaj numaralarına göre değişimi ve bu değişikliklerin yaşlanma ile ilişkisinin incelenmesi bakımından önemlidir.

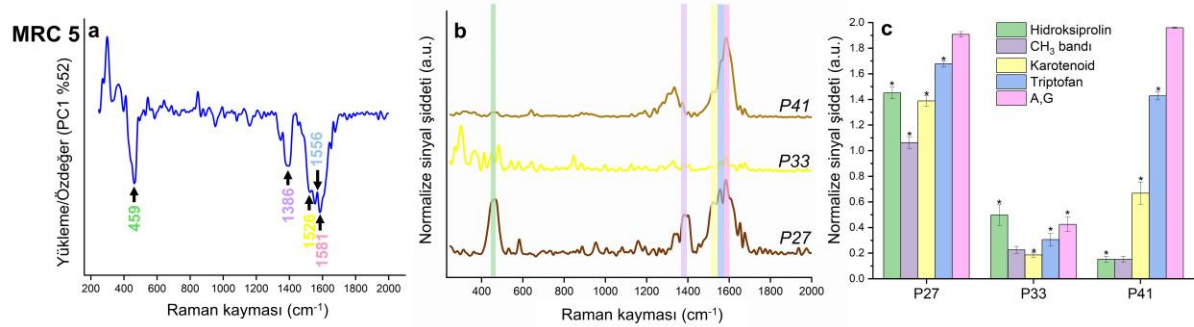
Yaşlanan hücrelerde aromatik amino asitler, tirozin ve fenilalanin miktarının arttığı literatürde belirtilmektedir (Bai *et al.*, 2015). Yapılan one-way ANOVA testi sonucunda; MCF 7 hücre hattına ait (Şekil 48c) 1.540 ile 1.617 cm^{-1} bantlarına atanan bu biyomoleküller, pasaj

sayısına bağılı olarak yaşılanan hücrelerde artış göstermiştir. Aynı biyomoleküllerin seviyesindeki artış MCF 10A hücre hattında (Şekil 49c) MCF 7 hücre hattına göre daha az belirgindir. Bu sonuç; kanser hücrelerindeki yaşılanma süreci ile sağlıklı hücrelerdeki yaşılanma sürecinin birbirinden farklı olabileceğini düşündürmektedir. Bununla beraber sınırsız bölünme yeteneğine sahip kanser hücrelerinde nükleik asit miktarı fazladır (Ganesh *et al.*, 2020). Bu bilgi doğrultusunda A549 kanser hücresinde 910 cm^{-1} bandına denk gelen nükleik asit miktarı, hücre yaşılandıkça artış göstermektedir (Şekil 46c). Ayrıca yaşılanma belirtici olarak kullanılan hücre içi hasarların artışı (proteinlerin hatalı katlanması), aynı hücrede 1.650 cm^{-1} denk gelen Amide I bandının miktarsal olarak artışını (Şekil 46c) da açıklamaktadır. Pasaj numarası artışı ile miktarı değişen diğer bir biyomolekül ise triptofandır ve yaşılanmaya bağılı olarak bu biyomolekülün seviyesindeki azalma literatürde bildirilmiştir (Cervenka *et al.*, 2017). A549 hücre hattına ait 1.551 cm^{-1} piki, triptofan biyomolekülüne atanmıştır (Şekil 46a-c) ve bu biyomolekülün seviyesi hücre yaşılandıkça azalış göstermektedir (Şekil 46c). Bununla beraber aynı biyomolekülün fibroblast kökenli yaşılanan MRC 5 hücre hattındaki seviyesi yaşılanan A549 hücresine kıyasla farklılık göstermektedir (Şekil 47a-c). Bu sonuç bir kez daha kanser hücrelerindeki yaşılanma ile sağlıklı hücrelerdeki yaşılanmanın farklı olabileceğini ve yine fibroblast kökenli hücre ile epitel kökenli hücre tipindeki yaşılanma süreçlerinin değişebileceğini göstermektedir. Tip I kollajen, tümör hücrelerinde, hücre çoğalmasını ve invazyonunu denetler ve miktarı fazladır (Saby *et al.*, 2016). Bu bilgi, A549 hücrelerinde (1.339 cm^{-1} piki) kollajen pikinin varlığını açıklamaktadır (Şekil 46a-c). Ayrıca kollajen miktarının artışı kanser hücrelerindeki metastazı da azalmaktadır (Bartling *et al.*, 2009). 1.527 cm^{-1} pikine atanan karotenoidin (Şekil 46a) akciğer kanseri olan kişilerde miktarının yüksek olduğu literatürde yapılan çalışmalarla bildirilmektedir (Kordiak *et al.*, 2022; Paolini *et al.*, 2003). Bu bilgi doğrultusunda A549 hücresindeki karotenoid seviyesinin fazlalığı beklenen bir sonuçtur (Şekil 46c). Aynı biyomolekülde fibroblast kökenli MRC 5 hücre hattında görülen değişimler (Şekil 47c) dikkat çeken ikinci bir detaydır. Tip I kollajenin seviyesi MCF 10A hücre hattında (Şekil 49a-c) genç pasaja göre azalış göstermektedir ve bu azalış literatürden edinilen; yaşılanmış hücrelerde kollajen seviyesi düşmektedir, bilgisi ile uyumluluk göstermektedir (Rossetti *et al.*, 2011; Sherratt, 2009). MRC 5 hücre hattının 459 cm^{-1} bandına atanan hidroksiprolin amino asiti, toplam amino asitlerin %14'ünü oluşturur ve tüm tiplerdeki kollajenin temel bileşenidir (Cundy *et al.*, 2014). Yaşılanan memeli dokularındaki kollajen miktarı, Teuscher ve ark. tarafından hidroksiprolin amino asitinin seviyesine bakılarak incelenmiş ve hidroksiprolinin yaşılanma ile azalış gösterdiği bilgisi edinilmiştir (Teuscher *et al.*, 2019). Bu kapsamda yaşılanan MRC 5 hücrelerinde hidroksiprolin miktarının yaşa bağılı olarak azalış gösterdiği görülmektedir (Şekil 47c). Aynı çalışmada yaşılanan dokularda fibrozis

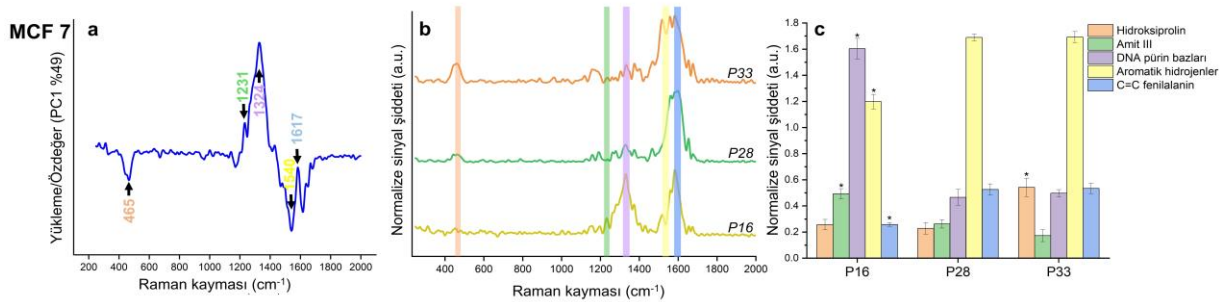
oluşumuyla birlikte bölgesel kollajen miktarının artışı, buna bağlı olarakta hidroksiprolinin artışı bildirilmiştir. Bu bilgi yaşlanan MCF 7 hücrelerindeki fibrozis oluşumunu düşündürmekle birlikte 465 cm^{-1} bandına atanan hidroksiprolinin artışını da anlamlı kılmaktadır (Şekil 48c). Diğer moleküller gibi bu molekülün seviyesi de hem köken hem de sağlıklı ve kanserli hücrelerin yaşlanmaya giden süreç bakımından farklı mekanizmalara sahip olduğunu destekler niteliktedir. Tüm bu sonuçlar; pasaj numarasına bağlı replikatif yaşlanma ile değişen biyokimyasal değişiklikleri açıkça göstermektedir.



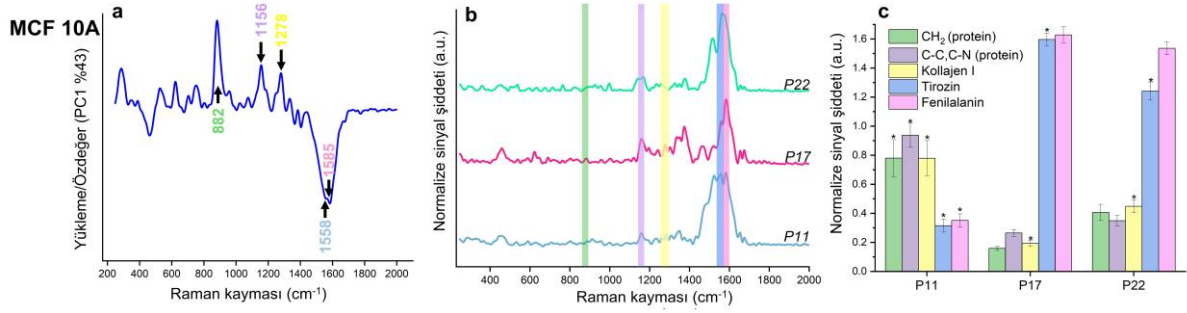
Şekil 46. A549 hücreleri için yapılan tepe noktası atamaları, atamalara karşılık gelen biyomoleküller ve one-way ANOVA Testi. (a) PC1 yükleme grafiği, (b) her pasaj numarası için ortalaması alınan Raman spektrumları, (c) biyomoleküllere karşılık gelen atamalar için yapılan one-way ANOVA Testi.



Şekil 47. MRC 5 hücreleri için yapılan tepe noktası atamaları, atamalara karşılık gelen biyomoleküller ve one-way ANOVA Testi. (a) PC1 yükleme grafiği, (b) her pasaj numarası için ortalaması alınan Raman spektrumları, (c) biyomoleküllere karşılık gelen atamalar için yapılan one-way ANOVA Testi.



Şekil 48. MCF 7 hücreleri için yapılan tepe noktası atamaları, atamalara karşılık gelen biyomoleküller ve one-way ANOVA Testi. (a) PC1 yükleme grafiği, (b) her pasaj numarası için ortalaması alınan Raman spektrumları, (c) biyomoleküllere karşılık gelen atamalar için yapılan one-way ANOVA Testi.



