

Kuantum Noktacıklarının Hücresel Etkileşim ve Sitotoksitelerinin Araştırılması

Proje No: 109R031

Yrd. Doç. Dr. Can ÖZEN

Doç. Dr. Havva Funda YAĞCI ACAR

HAZİRAN 2012

ANKARA

ÖNSÖZ

2010-2012 yılları arasında TÜBİTAK (SBAG 109R031) desteğiyle Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Merkez Laboratuvar ve BIOMATEN öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Can Özen'in ve Koç Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Havva Funda Yağcı Acar'ın araştırma grupları arasında disiplinlerarası bir çalışma olarak tamamlanan bu projede kombine mikroskopik ve spektroskopik metodlar kullanarak farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahip kuantum noktacıklarının hücrel etkileşim ve sitotoksiteleri araştırılmıştır.

Çalışmalar ODTÜ Merkezi Laboratuvar Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezi ve Koç Üniversitesi Kimya Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Floresan spektroskopi alanında ODTÜ Biyomateryal ve Doku Mühendisliği Mükemmeliyet Merkezi (BIOMATEN) ve Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM)'nden destek alınmıştır.

Proje ekibi olarak çalışmalarımıza destek sağlayan Prof. Dr. Meral Yücel, Yrd. Doç. Dr. Deniz Yücel, Yrd. Doç. Dr. Elif Erson Bensen, Yrd. Doç. Dr. Sreeparna Banerjee ve Prof. Dr. Ufuk Gündüz'e teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTELERİ	6
TABLO LİSTELERİ	8
ÖZET	9
ABSTRACT	10
1 GİRİŞ	11
2 GENEL BİLGİLER.....	12
2.1 Kuantum Noktacıkları	12
2.2 Biyolojik Uygulamalar	13
2.3 Hücresel Etkileşimler	15
2.4 Sitotoksosite	16
3 GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1 Kuantum Noktacıkları	18
3.1.1 Qdot 565 (Q565)	18
3.1.2 CdTe-2MPA (QMPA)	18
3.1.3 CdTe-CdS/2MPA-DMSA (QDMSA) ve Türevleri (QPEG, QRDG)	19
3.1.4 Ag ₂ S-2MPA(QAGS)	20
3.2 Hücre Hatları ve Kültürü	21
3.2.1 Hücre Hatları	21
3.2.2 Hücre Kültürü	21
3.3 Sitotoksosite Çalışmaları	21
3.3.1 Dehidrogenaz Aktivitesine Dayalı XTT Testi	21
3.3.2 Esteraz Aktivitesine Dayalı Viyabilite Testi	22
3.3.3 CyQUANT Hücre Proliferasyon Analizi.....	22
3.3.4 Aneksin V Apoptoz Analizi	23

3.3.5 Kadmiyum Tayin Analizi	24
3.4 Hücre İçi Alım ve Lokalizasyon Çalışmaları	24
3.4.1 Hücre Görüntüleme	24
3.4.2 Kantatif Hücre İçi Alım Analizi	25
4 BULGULAR	26
4.1 Kuantum Noktacıklarının Sitotoksitesisi	26
4.1.1 XTT Analizi	26
4.1.1.1 Reaksiyon Solüsyon Hacminin Optimizasyonu	26
4.1.1.2 İnkübasyon Zamanının Optimizasyonu	26
4.1.1.3 Hücre Miktarının Optimizasyonu ve Fenol Kırmızısının Sinyal Etkisinin Araştırılması	27
4.1.1.4 Kuantum Noktacıklarının Dehidrogenaz Enzimlerine Bağlı Hücre Metabolik Aktivitesine Etkisi	28
4.1.2 Esteraz Aktivitesine Dayalı Viyabilite Testi	31
4.1.3 Kuantum Noktacıklarının Hücre Proliferasyonuna Etkisi	34
4.1.4 Aneksin V Apoptoz Analizi	36
4.1.5 Sitotoksitesinin Kuantum Noktacıklarının Hücre İçi Kararlılığı ve Kadmiyum Salınımıyla İlişkisi	40
4.2 Kuantum Noktacıklarının Hücre İçi Alım ve Lokalizasyonları	41
4.2.1 Hücre Fiksasyonu	41
4.2.2 Tripan Mavisıyla Sinyal Ayrımı	41
4.2.3 Çekirdek ve İskelet İşaretleme	42
4.2.4 Endozom Boyaması	44
4.2.5 Lamel Tabanlı Petri Kabı Hazırlanması	44
4.2.6 Canlı Hücre Gözlem Sistemi	45
4.2.7 Kuantum Noktacıklarının Hücre İçi Lokalizasyonu	45
4.2.8 Kantatif Hücre İçi Alım Analizi	48
5 TARTIŞMA	49
5.1 Dozaj Birimi; Molar Konsantrasyon ve Kütle Konsantrasyonu	49
5.2 Hücre Tipi ve Sitotoksitesite	49

5.3 Parçacık Kimyası ve Sitotoksite.....	50
6 SONUÇ	52

ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1. Tipik bir kuantum noktacığının (A) şematik yapısı ve (B) TEM görüntüsü (Invitrogen).....	12
Şekil 2. Çapları 2-7 nm arasında olan CdSe kuantum noktacıklarının emisyon dalga boyu değişimi (HAN, 2001).....	13
Şekil 3. Kuantum noktacıklarının biyolojik uygulamaları (MICHALET, 2005).....	13
Şekil 4. Kuantum noktacıklarıyla işaretlenmiş bir memeli hücresi; çekirdek (kırmızı), golgi (sarı) ve hücre iskeleti (yeşil) [Invitrogen].....	14
Şekil 5. Kuantum noktacıklarıyla işaretli vesikül hareketinin takibi (NAN 2005).....	14
Şekil 6. Invitrogen tarafından üretilen kuantum noktacıklarının uyarım ve ışımaya eğrileri.	18
Şekil 7. Kuantum noktacıklarında kaplama malzemesi olarak kullanılan momerik kaplamalar.	18
Şekil 8. QMPA kuantum noktacığının (A) uyarım (B) ışımaya eğrileri.....	19
Şekil 9. QDMSA kuantum noktacığının uyarım (sol) ve ışımaya (sağ) eğrileri.	20
Şekil 10. QAGS kuantum noktacığının (A) uyarım (B) ışımaya eğrileri.....	20
Şekil 11. XTT'nin formazan'a indirgenme reaksiyonu (Roche).....	22
Şekil 12. Esteraz aktivitesi ve fosfatidil serin'e dayalı apoptoz testi; sağlıklı (yeşil), erken apoptotik (yeşil+kırmızı) ve geç apoptotik/ölü (kırmızı) hücreler.....	24
Şekil 13. HeLa hücreleri kullanılarak yapılan XTT solüsyon hacmi optimizasyonu.....	26
Şekil 14. HeLa hücreleri kullanılarak yapılan XTT inkübasyon süresi optimizasyonu.	27
Şekil 15. NIH/3T3 hücreleri kullanılarak yapılan XTT inkübasyon süresi optimizasyonu. .	27
Şekil 16. Fenol kırmızısının XTT sonuçlarına etkisi.	28
Şekil 17. Cd çekirdekli kuantum noktacıkları uygulanan NIH/3T3 hücrelerinin metabolik aktivitesi (24 saat, n=3).....	29
Şekil 18. Q565 noktacıklarıyla 24 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin metabolik aktivite değişimi (n=3).	30
Şekil 19. QDMSA noktacıklarıyla 24 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin metabolik aktivite değişimi (n=3).....	30
Şekil 20. 24 saatlik QAGS uygulamasının NIH/3T3 hücrelerinin metabolik aktivitesine etkisi.	31
Şekil 21. 2 µM EthD-1 ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40X (NA 1.30) objektifle çekilen floresan konfokal görüntüsü (A: EthD-1 kanalı, B: Transmisyon kanalı, C: A ve B birleştirilmiş kanallar)	32

Şekil 22. 0.5 µM kalsein ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40X (NA 1.30) objektifle çekilen floresan konfokal görüntüsü (A: EthD-1 kanalı, B: Transmisyon kanalı, C: Kalsein kanalı, D: A, B ve C birleştirilmiş kanallar)	33
Şekil 23. NIH/3T3 hücreleri için hazırlanmış standart proliferasyon eğrisi (n=3).	34
Şekil 24. QDMSA kuantum noktacıyla 24 saat inkübe edilmiş NIH/3T3 hücrelerinin proliferasyon grafiği (n=3).....	35
Şekil 25. QAGS kuantum noktacıyla 24 saat inkübe edilmiş NIH/3T3 hücrelerinin proliferasyon grafiği (n=3).....	36
Şekil 26. Aneksin V apoptoz analizi sonucu kırmızı (Cy5) ve mavi (kalsein) floresan kanallardan elde edilen sayımın (events) sinyal şiddeti dağılımını gösteren noktasal grafikler. Üst: Negatif kontrol, Orta: Etoposid (pozitif kontrol), Alt: QMPA uygulaması...37	37
Şekil 27. Aneksin V apoptoz analizi sonucu kırmızı (Cy5) ve mavi (kalsein) floresan kanallardan elde edilen sayımın (events) sinyal şiddeti dağılımını gösteren histogramlar. Üst: Negatif kontrol, Orta: Etoposid (pozitif kontrol), Alt: QMPA uygulaması.	39
Şekil 28. Kadmiyum iyonu için hazırlanmış standart eğri (n=3).	40
Şekil 29. QDMSA parçacıyla 24 saat inkübe edilmiş NIH/3T3 hücrelerinde belirlenmiş kadmiyum iyon konsantrasyonu (n=3).	41
Şekil 30. FITC ile boyanmış aktin hücre iskeletinin konfokal görüntülemesi. (A) MCF-7 (B) NIH/3T3 (C) HeLa hücreleri.	42
Şekil 31. DAPI ile boyanmış hücre çekirdeğinin geniş alan floresan görüntülemesi. (A) MCF-7 (B) NIH/3T3 (C) HeLa hücreleri.	43
Şekil 32. FITC ve DAPI ile boyanmış HeLa hücreleri. (A) DAPI kanalı, (B) FITC kanalı, (C) Tüm kanallar.....	43
Şekil 33. PI ile boyanmış hücre çekirdeğinin konfokal görüntülemesi. (A) MCF-7 (B) NIH/3T3 (C) HeLa hücreleri	44
Şekil 34. Q565 parçacığının hücre içi lokalizasyonu (A) Geniş alan (B) Konfokal görüntüler (40X, NA: 1.3).....	46
Şekil 35. QDMSA (50 µg/mL) KN'sinin 5 saatlik uygulama sonrası HeLa hücrelerindeki geniş alan (A) ve konfokal lazer tarama (B) görüntüleri.....	47
Şekil 36. NIH/3T3 hücrelerinin QAGS (200 µg/mL) görüntülemesi. (A) Konfokal floresan, (B) Transmisyon ve (C) Birleştirilmiş görüntü kanalları. Skala çizgisi 20 mikron.....	47
Şekil 37. QDMSA parçacığı için hazırlanmış standart konsantrasyon eğrisi (n=3).	48
Şekil 38. QDMSA parçacığının HeLa ve NIH/3T3 hücreleri üzerindeki toksik etkisi (n=3).	50

TABLO LİSTELERİ

Tablo 1. HeLa hücre miktarı ve besi ortamında yer alan fenol kırmızısının XTT sonuçlarına etkisi.28

Tablo 2. Etoposid ve QMPA uygulaması yapılmış NIH/3T3 hücrelerinde apoptotik,sağlıklı ve nekrotik hücre yüzdeleri.....39

ÖZET

Kuantum Noktacıkları çapları 2 ila 10 nm arasında değişen, floresan özelliğe sahip küresel yarı iletken nano kristallerdir. Son yıllarda özellikle biyolojik ve medikal uygulamalarıyla dikkat çeken, geniş uyarım ve dar emisyon spektrumuna sahip bu nano parçacıklar, yüksek parlaklıkları, ışımaya verimleri ve foto-kararlılıklarının yanı sıra parçacık boyutuna bağlı emisyon dalga boyu değişimi sağlayabilmeleri sayesinde diğer floresan işaretleyicilere kıyasla önemli avantajlar sağlamaktadır.

Literatürde kuantum noktacıları üzerine yapılmış çalışmalar ağırlıklı olarak sentez, fiziksel karakterizasyon ve özgün uygulama alanları üzerine yoğunlaştığından parçacıkların *in situ* ve *in vivo* karakterizasyonu konusunda bilgi eksikliği bulunmaktadır. Projemizde bu bilgi açığının kapatılmasına yönelik olarak farklı kimyasal yapıya sahip kuantum noktacılarının hücresel etkileşim ve sitotoksitelerinin çalışılması amaçlanmıştır.

Kadmiyum ve gümüş merkezli, organik monomer veya polimer (PEG) kaplı parçacıkların HeLa kanser ve NIH/3T3 fare fibroblast hücre hatları üzerindeki sitotoksiteleri ağırlıklı olarak XTT ve proliferasyon analizleriyle belirlenmiştir. Hücre içi kuantum noktacı lokalizasyonu, geniş alan ve konfokal floresan mikroskobu kullanılarak gözlemlenmiştir.

Kuantum noktacılarının hücre içi parçacık kararlılığının kaybına bağlı kadmiyum salınımı sitotoksitenin temel nedeni olarak belirlenmiştir. Kanseri hücrelerinin kuantum noktacılarının toksik etkilerine daha dayanıklı olduğu görülmektedir. Parçacıklardan kopan kadmiyum iyonlarını tutmak amacıyla özgün bir kaplama malzemesi olarak kullanılan dimerkaptosüksinik asit (DMSA) kaplamasının toksik etkiyi düşürebildiği gösterilmiştir. Kuantum noktacıları, endositoz yoluyla hücre girişi ve endozom-lizozom içi birikimin tipik belirteci olan peri-nükleer alanda görüntülenmiştir. Gümüş merkezli kuantum noktacılarının 600 µg/mL'e varan oldukça yüksek dozajda ve 24 saatlik uygulama sonrasında bile fare fibroblast hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olmadığı gösterilerek yakın kızıl ötesi (NIR) *in vivo* görüntüleme alanında önemli bir kullanım potansiyeli olan bir kuantum noktacı üretilmiştir.

Anahtar kelimeler: kuantum noktacıları, nano parçacık, hücre-nanoparçacık etkileşimleri, nanoteknoloji, nanotoksikoloji, sitotoksiteler, *in vitro* karakterizasyon, konfokal floresan mikroskopisi.

ABSTRACT

Quantum dots are fluorescent spherical semiconductor nanocrystals which have an average size of 2 to 10 nm. Recent years have witnessed an increased use of these interesting nanoparticles especially in biological and medical applications. When compared to other fluorescent probes, quantum dots offer various advantages such as wide excitation and narrow emission spectra, higher brightness, quantum yield, and photostability and size-dependent emission wavelength.

Current quantum dot research is primarily focused on synthesis, physical characterization and novel applications. There is an urgent need for *in situ* and *in vivo* characterization studies to fill the knowledge gap in quantum dot interactions at cellular and organism level. Therefore, our aim in this work, was to study the cellular interactions and cytotoxicity of quantum dots with different chemical and physical properties.

We determined the cytotoxicity of quantum dots synthesized with cadmium and silver cores coated with organic monomers or polymers (PEG) on HeLa cancer and NIH/3T3 mouse fibroblast cell lines by XTT and proliferation assays. Intracellular localization of the particles was determined by wide-field and confocal fluorescence microscopy.

Cadmium release due to the loss of intracellular particle stability was determined as the major factor leading to the cytotoxicity. Toxic effects of QDs are less pronounced on cancer cells. It was also shown that incorporation of a novel coating material, dimercaptosuccinic acid (DMSA), as a cadmium scavenger can reduce the observed toxic effects. Quantum dots were observed in the peri-nuclear region of the cells which is a typical indication of cell entry via endocytosis followed by the particle entrapment in the late endosomes and lysosomes. QAGS, a quantum dot with silver core, was shown to have no cytotoxic effects on the mouse fibroblast cells, even at 600 µg/mL and 24 hr incubation time. This particle has an important potential in near infrared (NIR) *in vivo* imaging due to its high cytocompatibility.

Keywords: quantum dots, nanoparticle, cell-nanoparticle interactions, nanotechnology, nanotoxicology, cytotoxicity, *in vitro* characterization, confocal fluorescence microscopy.

1 GİRİŞ

Günümüzün en sıcak araştırma alanlarından biri olan ve 2012 yılı sonunda 1 trilyon dolarlık bir ekonomi hacmine ulaşacağı tahmin edilen nanoteknolojik ürünler, elektrik-elektronik, enerji, medikal, gıda, tarım, çevre ve milli güvenlik gibi birçok konuda kullanım alanı kazanmaya hızla devam etmektedir. Son yıllarda özellikle biyolojik ve medikal uygulamalarıyla dikkat çeken Kuantum Noktacıkları (KN), floresan özelliğe sahip, çapları 2 ile 10 nm arasında değişen, yarı iletken nano kristallerdir. Hücre ve doku görüntüleme amacıyla kullanılan diğer floresan işaretleyicilere (organik boyalar ve floresan proteinler) kıyasla önemli optik avantajları bulunan kuantum noktacıları, hem tanı hem de tedavi amaçlı uygulamalar için parlak bir gelecek vadetmektedir.

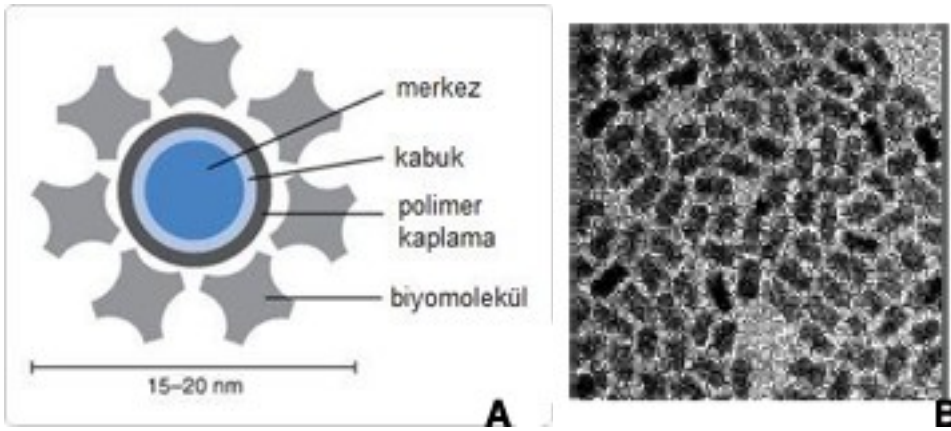
Literatürde kuantum noktacıları üzerine yapılmış çalışmalar ağırlıklı olarak sentez, optik özelliklerin karakterizasyonu ve özgün uygulama alanları üzerine yoğunlaşmıştır. Parçacıkların biyolojik ve klinik uygulamalardaki potansiyellerinin vurgulanmasına karşın, hücresel etkileşim ve sitotoksosite üzerine kapsamlı ve kıyaslamalı çalışmaların sayısının az olduğu görülmektedir.

Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Merkez Laboratuvar ve BIOMATEN öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Can Özen'in yürütücüsü, Koç Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Funda Yağcı Acar'ın araştırmacısı olduğu bu disiplinlerarası çalışmada, kombine mikroskopik-spektroskopik metodlar kullanarak farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahip kuantum noktacılarının hücresel etkileşim ve sitotoksitelerini araştırmak amaçlanmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kuantum Noktacıkları

Kuantum Noktacıkları (KN) yarı iletken özellik gösteren küresel nano kristallerdir (BRUCHEZ, 1998). Çapları 2 ila 10 nm arasında olan her bir noktacıta 200-10,000 civarında atom bulunur. Günümüzde değişik sentetik metodlar yoluyla üretilen KN'lerin sentezi ilk olarak 1982 yılında gerçekleştirilmiştir (EFROS,1982). Tipik bir kuantum noktacığın içten dışarıya doğru üç ana katmandan oluşmaktadır (Şekil 1). En iç kısımdaki merkez, kompozit bir metal bileşiğinden oluşur ve KN'nin emisyon dalga boyunu belirler. En sık kullanılan metal kompoziti olan kadmiyum selenit (CdSe)'in yanı sıra kadmiyum tellür (CdTe), kadmiyum sülfür (CdS), galyum arsenat (GaAs) ve indiyum fosfat (InP) benzeri metal kompleksleri de merkez oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu merkez üzerine kabuk ismi verilen ikinci bir yarı iletken katmanının kaplanması fotolimünesans verimini artırdığı gözlemlenmiştir (DABBOUSI, 1997). Çinko sülfür (ZnS) bu katman için tercih edilen başlıca metal kompleksidir. Özellikle biyolojik uygulamalarda yüzeye biyoyuymululuk kazandırmak için kabuk üzerine uygun bir organik molekül veya polimer de kaplanır. Molekül, hücre veya doku hedefleme gibi amaçlarla üretilen KN'lere nükleik asit veya protein gibi biyomoleküller de kovalent veya elektrostatik şekilde bağlanabilir.



