



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KANSER HÜCRELERİNİN GÖRÜNTÜLENMESİNE
YÖNELİK SPESİFİK BİYOKONJUGATLARIN
TASARIMI, KARAKTERİZASYONU VE *IN VITRO*
UYGULAMALARI**

Mehriban AKIN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Suna TİMUR

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi : 27.04.2012

Bornova-İZMİR

2012

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KANSER HÜCRELERİNİN GÖRÜNTÜLENMESİNE
YÖNELİK SPESİFİK BİYOKONJUGATLARIN
TASARIMI, KARAKTERİZASYONU VE *IN VITRO*
UYGULAMALARI**

Mehriban AKIN

Tez Danışmanı :Prof. Dr. Suna TİMUR

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi : 27.04. 2012

Bornova-İZMİR

2012

Mehriban AKIN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Kanser Hücrelerinin Görüntülenmesine Yönelik Spesifik Biyokonjugatların Tasarımı, Karakterizasyonu ve *in vitro* Uygulamaları ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 27.04.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	:	
Raportör Üye	:	
Üye	:	

ÖZET**KANSER HÜCRELERİNİN GÖRÜNTÜLENMESİNE YÖNELİK
SPESİFİK BİYOKONJUGATLARIN TASARIMI,
KARAKTERİZASYONU VE *IN VITRO* UYGULAMALARI**

AKIN, Mehriban

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR

Nisan 2012, 67 sayfa

Bu çalışmada kuantum nanoparçacıklarının (QDs) poliamidoamin (PAMAM) dendrimerleri ile kontrol edilebilir ligand oranlarında faz-transfer reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PAMAM moleküllerinin sahip olduğu eşsiz özellikler sayesinde elektrostatik ve yapısal açıdan kararlı, suda çözünür kuantum nanokompleksleri sentezlenmiştir. Elde edilen PAMAM modifiye QD nanokonjugatları (P/QDs) floresans ve UV-görünür bölge spektrumlarına, yüzeye bağlanan PAMAM sayısına göre, hidrodinamik boyutlarına ve kararlılıklarına göre karakterize edilmişlerdir. Konjugatların MCF-7 (meme), A-549 (akciğer) ve HEP-G2 (karaciğer) tümör hücrelerine gösterdikleri olası toksik etkileri MTT testi uygulanarak incelenmiştir. Elde edilen hücre viyabilite verilerine göre IC50 (% 50 inhibisyon konsantrasyonu), NOAEC (görünür bir etkinin bulunmadığı konsantrasyon değeri) ve TLC (total ölüm konsantrasyonu) değerleri hesaplanmıştır. Sonrasında konjugatlar HER2 spesifik antikor ile işaretlenerek model olarak seçilen MCF-7 hücrelerinin floresans görüntülenmesi yapıldı.

Sonuç olarak antikor ile hedeflendirilen P/QDs konjugatları MCF-7 hücreleri tarafından reseptör-ligand etkileşimleri sonrasında endositotik yollarla hücre içerisine alınmıştır. Floresans mikroskobu görüntüleri göstermektedir ki tasarlanan PAMAM-modifiye QD nanoparçacıkları, floresans görüntüleme ve hedeflenmiş terapi alanında gelecek vaad eden QD temelli problemlerin ve nano-cihazların geliştirilmesinde önemli bir yol gösterici niteliğindedir.

Anahtar sözcükler: Kuantum nanoparçacıkları, PAMAM dendrimeri, yüzey modifikasyonu, floresans prob geliştirme, tümör hedefleme.

ABSTRACT**DESIGN, CHARACTERIZATION OF BIOCONJUGATES IN CELL IMAGING AND THEIR IN VITRO APPLICATION**

AKIN, Mehriban

MSc in Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Suna TİMUR

April 2012, 67 pages

Herein, phase-transfer reaction of quantum dots (QDs) with amine-terminated polyamidoamine (PAMAM) dendrimer with controllable ligand molar ratios was achieved. Unique properties of PAMAM allowed us to build up structurally and electrostatically stabilized water soluble QD complexes. Synthesized conjugates were characterized in terms of fluorescence and UV-vis profiles, hydrodynamic size, number of surface dendrimer groups, and stability. Cytotoxic effects of conjugates for MCF-7, A-549 and HEP-G2 cancer cells were assessed based on cell viability using MTT assay. Cytotoxicity results were expressed as no observable adverse effect concentration (NOAEC), 50% inhibitory concentration (IC₅₀) and total lethal concentration (TLC) values (μM).

Further, HER2 receptor-mediated targeting efficiency of antibody labeled P/QDs conjugates was evaluated by successful staining of MCF-7 cells with bioconjugates. Uniquely, effective cell internalization was achieved with well characterized antibody coupled P/QDs in contrast to antibody free P/QDs conjugates. Fluorescence microscopy images demonstrated that designed PAMAM-derivatized QDs nanoparticles feature great potential in the area of cellular imaging and targeted therapy.