Şekil 49. MCF 10A hücreleri için yapılan tepe noktası atamaları, atamalara karşılık gelen biyomoleküller ve one-way ANOVA Testi. (a) PC1 yükleme grafiği, (b) her pasaj numarası için ortalaması alınan Raman spektrumları, (c) biyomoleküllere karşılık gelen atamalar için yapılan one-way ANOVA Testi.

Tablo 9. A549 hücrelerine ait toplam PC skorları, PC yükleme (loading) grafiklerine atanan pikler ve bu piklere karşılık gelen biyomoleküller. Bold yazı tipi SVM sonuçları ile eşleşen ayrımın en yoğun olduğu bantların bilgisini vermektedir.

PC1+PC2+PC3	PC Yüklemleri (cm ⁻¹)	Biyomoleküller	Referanslar
%85	910 cm ⁻¹	Deoksiriboz	(Y. J. Lee <i>et al.</i>, 2013; Prescott <i>et al.</i>, 1984)
%85	1339 cm ⁻¹	Kollajen	(Cheng <i>et al.</i> , 2005; Talari <i>et al.</i> , 2015; Winnard <i>et al.</i> , 2017)
%85	1527 cm ⁻¹	Karotenoid	(Kutuzov <i>et al.</i> , 2013; G. V. Maksimov <i>et al.</i> , 1995, 2007; H. Ye <i>et al.</i> , 2019)
%85	1551 cm ⁻¹	Triptofan	(Z. Huang <i>et al.</i> , 2003; Poon <i>et al.</i> , 2012; Teixeira <i>et al.</i> , 2009; J. Wang <i>et al.</i> , 2014)
%85	1581 cm ⁻¹	Adenin (A), Guanin (G)	(Canetta <i>et al.</i>, 2011; De Luca <i>et al.</i>, 2014; H. Huang <i>et al.</i>, 2013; Jess <i>et al.</i>, 2007; Notingher, 2007; Talari <i>et al.</i>, 2015)
%85	1650 cm ⁻¹	Amide I	(Falamas <i>et al.</i> , 2010; Kobori <i>et al.</i> , 2007; Thomas <i>et al.</i> , 2017; H. Ye <i>et al.</i> , 2019)

Tablo 10. MRC 5 hücrelerine ait toplam PC skorları, PC yükleme (loading) grafiklerine atanan pikler ve bu piklere karşılık gelen biyomoleküller. Bold yazı tipi SVM sonuçları ile eşleşen ayrımın en yoğun olduğu bantların bilgisini vermektedir.

PC1+PC2+PC3	PC Yüklemleri (cm ⁻¹)	Biyomoleküller	Referanslar
%82	459 cm ⁻¹	Hidroksiprolinin C-C halka titreşimleri	(Azeem <i>et al.</i> , 2022)
%82	1386 cm ⁻¹	CH ₃ bandı	(Draga <i>et al.</i> , 2010; Movasaghi <i>et al.</i> , 2007; Stone <i>et al.</i> , 2004; Talari <i>et al.</i> , 2015)
%82	1526 cm ⁻¹	Karotenoid	(Kutuzov <i>et al.</i> , 2013; G. V. Maksimov <i>et al.</i> , 1995, 2007; H. Ye <i>et al.</i> , 2019)
%82	1556 cm ⁻¹	Triptofan	(Chou <i>et al.</i> , 2008; Movasaghi <i>et al.</i> , 2007; Shalabaeva <i>et al.</i> , 2017; Talari <i>et al.</i> , 2015)s
%82	1581 cm ⁻¹	A, G	(Canetta <i>et al.</i> , 2011; De Luca <i>et al.</i> , 2014; H. Huang <i>et al.</i> , 2013; Jess <i>et al.</i> , 2007; Notingher, 2007; Talari <i>et al.</i> , 2015)

Tablo 11. MCF 7 hücrelerine ait toplam PC skorları, PC yükleme (loading) grafiklerine atanan pikler ve bu piklere karşılık gelen biyomoleküller. Bold yazı tipi SVM sonuçları ile eşleşen ayrımın en yoğun olduğu bantların bilgisini vermektedir.

PC1+PC2+PC3	PC Yüklemleri (cm ⁻¹)	Biyomoleküller	Referanslar
%75	465 cm ⁻¹	Hidroksiprolinin C-C halka titreşimleri	(Azeem <i>et al.</i> , 2022)
%75	1231 cm ⁻¹	Amit III	(Brauchle <i>et al.</i> , 2016; P. Chen <i>et al.</i> , 2011; Y. Chen <i>et al.</i> , 2014; Risi <i>et al.</i> , 2012)
%75	1324 cm ⁻¹	DNA'nın pürin bazları	(Lau <i>et al.</i> , 2005; Perno <i>et al.</i> , 1989; Talari <i>et al.</i> , 2015)
%75	1540 cm ⁻¹	Amid karbonil grubu titreşimleri ve aromatik hidrojenler	(Katainen <i>et al.</i> , 2007; Movasaghi <i>et al.</i> , 2007; Talari <i>et al.</i> , 2015; Yazdi <i>et al.</i> , 1999)

Tablo 11. (devamı)

%75	1617 cm ⁻¹	Fenilalanin (C=C), Tirozin	(Kunapareddy <i>et al.</i> , 2008; Z. Liu <i>et al.</i> , 2008; Movasaghi <i>et al.</i> , 2007; Talari <i>et al.</i> , 2015)
-----	-----------------------	-------------------------------	---

Tablo 12. MCF 10A hücrelerine ait toplam PC skorları, PC yükleme (loading) grafiklerine atanan pikler ve bu piklere karşılık gelen biyomoleküller. Bold yazı tipi SVM sonuçları ile eşleşen ayrımın en yoğun olduğu bantların bilgisini vermektedir.

PC1+PC2+PC3	PC Yükleme (cm ⁻¹)	Biyomoleküller	Referanslar
%68	882 cm ⁻¹	CH ₂ gerilme modu- protein	(Bhattacharjee <i>et al.</i> , 2014; Chowdary <i>et al.</i> , 2006; Movasaghi <i>et al.</i> , 2007; Talari <i>et al.</i> , 2015)
%68	1156 cm ⁻¹	C-C, C-N gerilmesi - protein	(Chan <i>et al.</i> , 2006; Movasaghi <i>et al.</i> , 2007; Peticolas, 1995; Talari <i>et al.</i> , 2015)
%68	1278 cm ⁻¹	Protein, Kollajen I	(Binoy <i>et al.</i> , 2004; Movasaghi <i>et al.</i> , 2007; Talari <i>et al.</i> , 2015)
%68	1558 cm ⁻¹	Tirozin, Amit II, COO-	(Lakshmi <i>et al.</i> , 2002; Movasaghi <i>et al.</i> , 2007; Talari <i>et al.</i> , 2015)
%68	1585 cm ⁻¹	Fenilalanin, Hidroksiprolin	(N. Huang <i>et al.</i> , 2011; Movasaghi <i>et al.</i> , 2007; Talari <i>et al.</i> , 2015)

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez kapsamında elde edilen sonuçları şu şekilde özetlemek anlamlı olacaktır.

- Son derece hassas, ucuz 3D anizotropik yapıda GNA etiketsiz SERS platformu PVD tekniği kullanılarak üretilmiştir.
- Farklı pasaj numaralarına sahip sağlıklı ve kanserli hücre hatları kültürlenerek SERS platformu ile birleştirilmiştir.
- SERS platformu üzerindeki hücrelerden haritalama yöntemiyle spektrumlar başarıyla toplanmıştır.
- Elde edilen spektrumlar içerisinde Şekil 27’de gösterildiği gibi sinyal şiddeti yüksek, her hücre hattı için ayrı ayrı 20 spektrum seçilmiştir.
- Bu spektrumlar, daha hassas ve güvenilir bilgi sağlamak amacıyla ön işleme aşamalarından geçirilmiş ve çok değişkenli istatistiksel analizlere tabi tutulmuşlardır.
- Yapılan istatistiksel analizler sonucunda farklı pasaj numarasına sahip hücre hatlarının birbirinden ayrıldığı %100 doğrulukla gösterilmiştir.
- Pasaj sayısının artışıyla ilişkili yaşlanan hücre hatlarındaki biyokimyasal değişimler, pik ataması yapılarak incelenmiş ve bu piklerin yaşlanmayla bağlantılı olduğu sonucuna varılmıştır.

Özetle; SERS etiketsiz tespit yöntemiyle pasaj sayısına bağlı olarak yaşlanan hücrelerin birbirinden ayrıldığı beş farklı analiz ile gösterilmiş olup her hücreden alınan spektrumlardaki niceliksel değişiklikler, one-way ANOVA testi kullanılarak izlenmiştir. A549, MCF 7 kanserli hücre hatlarındaki yaşlanmaya giden süreç ile sağlıklı hücreler olan MRC 5 VE MCF 10A’da yaşlanma süreci birbirinden farklılık göstermektedir. Kanserli hücrelerin PC loading grafiği (Şekil 46a-Şekil 48a) (ayrımın hangi bant aralığında olduğu bilgisi) yaşlanmış hücreler hakkında daha az bilgi sunarken, sağlıklı yaşlanan hücrelerde bu grafiğin (Şekil 47a-Şekil 49a) daha fazla bilgi sunduğu görülmektedir. 12 hücre hattının her birinden 20 spektrum alınarak gerçekleştirilen beş farklı analiz ile bu hücrelerin birbirinden ayrıldığı %100 doğrulukla gösterilmektedir. Ayrıca bu çalışma epitel ve fibroblast kökenli yaşlanan hücrelerin birbirinden ayrıldığını ve farklı yaşlanma süreçlerine sahip olduklarını göstermesi bakımından önemlidir. Ek olarak bu çalışma; etiketsiz tespit sistemi kullanılarak *in vitro* yaşlanma sürecinin başarıyla izlenmesini mümkün kılmıştır. Elde edilen veriler, gelecekte yaşa bağlı uygulamaların ilk adımını oluşturması bakımından dikkat çekicidir.