Şekil 1. Tipik bir kuantum noktacığının (A) şematik yapısı ve (B) TEM görüntüsü (Invitrogen).

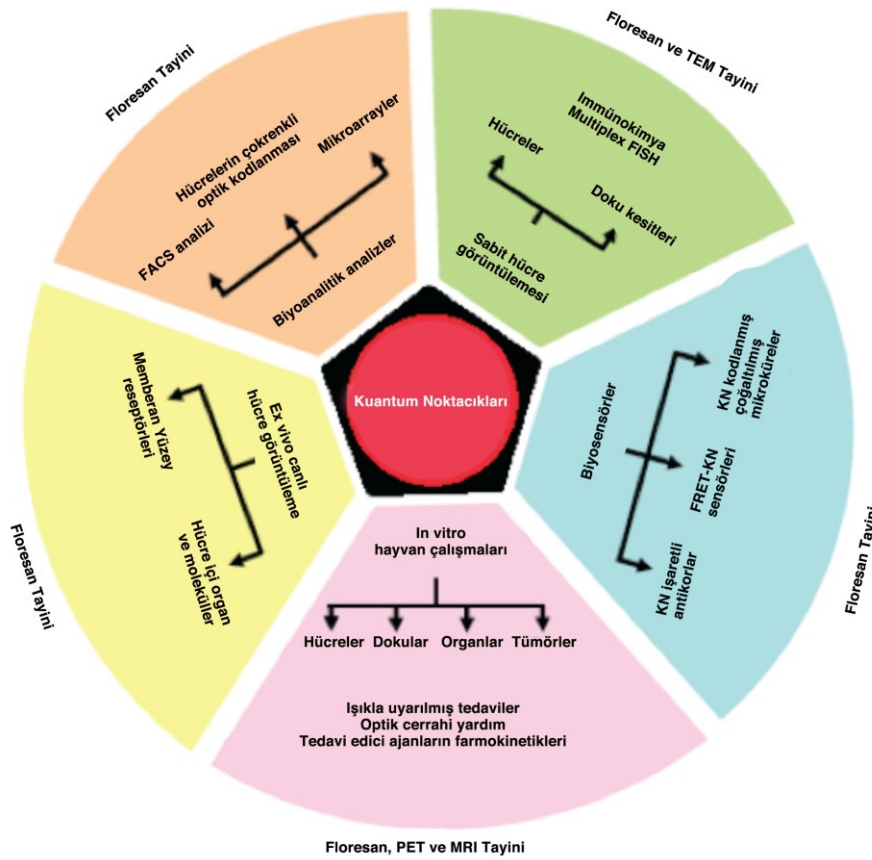
Floresan işaretleme amacıyla kullanılan organik boyalar ve floresan proteinlerle kıyaslandığında, yüksek kuantum verimleri sayesinde 100 kata kadar daha parlak ışımaya yapabilen bu parçacıkların diğer avantajları arasında uyarım sonucu renk kaybına daha dirençli olmaları (fotostabilite), parçacık boyutuna bağlı olarak değiştirilebilen ışımaya dalga boyu, dar emisyon ve geniş uyarım spektrumları sayılabilir (Şekil 2).



Şekil 2. Çapları 2-7 nm arasında olan CdSe kuantum noktacıklarının emisyon dalga boyu değişimi (HAN, 2001).

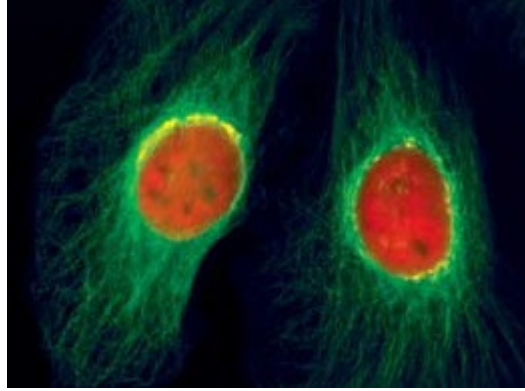
2.2 Biyolojik Uygulamalar

Kuantum noktacıklarının *in vitro*, *in situ* ve *in vivo* kapsamda hem hücre işaretleme ve takip, hem de ilaç taşıyıcı ve kontrollü salınım ajanları olarak tedavi amaçlı geniş bir biyolojik uygulama alanı bulunmaktadır (CHAN 1998, LIDKE 2004, DAHAN 2003, GAO 2005, WU 2003, AKERMAN 2002, RHYNER,2006, YEZHELYEV 2007, MAKSYM 2008), (Şekil 3).



Şekil 3. Kuantum noktacıklarının biyolojik uygulamaları (MICHALET, 2005).

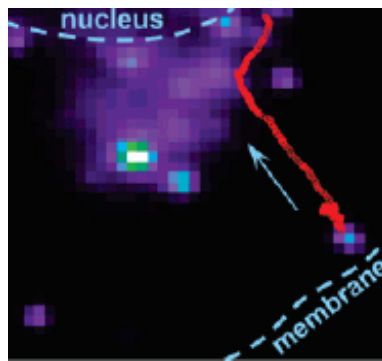
Kuantum noktacıkları hem canlı hücrelerin hem de fikse edilmiş hücrelerin doğrudan veya immüno Floresan metodlar kullanılarak boyanması ve takip edilmesinde kullanılabilirler (Şekil 4).



Şekil 4. Kuantum noktacıklarıyla işaretlenmiş bir memeli hücresi; çekirdek (kırmızı), golgi (sarı) ve hücre iskeleti (yeşil) [Invitrogen]

Schroeder ve ark. folat kaplanmış KN'ler kullanarak farelerin lenfoma hücrelerindeki folat reseptörlerinin *in vivo* koşullar altında işaretlenebileceğini göstermişlerdir (SCHROEDER, 2007). Folat reseptörlerinin sayısı kanserli hücrelerde normal hücrelere göre daha fazla olduğundan bu tür bir çalışmanın kanser teşhisinde önemli bir kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Benzer şekilde bir göğüs kanseri biyo-ışaretleyicisi olan Her2 reseptörünün varlığı antikor bağlı KN'ler yoluyla başarıyla gösterilebilmiştir (BIJU, 2008).

Yüksek parlaklık özelliğine sahip olmaları nedeniyle KN'ler önemli hücresel olayların gerçek zamanlı görüntülenmesi amacıyla da kullanılabilirler. Nan ve ark., hücre zarından peri-nükleer bölgeye kargo transferini KN'ları kullanarak gözlemiş ve transfer hızını 1.5 $\mu\text{m}/\text{saniye}$ olarak belirlemişlerdir (NAN 2005, Şekil 5).



Şekil 5. Kuantum noktacıklarıyla işaretli vesikül hareketinin takibi (NAN 2005).

Beaurepaire ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda antikorkaplı KN'lerle hücre reseptörleri spesifik olarak hedeflenmiştir (BEAUREPAIRE, 2004). Parak ve ark., metastaz potansiyeli olan kanserli hücrelerin tanısı için kullanım potansiyeli olan ilginç bir çalışmada, KN kaplı bir yüzeyde yayılan kanser hücrelerinin endositoz yoluyla parçacıkları hücre içerisine aldıklarını ve katettikleri yol boyunca arkalarında bir iz bıraktıklarını göstermiştir (PARAK, 2002).

Kuantum Noktacıkları FISH (Fluorescence in situ Hybridization) ve benzeri floresan metodlar için de organik boyalara nispeten avantajlar sağlamaktadır. Oligonükleotid bağlı KN'ler kullanılarak göğüs kanseri işaretleyicilerinden olan ERBB2/HER2/neu lokusunun tespiti bu açıdan önemli bir örnek teşkil etmektedir. KN'lerin SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) tayini ve FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) çalışmalarında da başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir (JAIMESON, 2007). Kuantum Noktacıklarının diğer biyolojik uygulamalarına örnek olarak toksin ve patojen tayini (JAIMESON, 2007) ve biyosensör (SMITH, 2008) çalışmaları gösterilebilir.

2.3 Hücresel Etkileşimler

Kuantum Noktacıklarının birçok biyolojik uygulaması hücre zarından geçerek hücre içerisinde görüntüleme için yeterli sinyal sağlayacak etkin bir konsantrasyona ulaşmalarını gerektirir. Bu geçiş, pasif içe-alım, reseptöre bağlı içe-alım, transfeksiyon ve mikro-injeksiyon gibi mekanik metodlar yoluyla sağlanabilir. Transfeksiyon ve mekanik metodların pratik zorluklarına ek olarak hücreye zarar verme riskleri bulunduğu için endositoza dayalı hücresel alım en yaygın olarak kullanılan metoddur (ZHANG, 2009).

Endositoz yoluyla hücre içine alınan KN'ler erken endozomlar içerisinde toplanırlar. Gözlemler, KN'lerin daha sonra geç endozomlar ve son olarak da lizozomlar içerisinde toplandıklarına işaret etmektedir (ZHANG, 2009). Geç endozom ve lizozomlar hücre içerisinde tipik olarak peri-nükleer alan adı verilen hücre çekirdeği etrafındaki bölgede toplanırlar. Özellikle geç endozomlar ve lizozomların düşük pH değeri, içlerinde hapsettikleri KN'lerin hücre içi stabiliteleri açısından önemli bir problem teşkil edebilir. Bu nedenle kaplama malzemesi olarak kullanılan organik katmanın pH direnci göz önünde bulundurulmalıdır. Hücre içi yapıların işaretlenmesini amaçlayan çalışmalarda KN'lerin endozomlarda kalmaları (endosomal entrapment) problem teşkil ettiği için parçacıkların organel dışına çıkışını sağlamak amacıyla polietilenimin (PEI) ve benzeri katyonik proton pompası polimerler kullanılabilir (ALIVISATOS, 2005).

Kuantum noktacıklarının çapının hücre içi lokalizasyonlarını belirleyen önemli bir parametre olabileceğini gösteren çalışmalar da yapılmıştır. Lovric ve ark. yaklaşık 2 nm çapındaki parçacıkların oldukça seçici çekirdek zarını geçerek hücre çekirdeğine lokalize olabileceğini göstermiştir (LOVRIC, 2005). Hücre içine alınan KN'lerle ilgili diğer önemli bir soru da, bu parçacıkların ne kadar süreyle kararlı kalarak sinyal vermeye devam edebileceğidir. Uzun süreli canlı hücre gözlem çalışmaları, bir haftayı aşan zaman aralıklarında bile hücre içi KN'lerden güçlü sinyal alınabileceğini rapor etmektedir (JAISWAL, 2003)

2.4 Sitotoksosite

Kuantum Noktacıklarının biyolojik uygulamalarındaki en önemli problemlerden biri toksisitedir (JAMES, 2005). Yuvarlaklaşan hücreler ve hücre zarında cepciklerin (bleb) oluşumu toksisiteye bağlı hücre ölümüne işaret eden en belirgin gözlemlerdir.

Derfus ve ark. KN'lerin uzun süreli UV uyarımının hücrelerde ciddi toksik etkilere yol açtığını göstermiştir (DERFUS, 2004). Bu etkiler, mutajenik etkisi güçlü olan UV uyarımına doğrudan bağlı olabileceği gibi UV dalga boyundaki fotonların enerjisinin kovalent bağların enerjisine yakın olmasına bağlı olarak KN'lerin hücre içi kararlılığının azalmasından da kaynaklanmış olabilir. Literatürdeki diğer bazı çalışmalar ise UV uyarım kullanılmayan durumlarda KN'lerin ciddi bir toksisitesinin olmadığına işaret etmektedir (GAO, 2005, BALLOU, 2004).

Lovric ve ark. merkaptopropiyonik asit ve sistamin kaplı CdTe KN'lerin 10 µg/mL konsanstrasyonda fare hücrelerinde (PC12) sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (LOVRIC, 2005). Mikroskopik gözlemlerde apoptozun tipik belirtileri olan kromatin yoğunlaşması ve hücre zarında cepciklerin (blebbing) oluşumu gözlemlenmiştir. Aynı grup, pozitif yüklü 2 nm'lik KN'lerin 5 nm'lik KN'lere göre daha toksik olduğunu göstermiştir.

Sitotoksosite, temel olarak olarak kuantum noktacıklarının merkezindeki kadmiyumun salınımı sonucu ağır metal zehirlenmesi ve aktif yüzey yapılarının hücre içerisinde Reaktif Oksijen Türleri (ROT)'nin oluşumuna yol açmasına bağlanmıştır. N-asetilsistin (NAC) benzeri antioksidan destekli besiyer kullanımı sonucu azalan toksik etkiler, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna bağlı toksisiteye işaret eden güçlü bir kanıt oluşturmuştur (LOVRIC, 2005). Öte yandan KN'lerin parçacık kimyasına bağlı toksik etkileri merkezin yanı sıra kaplama olarak kullanılan malzemelerden de kaynaklanabilir. Hoshino ve ark. KN sentezinde kullandıkları merkaptoundekanoik asit (MUA) ve sistamin'in fare hücrelerinde toksik etkiye sahip olduğunu belirtmektedirler (HOSHINO, 2004).

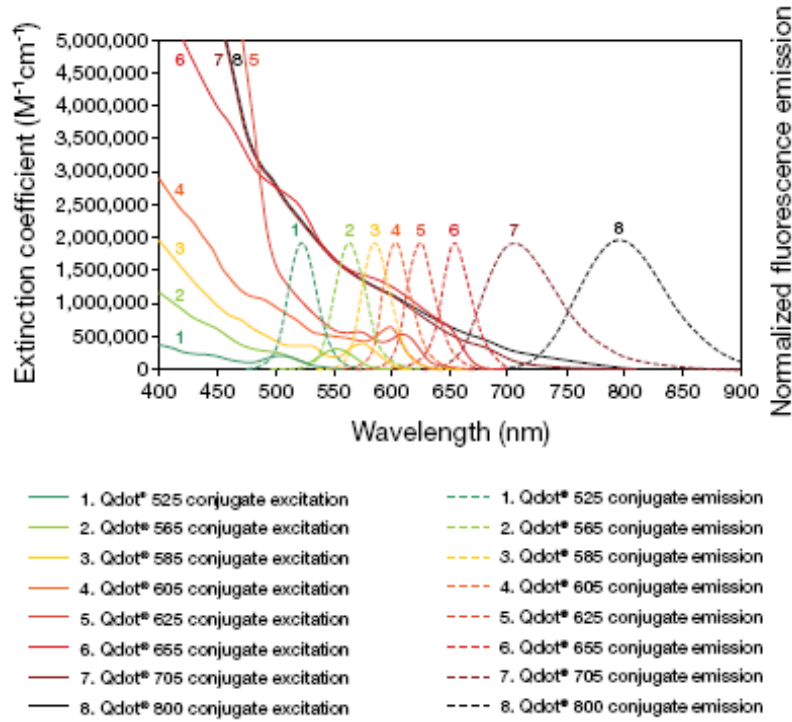
Kuantum Noktacıklarının toksisiteleri üzerine yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde problemin oldukça kompleks bir doğası olduğu ve parçacık boyutu, kimyası, uygulama dozajı ve süresi dışında hücre tipinin de büyük önem taşıdığı görülmektedir (GAO, 2003).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kuantum Noktacıkları

3.1.1 Qdot 565 (Q565)

Invitrogen firmasından temin edilen Qdot 565, CdSe çekirdek ve ZnS kabuğa sahip bir kuantum noktacıdır (Şekil 6). Parçacığın üzeri firma tarafından kimyasal yapısı saklı tutulan bir polimer ile kaplanmıştır. Oldukça yaygın kullanılan başarılı bir ticari ürün olması nedeniyle projemizde optimizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 6. Invitrogen tarafından üretilen kuantum noktacılarının uyarım ve ışımaya eğrileri.

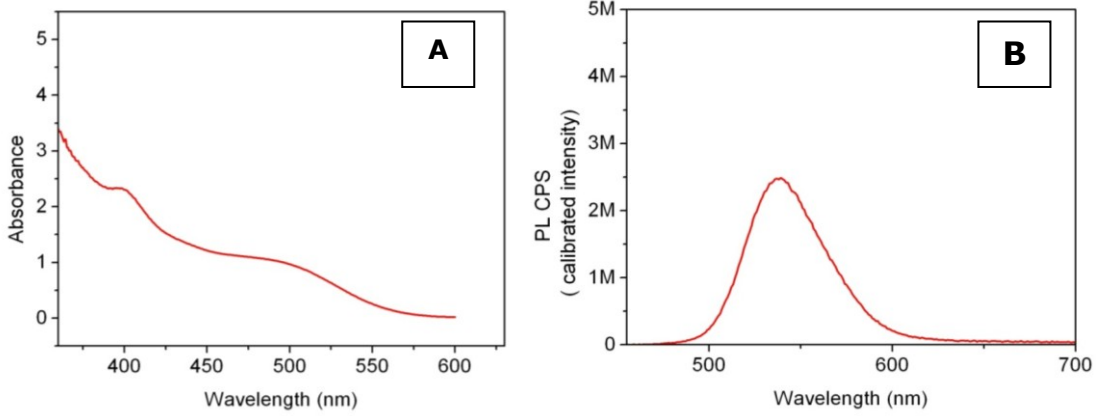
3.1.2 CdTe-2MPA (QMPA)

CdTe çekirdek ve 2-merkaptopropiyonik asit (2-MPA) kaplamaya (Şekil 7) sahip bu KN Dr. Acar'ın grubu tarafından sentezlenmiştir.



Şekil 7. Kuantum noktacılarının sentezinde kullanılan kaplama malzemeleri.

Kadmiyum asetat (213.2 mg, $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 2MPA 160 mL suda çözülür ve pH değeri 9.0'a ayarlanır. İçerisinden yarım saat nitrojen geçirildikten sonra 20 mL suda çözülmüş Na_2Te eklenir. Bu solüsyonun sıcaklığı 90°C çıkartılır ve reaksiyon bu sıcaklıkta devam eder. Cd:Te:2MPA oranı 1:0.38:2.4 olarak kullanılmıştır. Reaksiyon süresince numune alınıp parçacığın büyümesi takip edilmiştir. QMPA, QDMSA ve QAGS kuantum noktalarının uyarım ve ışımaya eğrileri şekil 8, 9 ve 10 da yer almaktadır.



Şekil 8. QMPA kuantum noktasının (A) uyarım (B) ışımaya eğrileri.

3.1.3 CdTe-CdS/2MPA-DMSA (QDMSA) ve Türevleri (QPEG, QRDG)

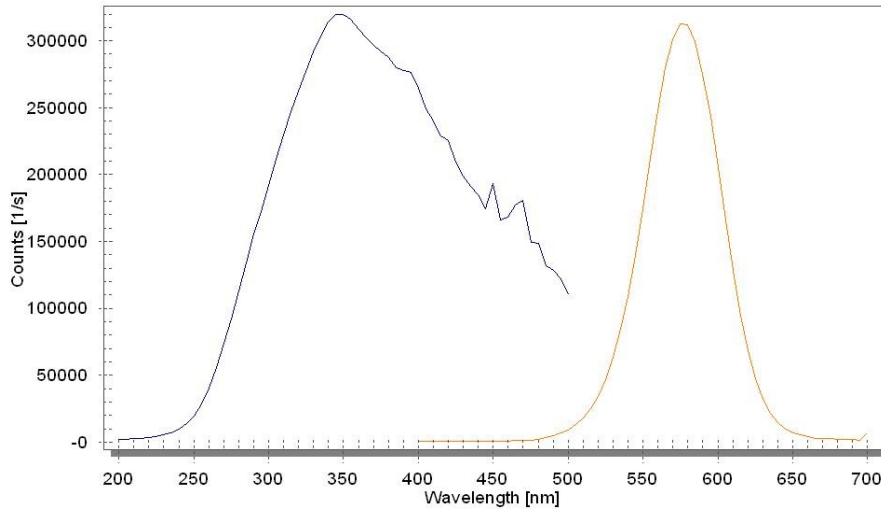
CdTe çekirdek ve CdS kabuğa sahip bu KN 2-merkaptopropiyonik asit (2-MPA) ve mezo-2-3-dimerkaptosüksinik asit (DMSA) kompozit monomer kaplamasıyla (Şekil 7) Dr. Acar'ın grubu tarafından sentezlenmiş özgün bir parçacıktır. DMSA, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ağır metal zehirlenmesi durumlarında kullanımı onaylanmış bir ilaçtır. KN yapısına kaplama malzemesi olarak katılan DMSA'nın merkezden kopan kadmiyum iyonlarını tutarak ağır metal salınımına bağlı toksik etkileri azaltması beklenmiştir.