Keywords: Quantum dots, PAMAM dendrimers, surface modification, fluorescence prob design, tumor targeting

TEŞEKKÜR

Bu çalışma kapsamında kullanılan materyal ve yöntemlerde büyük yardımı olan Rebecca Borgartz'a (Hannover Üniversitesi, Teknik Kimya Enstitüsü, Almanya); sitotoksite ve SEM analizlerinde teknik desteklerinden dolayı Stefanie Wagner ve Clarris Baumanis'e (Hannover Üniversitesi, Teknik Kimya Enstitüsü, Almanya); hücre kültürü denemelerinde malzeme temininde yardımcı olan İlker Medine'ye (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü); çalışma boyunca fikirlerini esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Frank Stahl, Dr. Johanna Walter (Hannover Üniversitesi, Teknik Kimya Enstitüsü, Almanya) ve Dr. Dilek Odacı Demirkol'a (Ege Üniversitesi, Biyokimya Bölümü) minnettarlığımı sunarım. Son olarak çalışmanın başlangıcından bitimine kadar her adımda yanımda olan danışmanın Prof. Dr. Suna Timur'a (Ege Üniversitesi, Biyokimya Bölümü) sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu tez çalışması TÜBİTAK (109T573) ve Ege Üniversitesi 2010/FEN/0053 no'lu BAP projesi tarafından desteklenmiştir. Mali desteklerinden dolayı TÜBİTAK ve Ege Üniversitesi'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1 Kuantum Nanoparçacıklar.....	1
1.2 Kuantum Nanoparçacık Sentezi	1
1.3 Kuantum Nanoparçacıklarının Optik Özellikleri.....	5
1.4 Kuantum Nanoparçacıklarının Suda Çözünürleştirilmesi.....	9
a) Ligand yer değiştirme reaksiyonları	10
b) Hidrofobik etkileşimlerle misel oluşturulması.....	11
c) Silika enkapsülasyonu.....	12
1.5 Kuantum Nanoparçacıklarının Biyokonjugasyonu.....	13
1.6 Kuantum Nanoparçacıklarının Biyolojik Uygulama Alanları.....	15
1.7 Tümör Hedefleme ve Görüntüleme	16

İÇİNDEKİLER (devam)

1.8 Kuantum Nanoparçacıklarının Sitotoksitesi	18
1.9 Poliamidoamin (PAMAM) Dendrimerleri	20
-Pamam dendrimeri ile kuantum nanoparçacıklarının modifikasyonu	23
1.10 Human Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2 (HER2) Spesifik Hedefleme	25
2. MATERYAL VE METOD	28
2.1 Kimyasallar.....	28
2.2 Kuantum Nanoparçacıklarının Pamam Dendrimeri ile Modifikasyonu (P/QDs Konjugatlarının Sentezi)	28
2.3 Bradford Reaktifi ile Pamam Moleküllerinin Tayini.....	29
2.4 Anti-HER2 Antikörünün P/QDs Konjugatlarına Çapraz Bağlanması (P/QDs- antiHER2)	29
2.5 Floresans Ölçümler	30
2.6 Boyut Analizleri.....	30
2.7 Hücre Kültürü Çalışmaları	30
2.8 Toksikite Testi.....	31
2.9 Floresans Mikroskobu Uygulamaları.....	31
3. SONUÇLAR VE YORUMLAR.....	33
3.1 Kuantum Nanokristallerinin Pamam Dendrimeri ile Modifikasyonu (P/QDs sentezi)	33

İÇİNDEKİLER (devam)

3.2 P/QDs Konjugatlarının Karakterizasyonu.....	34
3.3 Bağlanan Pamam Moleküllerinin Bradford Testi İle Tayini.....	36
3.4 Boyut Analizi.....	38
3.5 Kararlılık.....	40
3.6 Sitotoksosite	41
3.7 <i>In vitro</i> Uygulamalar	44
4. GENEL DEĞERLENDİRME.....	50
KAYNAK DİZİNİ.....	52
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. 6 farklı kuantum nanoparçacığın floresans ve absorpsiyon profilleri (üstte), boyut bağımlı floresans özellikleri ve spektral aralıkları (altta) (Medintz et al., 2005).	2
Şekil 1.2. Kuantum nanoparçacıkların çekirdek materyaline göre farklılaşan emisyon spektrumları. Ayrıca bu dalga boylarına ilişkin mayeryallerin kullanıldığı biyolojik alanlar da belirtilmiştir (Medintz et al., 2005).	3
Şekil 1.3. Kuantum nanoparçacıklarının optik özellikleri A) Floresans ışık emisyonlarının organik boya olan tetrametilrodamin izotiyosiyanat (TRIT, solda), yeşil QD (ortada) ve kırmızı QD (sağda) ile kıyaslanması (normal oda ışığı altında, 1,0 µM konsantrasyonda). B) Aynı uyarılma koşulları altında QD ve Teksas Kırmızısı'na ilişkin foto-sönümlene eğrileri. C) QD ve klasik bir organik boyanın uyarılma halinden bozulması eğrilerinin kıyaslanması. T(dye) ve T(QD) floresans sinyallerin 1/e değerine kadar olan bozulma sürelerini göstermektedir. 'e' logaritmik bir sabit olup 2,718 değerine eşittir. D) Fare derisi ile QD emisyon spektrumlarının kıyaslanması. .	6
Şekil 1.4. Kuantum nanoparçacıklarının foto-sönümleyeme karşı olan direnci. Üst sütunda; 3T3 hücrelerinin kuantum nanoparçacık-streptavidin 630 konjugatı ile nükleer antijenleri (kırmızı) ve aynı anda mikrotübülleri AlexaFluor 488 (yeşil) ile işaretlenmiştir. Alt sütunda; mikrotübüller kuantum nanoparçacık-streptavidin 630 konjugatı (kırmızı) ile, nükleer antijenler AlexaFluor 488 (yeşil) ile işaretlenmiştir (Wu et al., 2003).	7