KAYNAKÇA

- Abid Hasan, S. M., He, Y., Chang, T. W., Wang, J., & Gartia, M. R. (2019). Detecting DNA Methylation Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry C*, 123(1), 698–709. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b10178>
- Absher, P. M., Absher, R. G., & Barnes, W. D. (1974). Genealogies of clones of diploid fibroblasts. Cinemicrophotographic observations of cell division patterns in relation to population age. *Experimental Cell Research*, 88(1). [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(74\)90622-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(74)90622-3)
- Andrew, A. M. (2001). An Introduction to Support Vector Machines and Other Kernel-based Learning Methods. In *Kybernetes* (Vol. 30, Issue 1). <https://doi.org/10.1108/k.2001.30.1.103.6>
- Angello, J. C., Pendergrass, W. R., Norwood, T. H., & Prothero, J. (1989). Cell enlargement: One possible mechanism underlying cellular senescence. *Journal of Cellular Physiology*, 140(2), 288–294. <https://doi.org/10.1002/JCP.1041400214>
- Aroca, R. F., Alvarez-Puebla, R. A., Pieczonka, N., Sanchez-Cortez, S., & Garcia-Ramos, J. V. (2005). Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science*, 116(1–3), 45–61. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2005.04.007>
- Aruna, S. (2011). A Novel SVM based CSSFFS Feature Selection Algorithm for Detecting Breast Cancer. *International Journal of Computer Applications*, 31(8), 975–8887.
- Azeem, M., Qaisar, R., Karim, A., Ranade, A., & Elmoselhi, A. (2022). Density Functional Model of Raman Spectra for the Seminiferous Tubules of Hindlimb Unloaded Mice. *Spectroscopy*, 36–41. <https://doi.org/10.56530/SPECTROSCOPY.TE7075V5>
- Bai, H., Li, H., Han, Z., Zhang, C., Zhao, J., Miao, C., Yan, S., Mao, A., Zhao, H., & Han, Z. (2015). Label-free assessment of replicative senescence in mesenchymal stem cells by Raman microspectroscopy. *Biomedical Optics Express*, 6(11). <https://doi.org/10.1364/boe.6.004493>
- Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D., & Van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530(7589), 184–189. <https://doi.org/10.1038/nature16932>
- Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonja, T., Lebrasseur, N. K., Childs, B. G., Van De Sluis, B.,

- Kirkland, J. L., & Van Deursen, J. M. (2011). Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372). <https://doi.org/10.1038/nature10600>
- Baker, M. J., Clarke, C., Démoulin, D., Nicholson, J. M., Lyng, F. M., Byrne, H. J., Hart, C. A., Brown, M. D., Clarke, N. W., & Gardner, P. (2010). An investigation of the RWPE prostate derived family of cell lines using FTIR spectroscopy. *The Analyst*, 135(5), 887–894. <https://doi.org/10.1039/B920385K>
- Bartling, B., Desole, M., Rohrbach, S., Silber, R.-E., & Simm, A. (2009). Age-associated changes of extracellular matrix collagen impair lung cancer cell migration. *The FASEB Journal*, 23(5), 1510–1520. <https://doi.org/10.1096/FJ.08-122648>
- Bernadotte, A., Mikhelson, V. M., & Spivak, I. M. (2016). Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging*, 8(1), 3–11. <https://doi.org/10.18632/aging.100871>
- Bhattacharjee, T., Kumar, P., Maru, G., Ingle, A., & Krishna, C. M. (2014). Swiss bare mice: A suitable model for transcutaneous in vivo Raman spectroscopic studies of breast cancer. *Lasers in Medical Science*, 29(1), 325–333. <https://doi.org/10.1007/S10103-013-1347-9/TABLES/2>
- Binoy, J., Abraham, J. P., Joe, I. H., Jayakumar, V. S., Pettit, G. R., & Nielsen, O. F. (2004). NIR-FT Raman and FT-IR spectral studies and ab initio calculations of the anti-cancer drug combretastatin-A4. *Journal of Raman Spectroscopy*, 35(11), 939–946. <https://doi.org/10.1002/jrs.1236>
- Brauchle, E., Knopf, A., Bauer, H., Shen, N., Linder, S., Monaghan, M. G., Ellwanger, K., Layland, S. L., Brucker, S. Y., Nsair, A., & Schenke-Layland, K. (2016). Non-invasive Chamber-Specific Identification of Cardiomyocytes in Differentiating Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 6(2). <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.12.007>
- Briske-Anderson, M. J., Finley, J. W., & Newman, S. M. (1997). The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 214(3), 248–257. <https://doi.org/10.3181/00379727-214-44093>
- Canetta, E., Mazilu, M., De Luca, A. C., Carruthers, A. E., Dholakia, K., Neilson, S., Sargeant, H., Briscoe, T., Herrington, C. S., & Riches, A. C. (2011). Modulated Raman spectroscopy for enhanced identification of bladder tumor cells in urine samples. *Journal of Biomedical Optics*, 16(3). <https://doi.org/10.1117/1.3556722>

- Cao, Y. C., Jin, R., Nam, J. M., Thaxton, C. S., & Mirkin, C. A. (2003). Raman Dye-Labeled Nanoparticle Probes for Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 125(48), 14676–14677.
https://doi.org/10.1021/JA0366235/SUPPL_FILE/JA0366235SI20031010_035823.PDF
- Cardona, M., & Giintherodt, G. (1984). Light Scattering in Solids IV: Electronic Scattering, Spin Effects, SERS, and Morphic Effects. *Springer-Verlag*, 54(3), 327–328.
<http://link.springer.com/10.1007/3-540-11942-6>
- Carroll, B., Nelson, G., Rabanal-Ruiz, Y., Kucheryavenko, O., Dunhill-Turner, N. A., Chesterman, C. C., Zahari, Q., Zhang, T., Conduit, S. E., Mitchell, C. A., Maddocks, O. D. K., Lovat, P., von Zglinicki, T., & Korolchuk, V. I. (2017). Persistent mTORC1 signaling in cell senescence results from defects in amino acid and growth factor sensing. *Journal of Cell Biology*, 216(7). <https://doi.org/10.1083/jcb.201610113>
- Cervenka, I., Agudelo, L. Z., & Ruas, J. L. (2017). Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. In *Science* (Vol. 357, Issue 6349). <https://doi.org/10.1126/science.aaf9794>
- Chan, J. W., Taylor, D. S., Zwerdling, T., Lane, S. M., Ihara, K., & Huser, T. (2006). Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. *Biophysical Journal*, 90(2). <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.066761>
- Chaturvedi, D., Balaji, S. A., Bn, V. K., Ariese, F., Umapathy, S., & Rangarajan, A. (2016). Different Phases of Breast Cancer Cells: Raman Study of Immortalized, Transformed, and Invasive Cells. *Biosensors* 2016, Vol. 6, Page 57, 6(4), 57.
<https://doi.org/10.3390/BIOS6040057>
- Chen, F., Flaherty, B. R., Cohen, C. E., Peterson, D. S., & Zhao, Y. (2016). Direct detection of malaria infected red blood cells by surface enhanced Raman spectroscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(6), 1445–1451.
<https://doi.org/10.1016/J.NANO.2016.03.001>
- Chen, P., Zhang, F., Lin, L., Bai, H., Zhang, L., Q. Tang, G., Fang, H., G. Mu, G., Gong, W., P., Z., B., Z., Zhao, H., & C., Z. (2011). Raman Spectroscopy for Noninvasive Monitoring of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Viability Transitions. In *Stem Cells in Clinic and Research*. <https://doi.org/10.5772/24103>
- Chen, Y., Dai, J., Zhou, X., Liu, Y., Zhang, W., & Peng, G. (2014). Raman spectroscopy analysis of the biochemical characteristics of molecules associated with the malignant transformation of gastric mucosa. *PLoS ONE*, 9(4).

- Cheng, W. T., Liu, M. T., Liu, H. N., & Lin, S. Y. (2005). Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma. *Microscopy Research and Technique*, 68(2), 75–79. <https://doi.org/10.1002/jemt.20229>
- Chini, C. C. S., Gonzalez Guerrico, A. M., Nin, V., Camacho-Pereira, J., Escande, C., Barbosa, M. T., & Chini, E. N. (2014). Targeting of NAD metabolism in pancreatic cancer cells: Potential novel therapy for pancreatic tumors AC. *Clinical Cancer Research*, 20(1), 120–130. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0150>
- Chou, I. H., Benford, M., Beier, H. T., Coté, G. L., Wang, M., Jing, N., Kameoka, J., & Good, T. A. (2008). Nanofluidic biosensing for β -amyloid detection using surface enhanced raman spectroscopy. *Nano Letters*, 8(6), 1729–1735. <https://doi.org/10.1021/nl0808132>
- Chowdary, M. V. P., Kumar, K. K., Kurien, J., Mathew, S., & Krishna, C. M. (2006). Discrimination of normal, benign, and malignant breast tissues by Raman spectroscopy. *Biopolymers*, 83(5), 556–569. <https://doi.org/10.1002/BIP.20586>
- Çınar Bam, B. (2017). *Nanoyapılı İnce film Örneklerin, Geçirmeli ve Yüzey Taramalı X-Işını Saçılma Yöntemleri (SAXS-GISAXS) ile İncelenmesi* [Fen Bilimleri Enstitüsü]. <http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/handle/11655/3581>
- Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C., & Tresini, M. (2004). Replicative senescence: A critical review. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(10-11 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.010>
- Cundy, T., Reid, I. R., & Grey, A. (2014). Metabolic bone disease. In *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5140-1.00031-6>
- Das, R. S., & Agrawal, Y. K. (2011). Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy*, 57(2), 163–176. <https://doi.org/10.1016/J.VIBSPEC.2011.08.003>
- De Luca, A. C., Managó, S., Ferrara, M. A., Rendina, I., Sirleto, L., Puglisi, R., Balduzzi, D., Galli, A., Ferraro, P., & Coppola, G. (2014). Non-invasive sex assessment in bovine semen by Raman spectroscopy. *Laser Physics Letters*, 11(5). <https://doi.org/10.1088/1612-2011/11/5/055604>
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R. M., Vijg, J., VanSteeg, H., Dollé, M. E. T., Hoeijmakers, J. H. J., deBruin, A., Hara, E., &