Yukarıda bahsedilen 2MPA/CdTe sentezi sırasında 20 mL sulu DMSA solüsyonu reaksiyona katılır (4.saatte). $S/\text{Cd} = 0.7$ olarak kullanılmıştır. CdTe/2MPA in kuantum verimi CdS kabuk eklenince %16 dan %51 e çıkmıştır. Bu yüzeydeki hataların ortadan kalkması ve band aralığı daha geniş bir malzeme ile kaplanılarak non-radiative birleşmelerin azaltılmasına bağlanabilir. Luminasans şiddeti uzayan reaksiyon sürelerinde azalma göstermiştir. Bu da CdS kalınlığının artması ile oluşabilecek yeni yüzey hatalarına ve kristal latisler arasındaki uyumsuzluğa bağlanabilir.

Yüzey kimyasının hücre etkileşim ve toksisiteye olan etkisini araştırmak amacıyla bu parçacık kimyasına dayalı ek iki farklı KN de üretilmiştir. Bunlardan ilkinde PEG 2000

polimer kaplaması kullanılmış (QPEG), diğesinde ise PEG kaplama üzerine RGD peptid motifi eklemesi (QRGD) yapılmıştır.

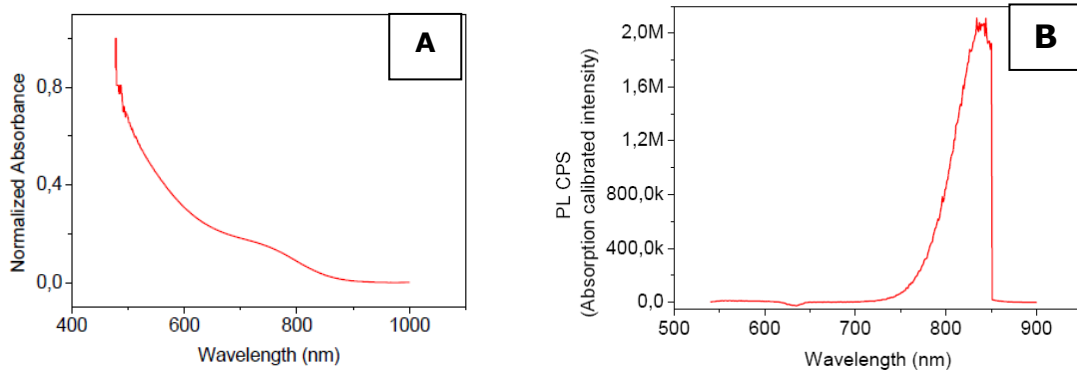
Parçacıkların uyarım ve emisyon özellikleri UV-VIS ve Fotolüminesans (PL) ölçümleri oda sıcaklığında alınarak tayin edilmiştir. Fotolüminesans ölçümleri 365-850 nm aralığında 0.5 nm'lik ölçüm kesitlerinde ve 355 nm uyarım dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 9. QDMSA kuantum noktaciğının uyarım (sol) ve ışıma (sağ) eğrileri.

3.1.4 Ag₂S-2MPA(QAGS)

Bu parçacık yukarıda listelenen kadmiyum tabanlı KN'lerden farklı olarak bir gümüş kompleksi olan Ag₂S merkez üzerine 2-merkaptopropiyonik asit (2-MPA) kaplaması kullanılarak Dr. Acar'ın laboratuvarında sentezlenmiştir.



Şekil 10. QAGS kuantum noktaciğının (A) uyarım (B) ışıma eğrileri.

3.2 Hücre Hatları ve Kültürü

3.2.1 Hücre Hatları

KN'lerin hücresel etkileşim ve sitotoksiteleri insan rahim kanseri (HeLa) ve fare fibroblast (NIH/3T3) hücre hatları üzerinde çalışılmıştır. Bu hatlar literatürde oldukça sık kullanılan ve kültür koşulları standardize edilmiş hücre hatlarıdır. HeLa hücreleri kanserli hücre, NIH/3T3 hücreleri de sağlıklı hücrelerin KN'lerle etkileşimini modellemek amacıyla kullanılmıştır.

3.2.2 Hücre Kültürü

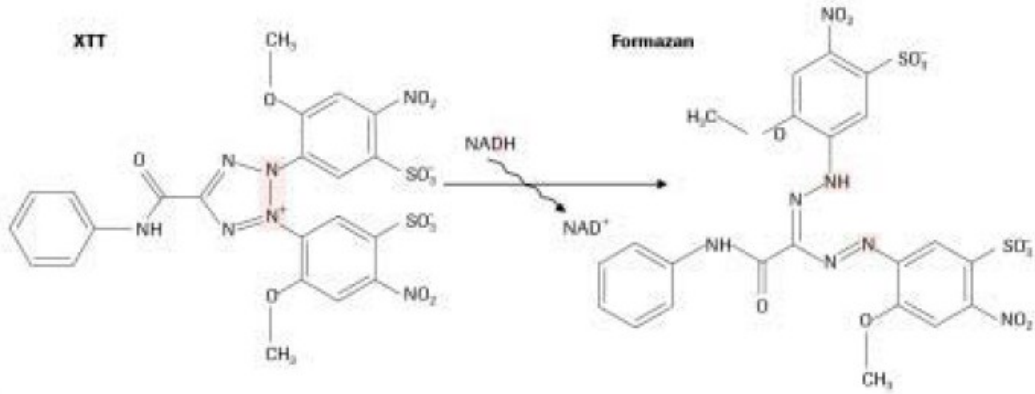
HeLa hücre hattı MEM Eagle, NIH/3T3 hücre hattı ise DMEM besi ortamı kullanılarak kültür edilmiştir. Besi ortamları %10 (v/v) FBS serum ve %1 (v/v) Pen-Strep antibiyotik kullanılarak desteklenmiştir. Kültür çalışmalarında T25, T75 ve T175 doku kültürü kapları (Greiner Bio-One, Almanya) kullanılmıştır. İnkübasyon 37°C'de ve %5 (v/v) CO₂ altında sağlanmıştır.

Hücre sayımları tripan mavisi ve hematositometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygun kültür kaplarına aktarılan ve yeterli sayıya ulaşan hücreler, filtrasyon yoluyla sterilize edilmiş KN'lerle çeşitli dozaj ve inkübasyon süresi aralıklarında yukarıda belirtilen kültür koşulları altında bekletilmiştir. Uygun yıkama basamakları sonrası örnekler spektroskopik ve mikroskopik analizlerde incelenmiştir.

3.3 Sitotoksite Çalışmaları

3.3.1 Dehidrogenaz Aktivitesine Dayalı XTT Testi

XTT testi, hücre biyolojisi çalışmalarında en sık kullanılan sitotoksite testlerinden biri olan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid] testinden türetilmiş bir testtir (SCUDIERO, 1988). Test, mitokondrilerdeki dehidrogenaz enzimlerinin XTT kimyasalını koyu renkli formazan molekülüne indirgemeleri esasına dayanır ve MTT'ye nispeten daha pratiktir (Şekil 11). Enzim aktivitesi sonucu oluşan formazan'ın konsantrasyonu spektroskopik olarak belirlenerek canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilir.



Şekil 11. XTT'nin formazan'a indirgenme reaksiyonu (Roche).

Kuantum noktacıklarının sitotoksitesi belirli dozajlar ve inkübasyon süresi sonrası gerçekleştirilen XTT analiziyle belirlenmiştir. Hücreler, 96-kuyucuklu kaplarda kuyucuk başına 10,000 hücre düşecek şekilde hazırlanmıştır. İnkübasyon (18 saat) sonrası besi ortamı değiştirilmiş ve belirlenen konstantrasyon aralıklarında KN uygulaması yapılarak 24 saatlik inkübasyon başlatılmıştır. Bu süre sonrasında hücreler yıkanmış ve XTT eklenerek 2 saat boyunca bekletilmiştir. Spektroskopik okuma 500 ve 650 nm dalga boylarında gerçekleştirilmiş, 650 nm de yapılan ölçüm, 500 nm de yapılandırılarak sonuçlar spesifik XTT soğurması açısından düzeltilmiştir. Üç ile altı replikanın kullanıldığı deneylerde sonuçların istatistiksel önemi GraphPad Prism yazılımında ANOVA testi kullanılarak belirlenmiştir.

3.3.2 Esteraz Aktivitesine Dayalı Viyabilite Testi

Kuantum noktacıklarının sitotoksik etkilerini araştırmak için kullandığımız diğer bir yöntem esteraz enzim aktivitesi ve hücre zarı geçirgenliğine dayalı olarak hücrelerin sağlığı konusunda bilgi sağlayan "Live/Dead Viability/Cytotoxicity (Invitrogen)" testidir. Test kalsein ve Etidyum Homodimer I (EthD-1) boya larını içermektedir. Canlı hücrelerin zarından geçerek hücre içine alınan kalsein, esteraz aktivitesi sonucu floresan özellikte bir yapıya dönüşerek hücre sitoplazmasını uygun uyarım altında yeşil boyamaktadır. Sadece ölü hücrelerin zarar görmüş hücre zarından geçebilen EthD-1 ise hücre çekirdeğindeki nükleik asitlere bağlanarak uygun uyarım altında kırmızı renk vermektedir.

3.3.3 CyQUANT Hücre Proliferasyon Analizi

Invitrogen firması tarafından sağlanan CyQUANT Hücre Proliferasyon testi, hücre sayısının belirlenmesi için pratik, hızlı ve hassas bir metoddur. 50 ile 50,000 hücre tek bir boya konsantrasyonu kullanarak lineer bir aralıkta tespit edilebilir. Bu metodun diğer standart bazı proliferasyon testlerine kıyasla önemli bir avantajı aktif hücre metabolizması gerektirmemesidir. CyQUANT testi farklı zaman noktalarında toplanan ve dondurularak saklanan hücreler üzerinde kolaylıkla uygulanabilir. Analiz, nükleik asitlere

bağlandığında güçlü bir floresan emisyon artışı gösteren yeşil renkli bir floresan boya olan CyQuant GR'a dayanmaktadır. Yıkama ve inkübasyon aşamaları gerektirmeyen metodda, hücreler analiz öncesi özel bir tampon solüsyonla parçalanmakta ve boya uygulaması sonrası 480 nm uyarımda, 510-600 nm aralığında doğrudan floresan emisyonu tespit edilmektedir.

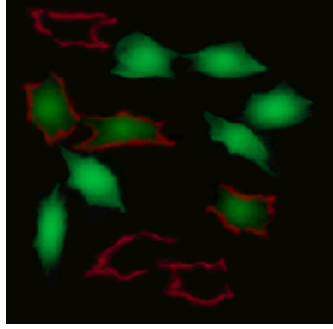
XTT hücre sitotoksosite metodu, KN'lerin sitotoksik etkilerini sadece canlı hücrelerin metabolik aktivitesine dayalı olarak belirlememizi sağlarken, CyQuant metodu ise KN'lerin hücre proliferasyonu üzerine etkisini nükleik asit miktarına bağlı olarak ve hem canlı hem de ölü hücrelerin toplam sayısını vererek belirlememizi sağlayan destekleyici bir metod olarak kullanılmaktadır.

3.3.4 Aneksin V Apoptoz Analizi

Kuantum noktacıklarının hücreler üzerindeki toksik etkileri hücre zarının zarar görmesi gibi nekrotik mekanizmalara bağlı olabileceği gibi DNA hasarı ve sitokrom c salınımı gibi apoptotik sonuçlar da doğurabileceğinden, projemizde aneksin V tayine dayalı bir apotoz testi de yer almıştır.

Bu test, kalsein ve Cy5 floresan boyalarını kullanan ve bir hücre popülasyonunda sağlıklı, nekrotik ve apoptotik hücrelerin oranının belirlenmesini sağlayan floresana dayalı bir analizdir (Agilent Technologies, 2003). Apoptozun erken aşamalarında ve nekrozda hücre zarının iç katmanında yer alan bir fosfolipid olan Fosfatidil Serin (FS) hücre zarının dış kısmına döner. Aneksin V, FS'ye yüksek afiniteyle bağlanan bir protein olduğundan streptavidin-Cy5 floresan boya kompleksi ve streptavidin-aneksin V konjugatı yoluyla hücre dışına dönmüş olan FS tespit edilebilir. Böylece popülasyondaki ölü ve apoptotik hücrelerden kırmızı bir sinyal alınır. Bu iki grubu birbirinden ayırmak için testteki diğer bir boya olan kalsein kullanılır. Kalsein Asetioksimetil (KA) hem ölü hem de canlı hücrelere girebilen ve yeşil ışığa yapan floresan bir boyadır. Işıma yapabilmesi için hücre içerisindeki esterazların enzimatik aktivitesi gereklidir. Canlı ve apoptozun erken aşamalarında bulunan hücreler, içeriye alınan KA boyasını metabolize eder ve yeşil bir renk alırlar. Ölü ve apoptozun geç aşamalarında yer alan hücreler ise hücre zarları ciddi zarar gördüğü için AM'yi hücre içinde tutamaz ve dolayısıyla yeşil renk veremezler. Özet olarak sağlıklı hücreler yeşil, apoptozun erken aşamasında bulunan hücreler hem yeşil hem kırmızı, apoptozun geç aşamasında bulunan ve ölü hücreler de sadece kırmızı renkte ışığa verirler (Şekil 12). Ölçümler Agilent'in 2100 model Bioanalyzer cihazı ve hücre çipleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kalsein sinyalini toplayan mavi kanal uyarımı 470 nm lazer ile yapılmış, emisyon 510 - 540 nm arası toplanmıştır. Cy5 sinyalini toplayan

kırmızı kanal uyarımı 635 nm de gerçekleştirilmiş ve 674 – 696 nm emisyon filtresi kullanılmıştır.



Şekil 12. Esteraz aktivitesi ve fosfatidil serin'e dayalı apoptoz testi; sağlıklı (yeşil), erken apoptotik (yeşil+kırmızı) ve geç apoptotik/ölü (kırmızı) hücreler

3.3.5 Kadmiyum Tayin Analizi

Raporun genel bilgiler kısmının sitotoksisite bölümünde belirtildiği gibi kadmiyum merkezli kuantum noktacıklarının başlıca toksisite sebebi parçacık kararlılığının azalmasına bağlı olarak salınan kadmiyum iyonlarıdır. Biz de sitotoksisiteyle parçacıklardan salınan kadmiyum arasındaki bağı test etmek ve sentezlediğimiz parçacıkların hücre içi kararlılıklarını belirlemek amacıyla Invitrogen firmasından temin ettiğimiz Measure-IT ağır metal tayin testini kullandık. Bu test, serbest kadmiyum iyonlarına bağlandığında floresan emisyonu artış gösteren bir floresan boya kullanılmaktadır ve 5 – 200 nm doğrusal aralıkta kadmiyum tayini sağlayabilmektedir.

3.4 Hücre İçi Alım ve Lokalizasyon Çalışmaları

3.4.1 Hücre Görüntüleme

Kuantum noktacıklarının kalitatif hücre içi alım tayinleri ve hücre içi lokalizasyonları geniş alan (wide-field) ve konfokal (confocal laser scanning) floresan mikroskopik metodları kullanılarak belirlenmiştir. Mikroskopik gözlemler aynı zamanda hücre morfolojisinin incelenmesine olanak sağladıkları için toksisite çalışmalarına da destek sağlamıştır.

Gözlemler Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvar Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi'ndeki mikroskop laboratuvarında bulunan Zeiss 510 model konfokal lazer tarama mikroskopunda yapılmıştır. Kontrast metodları olarak diferansiyel Interferanz Kontrast (DİK) ve Faz Kontrast (FK) kullanılmıştır. UV dalga boyunda uyarım hücrelerde önemli toksik etkilere yol açtığından, gözlemler ağırlıklı olarak 488, 543 nm arasında çeşitli dalga boylarındaki argon ve HeNe lazerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

KN'ler, bir gece öncesinden üzerine 50,000 hücre ekilen lamellerin bulunduğu 6-kuyulu hücre kültürü kaplarında uygulanmış velam üzerine taşınan lamellerden yağ immersiyon objektif (40X, NA 1.4) yoluyla yüksek çözünürlükte görüntü alınmıştır. Görüntülerin büyük bölümü %4 paraformaldehid solüsyonu kullanılarak fikse edilen hücrelerden elde edilmiştir. Gerekli durumlarda organel boyaları da kullanılmıştır. Kısa süreli canlı hücre gözlemi gerektiren durumlarda iselamel tabanlı 35 mm petri kapları (Mattek, ABD) tercih edilmiştir.

3.4.2 Kantatif Hücre İçi Alım Analizi

Kuantum noktacıklarının fizikokimyasal özellikleri ve inkubasyon parametreleriyle (dozaj ve süre) hücre içine alım miktarları arasındaki ilişkiyi araştırmak, elde edilen sonuçları sitotoksosite çalışmalarıyla ilişkilendirmek amacıyla kantatif hücre içi alım analizi yapılmıştır. Bu analiz hücre sayısı proliferasyon analiziyle belirlenmiş bir popülasyonundan alınan KN emisyon sinyalinin, belirlenmiş KN konsantrasyonlarına karşın emisyon sinyali ölçümü alınarak oluşturulan bir standart eğri kullanılarak femtogram KN/hücre değerine çevrilmesi esasına dayanmaktadır. Ölçümler, Orta Doğu Teknik Üniversitesi BIOMATEN araştırma merkezinde bulunan Spectramax M2e (Molecular Devices, ABD) model floresan mikropilaka okuyucu cihazında, KN spesifik uyarım ve emisyon dalga boylarında alınmıştır.

4 BULGULAR

Raporun bulgular bölümü kuantum noktacıklarının sitotoksitesi ve hücre içi alım/lokalizasyonları olmak üzere iki ana başlık altında toplanmıştır.

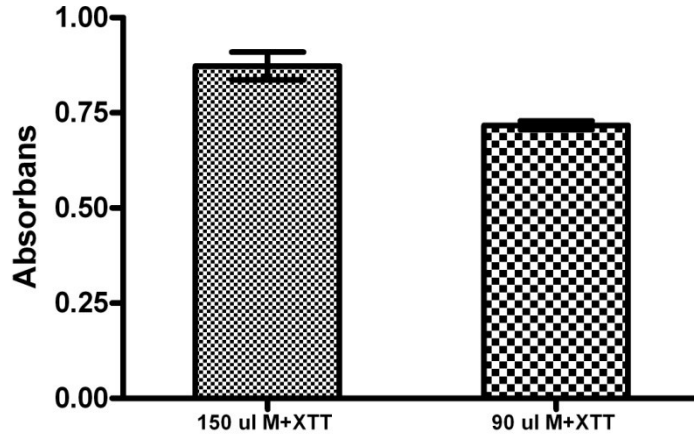
4.1 Kuantum Noktacıklarının Sitotoksitesi

4.1.1 XTT Analizi

Kuantum noktacıklarının sitotoksik etkilerinin XTT analiziyle tayini öncesi optimum deneysel parametrelerin bulunması amacıyla aşağıda özetlenen optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.1 Reaksiyon Solüsyon Hacminin Optimizasyonu

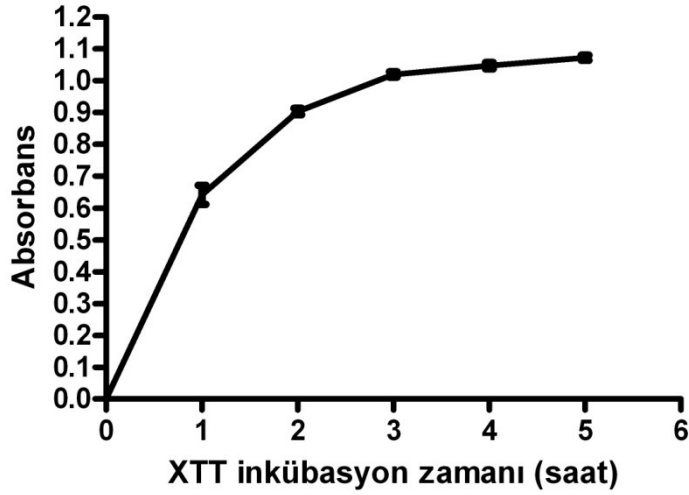
XTT reaksiyon solüsyonunu miktarının optimizasyonu ürün bilgi formunda tavsiye edilen şekilde yapılarak 90 uL hacmin sağlıklı ölçümler için yeterli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 13).



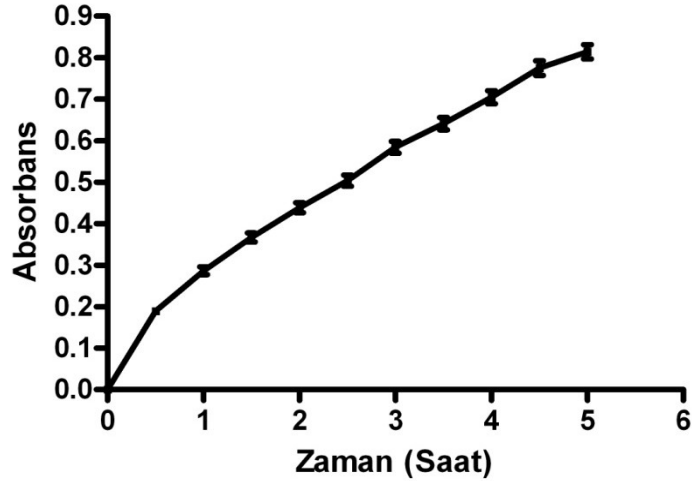
Şekil 13. HeLa hücreleri kullanılarak yapılan XTT solüsyon hacmi optimizasyonu.