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- Şekil 1.5.** İnsan epitel hücrelerinin 5 farklı kuantum nanoparçacığı ile işaretlenerek çoklu görüntülemenin yapılması. Siyan renk, nükleusun işaretlendiği 655 nm-kuantum nanoparçacığa, magenta Ki-67 proteinin işaretlendiği 605 nm- kuantum nanoparçacığa, turuncu mitakondrinin boyandığı 525 nm- kuantum nanoparçacığa, yeşil mikrotübülün boyandığı 565 nm- kuantum nanoparçacığa, kırmızı ise aktin filamentlerinin boyandığı 705 nm- kuantum nanoparçacığa aittir (Quantum Dot Corp.) (Medintz et al., 2005)..... 8
- Şekil 1.6.** Oleik asit kaplı organik fazdaki kuantum nanoparçacıkların glutatyon ile modifikasyonu sonrasınan organik fazdan su fazına transfer edilmesi (Deng et al., 2012)..... 9
- Şekil 1.7.** Kuantum nanoparçacıklarının ligand yerdeğiştirme, silika enkapsülasyon ve hidrofobik etkileşimlerle yüzeylerinin modifiye edilmesi ve sonucunda suda çözünürleştirilmesi. 10
- Şekil 1.8.** Kuantum nanoparçacık yüzeyinin olası moleküllerle ligand yerdeğiştirme yöntemi ile modifikasyonu 10
- Şekil 1.9.** TOPO yüzey kaplayıcı ajan, enkapsüle edici kopolimer tabakası, biyoyumluluğu sağlayan PEG ve antikor, peptid, inhibitör gibi tümör spesifik molekülden meydana gelen, multifonksiyonel kuantum nanoparçacık probunun yapısal şekli (Gao et al., 2004)..... 12
- Şekil 1.10.** Kuantum dotların biyomoleküllerle konjuge edilme metodları 14
- Şekil 1.11.** Tümörlü hücrelerin aktif ve pasif hedeflenme mekanizmaları..... 16
- Şekil 1.12.** Triblock kopolimer/PEG grupları ile enkapsüle edilen kuantum nanoparçacıkları ile prostat spesifik membran reseptörlerinin aktif olarak hedeflenmesi sonucunda prostat tümörü taşıyan farelere ilişkin alınan fluoresans görüntüler (Gao et al., 2004)..... 17

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- Şekil 1.13.** Amin ve metil gruplarının Michael katılımı sonrasında tetra-fonksiyonel PAMAM dendrimerlerinin sentezi (Tomalia et al., 2010) 21
- Şekil 1.14.** Dendrimer yapıları ve hedefleme türleri. a)çekirdek(i), iç yapı (ii) ve terminal yüzey gruplarından (Z) (iii) oluşan dendrimerin genel topolojisi. b)Pasif hedefleme: görüntüleyici prob (A), terapi ajanı (B) ve düşük toksisiteye sahip terminal grubundan (Z) oluşan dendrimer temelli diyagnostik nanoyapılar. c) Aktif reseptör temelli hedefleme: görüntüleyici prob (A), terapi ajanı (B), reseptör hedefleyici grup ve düşük toksisiteye sahip yüzey grubundan (Z) oluşan dendrimer temelli diyagnostik nanoyapılar (Tomalia et al., 2010). 21
- Şekil 1.15.** Jenerasyon 4-7 PAMAM dendrimerlerinin boyutlarının çeşitli protein, membran lipit tabakaları ve DNA ile kıyaslanması (Tomalia et al., 2010)..... 22
- Şekil 1.16.** N-asetil sisteine disülfid bağı ile bağlanan 4. Jenerasyon (G=4) PAMAM dendrimerinin şematik gösterimi. Dendrimer ilacı intraselüler olarak hücre içersine alınır.Yapıdaki disülfid bağları intraselüler glutatyon ile tiyol readoks yer değiştirme reaksiyonları sayesinde parçalanır. İlaç serbest kalırken dendrimer hücre dışına salınır (Tomalia et al., 2010)..... 23
- Şekil 1.17.** BT-474 meme kanser hücrelerinin nükleer hormon reseptörlerinin (estrogen (ER) ve progesteron reseptörü (PR), hücre membran yüzeyi antijenlerinin (HER2, EGFR) ve sitoplazmik mTOR proteinin antikör işaretli kuantum nanoparçacıkları ile işaretlenmesi. A) BT-474 hücrelerinin belirtilen 5 reseptörü de ürettiğini gösteren pozitif işaretleme, B) tümör ilişkili reseptörlerin farklı oranlarda eksprese edildiğini gösteren kuantum nanoparçacık emisyonları (Yezhelyev et al., 2007)..... 26