- Campisi, J. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell*, 31(6). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>
- Ding, S. Y., Yi, J., Li, J. F., Ren, B., Wu, D. Y., Panneerselvam, R., & Tian, Z. Q. (2016). Nanostructure-based plasmon-enhanced Raman spectroscopy for surface analysis of materials. *Nature Reviews Materials* 2016 1:6, 1(6), 1–16. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.21>
- Dizaji, A. N., Ozek, N. S., Yilmaz, A., Aysin, F., & Yilmaz, M. (2021). Gold nanorod arrays enable highly sensitive bacterial detection via surface-enhanced infrared absorption (SEIRA) spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 206, 111939. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2021.111939>
- Draga, R. O. P., Grimbergen, M. C. M., Vijverberg, P. L. M., Swol, C. F. P. V., Jonges, T. G. N., Kummer, J. A., & Ruud Bosch, J. L. H. (2010). In vivo bladder cancer diagnosis by high-volume Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 82(14), 5993–5999. <https://doi.org/10.1021/ac100448p>
- Driskell, J. D., Seto, A. G., Jones, L. P., Jokela, S., Dluhy, R. A., Zhao, Y. P., & Tripp, R. A. (2008). Rapid microRNA (miRNA) detection and classification via surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4), 917–922. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2008.07.060>
- Driskell, J. D., Zhu, Y., Kirkwood, C. D., Zhao, Y., Dluhy, R. A., & Tripp, R. A. (2010). Rapid and Sensitive Detection of Rotavirus Molecular Signatures Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *PLOS ONE*, 5(4), e10222. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010222>
- Eberhardt, K., Beleites, C., Marthandan, S., Matthäus, C., Diekmann, S., & Popp, J. (2017). Raman and Infrared Spectroscopy Distinguishing Replicative Senescent from Proliferating Primary Human Fibroblast Cells by Detecting Spectral Differences Mainly Due to Biomolecular Alterations. *Analytical Chemistry*, 89(5). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04264>
- El-Said, W. A., Kim, S. U., & Choi, J. W. (2015). Monitoring in vitro neural stem cell differentiation based on surface-enhanced Raman spectroscopy using a gold nanostar array. *Journal of Materials Chemistry C*, 3(16), 3848–3859. <https://doi.org/10.1039/c5tc00304k>
- Etchegoin, P. G., & Le Ru, E. C. (2008). A perspective on single molecule SERS: current status

- and future challenges. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(40), 6079–6089. <https://doi.org/10.1039/B809196J>
- Falamas, A., Cinta-Pinzaru, S., Dehelean, C., Krafft, C., & Popp, J. (2010). Raman and FT-IR imaging of in vivo damaged tissue induced By 7, 12-Dimethylbenzanthracene (DMBA) in mouse models. *Romanian Journal of Biophysics*, 20(1), 1–11.
- Feng, S., Chen, R., Lin, J., Pan, J., Wu, Y., Li, Y., Chen, J., & Zeng, H. (2011). Gastric cancer detection based on blood plasma surface-enhanced Raman spectroscopy excited by polarized laser light. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(7), 3167–3174. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2010.12.020>
- Fu, W. L., Zhen, S. J., & Huang, C. Z. (2014). Controllable preparation of graphene oxide/metal nanoparticle hybrids as surface-enhanced Raman scattering substrates for 6-mercaptopurine detection. *RSC Advances*, 4(31), 16327–16332. <https://doi.org/10.1039/C4RA00658E>
- Gaba, F., Tipping, W. J., Salji, M., Faulds, K., Graham, D., & Leung, H. Y. (2022). Raman Spectroscopy in Prostate Cancer: Techniques, Applications and Advancements. *Cancers* 2022, Vol. 14, Page 1535, 14(6), 1535. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14061535>
- Ganesh, S., Venkatakrishnan, K., & Tan, B. (2020). Quantum scale organic semiconductors for SERS detection of DNA methylation and gene expression. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14774-3>
- Garg, V. K., & Kalai, A. (2018). Supervising Unsupervised Learning Clustering problem in isolation : Clustering repository : How many clusters ? *Neural Information Processing Systems (NIPS), Nips*.
- Ginzberg, M. B., Kafri, R., & Kirschner, M. (2015). On being the right (cell) size. *Science*, 348(6236). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1245075/ASSET/6F6F0D07-A330-483B-BC8C-61053A5A3D20/ASSETS/GRAPHIC/348_1245075_FA.JPEG
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., ... Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813–827. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.10.005>
- Granato, D., Santos, J. S., Escher, G. B., Ferreira, B. L., & Maggio, R. M. (2018). Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for

- multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 72(October 2017), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.006>
- Haldavnekar, R., Venkatakrishnan, K., & Tan, B. (2018). Non plasmonic semiconductor quantum SERS probe as a pathway for in vitro cancer detection. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05237-x>
- Harmsen, S., Huang, R., Wall, M. A., Karabeber, H., Samii, J. M., Spaliviero, M., White, J. R., Monette, S., O'Connor, R., Pitter, K. L., Sastra, S. A., Saborowski, M., Holland, E. C., Singer, S., Olive, K. P., Lowe, S. W., Blasberg, R. G., & Kircher, M. F. (2015). Surface-enhanced resonance Raman scattering nanostars for high-precision cancer imaging. *Science Translational Medicine*, 7(271). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3010633>
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3). [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- He, X., Liu, Y., Xue, X., Liu, J., Liu, Y., & Li, Z. (2017). Ultrasensitive detection of explosives: Via hydrophobic condensation effect on biomimetic SERS platforms. *Journal of Materials Chemistry C*, 5(47), 12384–12392. <https://doi.org/10.1039/c7tc04325b>
- Huang, H., Shi, H., Feng, S., Chen, W., Yu, Y., Lin, D., & Chen, R. (2013). Confocal Raman spectroscopic analysis of the cytotoxic response to cisplatin in nasopharyngeal carcinoma cells. *Analytical Methods*, 5(1), 260–266. <https://doi.org/10.1039/c2ay25684c>
- Huang, N., Short, M., Zhao, J., Wang, H., Lui, H., Korbelik, M., & Zeng, H. (2011). Full range characterization of the Raman spectra of organs in a murine model. *Optics Express*, 19(23), 22892. <https://doi.org/10.1364/oe.19.022892>
- Huang, Z., McWilliams, A., Lui, H., McLean, D. I., Lam, S., & Zeng, H. (2003). Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. *International Journal of Cancer*, 107(6), 1047–1052. <https://doi.org/10.1002/ijc.11500>
- Huang, Z., Meng, G., Chen, B., Zhu, C., Han, F., Hu, X., & Wang, X. (2016). Surface-Enhanced Raman Scattering from au-nanorod arrays with sub-5-nm gaps stuck out of an AAO template. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(1), 934–938.

<https://doi.org/10.1166/jnn.2016.10809>

- Huang, Z., Zhang, A., Zhang, Q., & Cui, D. (2019). Nanomaterial-based SERS sensing technology for biomedical application. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(24), 3755–3774. <https://doi.org/10.1039/c9tb00666d>
- Huefner, A., Kuan, W. L., Barker, R. A., & Mahajan, S. (2013). Intracellular SERS nanoprobe for distinction of different neuronal cell types. *Nano Letters*, 13(6), 2463–2470. <https://doi.org/10.1021/nl400448n>
- Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H., & Gelber, C. (2007). The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: How much more data do we need? *BioTechniques*, 43(5), 575–586. <https://doi.org/10.2144/000112598>
- Hwang, E. S., Yoon, G., & Kang, H. T. (2009). A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 66, Issue 15). <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0034-2>
- Iske, J., Seyda, M., Heinbokel, T., Maenosono, R., Minami, K., Nian, Y., Quante, M., Falk, C. S., Azuma, H., Martin, F., Passos, J. F., Niemann, C. U., Tchkonja, T., Kirkland, J. L., Elkhail, A., & Tullius, S. G. (2020). Senolytics prevent mt-DNA-induced inflammation and promote the survival of aged organs following transplantation. *Nature Communications*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18039-x>
- Jarvis, R. M., Law, N., Shadi, I. T., O'Brien, P., Lloyd, J. R., & Goodacre, R. (2008). Surface-enhanced Raman scattering from intracellular and extracellular bacterial locations. *Analytical Chemistry*, 80(17), 6741–6746. https://doi.org/10.1021/AC800838V/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2008-00838V_0002.JPEG
- Jensen, H. L., & Norrild, B. (2000). The effects of cell passages on the cell morphology and the outcome of herpes simplex virus type 1 infection. *Journal of Virological Methods*, 84(2), 139–152. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00129-9](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00129-9)
- Jess, P. R. T., Smith, D. D. W., Mazilu, M., Dholakia, K., Riches, A. C., & Herrington, C. S. (2007). Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy. *International Journal of Cancer*, 121(12). <https://doi.org/10.1002/ijc.23046>
- Johmura, Y., Yamanaka, T., Omori, S., Wang, T. W., Sugiura, Y., Matsumoto, M., Suzuki, N., Kumamoto, S., Yamaguchi, K., Hatakeyama, S., Takami, T., Yamaguchi, R., Shimizu, E., Ikeda, K., Okahashi, N., Mikawa, R., Suematsu, M., Arita, M., Sugimoto, M., ...

- Nakanishi, M. (2021). Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6526), 265–270. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB5916>
- Jokerst, J. V., Cole, A. J., Van De Sompel, D., & Gambhir, S. S. (2012). Gold nanorods for ovarian cancer detection with photoacoustic imaging and resection guidance via Raman imaging in living mice. *ACS Nano*, 6(11), 10366–10377. https://doi.org/10.1021/NN304347G/SUPPL_FILE/NN304347G_SI_003.AVI
- Kang, J. W., So, P. T. C., Dasari, R. R., & Lim, D. K. (2015). High resolution live cell Raman imaging using subcellular organelle-targeting SERS-sensitive gold nanoparticles with highly narrow intra-nanogap. *Nano Letters*, 15(3), 1766–1772. <https://doi.org/10.1021/NL504444W>
- Kaplon, J., Zheng, L., Meissl, K., Chaneton, B., Selivanov, V. A., MacKay, G., Van Der Burg, S. H., Verdegaal, E. M. E., Cascante, M., Shlomi, T., Gottlieb, E., & Peeper, D. S. (2013). A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature*, 498(7452), 109–112. <https://doi.org/10.1038/nature12154>
- Katainen, E., Elomaa, M., Laakkonen, U. M., Sippola, E., Niemelä, P., Suhonen, J., & Järvinen, K. (2007). Quantification of the amphetamine content in seized street samples by Raman spectroscopy. *Journal of Forensic Sciences*, 52(1), 88–92. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00306.x>
- Khanmohammadi, M., Ansari, M. A., Garmarudi, A. B., Hassanzadeh, G., & Garoosi, G. (2009). Cancer Diagnosis by Discrimination between Normal and Malignant Human Blood Samples Using Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/02770900701512555](http://Dx.Doi.Org/10.1080/02770900701512555), 25(6), 397–404. <https://doi.org/10.1080/02770900701512555>
- Kim, J. H., Kim, J. S., Choi, H., Lee, S. M., Jun, B. H., Yu, K. N., Kuk, E., Kim, Y. K., Jeong, D. H., Cho, M. H., & Lee, Y. S. (2006). Nanoparticle probes with surface enhanced Raman spectroscopic tags for cellular cancer targeting. *Analytical Chemistry*, 78(19), 6967–6973. https://doi.org/10.1021/AC0607663/SUPPL_FILE/AC0607663SI20060708_115328.PDF
- Kim, Y. M., Byun, H. O., Jee, B. A., Cho, H., Seo, Y. H., Kim, Y. S., Park, M. H., Chung, H. Y., Woo, H. G., & Yoon, G. (2013). Implications of time-series gene expression profiles of replicative senescence. *Aging Cell*, 12(4), 622–634. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12087>