4.1.1.2 İnkübasyon Zamanının Optimizasyonu

Doğrusal sinyal bölgesi içerisinde kullanılabilen minimum inkübasyon süresinin bulunması için HeLa ve 3T3 hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucu 2 saatlik XTT solüsyon inkübasyonunun yeterli olacağı tespit edilmiştir (Şekil 14 ve 15).



Şekil 14. HeLa hücreleri kullanılarak yapılan XTT inkübasyon süresi optimizasyonu.



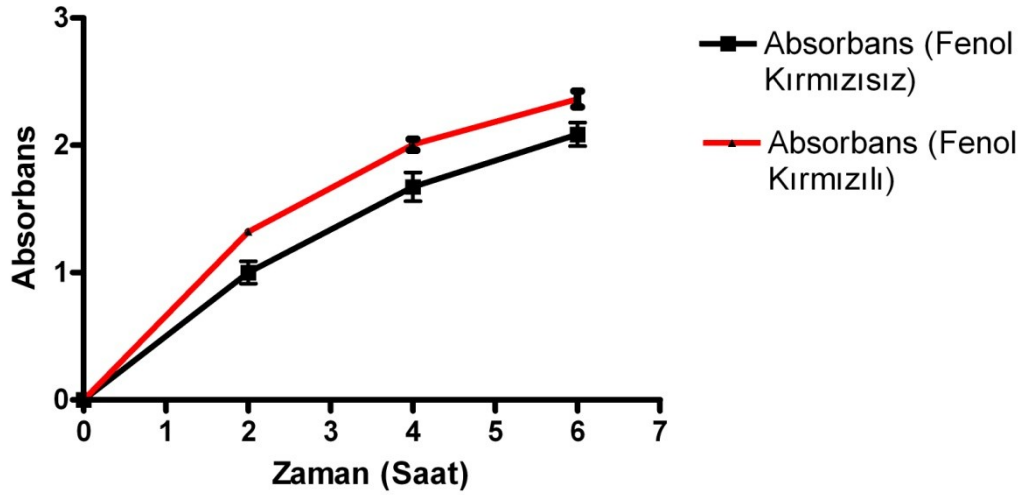
Şekil 15. NIH/3T3 hücreleri kullanılarak yapılan XTT inkübasyon süresi optimizasyonu.

4.1.1.3 Hücre Miktarının Optimizasyonu ve Fenol Kırmızısının Sinyal Etkisinin Araştırılması

XTT analizi için kullanılacak optimum hücre miktarı ve besi ortamındaki fenol kırmızısının analiz sonuçlarına etkisi HeLa hücreleriyle yapılan deneylerle belirlenmiştir. 10,000 ve 24,500 hücre, 96 kuyucuklu mikropalakların kuyucuklarına eklenmiş ve XTT reaksiyon solüsyonu ile 2, 4 ve 6 saat inkübe edilmiştir (Tablo 1). 10,000 hücre ile yapılan ölçümün yeterli olduğu tespit edilmiştir. Besi ortamında pH indikatörü olarak kullanılan fenol kırmızısının sonuçlar üzerinde önemli bir fark yaratmadığı ve bu nedenle hücre kültürü çalışmalarında kullanılmasının bir sakıncası olmadığına karar verilmiştir (Şekil 16).

Tablo 1. HeLa hücre miktarı ve besi ortamında yer alan fenol kırmızısının XTT sonuçlarına etkisi. Ölçüm hata oranı $\pm 0,05$.

24,500 Hücre	2 saat	4 saat	6 saat
Fenol Kırmızılı Sıvı Besiyeri	1,70	2,26	2,49
Fenol Kırmızısız Sıvı Besiyeri	1,63	2,22	2,38
10,000 Hücre	2 saat	4 saat	6 saat
Fenol Kırmızılı Sıvı Besiyeri	1,32	2,00	2,36
Fenol Kırmızısız Sıvı Besiyeri	1,00	1,67	2,08



Şekil 16. Fenol kırmızısının XTT sonuçlarına etkisi.

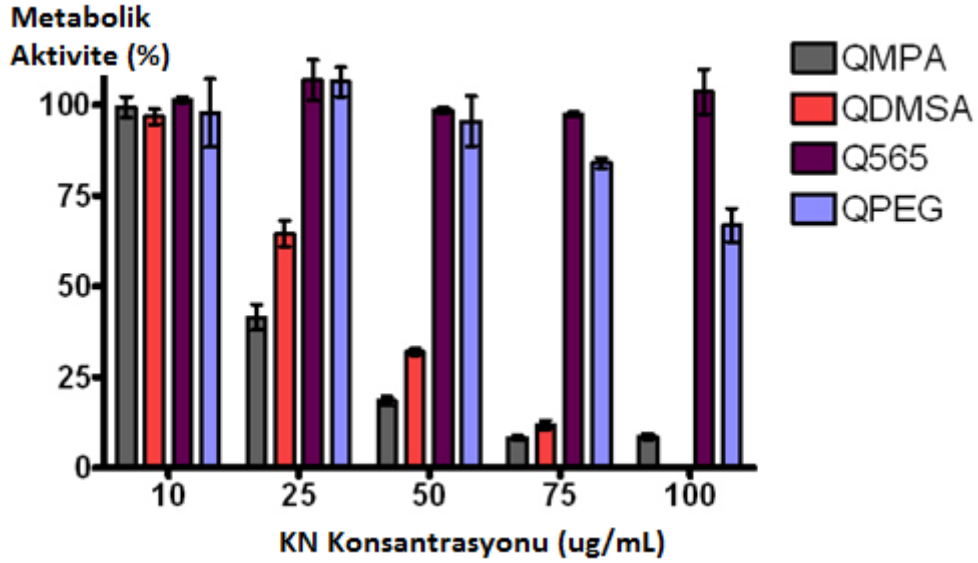
4.1.1.4 Kuantum Noktacıklarının Dehidrogenaz Enzimlerine Bağlı Hücre Metabolik Aktivitesine Etkisi

QMPA, QDMSA, Q565, QPEG ve QAGS kuantum noktacıklarının HeLa ve NIH/3T3 hücrelerinin metabolik aktivitelerine olan etkileri 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası 10 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyon aralığında belirlenmiştir. Bu aralıkta herhangi bir toksisite göstermeyen QAGS parçacığı için 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyona kadar çıkmıştır.

Cd çekirdekli QMPA, QDMSA, Q565 ve QPEG KN'lerinin 3T3 hücrelerinin metabolik aktivitesine etkileri aşağıda listelenen bazı önemli soruları cevaplamak amacıyla çalışılmış ve alınan sonuçlar şekil 17'de özetlenmiştir.

- Başlangıç materyali olarak kullanmayı tercih ettiğimiz CdTe-2MPA (QMPA) KN'sinin 3T3 hücrelerinin metabolik aktivitesine etkisi nedir?

- QMPA KN'sinin toksisitesi, parçacık üzerine bir kabuk (CdS) ve serbest Cd iyonlarını tutarak ortamdaki uzaklaştıracak ek bir kaplama (DMSA) kullanılarak azaltılabilir mi? [QMPA – QMDSA kıyaslaması]
- Nanoparçacıkların biyo-uyumluluklarını artırmak için sık olarak kullanılan pegilasyon yöntemiyle KN toksisitesi de azaltılabilir mi?

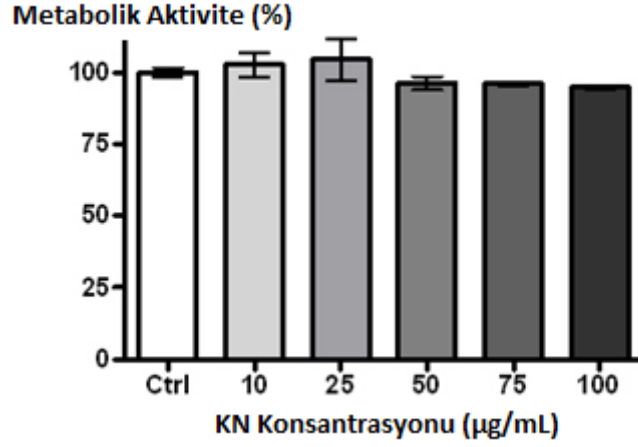


Şekil 17. Cd çekirdekli kuantum noktacıları uygulanan NIH/3T3 hücrelerinin metabolik aktivitesi (24 saat, n=3).

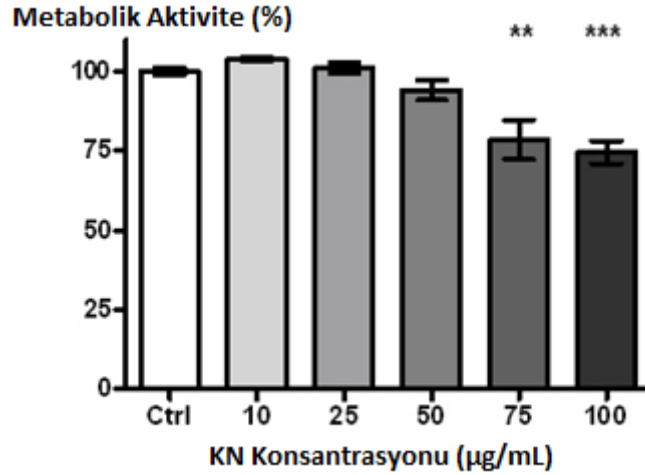
Sentezlediğimiz CdTe-2MPA (QMPA), çekirdek-kabuk yapıya sahip CdTe-CdS/2MPA-DMSA (QDMSA), QDMSA parçacığının PEG kaplanmış versiyonu (QPEG) ve ticari bir ürün olan Invitrogen Qdot 565 (Q565) kuantum noktacılarının XTT'ye dayalı sitotoksiteleri kıyaslandığında 10 µg/mL dozajlık 24 saatlik uygulamanın NIH/3T3 hücrelerinde herhangi bir toksik etkiye yol açmadığı görülmektedir. QMPA'nın 25 µg/mL konsantrasyondan itibaren ciddi toksik etkisi başlamaktadır. CdS kabuk ve ek DMSA kaplaması bu parçacığın toksisitesini bir ölçüde azaltmaktadır. Polimerik bir kaplamaya sahip Q565, 100 µg/mL konsantrasyona kadar herhangi bir toksik etki göstermemektedir. PEG kaplaması yapılan QMDSA parçacığı (QPEG) uygulanan maksimum dozajda (100 µg/mL) ~%35'lik bir metabolik aktivite kaybına yol açmaktadır.

3T3 hücrelerinde herhangi bir toksik etki göstermeyen Q565 ve ek kabuk/kaplama modifikasyonu ile geliştirilmiş QDMSA parçacıklarının HeLa hücrelerine etkileri Şekil 18 ve 19'da gösterilmektedir. Q565 HeLa hücrelerinde de gözlemlenebilir bir toksik etkiye sahip

değildir. QDMSA'in toksik etkisi ise 3T3 hücrelerine kıyasla daha yüksek bir konsantrasyon eşiğinden sonra ortaya çıkmaktadır.

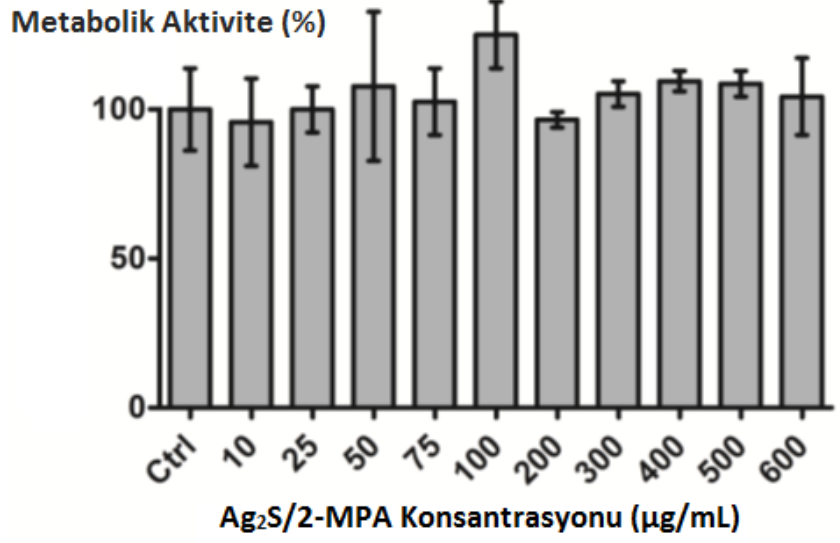


Şekil 18. Q565 noktacılarıyla 24 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin metabolik aktivite değışimi (n=3).



Şekil 19. QDMSA noktacılarıyla 24 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin metabolik aktivite değışimi (n=3).

Son olarak kadmiyum yerine gümüş bir merkezin kullanıldığı QAGS parçacığının toksisitesi 3T3 hücreleri üzerinde çalışılmış ve 600 µg/mL kadar yüksek bir konsantrasyon değerinde bile istatistiksel açıdan önem teşkil eden bir metabolik aktivite kaybı gözlemlenmemiştir (Şekil 20).

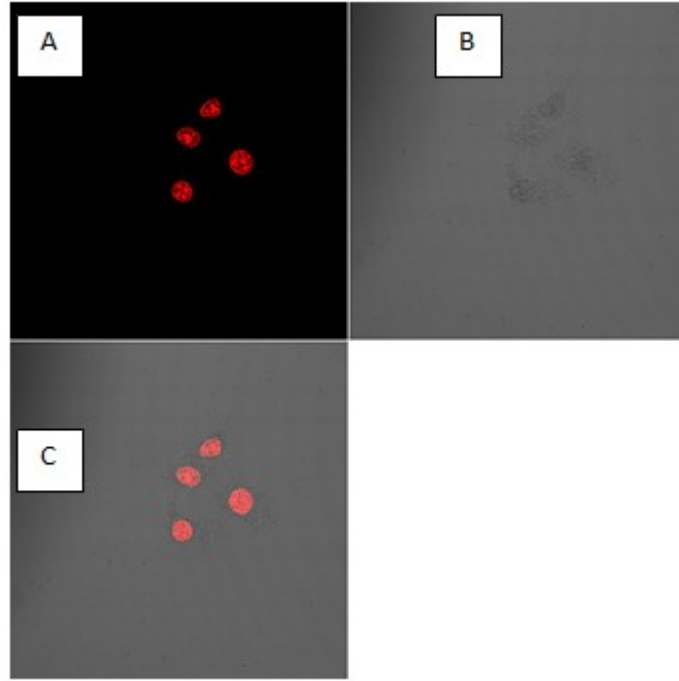


Şekil 20. 24 saatlik QAGS uygulamasının NIH/3T3 hücrelerinin metabolik aktivitesine etkisi.

4.1.2 Esteraz Aktivitesine Dayalı Viyabilite Testi

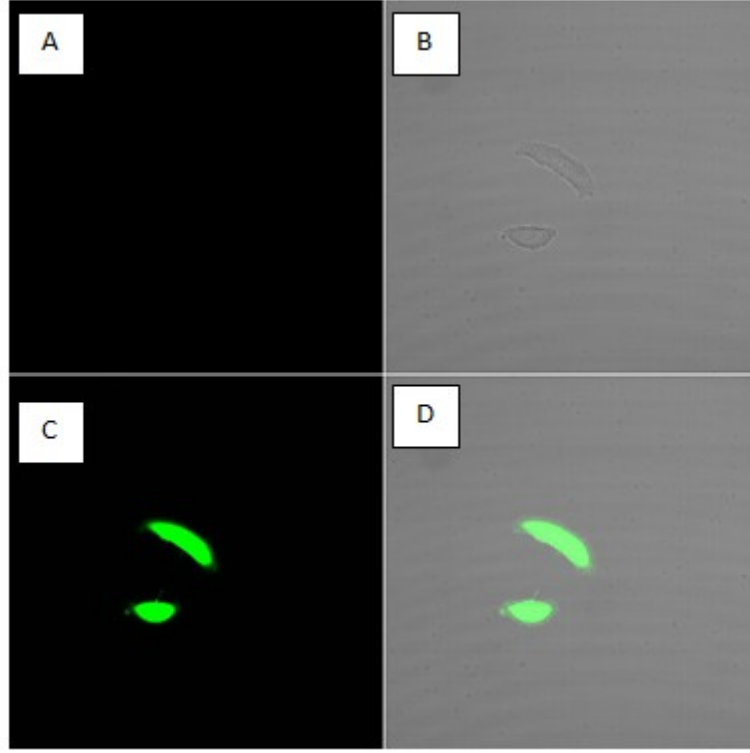
Kuantum Noktacıklarının sitotoksik etkilerinin araştırılmasında dehidrogenaz aktivitesine dayalı XTT metoduyla kıyaslama yapabilmek amacıyla çalışma prensibi hücre zarı geçirgenliği ve esteraz enzim aktivitesine dayalı bir analiz olan esteraz aktivitesine dayalı viyabilite testi (Invitrogen) kullanılması planlanmıştır. Analizin optimizasyon çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

EthD-1 (Etidyum Homodimer I) ölü hücreleri işaretlemek amacıyla kullanılacağından test için kullanılacak hücelere %70 metanol uygulaması yapılmıştır. Ürün kullanım kitapçığındaki boyama prosedürü takip edilerek 1.0-6.0 µM konsantrasyon aralığında ve 30 dakika süresince EthD-1 uygulanmış ve 2.0 µM'lik boya konsantrasyonu optimum değer olarak belirlenmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. 2 μM EthD-1 ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40X (NA 1.30) objektifle çekilen floresan konfokal görüntüsü (A: EthD-1 kanalı, B: Transmisyon kanalı, C: A ve B birleştirilmiş kanallar)

Lamel tabanlı 35 mm hücre kültür petrisinde (glass-bottom cell culture dish) yetiştirilen HeLa hücreleri inkübatörden alındıktan sonra EthD-1 boyama prosedürü ve ardından da 0.1-2.0 μM konsantrasyon aralığında kalsein konsantrasyonu uygulanmış ve HeLa hücrelerinde optimim kalsein boyama konsantrasyonu 0.5 μM olarak belirlenmiştir (Şekil 22).



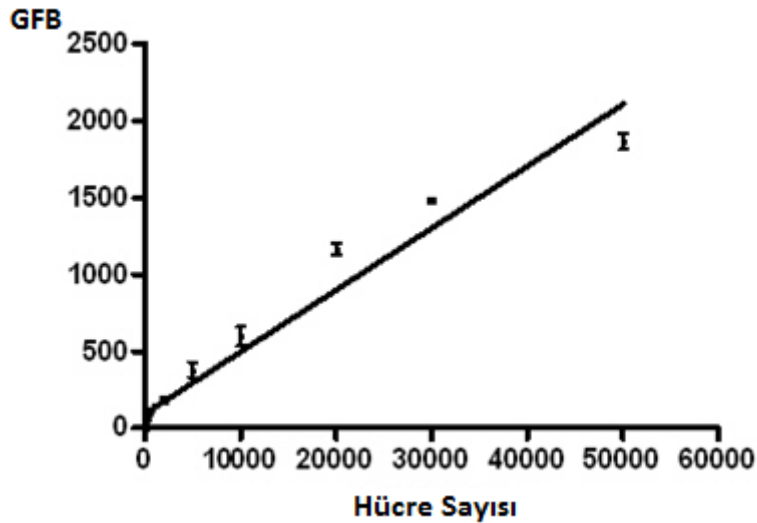
Şekil 22. 0.5 µM kalsein ile boyanmış HeLa hücrelerinin 40X (NA 1.30) objektifle çekilen floresan konfokal görüntüsü (A: EthD-1 kanalı, B: Transmisyon kanalı, C: Kalsein kanalı, D: A, B ve C birleştirilmiş kanallar)

Boyama öncesi herhangi bir stres uygulaması yapılmadığından beklendiği gibi EthD-1 ve EthD-1/kalsein ile işaretlenmiş hücre sayısı oldukça az olmuştur. Gözlemlenen hücrelerin çoğunluğu yeşil ışımaya veren canlı hücrelerden oluşmaktadır. Görüntüleme öncesi yaklaşık 45 dakikalık boya uygulaması ve görüntü alma koşullarının ayarlanması sürecinde hücreler ideal kültür ortamında bulunmadıklarından dolayı sağlıklı hücre morfolojilerini kaybettikleri görünmektedir. Bu sonuç kalsein boyama prosedüründen bağımsız bir durumdur. Proje kapsamında yer alan canlı hücre görüntüleme sisteminin kurulmasıyla beraber mikroskop tablası üzerinde ideal inkübasyon koşulları sağlanabileceğinden optimizasyon çalışmalarına sistem kurulana kadar ara verilmiştir. Raporun ilgili bölümünde açıklanan problemler yüzünden bahsi geçen sistemin kurulmasında aksamalar olması nedeniyle esteraz aktivitesine dayalı viyabilite testi modülü tamamlanamamıştır.