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- Şekil 1.18.** HER2 spesifik antikor (HER2Ab) ile işaretli kuantum nanoparçacıkları (540 nm-yeşil, 585 nm-sarı, 650 nm kırmızı) ile işaretlenmiş KPL-4 hücrelerine ilişkin alınan konfokal mikroskop görüntüleri. Hücreler HER2Ab-QD nanoparçacıkları ile 37 °C’de 30 dk boyunca inkübe edilmişlerdir (Jin et al., 2009). 27
- Şekil 3.1.** HDA ile stabilize edilen CdSe/ZnS kuantum nanoparçacıkları ile PAMAM dendrimeri arasında meydana gelen ligand-yer değiştirme reaksiyonu; HDA molekülünün terminal amin grupları, PAMAM molekülünün terminal amin grupları ile yer değiştirmektedir. Elde edilen PAMAM/QDs (P/QDs) nanokompleksleri, sonrası karakterizasyon ve uygulama adımları için PBS 7,4 tamponunda çözüldü. 34
- Şekil 3.2.** Modifiye edilmemiş CdSe/ZnS nanoparçacıkları (siyah) ile PAMAM (kırmızı) ve PAMAM/HER2 ile modifiye edilen (kırmızı) kuantum nanoparçacıklarına ilişkin A) floresans, B) UV-görünür bölge spektrumları (CdSe/ZnS nanoparçacıkları 460 ± 10 nm’de uyarıldı; B) Insert grafiği 280 nm’de serbest PAMAM ve PAMAM modifiye QDs nanoparçacıklarına ilişkin absorban spektrumunu göstermektedir). 35
- Şekil 3.3.** 10, 20, 30 ve 50 kat fazla PAMAM molekülü ile muamele edilen QD nanoparçacıklarına ilişkin normalize edilmiş floresans şiddetleri ve bunlara karşılık gelen bağlanan PAMAM molekül sayısı. 38
- Şekil 3.4.** Serbest PAMAM, 14 ve 28 PAMAM molekülü ile kaplanmış kuantum nanoparçacıklarına ilişkin hidrodinamik boyut analizleri. Molekül boyutları sırası ile PAMAM dendrimeri için $5,6 \pm 0,0003$; P14/QDs konjugatı için $32,7 \pm 0,216$ nm; P28/QDs konjugatları için de $58,8 \pm 0,029$ nm olarak hesaplanmıştır (Veriler N=3 için ortalaması $\pm$ standart hata şeklinde verilmektedir. Ölçümler PBS pH 7,4 tamponunda gerçekleştirilmiştir). 39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- Şekil 3.5.** Yüzeyi 14 adet PAMAM molekülü ile modifiye edilmiş QD nanoparçacıklarına (P14/QDs) ilişkin SEM analizi. Ortalama konjugat boyutu $31,81 \pm 3,40$ nm olarak hesaplanmıştır..... 40
- Şekil 3.6.** 0,002; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 ve 0,5 μ M kuantum nanoparçacık içeren P/QDs konjugatlarının 4 saatlik inkübasyon süresi sonrasında MCF-7, A-549 ve HEP-G2 hücrelerinin yaşamsal faaliyetlerine olan etkisinin incelenmesi; **A)** P/QDs konjugatlarına ilişkin MTT testi sonuçları, **B)** MTT sonuçlarına göre tahmin edilen konsantrasyon bağımlı teorik sitotoksikite grafikleri (veriler N=4 için ortalama $\pm$ standart hata şeklinde verilmektedir)..... 42
- Şekil 3.7.** P/QDs konjugatlarının MCF-7 hücreleri ile spesifik olmayan etkileşimlerinin nanoparçacık yüzeyindeki ligand yoğunluğuna göre incelenmesi. A)Yüzeyi 28 PAMAM molekülü ile modifiye edilen QDs konjugatı (P28/QDs) ile, B) Yüzeyi 14,1 PAMAM molekülü ile modifiye edilen QDs konjugatı (P14/QDs) ile işaretlenen MCF-7 hücrelerinin floresans mikroskobu görüntüleri (konjugatlar hücrelerde 37 °C’de 4 saat boyunca inkübe edilmişlerdir)..... 44
- Şekil 3.8.** A) 0,9 μ M; B) 0,5 μ M P/QDs-AntiHER2 biyokonjugatı ile 37 °C’de 4 saat inkübe edilen MCF-7 hücrelerine ilişkin alınan floresans mikroskobu görüntüleri. *Sağ panel:* hücrelerin beyaz ışık altındaki görüntülerini, *sol panel;* 460-480 nm aralığında uyarılan kuantum konjugatlarına ilişkin floresans görüntüleri göstermektedir (ölçek 50 μ m)..... 46
- Şekil 3.9.** A) 0,9 μ M; B) 0,5 μ M P/QDs-AntiHER2 biyokonjugatı ve C) 0,5 μ M P14/QDs konjugatı ile 4 °C’de 4 saat inkübe edilen MCF-7 hücrelerine ilişkin alınan floresans mikroskobu görüntüleri. *Sağ panel:* hücrelerin beyaz ışık altındaki görüntülerini, *sol panel;* 460-480 nm aralığında uyarılan kuantum konjugatlarına ilişkin floresans görüntüleri göstermektedir (ölçek 25 μ m). 48

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 1.** Kuantum nanoparçacığına bağlanan PAMAM moleküllerinin Bradford testi ile hesaplanması; 10, 20, 30 ve 50 kat PAMAM ile muamele edilen QD nanoparçacıklarına sırası ile 9,8; 19,5; 28 ve 25,7 PAMAM molekülü bağlanmıştır. Bağlanma verimi bağlanan PAMAM moleküllerinin başlangıç PAMAM miktarına oranlanmasıyla elde edilmiştir (veriler N=3 için ortalama±standart hata şeklinde verilmektedir). 37
- Çizelge 2.** MTT verilerinden yola çıkılarak hesaplanan tahmini teorik sitotoksosite değerleri. Sitotoksosite değerleri IC₅₀ (%50 inhibisyon konsantrasyonu), NOAEC (görünür bir etkinin bulunmadığı konsantrasyon değeri) ve TLC (total ölüm konsantrasyonu) değerleri şeklinde tanımlanmıştır. Sonuçlara göre P14/QDs konjugatları IC₅₀ 0,373 µM değeri ile A-549 hücreleri üzerinde toksik etki göstermektedir. 43