- Kneipp, J., Kneipp, H., Rajadurai, A., Redmond, R. W., & Kneipp, K. (2009). Optical probing and imaging of live cells using SERS labels. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(1), 1–5. <https://doi.org/10.1002/jrs.2060>
- Kneipp, K., Haka, A. S., Badizadegan, K., Shafer-Peltier, K. E., Dasari, R. R., Feld, M. S., Motz, J. T., Yoshizawa, N., Kneipp, H., & Boone, C. (2002). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Single Living Cells Using Gold Nanoparticles. *Applied Spectroscopy*, Vol. 56, Issue 2, Pp. 150-154, 56(2), 150–154. <https://opg.optica.org/abstract.cfm?uri=as-56-2-150>
- Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., Perelman, L. T., Itzkan, I., Dasari, R. R., & Feld, M. S. (1997). Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Physical Review Letters*, 78(9), 1667. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.1667>
- Kobori, T., Iwamoto, S., Takeyasu, K., & Ohtani, T. (2007). Biopolymers Volume 85 / Number 4 295. *Biopolymers*, 85(4), 392–406. <https://doi.org/10.1002/bip>
- Kolodziejczyk, A. M., Kucinska, M., Jakubowska, A., Sokolowska, P., Rosowski, M., Tkacz-Szczesna, B., Komorowski, P., Makowski, K., & Walkowiak, B. (2020). Endothelial cell aging detection by means of atomic force spectroscopy. *Journal of Molecular Recognition*, 33(12), e2853. <https://doi.org/10.1002/JMR.2853>
- Kordiak, J., Bielec, F., Jabłoński, S., & Pastuszek-Lewandoska, D. (2022). Role of Beta-Carotene in Lung Cancer Primary Chemoprevention: A Systematic Review with Meta-Analysis and Meta-Regression. In *Nutrients* (Vol. 14, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/nu14071361>
- Krishnan, R. S., & Shankar, R. K. (1981). Raman effect: History of the discovery. *Journal of Raman Spectroscopy*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/JRS.1250100103>
- Ksiazek, K., Mikula-Pietrasik, J., Olijslagers, S., Jörres, A., Von Zglinicki, T., & Witowski, J. (2009). Vulnerability to oxidative stress and different patterns of senescence in human peritoneal mesothelial cell strains. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 296(2). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90451.2008>
- Kunapareddy, N., Freyer, J. P., & Mourant, J. R. (2008). Raman spectroscopic characterization of necrotic cell death. *Journal of Biomedical Optics*, 13(5). <https://doi.org/10.1117/1.2978061>
- Kutuzov, N. P., Brazhe, A. R., Yusipovich, A. I., Maksimov, G. V., Dracheva, O. E.,

- Lyaskovskiy, V. L., Bulygin, F. V., & Rubin, A. B. (2013). ATP-induced lipid membrane reordering in the myelinated nerve fiber identified using Raman spectroscopy. *Laser Physics Letters*, 10(7). <https://doi.org/10.1088/1612-2011/10/7/075606>
- Kwist, K., Bridges, W. C., & Burg, K. J. L. (2016). The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology*, 68(4), 1661–1667. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9883-8>
- Lakshmi, R. J., Kartha, V. B., Krishna, C. M., Solomon, J. G. R., Ullas, G., & Devi, P. U. (2002). Tissue Raman spectroscopy for the study of radiation damage: Brain irradiation of mice. *Radiation Research*, 157(2), 175–182. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2002\)157\[0175:TRSFTS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2002)157[0175:TRSFTS]2.0.CO;2)
- Lane, L. A., Qian, X., & Nie, S. (2015). SERS Nanoparticles in Medicine: From Label-Free Detection to Spectroscopic Tagging. *Chemical Reviews*, 115(19), 10489–10529. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.5B00265/ASSET/IMAGES/LARGE/CR-2015-00265Q_0004.JPEG
- Langelier, E. G., Van Uffelen, C. J. C., Blankenstein, M. A., Van Steenbrugge, G. J., & Mulder, E. (1993). Effect of culture conditions on androgen sensitivity of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *The Prostate*, 23(3), 213–223. <https://doi.org/10.1002/PROS.2990230304>
- Langer, J., de Aberasturi, D. J., Aizpurua, J., Alvarez-Puebla, R. A., Auguie, B., Baumberg, J. J., Bazan, G. C., Bell, S. E. J., Boisen, A., Brolo, A. G., Choo, J., Cialla-May, D., Deckert, V., Fabris, L., Faulds, K., Javier García de Abajo, F., Goodacre, R., Graham, D., Haes, A. J., ... Liz-Marzán, L. M. (2020). Present and future of surface-enhanced Raman scattering. *ACS Nano*, 14(1), 28–117. https://doi.org/10.1021/ACS.NANO.9B04224/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NN9B04224_0044.GIF
- Lau, D. P., Huang, Z., Lui, H., Anderson, D. W., Berean, K., Morrison, M. D., Shen, L., & Zeng, H. (2005). Raman spectroscopy for optical diagnosis in the larynx: Preliminary findings. *Lasers in Surgery and Medicine*, 37(3), 192–200. <https://doi.org/10.1002/LSM.20226>
- Lawless, C., Wang, C., Jurk, D., Merz, A., Zglinicki, T. von, & Passos, J. F. (2010). Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Experimental Gerontology*, 45(10). <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.018>
- Lee, I., & Yang, J. (2009). Common Clustering Algorithms. *Comprehensive Chemometrics*, 2,

577–618. <https://doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00064-8>

- Lee, Y. J., Jung, G. B., Choi, S., Lee, G., Kim, J. H., Son, H. S., Bae, H., & Park, H. K. (2013). Biocompatibility of a novel cyanoacrylate based tissue adhesive: Cytotoxicity and biochemical property evaluation. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079761>
- Leito, I. (2022). *IR spectroscopy | MOOC: Instrumental analysis of cultural heritage objects*. <https://sisu.ut.ee/heritage-analysis/book/32-raman-spectroscopy>
- Li, J., Zhu, Z., Zhu, B., Ma, Y., Lin, B., Liu, R., Song, Y., Lin, H., Tu, S., & Yang, C. (2016). Surface-Enhanced Raman Scattering Active Plasmonic Nanoparticles with Ultrasmall Interior Nanogap for Multiplex Quantitative Detection and Cancer Cell Imaging. *Analytical Chemistry*, 88(15), 7828–7836. <https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B01867>
- Li, M., Cushing, S. K., & Wu, N. (2014). Plasmon-enhanced optical sensors: a review. *Analyst*, 140(2), 386–406. <https://doi.org/10.1039/C4AN01079E>
- Li, M., Cushing, S. K., Zhang, J., Lankford, J., Aguilar, Z. P., Ma, D., & Wu, N. (2012). Shape-dependent surface-enhanced Raman scattering in gold–Raman-probe–silica sandwiched nanoparticles for biocompatible applications. *Nanotechnology*, 23(11), 115501. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/11/115501>
- Li, M., Cushing, S. K., Zhang, J., Suri, S., Evans, R., Petros, W. P., Gibson, L. F., Ma, D., Liu, Y., & Wu, N. (2013). Three-dimensional hierarchical plasmonic nano-architecture enhanced surface-enhanced Raman scattering immunosensor for cancer biomarker detection in blood plasma. *ACS Nano*, 7(6), 4967–4976. https://doi.org/10.1021/NN4018284/SUPPL_FILE/NN4018284_SI_001.PDF
- Li, M., Durbin, K. R., Sweet, S. M. M., Tipton, J. D., Zheng, Y., & Kelleher, N. L. (2013). Oncogene-induced cellular senescence elicits an anti-Warburg effect. *Proteomics*, 13(17). <https://doi.org/10.1002/pmic.201200298>
- Li, Z., Deen, M. J., Kumar, S., & Selvaganapathy, P. R. (2014). Raman spectroscopy for in-line water quality monitoring — Instrumentation and potential. *Sensors (Switzerland)*, 14(9), 17275–17303. <https://doi.org/10.3390/s140917275>
- Liu, C. Y., Han, Y. Y., Shih, P. H., Lian, W. N., Wang, H. H., Lin, C. H., Hsueh, P. R., Wang, J. K., & Wang, Y. L. (2016). Rapid bacterial antibiotic susceptibility test based on simple surface-enhanced Raman spectroscopic biomarkers. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–