4.1.3 Kuantum Noktacıklarının Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Hücrelerin içerdikleri nükleik asit miktarına göre sayılarının belirlenmesini sağlayan hızlı ve güvenilir bir test olan CyQuant proliferasyon analizi (Invitrogen) alternatif bir sitoksisite çalışması olarak projemize dahil edilmiştir. Raporun bundan önceki bölümlerinde bahsi geçen XTT ve Esteraza dayalı viyabilite testleri hücrelerin enzim aktivitesine bağlı olarak dolaylı yoldan canlılık durumlarının tespitine dayanmaktadır. Bu tür analizlerin taşıdığı önemli bir risk enzim aktivitesini etkileyecek durumların ortaya çıkmasının analiz sonuçlarını da olumsuz etkilemesidir. Örneğin XTT analizinde hücre içerisindeki redoks dengesini bozacak bir uygulama dehidrogenaz enzim aktivitesini de etkileyeceğinden deneyden doğru olmayan sonuçların alınmasına yol açabilir (COOPER, 2010). Hücrelerin DNA miktarı hücre sayısı ile güçlü korelasyon gösteren bir metrik olması nedeniyle hücre sayısı ve dolayısıyla toksisite belirlenmesinde kullanılan güvenilir bir alternatif sunmaktadır.

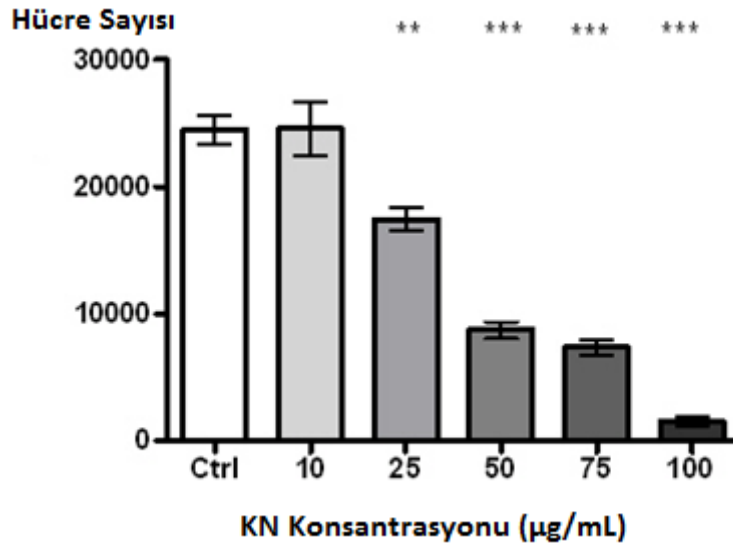
Analizin optimizasyon çalışmaları 96-kuyulu mikropalakalarda NIH/3T3 hücreleriyle yapılmıştır. Ürün kitapçığında belirtildiği şekilde hücre sayısı ve DNA standart eğrileri oluşturulmuş, uygun kontrol ve replikalar içeren bir deney setinde hücre sayısı Thoma lamı ile 10,000 ve 20,000 olarak belirlenen ve CyQuant ile boyanan örneklerin floresan emisyonları kıyaslanmıştır. Emisyon eğrilerinin yaklaşık olarak 520 nm’de zirve yaptıkları gözlemlenmiştir. Bu dalga boyunda elde edilen ortalama floresan şiddeti değerlerinin hücre sayısının ikiye katlanması sonucu iki kat arttığı gösterilmiş ve CyQuant analizinin beklendiği şekilde çalıştığı teyid edilmiştir (Şekil 23).



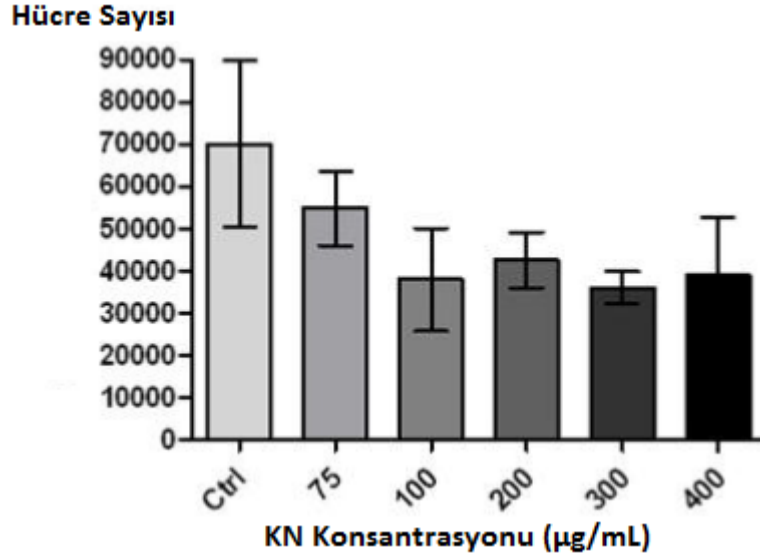
Şekil 23. NIH/3T3 hücreleri için hazırlanmış standart proliferasyon eğrisi (n=3), GFB: Göreceli Floresan Birimi.

Kuantum noktacılarıyla yapılan çalışmalar sonrası XTT ve CyQuant analizlerinin QDMSA ve QAGS uygulanan hücreler için benzer sonuçlar sağladığı görülmüştür (Şekil 24 ve 25). Optimum hücre boyama konsantrasyonu olan 10 µg/mL QDMSA dozajının hücreler üzerinde gözlemlenebilir bir toksik etki yaratmadığı teyid edilmiştir. CyQuant analizi özellikle QAGS ile yapılan çalışmalarda yüksek standart sapmalar vermiştir. Şekil 24'deki hücre sayısı, artan KN konsantrasyonuna bağlı olarak azalıyor gibi gözükse de bu değişim kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan önem taşımadığı için sonuçların XTT analizinden farklı olduğuna işaret eden güçlü bir delil bulunamamıştır.

Bu bulgular ışığında QDMSA, QAGS ve benzeri KN'lerin hücrelerin redoks dengesini etkilemediğine ve bu nedenle projenin bundan sonraki çalışmalarında sadece XTT analizinin viyabilite ölçütü olarak kullanılabileceğine karar verilmiştir.



Şekil 24. QDMSA kuantum noktacıyla 24 saat inkübe edilmiş NIH/3T3 hücrelerinin proliferasyon grafiği (n=3). **: p<0.05, ***: p<0.01

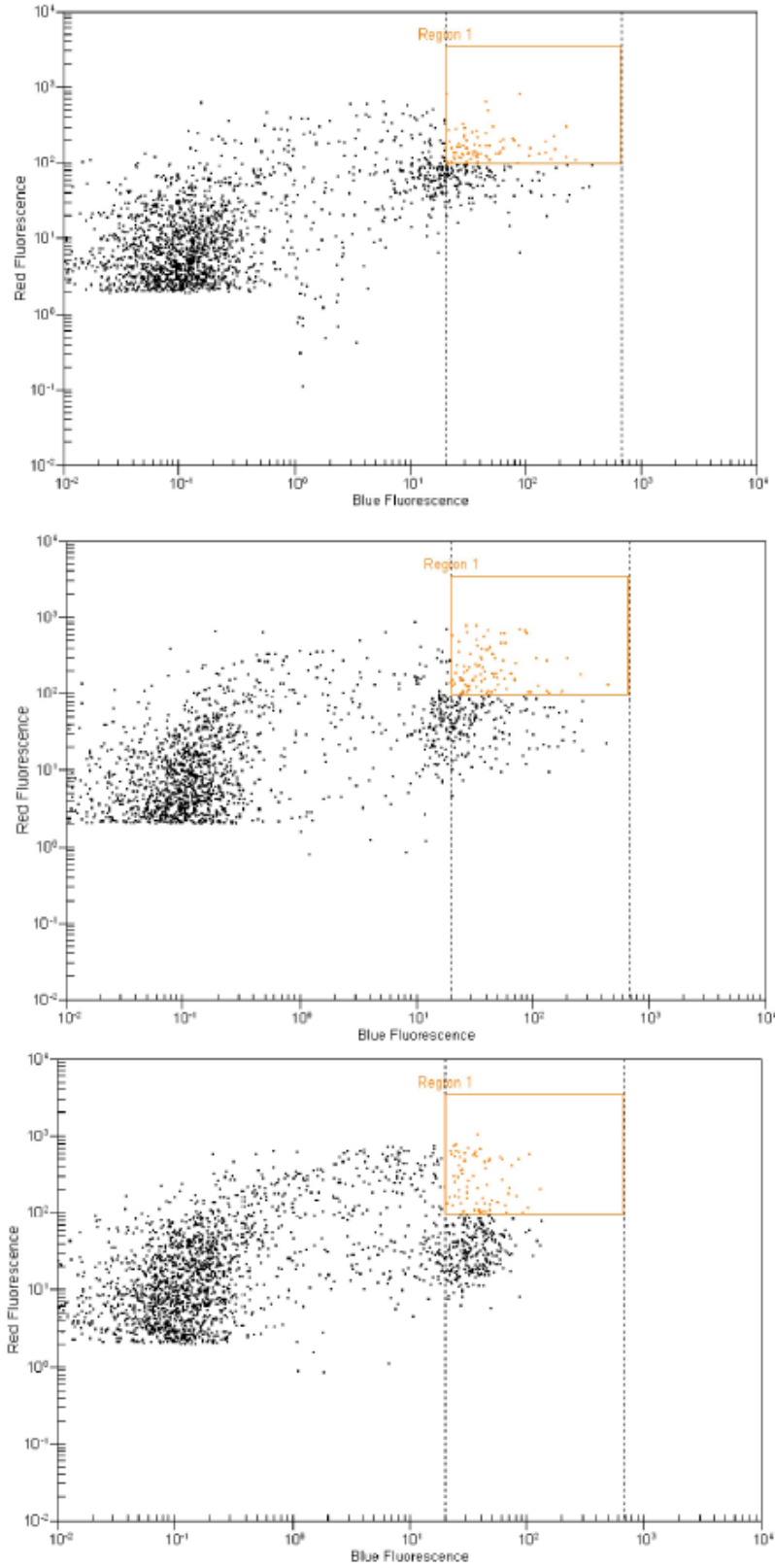


Şekil 25. QAGS kuantum noktacıyla 24 saat inkübe edilmiş NIH/3T3 hücrelerinin proliferasyon grafiği (n=3).

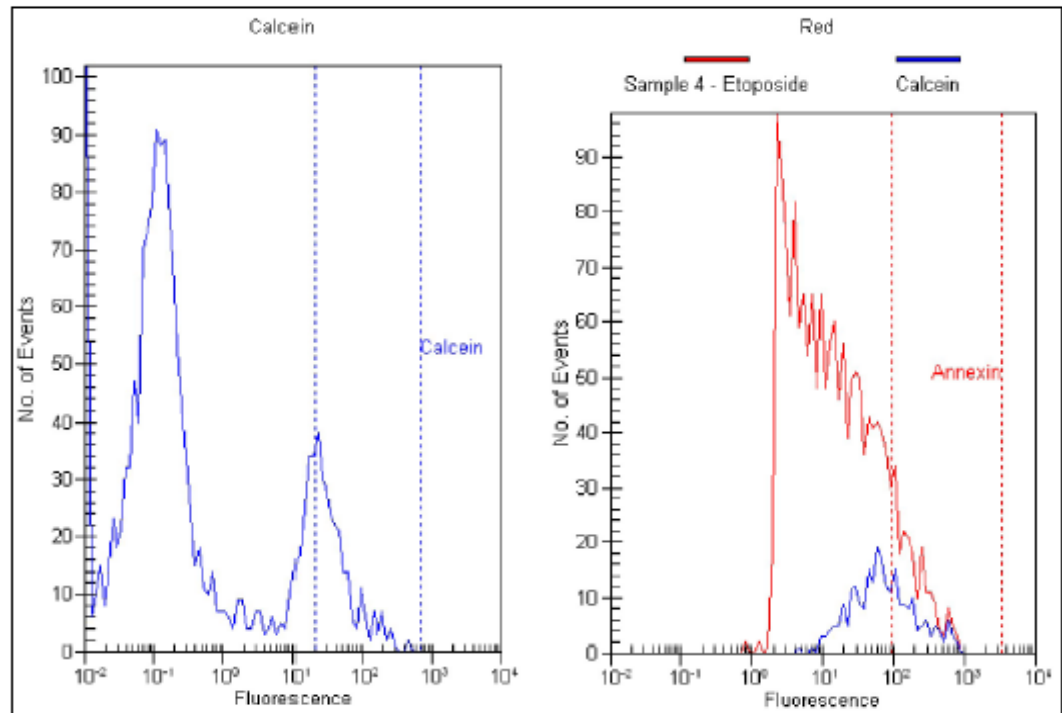
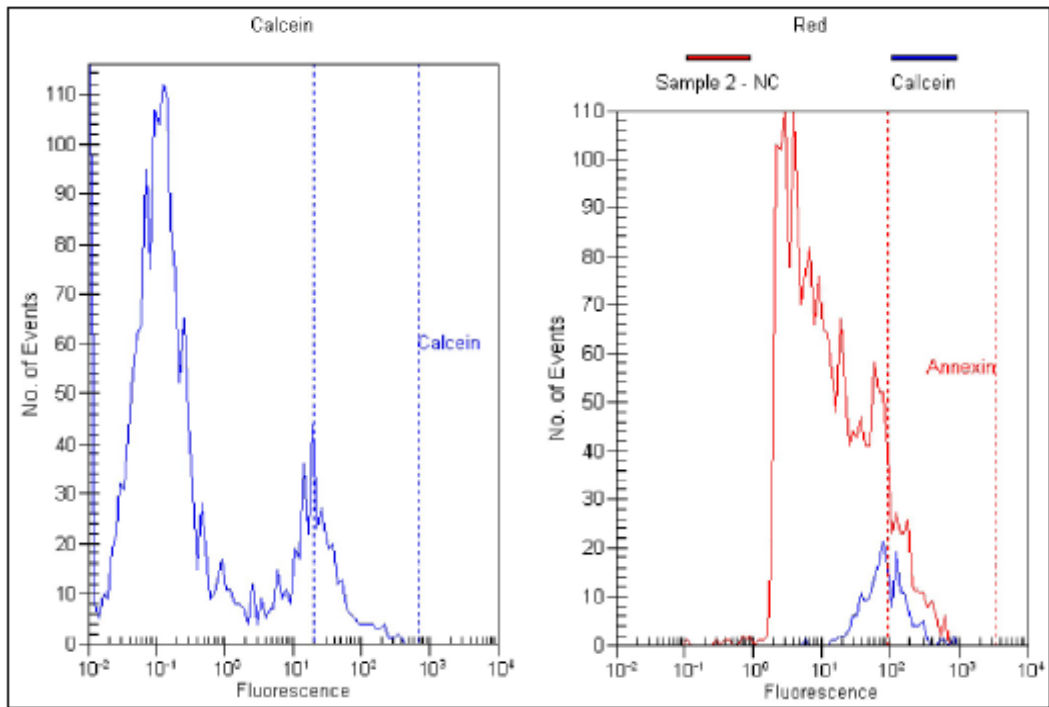
4.1.4 Aneksin V Apoptoz Analizi

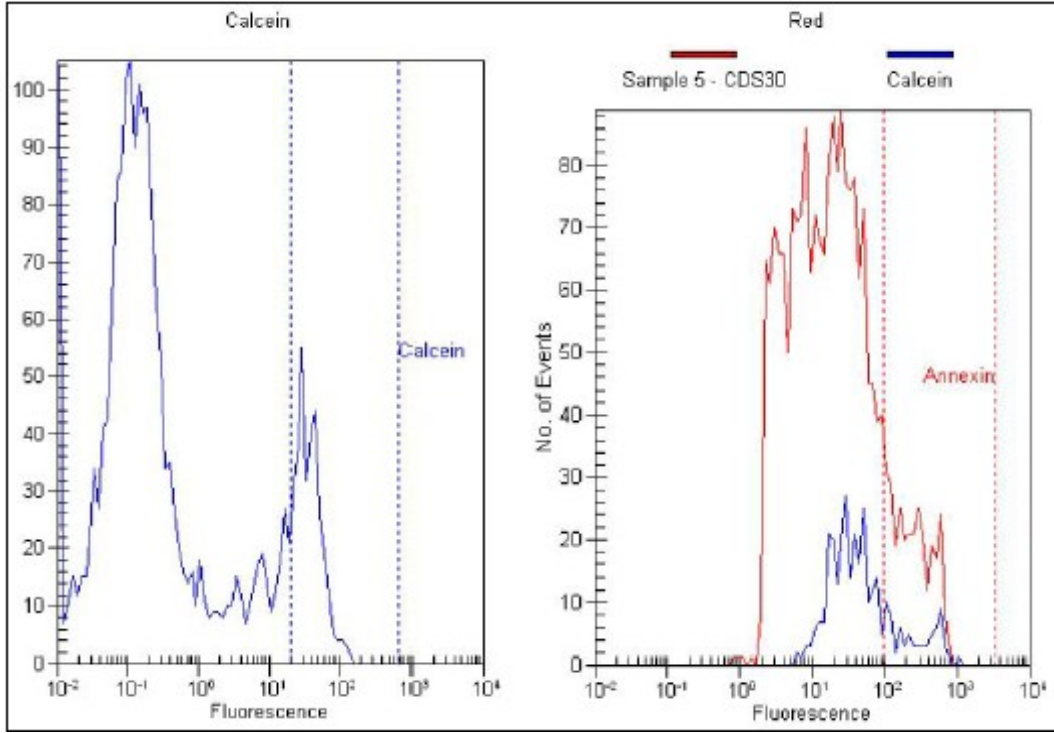
Proje raporunun gereç ve yöntemler bölümünde çalışma prensibi açıklanan bu analiz bir hücre popülasyonundaki sağlıklı, apoptotik ve ölü hücrelerin oranlarının belirlenmesi ve bu sayede hücreler üzerinde toksik etkisi olan bir uygulamanın hücre ölümüne hangi temel mekanizma (nekrotik veya apoptotik) yoluyla neden olduğunun anlaşılmasını sağlamaktadır.

Analizin optimizasyon çalışmaları toksik olduğu daha önceden gösterilen QMPA parçacığı (25 µg/mL) ve pozitif kontrol olarak apoptotik etkisi bilinen bir kanser ilacı olan etoposid (0.4 mM) ile yapılmıştır. Tüm örnekler için 24 saat inkübasyon süresi kullanılmış, bu süre ardından hücreler Agilent Bioanalyzer çiplerine yüklenerek okuma alınmıştır. Her bir hücreden elde edilen floresan sinyalin tipine ve şiddetine göre dağılımını gösteren noktasal grafikler ve histogramlar (Şekil 26 ve 27), Agilent firmasının standart apoptoz analizi kapsamında optimizasyonu yapılan eşik değerlerine göre kategorize edilerek Tablo 2'deki değerler elde edilmiştir.



Şekil 26. Aneksin V apoptoz analizi sonucu kırmızı (Cy5) ve mavi (kalsein) floresan kanallardan elde edilen sayımın (events) sinyal şiddeti dağılımını gösteren noktasal grafikler. Üst: Negatif kontrol, Orta: Etoposid (pozitif kontrol), Alt: QMPA uygulaması.





Şekil 27. Aneksin V apoptoz analizi sonucu kırmızı (Cy5) ve mavi (kalsein) floresan kanallardan elde edilen sayımın (events) sinyal şiddeti dağılımını gösteren histogramlar. Üst: Negatif kontrol, Orta: Etoposid (pozitif kontrol), Alt: QMPA uygulaması.