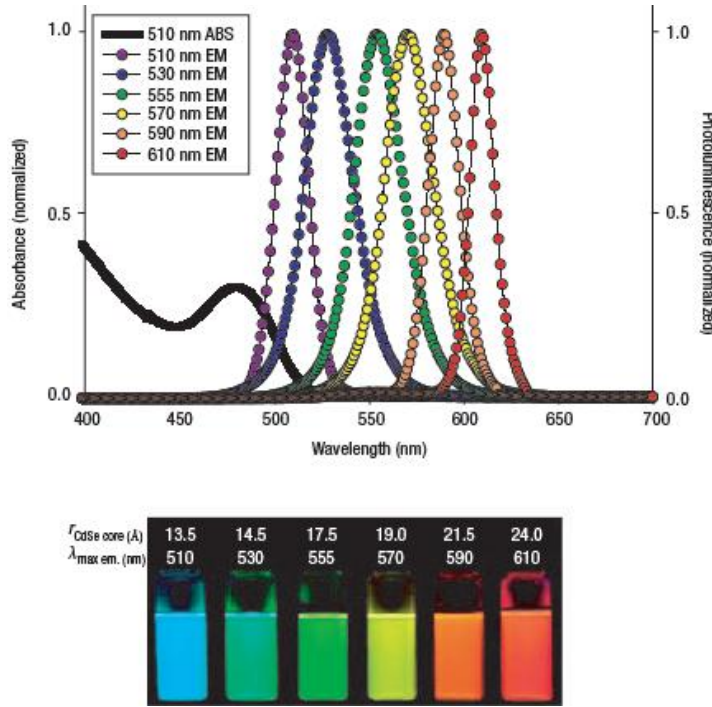
1. GİRİŞ

1.1 Kuantum Nanoparçacıklar

Kuantum nanoparçacıkları (quantum dots; QDs), 200-10,000 atomdan meydana gelen, 2-10 nm arasında boyuta sahip olan, küresel yarı-iletken parçacıklardır. Yarı-iletken doğası ve boyut-bağımlı fluoresans özelliklerinden, optoelektronik cihazların yapımında, biyolojik taylorlerde, görüntüleme çalışmalarında, kolloidlerin ve nanomateriyallerin boyut bağımlı özelliklerinin çalışılmasında gün geçtikçe artan bir ilgi ile yararlanılmaktadır (Alivisatos 1996). Yarı-iletken kütleleri, kompozisyonlarına bağılı olan bant aralığı (bandgap) enerjilerine göre karakterize edilirler. Bu bant aralığı enerjisi, bir elektronun bulunduğı düzeyden bir üst seviyedeki enerji düzeyine uyarılması için gerekli olan enerjidir. Uyarılma için gerekli olan enerji, genelde band gap enerjiden daha büyük olan bir foton enerjisinin absorpsiyonundan temin edilir. Uyarılmış elektronun başlangıç enerji düzeyine geri dönmesi, fotonun fluoresans emisyonu ile sonuçlanır. Bandgap enerjileri nano boyuttaki kristallerin parçacık boyutlarına göre farklılırlar ve bu band gap enerjilerine göre karakterize edilirler. Bir başka deyişle, kuantum nanoparçacıklarının optik özelliklerini boyutları belirlemektedir (Smith et al. 2008). Şekil 1.1’de CdSe nanoparçacıklarının farklı boyutlarına bağılı olarak değışen optik özellikleri; fluoresans emisyon ve absorpsiyon profilleri verilmektedir.

1.2 Kuantum Nanoparçacık Sentezi

İlk kuantum nanoparçacık (QD) sentezi, 1982 yılında Efros ve Ekimov tarafından gerçekleştirilmiştir (Efros et al. 1982; Ekimov et al. 1982). Yarı-iletken nano ve mikrokristalleri cam matrislerde sentezlenmişlerdir. Bu çalışmadan sonra nanokristallerin sentezine ilişkin, sulu faz, yüksek sıcaklıktaki organik çözenleri ya da katı substratları içeren farklı ortamlar kullanılarak birçok sentetik metod geliştirilmiştir (Alivisatos 1996; Crouch et al. 2003). Kuantum nanoparçacık kolloid süspansiyonları, genellikle kristal oluşumunu termodinamik olarak tetikleyen koşullar altında, yarı-iletken öncül maddelerin ve bu maddeleri bağlayan ajanların varlığında sentezlenir. Yarı-iletken maddeleri bağlayan ajanlar kinetik olarak kristal büyümesini kontrol ederken boyutun kuantum-sınırlandırması dahilinde muhafaza edilmesini sağlar.



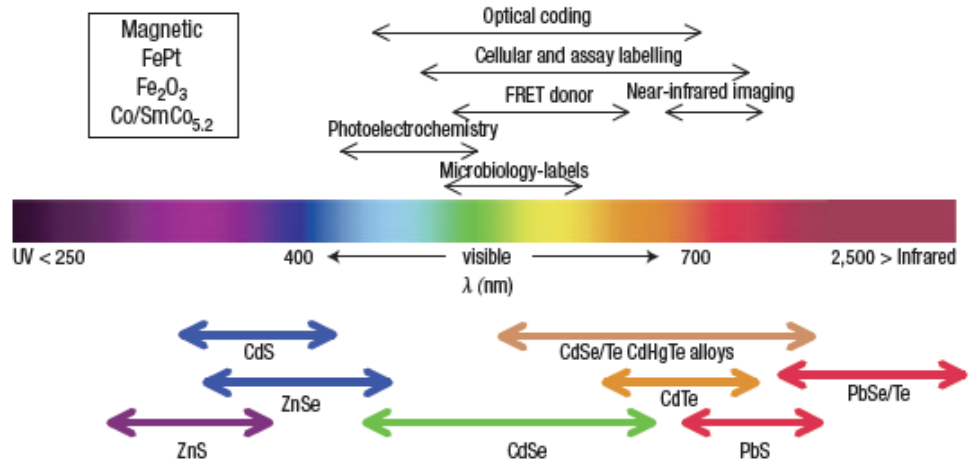
Şekil 1.1. 6 farklı kuantum nanoparçacığın floresans ve absorpsiyon profilleri (üstte), boyut bağımlı floresans özellikleri ve spektral aralıkları (altta) (Medintz et al. 2005).