15. <https://doi.org/10.1038/srep23375>
- Liu, J. Y., Souroullas, G. P., Diekman, B. O., Krishnamurthy, J., Hall, B. M., Sorrentino, J. A., Parker, J. S., Sessions, G. A., Gudkov, A. V., & Sharpless, N. E. (2019). Cells exhibiting strong p16 INK4a promoter activation in vivo display features of senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.1818313116>
- Liu, N., Koot, A., Hettinga, K., de Jong, J., & van Ruth, S. M. (2018). Portraying and tracing the impact of different production systems on the volatile organic compound composition of milk by PTR-(Quad)MS and PTR-(ToF)MS. *Food Chemistry*, 239, 201–207. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.06.099>
- Liu, Z., Davis, C., Cai, W., He, L., Chen, X., & Dai, H. (2008). Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), 1410–1415. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707654105>
- Lorén, A., Eliasson, C., Josefson, M., Murty, K. V. G. K., Käll, M., Abrahamsson, J., & Abrahamsson, K. (2001). Feasibility of quantitative determination of doxorubicin with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 32(11), 971–974. <https://doi.org/10.1002/JRS.783>
- Lu, C., & Lipson, R. H. (2010). Interference lithography: a powerful tool for fabricating periodic structures. *Laser & Photonics Reviews*, 4(4), 568–580. <https://doi.org/10.1002/LPOR.200810061>
- Lutz, B., Dentinger, C., Sun, L., Nguyen, L., Zhang, J., Chmura, A. J., Allen, A., Chan, S., & Knudsen, B. (2008). Raman nanoparticle probes for antibody-based protein detection in tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 56(4), 371–379. <https://doi.org/10.1369/jhc.7A7313.2007>
- Ma, P., Xu, L., Wang, L., Chen, N., Zhang, X., Chen, H., & Li, J. (2019). Molecular detection of cordycepin-induced HeLa cell apoptosis with surface-enhanced raman spectroscopy. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(19). <https://doi.org/10.3390/app9193990>
- Macieira-Coelho, A., & Azzarone, B. (1982). Aging of human fibroblasts is a succession of subtle changes in the cell cycle and has a final short stage with abrupt events. *Experimental Cell Research*, 141(2). [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(82\)90220-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(82)90220-8)
- Maksimov, G. V., Chokharadze, T. A., Churin, A. A., & Pashchenko, V. Z. (1995). Excitation

- profile of nerve carotenoids in stimulation and block. *Biofizika*, 40(1).
- Maksimov, G. V., Volkov, V. V., Parshina, E. Y., Akhalaia, M. I., Kozlova, O. V., Derinskaya, E. V., Revin, V. V., & Rubin, A. B. (2007). Investigation of carotenoid conformations in myelin nerve upon changes in oxygen content. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 417(1). <https://doi.org/10.1134/S1607672907060099>
- Martinez, A. M., & Kak, A. C. (2001). PCA versus LDA. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 23(2), 228–233. <https://doi.org/10.1109/34.908974>
- McLaughlin, C., MacMillan, D., McCardle, C., & Smith, W. E. (2002). Quantitative analysis of mitoxantrone by surface-enhanced resonance Raman scattering. *Analytical Chemistry*, 74(13), 3160–3167. <https://doi.org/10.1021/AC010067K/ASSET/IMAGES/LARGE/AC010067KF00008.JPEG>
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2007). Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42(5), 493–541. <https://doi.org/10.1080/05704920701551530>
- Mulvaney, S. P., Musick, M. D., Keating, C. D., & Natan, M. J. (2003). Glass-coated, analyte-tagged nanoparticles: A new tagging system based on detection with surface-enhanced Raman scattering. *Langmuir*, 19(11), 4784–4790. <https://doi.org/10.1021/LA026706J/ASSET/IMAGES/LARGE/LA026706JF00007.JPEG>
- Næs, T., Brockhoff, P. B., & Tomic, O. (2010). Statistics for Sensory and Consumer Science. In *Statistics for Sensory and Consumer Science*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470669181>
- Nassrally, M. S., Lau, A., Wise, K., John, N., Kotecha, S., Lee, K. L., & Brooks, R. F. (2019). Cell cycle arrest in replicative senescence is not an immediate consequence of telomere dysfunction. *Mechanisms of Ageing and Development*, 179. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.01.009>
- Negri, P., Choi, J. Y., Jones, C., Tompkins, S. M., Tripp, R. A., & Dluhy, R. A. (2014). Identification of virulence determinants in influenza viruses. *Analytical Chemistry*, 86(14), 6911–6917. https://doi.org/10.1021/AC500659F/SUPPL_FILE/AC500659F_SI_001.PDF
- Neurohr, G. E., Terry, R. L., Lengefeld, J., Bonney, M., Brittingham, G. P., Moretto, F.,

- Miettinen, T. P., Vaites, L. P., Soares, L. M., Paulo, J. A., Harper, J. W., Buratowski, S., Manalis, S., van Werven, F. J., Holt, L. J., & Amon, A. (2019). Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell*, 176(5), 1083-1097.e18. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.01.018>
- Nguyen, A. H., Peters, E. A., & Schultz, Z. D. (2017). Bioanalytical applications of surface-enhanced Raman spectroscopy: De novo molecular identification. *Reviews in Analytical Chemistry*, 36(4). https://doi.org/10.1515/REVAC-2016-0037/ASSET/GRAPHIC/J_REVAC-2016-0037_FIG_006.JPG
- Nie, S., & Emory, S. R. (1997). Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science*, 275(5303), 1102–1106. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5303.1102>
- Noble, W. S. (2004). *QL-dmiQGVHq.pdf*. 71–92.
- Norouz Dizaji, A., Simsek Ozek, N., Aysin, F., Calis, A., Yilmaz, A., & Yilmaz, M. (2021). Combining vancomycin-modified gold nanorod arrays and colloidal nanoparticles as a sandwich model for the discrimination of Gram-positive bacteria and their detection: Via surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). *Analyst*, 146(11), 3642–3653. <https://doi.org/10.1039/d1an00321f>
- Notingher, I. (2007). Raman spectroscopy cell-based biosensors. In *Sensors* (Vol. 7, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/s7081343>
- Ogrodnik, M. (2021). Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest in vitro and in vivo. *Aging Cell*, 20(4), e13338. <https://doi.org/10.1111/ACEL.13338>
- Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonja, T., Tiniakos, D., Wilson, C. L., Lahat, A., Day, C. P., Burt, A., Palmer, A., Anstee, Q. M., Grellscheid, S. N., Hoeijmakers, J. H. J., Barnhoorn, S., Mann, D. A., Bird, T. G., Vermeij, W. P., Kirkland, J. L., Passos, J. F., Von Zglinicki, T., & Jurk, D. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15691>
- Ogrodnik, M., Zhu, Y., Langhi, L. G. P., Tchkonja, T., Krüger, P., Fielder, E., Victorelli, S., Ruswhandi, R. A., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Podgorni, O., Enikolopov, G., Johnson, K. O., Xu, M., Inman, C., Palmer, A. K., Schafer, M., Weigl, M., Ikeno, Y., ... Jurk, D. (2019). Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis. *Cell Metabolism*, 29(5), 1061-1077.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.12.008>

- Oseledchyk, A., Andreou, C., Wall, M. A., & Kircher, M. F. (2017). Folate-Targeted Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering Nanoprobe Ratiometry for Detection of Microscopic Ovarian Cancer. *ACS Nano*, 11(2), 1488–1497. <https://doi.org/10.1021/ACSNANO.6B06796>
- Özek, N. Ş. (2015). *Characterization of Molecular-Level Changes Due To Microrna-125B Expression in Breast Cancer Cells By Spectroscopic and Chemometric Analysis Techniques a Thesis Submitted To the Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical Univ. October.*
- Pal, A. K., Pagal, S., Prashanth, K., Chandra, G. K., Umapathy, S., & D., B. M. (2019). Ag/ZnO/Au 3D hybrid structured reusable SERS substrate as highly sensitive platform for DNA detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 279, 157–169. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2018.09.085>
- Pan, F., Song, G., Gan, X., & Gu, Q. (2014). Consistent feature selection and its application to face recognition. *Journal of Intelligent Information Systems*, 43(2), 307–321. <https://doi.org/10.1007/s10844-014-0324-5>
- Paolini, M., Abdel-Rahman, S. Z., Sapone, A., Pedulli, G. F., Perocco, P., Cantelli-Forti, G., & Legator, M. S. (2003). β -carotene: A cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 543(3). [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00002-4)
- Pérez-Jiménez, A. I., Lyu, D., Lu, Z., Liu, G., & Ren, B. (2020). Surface-enhanced Raman spectroscopy: benefits, trade-offs and future developments. *Chemical Science*, 11(18), 4563–4577. <https://doi.org/10.1039/D0SC00809E>
- Perno, J. R., Grygon, C. A., & Spiro, T. G. (1989). Ultraviolet Raman excitation profiles for the nucleotides and for the nucleic acid duplexes poly(rA)-poly(rU) and poly(dG-dC). *Journal of Physical Chemistry*, 93(15), 5672–5678. <https://doi.org/10.1021/j100352a009>
- Peticolas, W. L. (1995). Raman Spectroscopy of DNA and Proteins. *Methods in Enzymology*, 246(C). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)46019-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)46019-5)
- Pfukwa, N. B. C. (2016). Surface Enhanced Raman spectroscopy (SERS) of amino acids. In *Stellenbosch University, Private Bag X1, Matieland 7602, South Africa.* (Issue March). Stellenbosch University.
- Pilot, R., Signorini, R., Durante, C., Orian, L., Bhamidipati, M., & Fabris, L. (2019). A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Biosensors 2019, Vol. 9, Page 57*, 9(2), 57.

<https://doi.org/10.3390/BIOS9020057>

- Pomerantsev, A. L., & Rodionova, O. Y. (2020). Popular decision rules in SIMCA: Critical review. *Journal of Chemometrics*, 34(8), 1–14. <https://doi.org/10.1002/cem.3250>
- Pontén, J., Stein, W. D., & Shall, S. (1983). A quantitative analysis of the aging of human glial cells in culture. *Journal of Cellular Physiology*, 117(3). <https://doi.org/10.1002/jcp.1041170309>
- Poon, K. W. C., Lyng, F. M., Knief, P., Howe, O., Meade, A. D., Curtin, J. F., Byrne, H. J., & Vaughan, J. (2012). Quantitative reagent-free detection of fibrinogen levels in human blood plasma using Raman spectroscopy. *Analyst*, 137(8), 1807–1814. <https://doi.org/10.1039/c2an35042d>
- Prescott, B., Steinmetz, W., & Thomas, G. J. (1984). Characterization of DNA structures by laser Raman spectroscopy. *Biopolymers*, 23(2), 235–256. <https://doi.org/10.1002/bip.360230206>
- Qian, X., Peng, X. H., Ansari, D. O., Yin-Goen, Q., Chen, G. Z., Shin, D. M., Yang, L., Young, A. N., Wang, M. D., & Nie, S. (2008). In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nature Biotechnology*, 26(1), 83–90. <https://doi.org/10.1038/NBT1377>
- Rácz, A., Gere, A., Bajusz, D., & Héberger, K. (2018). Is soft independent modeling of class analogies a reasonable choice for supervised pattern recognition? *RSC Advances*, 8(1), 10–21. <https://doi.org/10.1039/c7ra08901e>
- Raman, C. V., & Krishnan, K. S. (1928). A New Type of Secondary Radiation. *Nature* 1928 121:3048, 121(3048), 501–502. <https://doi.org/10.1038/121501c0>
- Ren, X., Nam, W., Ghassemi, P., Strobl, J. S., Kim, I., Zhou, W., & Agah, M. (2020). Scalable nanolaminated SERS multiwell cell culture assay. *Microsystems and Nanoengineering*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41378-020-0145-3>
- Risi, R., Manti, L., Perna, G., Lasalvia, M., Capozzi, V., Delfino, I., & Lepore, M. (2012). X-ray radiation-induced effects in human mammary epithelial cells investigated by Raman microspectroscopy. *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care III*, 8427. <https://doi.org/10.1117/12.921389>
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 192, Issue 4). <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
- Rohman, A., & Windarsih, A. (2020). The application of molecular spectroscopy in