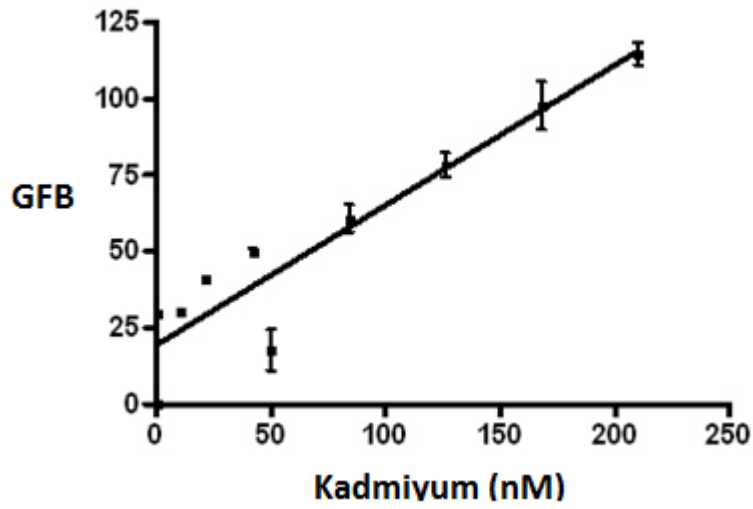
Herhangi bir kimyasal ajan uygulaması yapılmayan negatif kontrollerin tekrarlanan birçok deney sonrasında pozitif kontrol olarak kullanılan etoposid uygulamasının yol açtığı derecede apoptotik hücreye sahip olması analize ilgili önemli bir probleme işaret etmektedir. Sistematik şekilde yapılan problem çözüm çalışmalarından (hücre stokları, kültür koşulları, farklı üretim kaynaklı etoposid kullanımı, cihaz bakım ve temizliği) ve cihaz satıcısı firma ile yapılan görüşmelerden olumlu bir sonuç elde edilememiştir. Problemin elimizde bulunan hücre çiplerinden kaynaklanma olasılığı yüksektir. Öte yandan proje süresince ağırlıklı olarak mali sebeplere dayalı olarak yeni çipler elde etmek mümkün olmamıştır.

Tablo 2. Etoposid ve QMPA uygulaması yapılmış NIH/3T3 hücrelerinde apoptotik, sağlıklı ve nekrotik hücre yüzdeleri.

	Apoptotik (%)	Sağlıklı (%)	Nekrotik (%)
Negatif Kontrol	27±3	34±3	39±0
Etoposid	25±1	44±1	31±0
QMPA	12±1	40±6	49±8

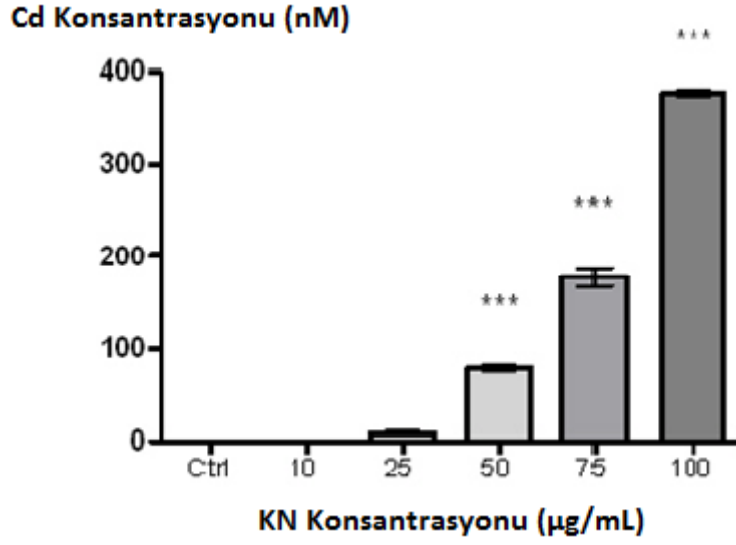
4.1.5 Sitotoksitenin Kuantum Noktacıklarının Hücre İçi Kararlılığı ve Kadmiyum Salınımıyla İlişkisi

Serbest kadmiyum iyon konsantrasyonunu 5 – 200 nM doğrusal aralıkta tayin edebilen ve kadmiyum iyonlarına bağlandığında emisyon şiddeti artan ticari bir floresan boyaya dayalı Measure-IT (Invitrogen) ağır metal analizi kullanılarak kuantum noktacıklarının yol açtığı toksisite ile parçacık kararlılığının azalmasına bağlı olarak merkezden sızan kadmiyum iyonları arasındaki ilişkinin çalışılması amaçlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları kapsamında bir standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 28).



Şekil 28. Kadmiyum iyonu için hazırlanmış standart eğri (n=3), GFB: Göreceli Floresan Birimi.

XTT ve proliferasyon analizlerinde toksik dozaj aralığı belirlenen QDMSA parçacığının bu analizlerde kullanılan aynı dozaj aralığı (10 – 100 µg/mL) ve uygulama koşulları (24 saat) altında NIH/3T3 hücrelerinde kadmiyum salınımı belirlenmiştir (Şekil 29). İstatistiksel açıdan önem taşıyan kadmiyum salınımı 25 µg/mL uygulama değerinde başlamakta ve artan parçacık konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermektedir.



Şekil 29. QDMSA parçacığıyla 24 saat inkübe edilmiş NIH/3T3 hücrelerinde belirlenmiş kadmiyum iyon konstrasyonu (n=3). ***: p<0.01

4.2 Kuantum Noktacıklarının Hücre İçi Alım ve Lokalizasyonları

Raporun bu bölümü kuantum noktacıklarının hücre içi alım ve lokalizasyonlarının belirlendiğı mikroskopik çalışmaları ve hücre içi alımın kantatif tayini için gerçekleştirilen spektroskopik ölçümlerin sonuçlarını içermektedir.

4.2.1 Hücre Fiksasyonu

Görüntülenecek hücrelerin morfolojik açıdan bozulmalarını engellemek için kullanılacak fiksasyon metodu ve parametreleri optimize edilmiştir. Bunun için farklı sürelerde metanol ve %4'lük paraformaldehit uygulamaları denenmiştir. Deneyler sonucunda hücresel özellikleri en iyi muhafaza eden ve görüntülerde en az arka plan kirliliğinin görüldüğü fiksasyon protokolünün on dakikalık, 1 mL %4'lük paraformaldehit uygulaması olduğuna karar verilmiştir. Fiksasyon sorunsuz çalışan bir yöntem değildir. Hücrelerde bir miktar yapısal bozulma ve floresan kaybına sebep olabilmektedir.

4.2.2 Tripan Mavisikle Sinyal Ayrımı

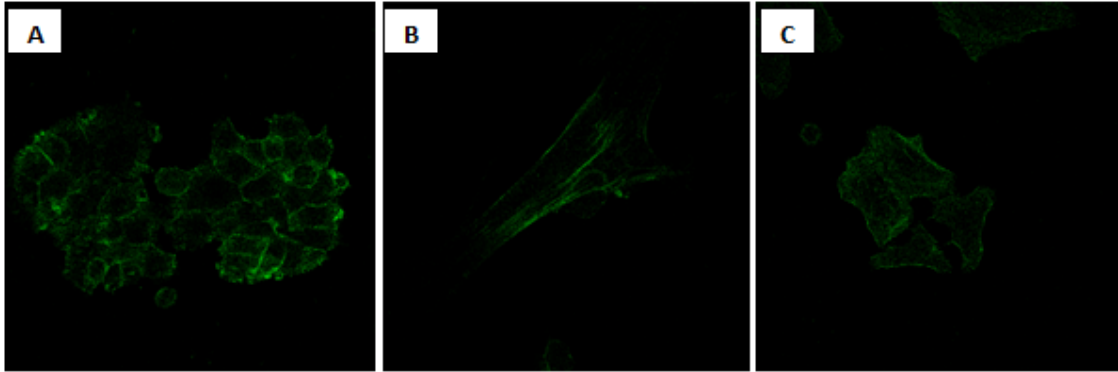
Çalışmalar sırasında hücre dışında kalan KN'lerin ciddi bir sinyal kirliliğı yarattığı gözlemlenmiştir. Literatürde, tripan mavisinin hücre içine girmemiş ve lamele yapışmış KN'lerin söndürülmesi için kullanılabileceğı belirtilmiştir (HOWARTH, 2008). Alınan konfokal görüntülerinde sadece hücre içine giren KN'leri gözlemlmek için tripan mavisini ile çalışmalar yapılmıştır ve tripan mavisinin KN'lerden gelen sinyali azalttığı görülmüştür.

Tripan Mavisinin sadece hücre dışında kalan KN'leri etkilediğini gösterebilmek için uygulama öncesi ve sonrası aynı hücre topluluğunun gözlenmesi gerekmektedir. Bu

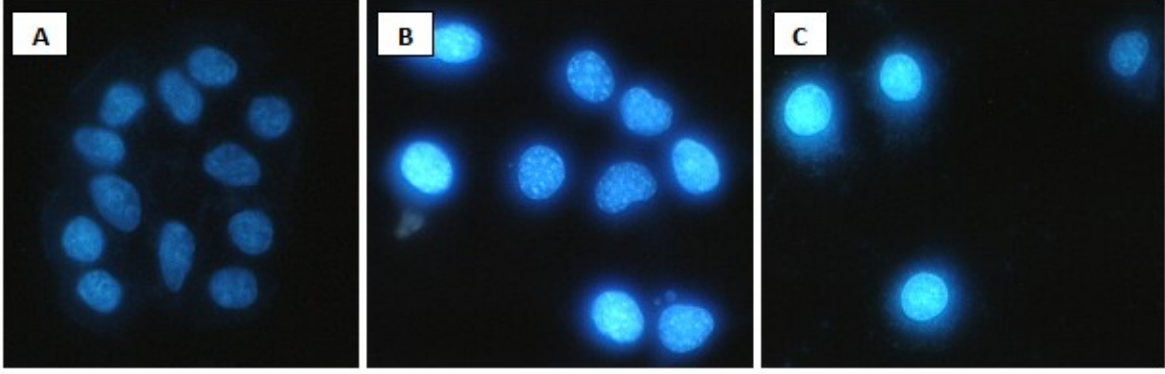
amacın gerçekleştirilebilmesi için yapılan çalışmalarda mikroskop tablası işaretlenmiş ve tabanı lamelli petri kaplarının işaretli kısımlarına denk getirilmeye çalışılmıştır. Büyütme oranının 400X olması nedeniyle aynı hücre topluluğunun objektif altında tekrar bulunması son derece zordur. Bu tür çalışmaların gerçekleştirilebilmesi için yüksek hassasiyette hücre konumu kaydetme ve hatırlama fonksiyonu bulunan bir motorize tabla gerekmektedir.

4.2.3 Çekirdek ve İskelet İşaretleme

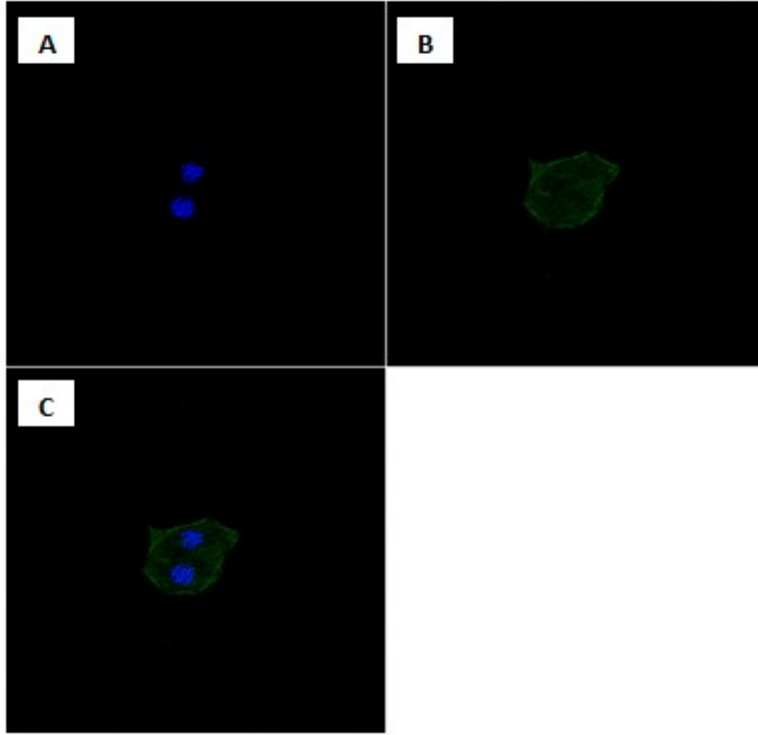
Lokalizasyon çalışmalarında hücre bölgelerinin teyid edilebilmesi amacıyla hücre çekirdeği ve iskeleti boyama koşulları optimize edilmiştir (Şekil 30-33). Falloidin konjuge edilmiş FITC ile alınan konfokal görüntülerde 40X (NA:1.30) immersiyon objektifi kullanılmış ve FITC'nin emisyon aralığı olan 500-560 nm aralığında sinyal tayini yapılmıştır. DAPI uyarımı civa UV lambası ile gerçekleştirilmiştir. DAPI boyası 330 ile 400 nm arasında uyarılabilen bir boyadır. ODTÜ Merkez Laboratuvarına ait konfokal mikroskobun bu aralıkta ışına veren lazeri bulunmadığı içinciva UV lambası tercih edilmiştir. Fakat bu lambanın uyarımıyla meydana gelen DAPI emisyonunu konfokal modda toplamak güç olmaktadır. Sinyali artırmak için pinhole aralığı artırıldığında da görüntülerde bozulmalar gözlemlenmiştir. Bu sebeple gelecekteki çalışmalarda propidyum iyodür (PI) floroforunun kullanılmasının daha elverişli olacağına karar verilmiştir.



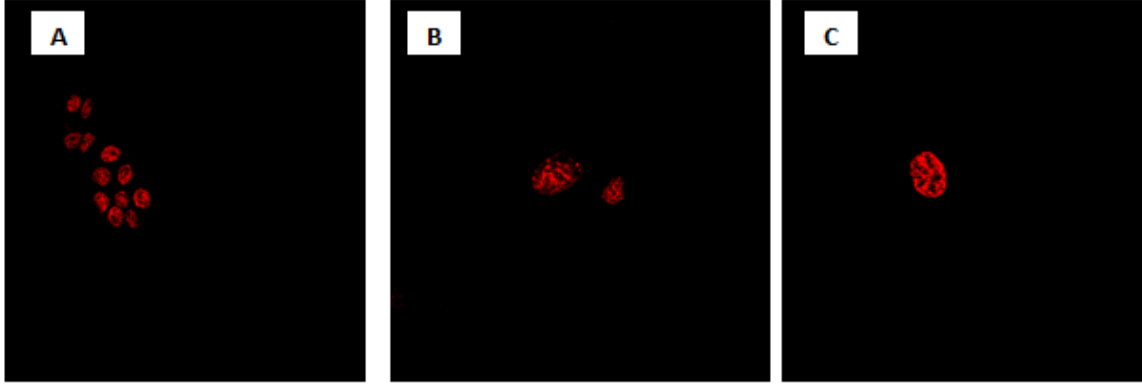
Şekil 30. FITC ile boyanmış aktin hücre iskeletinin konfokal görüntülemesi. (A) MCF-7 (B) NIH/3T3 (C) HeLa hücreleri.



Şekil 31. DAPI ile boyanmış hücre çekirdeğinin geniş alan floresan görüntülemesi. (A) MCF-7 (B) NIH/3T3 (C) HeLa hücreleri.



Şekil 32. FITC ve DAPI ile boyanmış HeLa hücreleri. (A) DAPI kanalı, (B) FITC kanalı, (C) Tüm kanallar.



Şekil 33. PI ile boyanmış hücre çekirdeğinin konfokal görüntülemesi. (A) MCF-7 (B) NIH/3T3 (C) HeLa hücreleri

4.2.4 Endozom Boyaması

Kuantum Noktacıklarının hücre içine alım mekanizması ve lokalizasyonlarının belirlenmesine yönelik olarak Invitrogen firmasından temin edilen "Organelle Lights Endosome" boyama testi kullanılmıştır. Ürün, modifiye edilerek Yeşil Floresan Protein (GFP) ve endozom-spesifik hedefleyici peptid kodlayan sekanslar eklenmiş bir bakülovirüs transfeksiyon metoduna dayalıdır ve bu metodla transfekte edilen hücrelerin endozomları yeşil renkle işaretlenir. Literatürdeki çalışmalar KN'lerin endositoz yoluyla hücre içerisine alındıklarını göstermektedir. Bu çalışmadaki amacımız KN ve endozomların kolokalizasyonlarını analiz ederek KN'lerin hücre içerisine giriş ve lokalizasyonları konusunda bilgi edinmektir.

KN uygulaması öncesi HeLa hücreleriyle endozom boyama optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Geniş bir bakülovirüs/"enhancer" solüsyon konsantrasyon aralığı ve inkübasyon süresi kullanıldığı halde transfeksiyon verimi ve buna bağlı sinyal miktarı oldukça düşük gerçekleşmektedir. Firmanın teknik servisi ile bağlantıya geçilmiş fakat geri dönüş sağlanamamıştır. Ürün temin edildikten birkaç ay sonra Invitrogen firması ürünün satışını durdurmuş ve yerine geliştirilmiş bir başka endozom seti çıkartmıştır. Bu değişikliğin kullandığımız endozom boyama testiyle bizim dışımızdaki araştırma gruplarının da yaşadıkları teknik zorlulardan ötürü yapıldığı düşünülmektedir.

4.2.5 Lamel Tabanlı Petri Kabı Hazırlanması

KN'lerin hücrel etkileşimlerinin tam anlamıyla anlaşılabilmesi için fikse edilmiş hücre görüntüleme teknikleri yanı sıra canlı hücre çalışmalarına da ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaç özellikle belirli bir uygulama öncesi ve sonrası hücrede gerçekleşen değişimlerin gözlemlenmesi istenildiği zaman ortaya çıkmaktadır. Lamel tabanlı ufak petri kapları

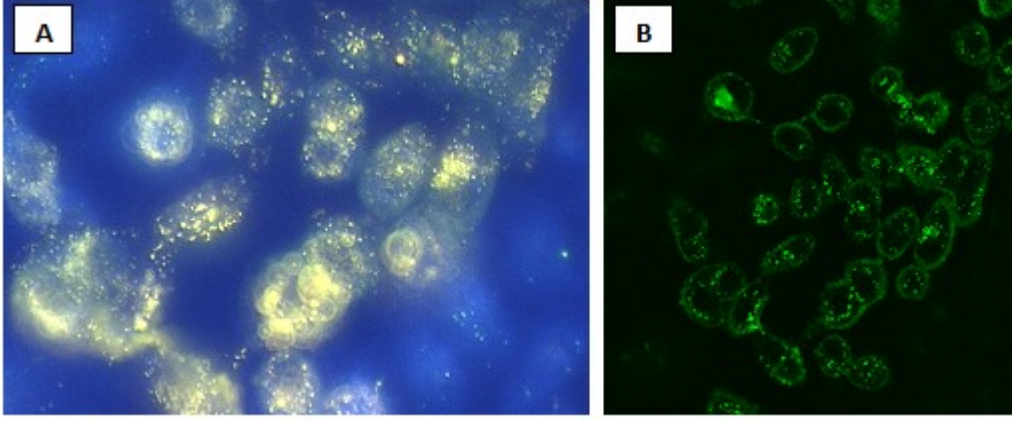
uygun koşullar sağlandığı takdirde canlı hücre gözlemi için çok uygun olduğundan çalışmalara bu kaplarla devam etmeye karar verilmiştir. Yapılan piyasa araştırmasında bu ürünün ana sağlayıcılar tarafından Türkiye'ye getirilmediği ve yurt dışından temin edilmesinin de çok masraflı olduğu görülmüştür. Bu nedenle grubumuz kendi ihtiyacını karşılamak amacıyla lamel tabanlı ufak petri kapları üretmeyi denemiştir. Plastik petri kaplarının tabanı ısıtılmış metal ile eritilerek çıkarılmıştır ve yerlerine farklı yapıştırıcılar kullanarak cam lameller yapıştırılmıştır. Bu yapıştırıcıların yeterince güçlü olmadıkları veya toksik etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Bunlardan ilki silikon olup; sağlam olmamakla beraber lamelde kirliliğe sebep olmuştur. İkinci olarak japon yapıştırıcısı uygulanmıştır. Bu ürün nispeten güçlü bir tutuş sağlamıştır fakat hücrelerin tabanda üremesine engel oluşturmuştur. Daha sonra parafilm ısıtılıp şekillendirilerek petri kaplarına uygulanmıştır. Bu denemeden de başarılı sonuç alınamamıştır.

4.2.6 Canlı Hücre Gözlem Sistemi

Uzun süreli canlı hücre gözlemleri için temin edilen inkübatör sisteminin elimizdeki CO₂ tüpleri ile uyumsuzluğu bu kapsamda yapılması planlanan çalışmaları aksatmıştır. Özel olarak imal ettirilen bir regülatör adaptör sistemiyle bu sorun çözülmüş fakat konfokal lazer tarama mikroskopumuzun lazer sisteminin değişim gerektirmesi sebebiyle deneyler hız kaybetmiştir. Fikse edilmiş hücrelerden alınan görüntüler lokalizasyon açısından önemli bir bilgi sağlamaktadır. Bu nedenle canlı hücre gözlem paketindeki gecikme projenin sonuçlandırılması açısından bir engel temin etmemektedir.