Kuantum nanoparçacıkların boyut-bağımlı optik özellikleri, ancak nanoparçacıklar dar boyut dağılımlarında sentezlendiklerinde söz konusu olabilmekteydi. 1993 yılında Bawendi ve arkadaşları, kadmiyum sülfür (CdS), kadmiyum selenit (CdSe) ya da kadmiyum tellüritten (CdTe) oluşan homojen dağılımlı kuantum nanoparçacıkların sentezi için yeni bir sentetik metod oluşturarak bu konuda önemli bir gelişme kaydetmişlerdir (Murray et al. 1993). Bu gelişmenin ardından, CdSe kuantum nanoparçacıklarının sentetik kimyası hızla gelişerek, görünür bölgede spektruma sahip olan yeterince parlak kuantum nanoparçacıklar sentezlenmiştir. Sonuç olarak, CdSe , kuantum nanoparçacık sentezinde ve özellikle biyolojik uygulamalarda en yaygın kullanılan kompozisyon haline gelmiştir.

Sentez sonrasında kuantum nanoparçacıklarının amaca uygun tasarlanması için, koruyucu inorganik kabuğun ilavesi (Hines et al. 1996; Dabbousi et al. 1997), koloidal kararlılığın geliştirilmesine yönelik yüzey modifikasyonu ve direkt biyolojik moleküllerle konjugasyonu gibi birçok teknik geliştirilmiştir. Artık kuantum nanoparçacık üretimi, en iyi örnek olarak $\text{CdSe}(\text{ZnS})$ nanoparçacıklarının polimerler ile enkapsülasyonunun verilebildiği, itinalı

yürütülen moleküler mühendislik prosesi halini almıştır. Bu yöntemde, CdSe çekirdekleri apolar çözgen sistemlerinde hazırlanırlar ve sonrasında ZnS kabuk tabakası ile yüzeyleri kaplanır. Daha sonrasında amfifilik polimerler ile enkapsüle edilerek su fazına transfer edilirler. Son olarak, biyomoleküller ile amaca uygun olarak konjuge edilerek moleküler hedeflenmiş görüntüleme çalışmalarında kullanılırlar.

Kuantum nanoparçacık görüntüleme problemlerinin dizaynında, nanoparçacık çekirdek yapısının ve türünün seçimi hangi dalga boyunda emisyonun istendiğine göre belirlenir. Örneğin, CdSe nanoparçacıkları 450-650 nm aralığında emisyon verirlerken, CdTe 500-750 nm aralığında emisyonla sahiptir. Seçilen kompozisyondaki kuantum nanoparçacıkları sonrasında en uygun dalga boyuna sahip olacak boyutlarda sentezlenirler (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Kuantum nanoparçacıkların çekirdek materyaline göre farklı emisyon spektrumları ve bu dalga boylarına ilişkin materyallerin kullanıldığı biyolojik alanlar (Medintz et al. 2005).

Tipik bir CdSe sentezinde, oda sıcaklığındaki selenyum öncül maddesi (trioktilfosfin-selenit ya da tribütilfosfin-selenit) inert koşullarda (argon ya da azot gazı altında) 300 °C sıcaklığındaki kadmiyum öncül maddesini (dimetilkadmiyum ya da kadmiyum hekzadesilamin) ve nanoparçacık etrafında koordine olacak olan ligandı (trioktilfosfin oksit ya da hekzadesilamin) içeren çözeltiye aktarılır. Kadmiyum ve selenyum öncül maddeleri yüksek sıcaklıkta çok hızlı bir şekilde reaksiyona girerek CdSe çekirdeğini oluştururlar. Koordine olan ligantlar,

büyümekte olan nanokristallerin yüzeyindeki metal atomlarına bağlanırlar ve kolloidal yapıyı stabilize ederek büyüme hızını kontrol ederler. Soğuk solusyonun aniden ortama ilavesi reaksiyon sıcaklığını düşürerek nükleasyonun durmasına sebep olur. Kalan kadmiyum ve selenyum öncül maddeleri var olan çekirdek üzerinde daha düşük sıcaklıkta (240–270 °C) daha düşük hızlarda reaksiyona devam ederler. Kuantum nanoparçacıkları istenen boyuta ve dalga boyuna geldiklerinde, reaksiyon ortamı oda sıcaklığına kadar soğutularak büyüme sonlandırılır. Elde edilen kuantum nanoparçacıklar, yüksek hidrofobositeye sahip alifatik ligandlarla kaplanırlar ve böylece sıvı-sıvı ekstraksiyon ya da polar çözgenlerden çöktürme yöntemiyle kolaylıkla saflaştırılırlar.