- combination with chemometrics for halal authentication analysis: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21145155>
- Rossetti, D., Kielmanowicz, M. G., Vigodman, S., Hu, Y. P., Chen, N., Nkengne, A., Oddos, T., Fischer, D., Seiberg, M., & Lin, C. B. (2011). A novel anti-ageing mechanism for retinol: Induction of dermal elastin synthesis and elastin fibre formation. *International Journal of Cosmetic Science*, 33(1). <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00588.x>
- Rüping, S. (2010). SVM classifier estimation from group probabilities. *LWA 2010 - Lernen, Wissen Und Adaptivitat - Learning, Knowledge, and Adaptivity, Workshop Proceedings*, 129–135.
- S. Gorelik, V. (2002). Raman Scattering. In *Scattering* (pp. 828–848). <https://doi.org/10.1016/b978-012613760-6/50045-0>
- Saby, C., Buache, E., Brassart-Pasco, S., El Btaouri, H., Courageot, M. P., Van Gulick, L., Garnotel, R., Jeannesson, P., & Morjani, H. (2016). Type I collagen aging impairs discoidin domain receptor 2-mediated tumor cell growth suppression. *Oncotarget*, 7(18). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8795>
- Sain, S. R., & Vapnik, V. N. (1996). The Nature of Statistical Learning Theory. *Technometrics*, 38(4). <https://doi.org/10.2307/1271324>
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., & Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21(1), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6>
- Selvan, S. T., Tan, T. T., & Ying, J. Y. (2005). Robust, Non-Cytotoxic, Silica-Coated CdSe Quantum Dots with Efficient Photoluminescence. *Advanced Materials*, 17(13), 1620–1625. <https://doi.org/10.1002/ADMA.200401960>
- Shalabaeva, V., Lovato, L., La Rocca, R., Messina, G. C., Dipalo, M., Miele, E., Perrone, M., Gentile, F., & De Angelis, F. (2017). Time resolved and label free monitoring of extracellular metabolites by surface enhanced Raman spectroscopy. *PLoS ONE*, 12(4), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175581>
- Shan, B., Pu, Y., Chen, Y., Liao, M., & Li, M. (2018). Novel SERS labels: Rational design, functional integration and biomedical applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 371, 11–37. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2018.05.007>
- Sherratt, M. J. (2009). Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. In *Age* (Vol. 31, Issue 4).

<https://doi.org/10.1007/s11357-009-9103-6>

- Shi, G. C., Wang, M. L., Zhu, Y. Y., Shen, L., Ma, W. L., Wang, Y. H., & Li, R. F. (2018). Dragonfly wing decorated by gold nanoislands as flexible and stable substrates for surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25228-8>
- Shi, M., Zheng, J., Liu, C., Tan, G., Qing, Z., Yang, S., Yang, J., Tan, Y., & Yang, R. (2016). SERS assay of telomerase activity at single-cell level and colon cancer tissues via quadratic signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 77(October), 673–680. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.029>
- Siqueira, L. F. S., & Lima, K. M. G. (2016). MIR-biospectroscopy coupled with chemometrics in cancer studies. *Analyst*, 141(16), 4833–4847. <https://doi.org/10.1039/c6an01247g>
- Sitte, N., Merker, K., Grune, T., & Von Zglinicki, T. (2001). Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts in vitro: An indicator of oxidative stress. *Experimental Gerontology*, 36(3). [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00253-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00253-9)
- Smith, J. R., & Whitney, R. G. (1980). Intracloal variation in proliferative potential of human diploid fibroblasts: stochastic mechanism for cellular aging. *Science*, 207(4426). <https://doi.org/10.1126/science.7350644>
- Stone, N., Kendall, C., Smith, J., Crow, P., & Barr, H. (2004). Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers. *Faraday Discussions*, 126(1), 141–157. <https://doi.org/10.1039/b304992b>
- Sun, D., Luo, M., Jeong, M., Rodriguez, B., Xia, Z., Hannah, R., Wang, H., Le, T., Faull, K. F., Chen, R., Gu, H., Bock, C., Meissner, A., Göttgens, B., Darlington, G. J., Li, W., & Goodell, M. A. (2014). Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. *Cell Stem Cell*, 14(5). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.03.002>
- Talari, A. C. S., Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2015). Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(1), 46–111. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.923902>
- Teixeira, C. S. B., Bitar, R. A., Martinho, H. S., Santos, A. B. O., Kulcsar, M. A. V., Friguglietti, C. U. M., Da Costa, R. B., Arisawa, E. Â. L., & Martin, A. A. (2009). Thyroid tissue analysis through Raman spectroscopy. *Analyst*, 134(11), 2361–2370. <https://doi.org/10.1039/b822578h>

- Terman, A., & Brunk, U. T. (2004). Lipofuscin. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 36, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.08.009>
- Teuscher, A. C., Statzer, C., Pantasis, S., Bordoli, M. R., & Ewald, C. Y. (2019). Assessing collagen deposition during aging in Mammalian tissue and in *Caenorhabditis elegans*. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1944). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9095-5_13
- Tharwat, A., Gaber, T., Ibrahim, A., & Hassanien, A. E. (2017). Linear discriminant analysis: A detailed tutorial. *AI Communications*, 30(2), 169–190. <https://doi.org/10.3233/AIC-170729>
- Thomas, G., Nguyen, T. Q., Pence, I. J., Caldwell, B., O'Connor, M. E., Giltane, J., Sanders, M. E., Grau, A., Meszoely, I., Hooks, M., Kelley, M. C., & Mahadevan-Jansen, A. (2017). Evaluating feasibility of an automated 3-dimensional scanner using Raman spectroscopy for intraoperative breast margin assessment. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13237-y>
- Tripp, R. A., Dluhy, R. A., & Zhao, Y. (2008). Novel nanostructures for SERS biosensing. *Nano Today*, 3(3–4), 31–37. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(08\)70042-2](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(08)70042-2)
- Truong, N. C., Bui, K. H. T., & Van Pham, P. (2019). Characterization of Senescence of Human Adipose-Derived Stem Cells After Long-Term Expansion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1084, 109–128. https://doi.org/10.1007/5584_2018_235/COVER
- Unterluggauer, H., Mazurek, S., Lener, B., Hütter, E., Eigenbrodt, E., Zwerschke, W., & Jansen-Dürr, P. (2008). Premature senescence of human endothelial cells induced by inhibition of glutaminase. *Biogerontology*, 9(4), 247–259. <https://doi.org/10.1007/S10522-008-9134-X/FIGURES/6>
- Van Der Veer, E., Ho, C., O'Neil, C., Barbosa, N., Scott, R., Cregan, S. P., & Pickering, J. G. (2007). Extension of human cell lifespan by nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 10841–10845. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700018200>
- Van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature* 2014 509:7501, 509(7501), 439–446. <https://doi.org/10.1038/nature13193>
- Vicario, A., Sergo, V., Toffoli, G., & Bonifacio, A. (2015). Surface-enhanced Raman spectroscopy of the anti-cancer drug irinotecan in presence of human serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 127, 41–46.

<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2015.01.023>

- Vitol, E. A., Orynbayeva, Z., Bouchard, M. J., Azizkhan-Clifford, J., Friedman, G., & Gogotsi, Y. (2009). In situ intracellular spectroscopy with surface enhanced raman spectroscopy (SERS)-Enabled nanopipettes. *ACS Nano*, 3(11), 3529–3536. https://doi.org/10.1021/NN9010768/SUPPL_FILE/NN9010768_SI_001.PDF
- Vo-Dinh, T., Allain, L. R., & Stokes, D. L. (2002). Cancer gene detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Journal of Raman Spectroscopy*, 33(7), 511–516. <https://doi.org/10.1002/jrs.883>
- Von Maltzahn, G., Centrone, A., Park, J. H., Ramanathan, R., Sailor, M. J., Alan Hatton, T., & Bhatia, S. N. (2009). SERS-coded cold nanorods as a multifunctional platform for densely multiplexed near-infrared imaging and photothermal heating. *Advanced Materials*, 21(31), 3175–3180. <https://doi.org/10.1002/adma.200803464>
- Wang, G., Lipert, R. J., Jain, M., Kaur, S., Chakraborty, S., Torres, M. P., Batra, S. K., Brand, R. E., & Porter, M. D. (2011). Detection of the potential pancreatic cancer marker MUC4 in serum using surface-enhanced Raman scattering. *Analytical Chemistry*, 83(7), 2554–2561. https://doi.org/10.1021/AC102829B/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2010-02829B_0009.JPEG
- Wang, H. N., Crawford, B. M., Fales, A. M., Bowie, M. L., Seewaldt, V. L., & Vo-Dinh, T. (2016). Multiplexed Detection of MicroRNA Biomarkers Using SERS-Based Inverse Molecular Sentinel (iMS) Nanoprobes. *Journal of Physical Chemistry C*, 120(37), 21047–21055. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCC.6B03299/ASSET/IMAGES/LARGE/JP-2016-03299S_0009.JPEG
- Wang, J., Koo, K. M., Wee, E. J. H., Wang, Y., & Trau, M. (2017). A nanoplasmonic label-free surface-enhanced Raman scattering strategy for non-invasive cancer genetic subtyping in patient samples. *Nanoscale*, 9(10), 3496–3503. <https://doi.org/10.1039/C6NR09928A>
- Wang, J., Lin, D., Lin, J., Yu, Y., Huang, Z., Chen, Y., Lin, J., Feng, S., Li, B., Liu, N., & Chen, R. (2014). Label-free detection of serum proteins using surface-enhanced Raman spectroscopy for colorectal cancer screening. *Journal of Biomedical Optics*, 19(8), 087003. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.19.8.087003>
- Wang, W., Yang, X., De Silanes, I. L., Carling, D., & Gorospe, M. (2003). Increased AMP:ATP ratio and AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 27016–27023.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M300318200>