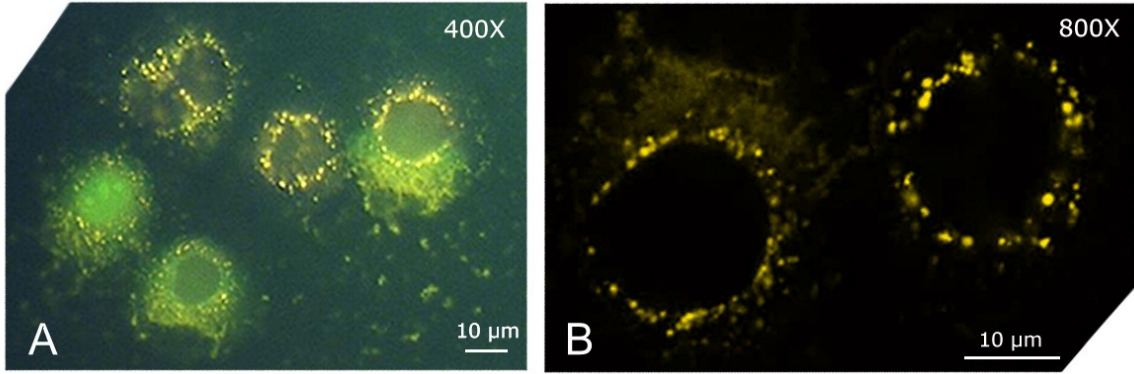
4.2.7 Kuantum Noktacıklarının Hücre İçi Lokalizasyonu

Kuantum noktacıklarının hücre içine girişleri kalitatif olarak belirlemek ve lokalizasyonlarını gözlemlemek amacıyla geniş alan (wide-field) ve konfokal (confocal) floresan mikroskopi metodları kullanılmıştır. Çalışmalara ticari bir KN olan Q565 ile başlanmış ve 8 nm dozaj, 5 saat inkübasyon sonrası KN'lerin etkin şekilde HeLa hücreleri içine alınarak endozomlar içerisinde toplandıkları görülmüştür (Şekil 34).



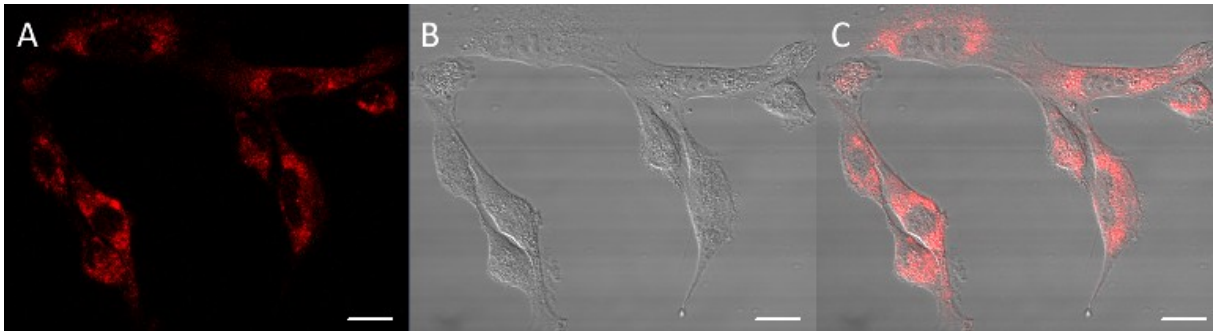
Şekil 34. Q565 parçacığının hücre içi lokalizasyonu (A) Geniş alan (B) Konfokal görüntüler (40X, NA: 1.3)

Optimum hücre görüntüleme koşullarının bulunması amacıyla farklı dozaj ve inkübasyon süreleri test edilmiş ve düşük toksisitenin yanı sıra yeterli hücre içi alım sağlayan 10 - 50 µg/mL KN konsantrasyonu ve 4 - 24 saat arası uygulama süresi uygun parametre aralıkları olarak kaydedilmiştir. 50 µg/mL QDMSA parçacığının HeLa hücreleriyle yapılan 5 saatlik inkübasyon süresi sonrası oldukça yüksek oranda hücre içine alınarak topaklaşmış şekilde peri-nükleer bölgede toplandıkları görülmüştür (Şekil 35). Literatürdeki çalışmalar (JAISWAL, 2003, CHOU, 2007, LOVRIC, 2005, JIANG 2010) bu bölgede toplanan KN'lerin geç endozomlar ve lizozomlar içerisinde bulduklarına işaret etmektedirler. QDMSA parçacığının konfokal görüntüsü (Şekil 35) 543 nm HeNe lazeri kullanılarak elde edilmiştir. Bu gözlem sentezlediğimiz QDMSA parçacığının iki önemli avantajına dikkat çekmektedir. Bunlardan birincisi KN'lerin etkin uyarımı için kullanılan ve diğer lazer sistemlerine göre çok pahalı olması nedeniyle araştırma laboratuvarlarında bulma zorluğu yaşanan UV lazerine ihtiyaç duyulmamasıdır. İkinci ve daha önemli bir avantaj ise hücreler üzerinde önemli derecede zararlı etkileri olan UV dalga boyunda ışınım kullanmadan görüntü alınabilmesidir.



Şekil 35. QDMSA (50 µg/mL) KN'sinin 5 saatlik uygulama sonrası HeLa hücrelerindeki geniş alan (A) ve konfokal lazer tarama (B) görüntüleri.

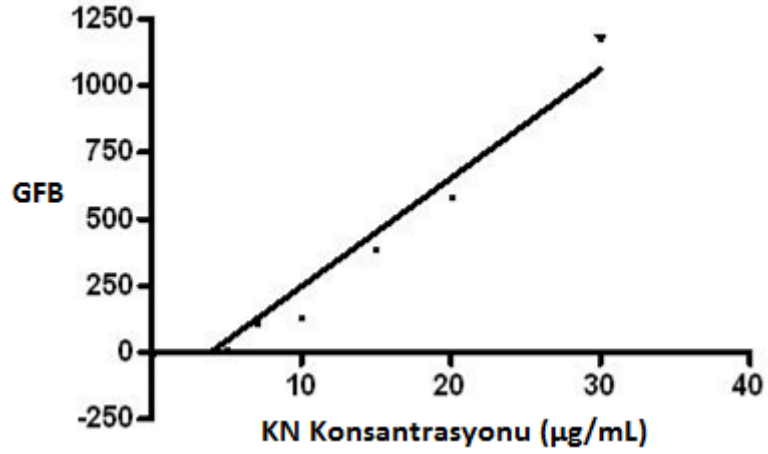
Mikroskopi çalışmaları kapsamında NIH/3T3 hücrelerine uygulanan QAGS parçacığının da görüntülemesi yapılmıştır (Şekil 36). Bu çalışma bilginiz dahilinde bir memeli hücresinin gümüş sülfür kuantum noktacıyla ilk defa görüntülenişidir. QAGS uygulaması 200 µg/mL olarak 24 saat boyunca gerçekleştirilmiş ve QDMSA parçacığında olduğu gibi etkin bir hücre içi alım ve endozom içi birikime dayalı olduğunu düşündüğümüz noktalı (punctuated) sitoplazmik dağılım gözlemlenmiştir. Beklendiği gibi hücre çekirdeğine parçacık girişi yoktur. Proje kapsamında sentezlenen QAGS parçacıkları da önemli avantajlara sahiptir. Emisyon aralığı elektromanyetik spektrumun yakın kırmızı ötesi bölgesinde olan bu parçacık ağırlıklı olarak spektrumun yeşil bölgesinden hücre otofloresanına bağlı olarak gelen sinyal karışımını minimuma indirmektedir. Ayrıca yüksek dalga boyuna sahip ışığın dokular tarafından soğurulması ve dağıtılması düşük dalga boylarına nispeten daha az olduğu için QAGS parçacığı aynı zamanda ideal bir *in vivo* görüntüleme ajanı olarak ön plana çıkmaktadır.



Şekil 36. NIH/3T3 hücrelerinin QAGS (200 µg/mL) görüntülemesi. (A) Konfokal floresan, (B) Transmisyon ve (C) Birleştirilmiş görüntü kanalları. Skala çizgisi 20 mikron.

4.2.8 Kantatif Hücre İçi Alım Analizi

Floresan mikroparka okuyucu kullanılarak kantatif hücre içi alım analizi prosedürü optimize edilmiş ve 24 saat süresince QDMSA KN'leriyle inkübe edilen NIH/3T3 hücrelerinin hücre içi kuantum noktacığı alım miktarları belirlenmiştir. Çalışmanın ilk ayağında parçacık konsantrasyonuna bağlı floresan sinyal şiddeti standart eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 37). Daha sonra gerçekleştirilen hücre deneylerinde kullanılan iki konsantrasyon değerinden biri olan 10 µg/mL'de analiz hassasiyetine bağlı olarak gözlemlenebilir bir sonuç elde edilememiş, 25 µg/mL'de hücre içi alım 287±13 femtogram/hücre olarak saptanmıştır.



Şekil 37. QDMSA parçacığı için hazırlanmış standart konsantrasyon eğrisi (n=3), GFB: Göreceli Floresan Birimi.

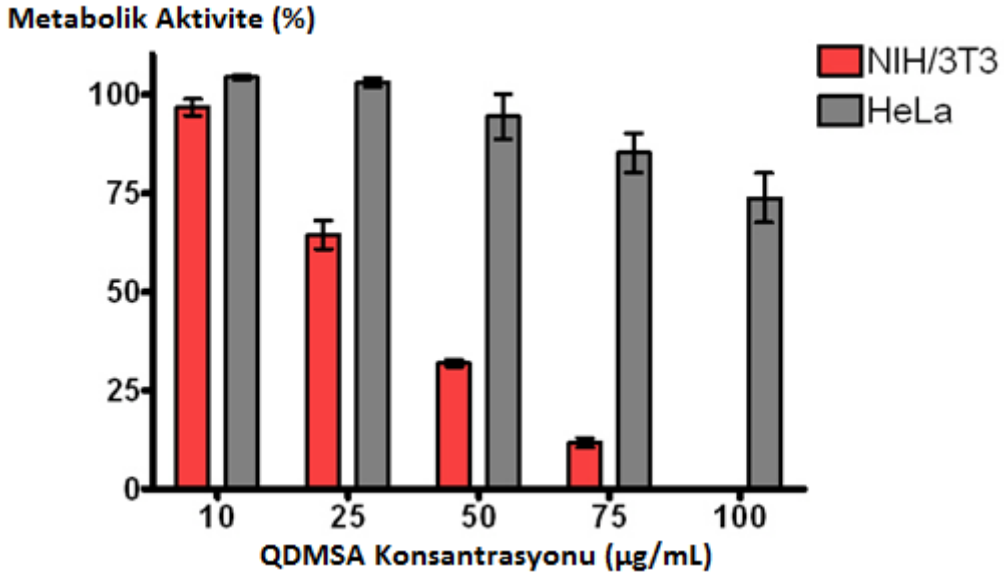
5 TARTIŞMA

5.1 Dozaj Birimi; Molar Konsantrasyon ve Kütle Konsantrasyonu

Kuantum noktacığı sitotoksitesisi çalışmalarındaki en büyük problemlerden biri parçacık dozajının bazı yayınlarda molar (nM) diğer yayınlarda ise kütle konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{mL}$) olarak verilmesi ve bu nedenle kıyaslamaların ve genel değerlendirmelerin yapılmasında büyük zorluk yaşanmasıdır. Parçacık sentezinde kullanılan farklı moleküler ağırlığa sahip kimsayalların parçacık yapısındaki kesin oranını hesaplamak oldukça zor olduğundan bu konsantrasyon ünitelerini güvenilir şekilde birbirine çevirmek de mümkün olmamaktadır. Bu önemli problem yaptığımız çalışmaları, literatürdeki benzer çalışmalarla kıyaslayarak bir takım genel çıkarımlar yapmamızı güçleştirmiştir. Bu zorluk PEG polimerik kaplamasının sitotoksitesiteye olan etkisini anlamamızı da güçleştirmektedir. Raporun bulgular bölümünün XTT analizi kısmında yer alan QDMSA ve QPEG KN'lerinin hücre metabolik aktivitesine olan etkisine bakıldığında PEG kaplamasının metabolik aktivite düşüşünü azaltarak parçacığın toksik etkisini azalttığı görünümü alınmaktadır. Öte yandan PEG'in yüksek moleküler ağırlıkta bir polimer olduğu hatırlanmalı ve bu nedenle aynı kütle konsantrasyonuna sahip QDMSA ve QPEG rnekleri ele alındığında, daha yüksek bir moleküler ağırlığa sahip QPEG örneğindeki parçacık sayısının QDMSA'ye oranla daha az olacağı göz ardı edilmemelidir. Toksosite KN'lerin hücre içerisine ne kadar alındığına bağlı olduğundan ve hücre içi alım da uygulanan parçacık sayısına göre değişebileceğinden, sonuçlar kıyaslanırken bu hususların kesinlikle unutulmaması gerekmektedir.

5.2 Hücre Tipi ve Sitotoksosite

Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerle kıyaslandığında hücre kontrol mekanizmalarındaki aksaklıklar ve buna bağlı yüksek metabolik aktivite sonucu ilaç ve toksin benzeri dış etmenlere karşı da yüksek direnç gösterebilmektedirler. Ayrıca, Rudd ve ark. kadmiyuma bağlanabilen metalotiyonin (metallothionein) proteinin bu iyona maruz kalan HeLa hücrelerinde artış gösterdiğini bulmuşlardır (RUDD 1979). QDMSA KN'siyle yaptığımız 24 saatlik KN uygulaması sonrası metabolik aktivite düşüşünün fare fibroblast hücrelerinde (NIH/3T3), HeLa kanser hücrelerine oranla çok daha fazla olduğunu grlmektedir (şekil 38). Bu gözlem kanser hücrelerinden beklenen fizyolojik tepkiyi doğrulamakta ve KN toksitesitesinin kullanılan hücre tipine göre önemli değişiklik gösterebileceğini vurgulamaktadır.



Şekil 38. QDMSA parçacığının HeLa ve NIH/3T3 hücreleri üzerindeki toksik etkisi (n=3).

5.3 Parçacık Kimyası ve Sitotoksisite

QDMSA ve QMPA KN'lerinin XTT analiziyle elde edilen sitotoksisite sonuçları karşılaştırıldığında CdS kabuk ve DMSA eklemelerinin toksisitede bir ölçüde düşüş sağladığını görmekteyiz. QDMSA'in 25 µg/mL dozajda tespit edilmeye başlanan kadmiyum iyon salınımıyla aynı konsantrasyon değerinde kendini gösteren toksisite arasında güçlü bir bağ olduğunu düşünüyoruz. Bir ağır metal bağlanıcı (chelator) olarak DMSA kaplamasının etkisinin beklentimizin altında oluşunu, molekül üzerindeki kükürt gruplarının aynı zamanda KN yüzeyine bağlanmak için kullanılmış olmasına bağlıyoruz. Gözlemlenen kadmiyum salınımının özellikle geç endozomlar ve lizozomların düşük pH değerlerinde parçacık kaplama malzemesinin kaybına bağlı olma ihtimali oldukça yüksektir.

2MPA kaplama malzemesinin hem toksik etkiler gösteren QMPA ve QDMSA parçacıklarında hem de son derece hücre-uyumlu olan QAGS parçacığında ortak kullanılan bir kaplama olması, kadmiyum merkezli KN'lerin toksisitesinde bir katkısı olmadığına işaret etmektedir. Bu nedenle literatürdeki yayınların da özellikle işaret ettiği kadmiyuma bağlı toksisite, gözlemlediğimiz metabolik aktivite düşüşünün ana faktörü olarak öne plana çıkmaktadır.

CdSe çekirdeğe sahip Q565 ticari KN'sinin uygulanan dozaj sınırları içerisinde toksik etki göstermeyişinde ana rolün kullanılan kaplama polimerinin kararlılığı olduğunu düşünüyoruz. Öte yandan ticari bir ürün olması nedeniyle bu polimerin kimyasal yapısı açıklanmadığından Q565 üzerinde daha ayrıntılı yorum yapmak mümkün olmamaktadır.

Dozaj birimi başlığı altında açıklandığı gibi PEG kaplamasının toksisiteye olan etkisini tartışmak, QPEG örneğindeki noktacık sayısını ve buna bağlı hücre alımı belirlemede yaşadığımız zorluklar yüzünden mümkün olmamaktadır. QPEG parçacığıyla kalitatif hücre içi alım ve lokalizasyon çalışmaları da gerçekleştirilmiş fakat hücrelerden KN sinyali alınamamıştır. Bunun moleküler ağırlıktaki artışa bağlı olarak birim kütle başına düşen parçacık sayısındaki azalmayla ilgili olduğunu düşünmekteyiz. Nanoparçacık kimyasında hücre içi alımı artırmak için kullanılan RGD peptid motifi PEG kaplama üzerine eklenerek bu olası problem çözülmeye çalışılmış, fakat QRDG parçacığından da KN sinyali elde edilememiştir.

Projemiz kapsamında farklı merkez kimyasıyla toksisite arasındaki ilişkilerin çalışılması amacıyla sentezlenen QAGS parçacığından aldığımız toksisite sonuçları beklediğimizden çok üstünde bir hücre uyumluluğu göstererek projeye ilginç bir açı katmıştır. Parçacık NIH/3T3 hücrelerinde 600 µg/mL gibi çok yüksek bir dozajda bile toksisite göstermemektedir. Bu kadar yüksek bir dozajda olmasa bile literatürdeki diğer bazı çalışmalar da bu gözlemimizi desteklemektedir. Bu uyumluluğun ana sebebi olarak iyon halinde oldukça toksik olan gümüş elementinin oluşturduğu gümüş sülfür benzeri komplekslerin oldukça kararlı bir moleküler yapıya sahip olması gösterilmektedir (SCUDIERO 1988, SURESH 2011).

Hücre görüntüleme çalışmalarında kullandığımız kadmiyum ve gümüş merkezli parçacıklar sitoplazmik dağılımları açısından önemli bir farklılık göstermediğinden elimizde sitotoksisiteyle hücre lokalizasyonu arasında bir bağa işaret eden delil bulunmamaktadır.

6 SONUÇ

Projemiz kapsamında kadmiyum ve gümüş merkezli, organik monomer veya polimer kaplı parçacıkların özellikle 10-100 µg/mL dozaj aralığında ve 24 saatlik uygulama sonrası HeLa kanser ve NIH/3T3 fare fibroblast hücreleriyle etkileşimleri ve toksik etkileri çalışılmıştır. Parçacık toksisitesi mitokondrial dehidrogenaz enzim aktivitesine dayalı XTT ve DNA miktarına dayalı proliferasyon analizleriyle belirlenmiştir. Parçacıkların hücre giriş ve lokalizasyonları floresan mikroskopi metodlarıyla gözlemlenmiştir. Ağır metal tayin analizi kullanılarak hücre içi parçacık kararlılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Sentezlediğimiz CdTe-2MPA (QMPA), çekirdek-kabuk yapıya sahip CdTe-CdS/2MPA-DMSA (QDMSA), QDMSA parçacığının PEG kaplanmış versiyonu (QPEG) ve ticari bir ürün olan Invitrogen Qdot 565 (Q565) kuantum noktacıklarının XTT'ye dayalı sitotoksiteleri kıyaslandığında 10 µg/mL dozajlık 24 saatlik uygulamanın hücrelerde herhangi bir toksik etkiye yol açmadığı görülmektedir. Q565 dışındaki parçacıklarda artan dozaja bağlı olarak hücre metabolik aktivitesinde düşüş gözlemlenmektedir. Q565'in polimerik kaplamasının kimyasal yapısı gizli tutulduğundan bu parçacıkla ilgili yapı-toksisite yorumu yapmak mümkün değildir. Sentezlediğimiz QDMSA parçacığının toksisitesini düşürmek amacıyla yapılan PEG polimerik kaplaması sonucu elde edilen yeni kuantum noktacığının (QPEG), QMPA ve QDMSA KN'lerine göre daha yüksek sito-uyumluluk gösterdiği kaydedilmiştir. Toksikitedeki düşüş PEG'e bağlı parçacık kararlılığı ve biyouyumluluk artışından kaynaklanabileceği gibi parçacık boyutunun büyümesine bağlı olarak hücre içi alımın azalmasından ötürü de gözlemlenmiş olabilir. Unutulmaması gerekli diğer bir nokta da uygulanan dozajdaki parçacık sayısıdır. Aynı uygulama dozajında, moleküler ağırlığı daha yüksek olan QPEG örneği, QMPA ve QDMSA KN'lerine göre daha az parçacık içermektedir. Parçacık sayısındaki bu azalma da hücre içine daha az giriş ve buna bağlı olarak daha az toksisiteye yol açmış olabilir. Mikroskopik gözlemlerde QPEG parçacıklarının hücre içi sinyalinin zayıf olması, hücre içinde daha az parçacık olması ihtimalini desteklemektedir. Hücre içi girişi artırmak için yapılan RGD peptid eklemesi (QRGD) gözlemlenebilir bir fark yaratmamıştır.