Kuantum nanoparçacıkları yüksek yüzey/hacim oranlarına sahip olduklarından dolayı, büyük miktarda atom bileşeni yüzeye hücum eder ve sonuç olarak atomik ve moleküler orbitallerin tamamı ligand moleküllerle koordine olamazlar. Bu boşta kalan orbitaller hasar noktaları olarak adlandırılırlar ve floresans şiddetin sönümlenmesinden sorumlu tutulurlar. Bu nedenle, elektronik yalıtımı sağlamak amacıyla daha geniş bandgap aralığına sahip başka bir tabakanın çekirdek yapıya ilavesi avantaj kazandırmaktadır. ZnS tabakanın CdSe çekirdeğinin etrafında oluşturulması, kuantum nanoparçacıklarının fotoluminesans etkinliğini önemli derecelerde arttırmaktadır (Hines et al. 1996; Dabbousi et al. 1997). Ayrıca ZnS tabakası, oksidasyona daha az eğilimli olduğundan kuantum nanoparçacıklarının kimyasal kararlılığını artırırken oksidatif photo-sönümleme hızını önemli ölçüde düşürür (Talpin et al. 2004). Buna ilave olarak, kuantum nanoparçacıklarının yüzeyindeki Zn^{+2} atomları, Cd^{+2} atomlarına kıyasla alkil fosfin ve alkilamin gibi yüzeyi stabilize eden ligantlara daha kuvvetli bağlanarak nanopartiküllerin kolloidal kararlılığını göreceli olarak arttırırlar (Xie et al. 2005).

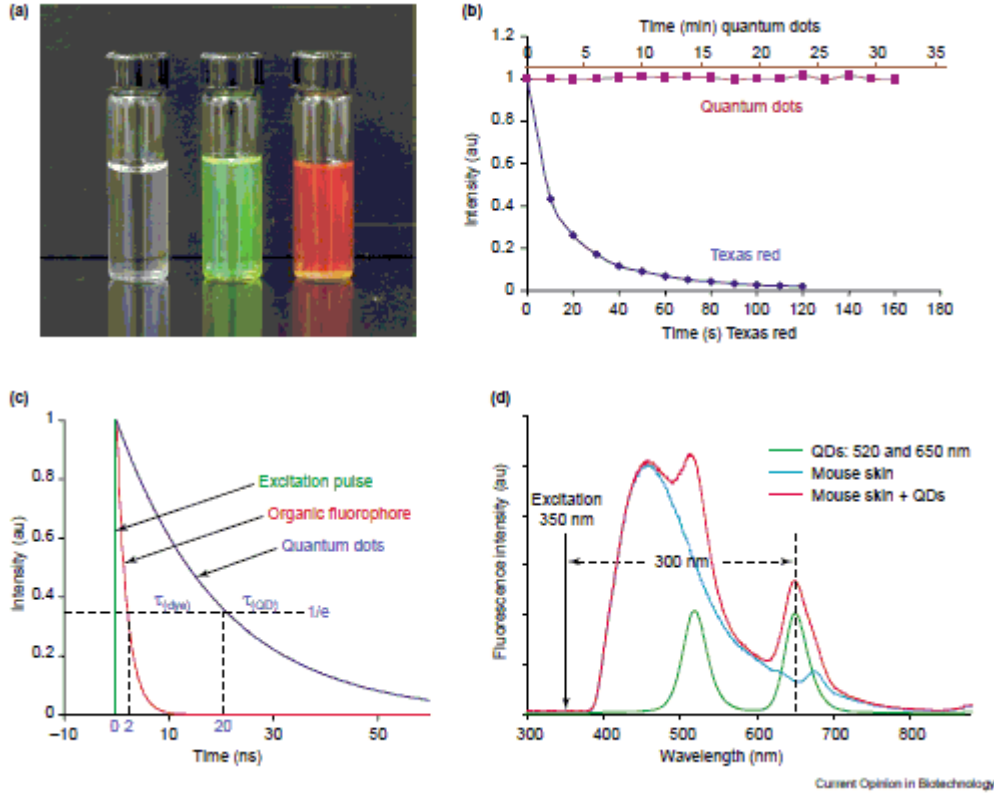
CdSe çekirdek üzerinde ZnS dış tabakanın oluşumunda, saflaştırılan çekirdek yapılar koordine olacak ligand moleküllerle karıştırılırlar ve 140-240 °C'ye kadar ısıtılırlar. Dış kabuğun öncül maddeleri (dietilçinko ve hekzametildisilatan) koordine olacak olan ligand çözeltide çözülürler ve yavaşça ortama ilave edilirler (Dabbousi et al. 1997). Daha sonra çekirdek yapının sentezinde olduğu gibi saflaştırılırlar.

Yüksek floresans özelliklerine sahip kuantum nanoparçacıklar, 3-n-oktilfosfin oksit (TOPO), 3-oktilfosfin (TOP) (Murray et al. 1993; Yu et al. 2003),

tetradesilfosfonik asit (TDPA) (Peng et al. 2001), oleik asit (Yu et al. 2002; Deng et al. 2012), oktadesilamin (Zhao et al. 2010) ve/veya hekzadesilamin (HDA) (Jin et al. 2009) içeren organik çözgen sistemleri kullanılarak yüksek sıcaklıkta ($>200^{\circ}\text{C}$) sentezlenmektedirler (Jin et al. 2009). Yüksek sıcaklık kullanılmasının sebebi, uzun alkil zincirleri içeren bu çözgenlerin kaynama noktalarının yüksek olmasıdır. Bu hidrofobik organik moleküller sadece reaksiyon ortamını oluşturmakla kalmazlar. Aynı anda kuantum nanoparçacık yüzeyindeki doymamış metal iyonları ile koordinasyonu sağlarlar ve böylece büyük kuantum nanoparçacık kümelerinin oluşmasını engellerler. Sonuç olarak nanoparçacıkların etrafı bu organik ligandlarla kaplanır ve kuantum nanoparçacıklarının polar olmayan hidrofobik çözgenlerde çözülmesini sağlarlar. Fakat, elde edilen bu kuantum nanoparçacıklarının biyolojik uygulamalarda kullanılabilmeleri için suda çözünür forma getirilmeleri gerekmektedir. Bunun için kuantum nanoparçacık yüzeyleri, çeşitli prodesürlerle modifiye edilmektedir.