- Wang, Z., Zong, S., Wu, L., Zhu, D., & Cui, Y. (2017). SERS-Activated Platforms for Immunoassay: Probes, Encoding Methods, and Applications. *Chemical Reviews*, 117(12), 7910–7963.
https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.7B00027/ASSET/IMAGES/LARGE/CR-2017-00027N_0035.JPEG
- Wei, L., Hu, F., Shen, Y., Chen, Z., Yu, Y., Lin, C. C., Wang, M. C., & Min, W. (2014). Live-cell imaging of alkyne-tagged small biomolecules by stimulated Raman scattering. *Nature Methods* 2014 11:4, 11(4), 410–412. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2878>
- Wenger, S. L., Senft, J. R., Sargent, L. M., Bamezai, R., Bairwa, N., & Grant, S. G. (2004). Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Bioscience Reports*, 24(6), 631–639.
<https://doi.org/10.1007/s10540-005-2797-5>
- Winnard, P. T., Zhang, C., Vesuna, F., Kang, J. W., Garry, J., Dasari, R. R., Barman, I., & Raman, V. (2017). Organ-specific isogenic metastatic breast cancer cell lines exhibit distinct Raman spectral signatures and metabolomes. *Oncotarget*, 8(12), 20266–20287.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.14865>
- WOLD, S., & SJÖSTRÖM, M. (1977). *SIMCA: A Method for Analyzing Chemical Data in Terms of Similarity and Analogy*. 243–282. <https://doi.org/10.1021/BK-1977-0052.CH012>
- Woloschak, G. E. (1997). CANCER agents : cell survival and gene expression. *Cancer Letters*, 113(0304), 77–86.
- Wu, X., Huang, Y. W., Park, B., Tripp, R. A., & Zhao, Y. (2015). Differentiation and classification of bacteria using vancomycin functionalized silver nanorods array based surface-enhanced Raman spectroscopy and chemometric analysis. *Talanta*, 139, 96–103.
<https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2015.02.045>
- Wu, X., Xu, C., Tripp, R. A., Huang, Y. W., & Zhao, Y. (2013). Detection and differentiation of foodborne pathogenic bacteria in mung bean sprouts using field deployable label-free SERS devices. *Analyst*, 138(10), 3005–3012. <https://doi.org/10.1039/C3AN00186E>
- Wu, Y., & Chen, L. (2017). Comparison of spectra processing methods for SERS based quantitative analysis. *ICCSS 2017 - 2017 International Conference on Information, Cybernetics, and Computational Social Systems*, 130–136.

<https://doi.org/10.1109/ICCSS.2017.8091399>

- Xanthopoulos, P., Pardalos, P. M., & Trafalis, T. B. (2013). *Linear Discriminant Analysis*. 27–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9878-1_4
- Xie, J., Zhang, Q., Lee, J. Y., & Wang, D. I. C. (2008). The synthesis of SERS-active gold nanoflower tags for in vivo applications. *ACS Nano*, 2(12), 2473–2480. https://doi.org/10.1021/NN800442Q/SUPPL_FILE/NN800442Q_SI_001.PDF
- Yan, T., Gu, H., Yuan, X., Wu, J., & Wei, H. (2009). Surface-enhanced Raman spectroscopy study of the interaction of antitumoral drug Paclitaxel with human serum albumin. *https://doi.org/10.1117/12.821462*, 7280, 190–195. <https://doi.org/10.1117/12.821462>
- Yang, L., Chen, Y., Li, H., Luo, L., Zhao, Y., Zhang, H., & Tian, Y. (2015). Application of silver nanoparticles decorated with β -cyclodextrin in determination of 6-mercaptopurine by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical Methods*, 7(16), 6520–6527. <https://doi.org/10.1039/C5AY01212K>
- Yang, Y., Li, J., & Yang, Y. (2015). The research of the fast SVM classifier method. *2015 12th International Computer Conference on Wavelet Active Media Technology and Information Processing, ICCWAMTIP 2015*, x, 121–124. <https://doi.org/10.1109/ICCWAMTIP.2015.7493959>
- Yazdi, Y., Ramanujam, N., Lotan, R., Mitchell, M. F., Hittelman, W., & Richards-Kortum, R. (1999). Resonance Raman spectroscopy at 257 nm excitation of normal and malignant cultured breast and cervical cells. *Applied Spectroscopy*, 53(1), 82–85. <https://doi.org/10.1366/0003702991945254>
- Ye, H., Rahul, Kruger, U., Wang, T., Shi, S., Norfleet, J., & De, S. (2019). Burn-related Collagen Conformational Changes in ex vivo Porcine Skin using Raman Spectroscopy. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55012-1>
- Ye, L. P., Hu, J., Liang, L., & Zhang, C. Y. (2014). Surface-enhanced Raman spectroscopy for simultaneous sensitive detection of multiple microRNAs in lung cancer cells. *Chemical Communications*, 50(80), 11883–11886. <https://doi.org/10.1039/C4CC05598E>
- Ye, S., Li, X., Wang, M., & Tang, B. (2017). Fluorescence and SERS Imaging for the Simultaneous Absolute Quantification of Multiple miRNAs in Living Cells. *Analytical Chemistry*, 89(9), 5124–5130. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.7B00697/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2017-00697K_0007.JPEG

- Yi, S., Lin, K., Jiang, T., Shao, W., Huang, C., Jiang, B., Li, Q., & Lin, D. (2020). NMR-based metabonomic analysis of HUVEC cells during replicative senescence. *Aging*, 12(4), 3626–3646. <https://doi.org/10.18632/AGING.102834>
- Yilmaz, M. (2014). *Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) için Nano-Yaklaşım Temelli Platformların Geliştirilmesi ve Tanı Amaçlı Uygulanması*. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yilmaz, M. (2019). Silver-Nanoparticle-Decorated Gold Nanorod Arrays via Bioinspired Polydopamine Coating as Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) Platforms. *Coatings*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/coatings9030198>
- Yilmaz, M., Bugra Kuloglu, H., Erdogan, H., Sebnem Cetin, S., Selman Yavuz, M., Ozaydin Ince, G., Demirel, G., Yilmaz, M., Erdogan, H., Cetin, S. S., Demirel, G., Kuloglu, H. B., Ince, G. O., & Yavuz, M. S. (2015). Light-Driven Unidirectional Liquid Motion on Anisotropic Gold Nanorod Arrays. *Advanced Materials Interfaces*, 2(12), 1500226. <https://doi.org/10.1002/ADMI.201500226>
- Yilmaz, M., Demirel, G. B., & Demirel, G. (2020). Silver thin film deposited 3-dimensional gold nanorod arrays for plasmonic catalysis. *Journal of Vacuum Science & Technology A*, 38(2). <https://doi.org/10.1116/1.5130721>
- Yilmaz, M., Senlik, E., Biskin, E., Yavuz, M. S., Tamer, U., & Demirel, G. (2014). Combining 3-D plasmonic gold nanorod arrays with colloidal nanoparticles as a versatile concept for reliable, sensitive, and selective molecular detection by SERS. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(12). <https://doi.org/10.1039/c3cp55087g>
- Yu, H., Cook, T. J., & Sinko, P. J. (1997). Evidence for Diminished Functional Expression of Intestinal Transporters in Caco-2 Cell Monolayers at High Passages. *Pharmaceutical Research* 1997 14:6, 14(6), 757–762. <https://doi.org/10.1023/A:1012150405949>
- Yuan, R., Flurkey, K., Van Aelst-Bouma, R., Zhang, W., King, B., Austad, S., Miller, R. A., & Harrison, D. E. (2006). Altered growth characteristics of skin fibroblasts from wild-derived mice, and genetic loci regulating fibroblast clone size. *Aging Cell*, 5(3), 203–212. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2006.00208.X>
- YUTAM. (2022). YUTAM - Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi. <https://yutam.erzurum.edu.tr/Cihazlar/Cihazlar>
- Zhang, Q., Piston, D. W., & Goodman, R. H. (2002). Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science*, 295(5561). <https://doi.org/10.1126/science.1069300>

- Zhong Xiao, R., Wu Zeng, Z., Lin Zhou, G., Jie Wang, J., Zhu Li, F., & Ming Wang, A. (2010). International Journal of Nanomedicine Dovepress Recent advances in PeG-PLA block copolymer nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S14912>
- Zhou, J., Yang, D., Liu, G., Li, S., Feng, W., Yang, G., He, J., & Shan, Y. (2021). Highly sensitive detection of DNA damage in living cells by SERS and electrochemical measurements using a flexible gold nanoelectrode. *Analyst*, 146(7), 2321–2329. <https://doi.org/10.1039/d1an00220a>
- Zhou, W., Tian, Y. F., Yin, B. C., & Ye, B. C. (2017). Simultaneous Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Detection of Multiplexed MicroRNA Biomarkers. *Analytical Chemistry*, 89(11), 6120–6128. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.7B00902/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2017-00902G_0007.JPEG
- Zhu, J., Zhou, J., Guo, J., Cai, W., Liu, B., Wang, Z., & Sun, Z. (2013). Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation on human breast cancer cells. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-37/FIGURES/4>
- Zong, C., Xu, M., Xu, L. J., Wei, T., Ma, X., Zheng, X. S., Hu, R., & Ren, B. (2018). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis: Reliability and Challenges. *Chemical Reviews*, 118(10), 4946–4980. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.7B00668/ASSET/IMAGES/LARGE/CR-2017-00668B_0028.JPEG
- Zrimsek, A. B., Wong, N. L., & Van Duyne, R. P. (2016). Single Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: A Critical Analysis of the Biantalyte versus Isotopologue Proof. *Journal of Physical Chemistry C*, 120(9), 5133–5142. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCC.6B00606/ASSET/IMAGES/LARGE/JP-2016-00606G_0005.JPEG
- Zwerschke, W., Mazurek, S., Stöckl, P., Hütter, E., Eigenbrodt, E., & Jansen-Dürr, P. (2003). Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochemical Journal*, 376(2), 403–411. <https://doi.org/10.1042/BJ20030816>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Nazlı Öncer
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Ziya Gökalp Lisesi
Lisans:	Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fak., Biyomühendislik Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Ens., Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı (2023)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Rusça:	Orta
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
TMMOB Kimya Mühendisleri Odası	