QDMSA kullanılarak gerçekleştirilen kıyaslamalı XTT ve proliferasyon analizleri benzer sonuçlar verdiği için KN'nin hücrenin redoks dengesi üzerinde gözlemlenebilir bir etkisi olmadığı ve dehidrogenaz enzim aktivitesine dayalı XTT analiz sonuçlarını etkilemediği görülmüştür.

Hücre içi kuantum noktacığı kararlılık deneyleri, kadmiyum merkezli kuantum noktacıklarının sitotoksitesinin azalan parçacık kararlılığına bağlı olarak merkezden sızan kadmiyum iyonlarına bağlı olduğuna işaret etmektedir.

QMPA, QDMSA ve QAGS parçacıklarında kullanılan 2-merkaptopropiyonik asit (2MPA) organik monomer kaplamasının, QAGS parçacığının gösterdiği son derece yüksek sito-uyumluluğa dayanarak diğer parçacıklarda gözlemlenen toksisiteni sebebi olmadığına karar verilmiştir.

HeLa kanser hücreleri, sağlıklı NIH/3T3 fare fibroblast hücrelerine kıyasla çalışmada kullanılan parçacıkların toksik etkilerine karşı daha dirençlidir. Bu direnç kanser hücrelerinde ifadesi artış gösteren ve kadmiyum iyonlarını tutarak ortamdan uzaklaştırabilen metalotiyonin (metallothionein) proteinine bağlı olabilir.

Literatürdeki birçok çalışmada rapor edildiği gibi parçacıkların homojen bir şekilde sitoplazmaya dağılmadığı ve noktalı (punctuated) gruplar halinde özellikle çekirdek etrafında kümeleştikleri görölmektedir. Bu gözlem KN'lerin endositoz yoluyla hücreye alındıktan sonra geç endozomlar ve lizozomlarda topladıklarına işaret etmektedir. Hücre işaretlemek amacıyla KN kullanımı açasından bir sorun teşkil etmeyen bu durum eğer sitoplazmada yer alan bir molekül hedeflenmek istenirse KN'lerin endozomlardan dışarı çıkarılmasını gerektirecektir. Polietilenimin (PEI) benzeri proton pompası katyonik polimerler endozomlarda ozmotik stres yaratarak patlamaya yol açaabildiklerinden bu tür bir endozomal kaçış amacı için KN yapısına dahil edilebilir.

10-50 ug/mL KN konsantrasyonu ve 4-24 saat uygulama süresi KN'ler için düşük toksisite ve yeterli hücre içi alım sağladığından benzeri KN ve hücre tipi iğer çalışmalar için optimum hücre görüntüleme parametre aralığı olarak gösterilebilir.

Kuantum noktacıklarının fizikokimyasal özellikleri ve toksisiteleri arasında doğrudan bağlar kurabilmek için yapılacak parametre değişimlerinde önemli bir problem göze çarpmaktadır. Amaçlanan bir kimyasal değişim (merkez veya yüzey kaplaması) parçacık boyutu gibi fiziksel bir parametrenin de değişimine yol açaabildiğinden, fiziksel ve kimyasal parametreleri birbirinden bağımsız değiştirmek çoğu zaman mümkün olamamaktadır. Bu nedenle değiştirilen parçacık yapısına bağlı hücresel etkileşim ve toksisite farklarının hangi değişikliğe bağlı olarak ortaya çıktığını anlamak oldukça zor olabilmektedir.

Kuantum noktacıları için genel bir toksikoloji modeli oluşturmak aynı konsantrasyon birimi (tercihen molar) kullanılarak birçok farklı hücre tipine uygulanacak farklı fizikokimyasal özellikler gösteren çok sayıda kuantum noktacı ve standardize edilmiş farklı *in vitro* analizler gerektirmektedir. Bu kapsamda bir çalışma ancak çok ortaklı ve yüksek bütçeli projeler kapsamında gerçekleştirilebilir.

Kuantum noktacı merkez kimyasının toksisite ilişkisini çalışmak amacıyla sentezlediğimiz Ag₂S-2MPA parçacı (QAGS) son derece yüksek sitem uyumluluğu nedeniyle projemize yeni bir boyut kazandırmış ve biyolojik uygulamalarda kullanım potansiyeli son derece yüksek bir parçacık olarak ön plana çıkmıştır. İlgili yayın aşağıdaki listede verilmektedir.

Hücre-nanoparçacık etkileşimleri ve nanotoksikoloji konularında yürütülecek projeler için aşağıda listelenen altyapı büyük önem taşımaktadır.

- Konfokal lazer tarama mikroskobu: UV uyarım gerektiren özel durumlar (çekirdek boyaları ve KN'ler) için bir UV lazer ünitesine sahip olmalıdır. Hücrelerin veya hücre gruplarının birbirleriyle kıyaslanabilmesi veya zamana bağlı olarak takip edilebilmeleri için X-Y düzleminde hassas hareket kabiliyeti olan bir motorize tablası bulunmalıdır. Canlı hücre gözlemi için bir inkübatör ve perfüzyon sistemine sahip olmalıdır. Yüksek çözünürlükte görüntü alabilmek için yüksek numerik açıklığa sahip bir 63X objektif de gerekmektedir.
- Yüksek Çıktılı Görüntüleme Sistemleri: Floresan mikroskopisi hücrelerin gözleme hazırlanması ve görüntü alımı aşamalarının zaman alıcı olması sebebiyle genellikle düşük sayıda hücreden elde edilmiş veriye dayalıdır. Bu nedenle kalitatif veya yarı-kantatif bir doğası vardır. Mikroskopinin kantatif data eldesi için kullanımı istatistiksel açıdan yeterli olacak kadar çok hücre gözlemi gerektirmektedir. Dört ila beş farklı örneğin bulunduğu ve her bir örnek için 50-100 hücre gözlemi gerektiren tipik bir deneyi floresan mikroskopta gerçekleştirmek pratik açıdan son derece zordur. Bu zorluğun farkında olan bazı şirketlerin son yıllarda piyasaya sürdüğü ve 96-kuyucuklu mikropalaklardan tamamen otomatik bir şekilde konfokal floresan görüntü alabilen sistemler bulunmaktadır. Yüksek sayıda hücreden geniş parametre aralıklarında görüntü alma ihtiyacı olan araştırmacılara bu tür sistemleri tavsiye ediyoruz.

- UV-VIS/Floresan mikrolaka okuyucu: Piyasada birçok farklı hücresel aktivitenin veya hücresel durumun analizi için standardize edilmiş floresana dayalı analiz kitleri bulunmaktadır. Bu analizler özellikle floresan modunda okuma yapabilen mikrolaka okuyucu gerektirmektedir.
- Akış sitometre (Flow cytometer): Kantatif floresana dayalı hücre analizleri ve mikroskopi çalışmalarının deneysel desteği için bir akış sitometresi gerekmektedir.
- Lamel tabanlı 6/24/96 kuyucuklu hücre kültür kapları: Ülkemizde temini çok kolay olmayan bu kaplar yüksek çözünürlükte (yağ immersiyon) hücre görüntülemesi için örnek hazırlama aşamasını son derece kolaylaştırmaktadır ve dolayısıyla deneylerden alınan verimi ciddi şekilde artırmaktadır.

Projeden sağlanan yayınlar aşağıda listelenmektedir:

- Ibrahim Hocaoglu, M. Natali Çizmeciyen, Rengin Erdem, Can Ozen, Adnan Kurt, Alphan Sennaroglu, Havva Yagci Acar. Development of Highly Luminescent and Cytocompatible Near-IR-Emitting Aqueous Ag₂S Quantum Dots. **J. Mater. Chem.**, 2012 (DOI: 10.1039/C2JM31959D).
- Didar Aşık, Esra Sevinç, Esen Sayın, Can Özen and Havva Yağcı Acar. Utilization of meso-dimercaptosuccinic acid in development of biocompatible quantum dots. 8. Türkiye Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı. Ankara. 25-29 Haziran 2012.
- Didar Aşık, Esra Sevinç, Esen Sayın, Can Özen and Havva Yağcı Acar. Utilization of meso-dimercaptosuccinic acid in development of biocompatible quantum dots. 8th NanoBio-Europe Conference, Varese, Italy, June 18-20 2012.

QDMSA parçacığıyla yaptığımız çalışmaların yer aldığı bir makale de şu an yayına hazırlanmaktadır.

Projedeki çalışmalar aşağıdaki uluslararası kongrelerde sunulacaktır (özetler kabul edilmiştir):

- Ibrahim Hocaoğlu, Havva Funda Yagcı Acar, Can Ozen, Rengin Erdem, Alphan Sennaroglu, Natali Cizmeciyen, Didar Asık. Aqueous Preparation of Near Infrared Emitting Ag₂s Quantum Dots for Bioapplications. International

Conference of Young Researchers on Advanced Materials (ICYRAM),
Singapore, July 1-6, 2012

- Didar Aşık, Esra Sevinç, Esen Sayın, Can Özen and Havva Yağcı Acar. Utilization of meso-dimercaptosuccinic acid in development of biocompatible quantum dots. 15th European Congress on Biotechnology, Istanbul, September 23-26, 2012.
- Ibrahim Hoccoğlu, Havva Funda Yagcı Acar, Can Ozen, Rengin Erdem, Alphan Sennaroglu, Natali Cizmeciyan, Didar Aşık. Aqueous Preparation of Near Infrared Emitting Ag₂S Quantum Dots for Bioapplications. 15th European Congress on Biotechnology, Istanbul, September 23-26, 2012.

Projemizin aşağıda özetlenen konularda yaygın etki sağlamıştır:

- Çalışma proje yürütücüsü Dr. Can Özen'in tamamladığı ilk ulusal proje olmuştur ve araştırmacıya hücre-nanoparçacık etkileşimleri ve proje yönetimi konusunda önemli bir tecrübe ve bilgi birikimi kazandırmıştır. Bu birikim Türkiye'nin farklı üniversitelerinden ODTÜ Merkezi Laboratuvar'a gelen hücre görüntüleme analiz taleplerinin de başarıyla gerçekleştirilmesine önemli bir katkı sağlamıştır. Dr. Özen ve Dr. Acar'ın laboratuvarları arasında güçlü bir disiplinlerarası ortaklık kurulmuştur ve yeni ortak projeler hazırlanmaya başlanmıştır.
- Proje bursiyerlerinden Esen Sayın ve Rengin Erdem'in yüksek lisans tez çalışmalarını tamamlayarak mezun olmuşlardır.

REFERANSLAR

1. ACAR H. Y., Kas R., Yurtsever E., Ozen C., Lieberwirth I., Development of highly stable and luminescent aqueous CdS quantum dots with the poly(acrylic acid)/mercaptoacetic acid binary coating system, *J. Phys. Chem.*, 113, 10005–10012, (2009).
2. Agilent Technologies (Last Access Date 10 July 2011)
http://www.chem.agilent.com/Library/applications/59884319_028052.pdf
3. AKERMAN M. E., Chan W. C. W., Laakkonen P., Bhatia S. N., Ruoslahti E., Nanocrystal targeting in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 12617–12621, (2002).
4. ALIVISATOS A. P., Gu W., Larabell C., Quantum Dots as Cellular Probes, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 7, 55–76, (2005).
5. BALLOU B., Lagerholm B.C., Ernst L.A., Bruchez M.P., Waggoner A.S., Noninvasive imaging of quantum dots in mice, *Bioconjugate Chem.*, 15, 79–86, (2004).
6. BEAUREPAÏRE E., Buissette V., Sauviat M. P., Giaume D., Lahlil K., Mercuri A., Casanova D., Huignard A., Martin J.L., Gacoin T., Boilot J.P., Alexandrou A., Functionalized fluorescent oxide nanoparticles: artificial toxins for sodium channel targeting and imaging at the single-molecule level, *Nano Lett.*, 4, 2079–2083, (2004)
7. BĪJU V., Itoh T., Anas A., Sujith A., Ishikawa M., Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications, *Anal Bioanal Chem*, 391, 2469–2495, (2008).
8. BRUCHEZ M. Jr., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos AP., Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels, *Science*, 281(5385), 2013–6 (1998).
9. CHAN WC, Nie S., Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection, *Science*, 281, 5385, 2016–8, (1998).
10. COOPER D. R., Dimitrijevic N. M., Nadeau J. L. Photosensitization of CdSe/ZnS QDs and reliability of assays for reactive oxygen species production. *Nanoscale*, 2, 114–121, (2010).
11. DABBOUSI B.O., Rodriguez-Viejo J., Mikulec F.V., Heine J.R., Mattoussi H., Ober R., Jensen K.F., Bawendi M.G., (CdSe)ZnS core–shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites, *J. Phys. Chem. B*, 101, 9463–9475, (1997).

12. DAHAN M., Levi S., Luccardini C., Rostaing P., Riveau B., Triller A., Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking, *Science*, 302, 442-445, (2003).
13. DERFUS A.M., Chan W.C.W., Bhatia S.N., Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots, *Nano Lett.*, 4, 11-18, (2004).
14. EFROS A.L., Efros A.L., Interband absorption of light in a semiconductor sphere, *Sov. Phys. Semicond.*, 16, 772-775, (1982).
15. GAO X., Nie S., Molecular profiling of single cells and tissue specimens with quantum dots, *Trends Biotechnol.*, 21, 371-373, 2003. Gao 2003 trends biotechnol
16. GAO X.H., Yang L.L., Petros J.A., Marshal F.F., Simons J.W., Nie S.M., In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16, 63-72, (2005).
17. HAN M., Gao X., Su J. Z., Nie S., Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules, *Nature Biotechnology*, 19, 631-635, (2001).
18. HOSHINO A., Fujioka K., Oku T., Suga M., Sasaki Y.F., Ohta T., Yasuhara M., Suzuki K., Yamamoto K., Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification, *Nano Lett.*, 4, 2163-2169, (2004).
19. HOWARTH M, Liu W, Puthenveetil S, Zheng Y, Marshall LF, Schmidt MM, Wittrup KD, Bawendi MG, Ting AY., Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells, *Nat Methods.*, 5, 397-9, (2008).
20. JAIMESON T., Bakhshi R., Petrova D., Pocock R., Imani M., Seifalian A. M., Biological applications of quantum dots, *Biomaterials*, 28, 4717-4732, (2007).
21. JAISWAL J.K., Mattoussi H., Mauro J.M., Simon S.M., Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates, *Nat. Biotechnol.*, 21, 47-51, (2003).
22. LIDKE D.S., Nagy P., Heintzmann R., Arndt-Jovin D.J., Post J.N., Grecco H.E., Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. Lidke D. S., P. Nagy R. Heintzmann, D. J. Amdt-Jovin, J. N. Post, H. E. Grecco, E. A. Jares-Erijman and T. M. Jovin, Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat. Biotechnol.*, 22, 198-203, (2004).
23. LOVRIC J, Cho S.J., Winnik F.M., Maysinger D., Unmodified Cadmium Telluride Quantum Dots Induce Reactive Oxygen Species Formation Leading to Multiple Organelle Damage and Cell Death, *Chemistry & Biology*, 12, 1227-1234, (2005).
24. LOVRIC J., Bazzi H.S., Cuie Y., Fortin G.R.A., Winnik F.M., Maysinger D., Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots, *J. Mol. Med. – JMM*, 83, 377-385, (2005).

25. MICHALET X., Pinaud F. F., Bentolila L. A., Tsay J. M., Doose S., Li J. J., Sundaresan G., Wu A. M., Gambhir S. S., Weiss S., Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics, *Science*, 307, 538-544, (2005).
26. NAN X., Sims P. A., Chen P., Xie X. S., Observation of Individual Microtubule Motor Steps in Living Cells with Endocytosed Quantum Dots, *J. Phys. Chem. B*, 109, 51, 24220- 24224, (2005).
27. PARAK W.J., Boudreau R., Le Gros M., Gerion D., Zanchet D., Micheel C.M., Williams S.C., Alivisatos A.P., Larabell C., Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks, *Adv. Mater.*, 14, 882-885, (2002).
28. RHYNER M.N., Smith A.M., Gao X.H., Mao H., Yang L., Nie S.M., Quantum dots and multifunctional nanoparticles: new contrast agents for tumor imaging, *Nanomedicine*, 1, 209-217, (2006).
29. RUDD C. J., Herschman H. R. Metallothionein in a human cell line: The response of HeLa cells to cadmium and zinc. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 47, Issue 2, 273-278, (1979).
30. SCHROEDER JE, Shweky I, Shmeeda H, Banin U, Gabizon A., Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 124,28-34, (2007).
31. SCUDIERO D. A., Shoemaker R. H., Paul K. D., Monks A., Tierney S., Nofziger T. H., Currens M. J., Seniff D., Boyd M. R., Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines, *Cancer Research*, 48, 4827-4833, (1988).
32. SCUDIERO D. A., Shoemaker R. H., Paull K. D., Monks A., Tierney S., Nofziger T. H., Currens M. J., Seniff D., Boyd M. R., Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer Research*, 48, 4827-4833, (1988).
33. SMITH A. M., Duan H., Mohs A. M., Nie S., Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1226-1240, (2008).
34. SURESH AK, Doktycz MJ, Wang W, Moon JW, Gu B, Meyer HM 3rd, Hensley DK, Allison DP, Phelps TJ, Pelletier DA., Monodispersed biocompatible silver sulfide nanoparticles: facile extracellular biosynthesis using the γ -proteobacterium, *Shewanella oneidensis*, *Acta Biomater.*,7, 4253-8 (2011).
35. TSAY J.M., Michalet X., New Light on Quantum Dot Cytotoxicity, *Chemistry & Biology*, 12,1159-1161, (2005).

36. WU X.Y., Liu H.J., Liu J.Q., Haley K.N., Treadway J.A., Larson J.P., Ge N.F., Peale F., Bruchez M.P., Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots, *Nat. Biotechnol.*, 21, 41–46, (2003).
37. YEZHELYEV M.V., Al-Hajj A., Morris C., Marcus A.I., Liu T., Lewis M., Cohen C., Zrazhevskiy P., Simons J.W., Rogatko A., Nie S., Gao X., O'Regan R.M., In situ molecular profiling of breast cancer biomarkers with multicolor quantum dots, *Adv. Mater.*, 19, 3146–3151, (2007).
38. YEZHELYEV M.V., Qi L., O'Regan R.M., Nie S., Gao X., Proton-Sponge Coated Quantum Dots for siRNA Delivery and Intracellular Imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (28), 9006-9012, 2008.
39. ZHANG L. W., Monteiro - Riviere N. A., Mechanisms of Quantum Dot Nanoparticle Cellular Uptake, *Toxicological Sciences*, 110(1), 138–155, (2009).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 109R031
Proje Başlığı: Kuantum Noktacıklarının Hücresel Etkileşim ve Sitotoksitelerinin Araştırılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yrd. Doç. Dr. Can ÖZEN, Doç. Dr. Havva Funda YAĞCI ACAR
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, İnönü Bulvarı (06531), Ankara, TURKEY
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.05.2010 – 01.05.2012
Öz (en çok 70 kelime) <p>Artan biyolojik uygulamalarıyla dikkat çeken kuantum noktacıları çapları 2-10 nm arasında değişen, floresan özelliğe sahip küresel yarı iletken nano kristallerdir. Bu projede kadmiyum ve gümüş merkezli, organik monomer veya polimer kaplı parçacıkların kanser ve sağlıklı hücre hatlarıyla etkileşimi ve toksisiteleri çalışılmıştır. Hücre içi parçacık kararlılığının kaybına bağlı kadmiyum salınımı sitotoksitenin temel nedeni olarak belirlenmiştir. Proje kapsamında ayrıca yüksek sito-uyumluluğa sahip bir gümüş sülfür (Ag₂S) merkezli kuantum noktacı da sentezlenmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler: kuantum noktacıları, nano parçacık, hücre-nanoparçacık etkileşimleri, nanoteknoloji, nanotoksikoloji, sitotoksite, in vitro karakterizasyon, konfokal floresan mikroskopi

[Fikri Ürün Bildirim Formu](#) **Sunuldu mu?**

Evet

Gerekli Değil

Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Projeden Yapılan Yayınlar:

Ibrahim Hocaoglu, M. Natali Çizmeciyen, Rengin Erdem, Can Ozen, Adnan Kurt, Alphan Sennaroglu, Havva Yagci Acar. Development of Highly Luminescent and Cytocompatible Near-IR-Emitting Aqueous Ag₂S Quantum Dots. **J. Mater. Chem.**, 2012 (DOI: 10.1039/C2JM31959D).

Didar Aşık, Esra Sevinç, Esen Sayın, Can Özen and Havva Yağcı Acar. Utilization of meso-dimercaptosuccinic acid in development of biocompatible quantum dots. **8. Türkiye Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı**. Ankara. 25-29 Haziran 2012.

Didar Aşık, Esra Sevinç, Esen Sayın, Can Özen and Havva Yağcı Acar. Utilization of meso-dimercaptosuccinic acid in development of biocompatible quantum dots. **8th NanoBio-Europe Conference**, Varese, Italy, June 18-20 2012.

Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşındığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.