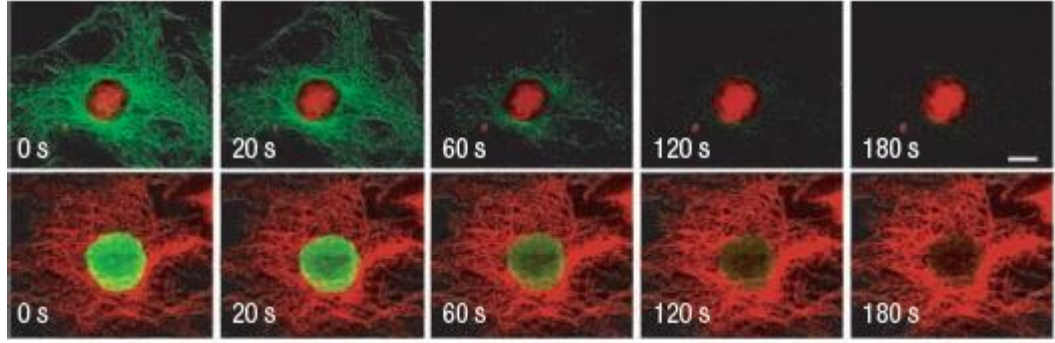
1.3 Kuantum Nanoparçacıklarının Optik Özellikleri

Kuantum nanoparçacıkları daha önce bahsedildiği üzere yarı-iletken metallere oluşturmaktadırlar. Geniş molar ekstinksiyon katsayısına sahiptirler ($0,5-5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ve bu onları fotonun sınırlı olduğu, ışık şiddetinin büyük bir kısmının saçılarak ya da absorplanarak azaldığı *in vivo* uygulamalarda daha parlak hale getirmektedir (Leatherdale et al. 2002). Teoride kuantum nanoparçacıklarının uyarılmış durumdaki ömürleri (20-50 ns) organik boyalara göre daha uzun olduğu için tek bir kuantum nanoparçacığının yarı ömürle sınırlı olan emisyon hızı organik boyaya göre 5-10 kat daha azdır. Fakat pratikte floresans görüntüleme, floresans emisyonu için en temel sınırlayıcı faktörün absorpsiyon hızının olduğu yani absorpsiyonun sınırlı olduğu koşullarda gerçekleşmektedir. Kuantum nanoparçacıklarının absorpsiyon katsayıları organik boyalara ($5-10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) göre 10-50 kat daha yüksek olduğundan aynı uyarılma koşullarında yani birim alana tesadüf eden foton miktarının eşit olduğu durumda kuantum nanoparçacıklarının absorpsiyon hızları da 10-50 kat fazla olacaktır. Sahip oldukları bu yüksek hızdaki ışık absorpsiyon hızları kuantum nanoparçacıklarını organik boyalara göre 10-20 kat daha parlak yapmaktadır (Bruchez et al. 1998; Nie et al. 1998) (Şekil 1.3.a). Buna ilave olarak, kuantum nanoparçacıkları fotosönümlenmeye karşı daha stabildirler (Şekil 1.3.b) ve böylelikle daha uzun görüntüleme proseslerinde kullanılabilmektedirler.



Şekil 1.3. Kuantum nanoparçacıklarının optik özellikleri A) Fluoresans ışık emisyonlarının organik boyaya olan tetrametilrodamin izotiyosiyanat (TRIT, solda), yeşil QD (ortada) ve kırmızı QD (sağda) ile kıyaslanması (normal oda ışığı altında, 1,0 μ M konsantrasyonda). B) Aynı uyarılma koşulları altında QD ve Teksas Kırmızısı'na ilişkin foto-sönümlene eğrileri. C) QD ve klasik bir organik boyanın uyarılma halinden bozulması eğrilerinin kıyaslanması. T(organik boya) ve T(QD) fluoresans sinyallerin 1/e değerine kadar olan bozulma sürelerini göstermektedir. 'e' logaritmik bir sabit olup 2,718 değerine eşittir. D) Fare derisi ile QD emisyon spektrumlarının kıyaslanması.

Şekil 1.4'te Wu ve ekibi tarafından yapılan karşılaştırmalı çalışmanın fluoresans görüntüleri verilmiştir (Wu et al. 2003). Kırmızı alanlar kuantum nanoparçacık-streptavidin ile boyanmış alanlardır, yeşil alanlar ise organik fluorofofor olan AlexaFluor ile işaretlenmiş bölgelerdir. 180 saniyelik görüntüleme süreci sonunda şekillerden de anlayacağı üzere kuantum nanoparçacıklarının fluoresans şiddeti hala görüntülemeye izin verecek şiddetteyken, organik boyadan gelen sinyal sönümlenerek kaybolmuştur.



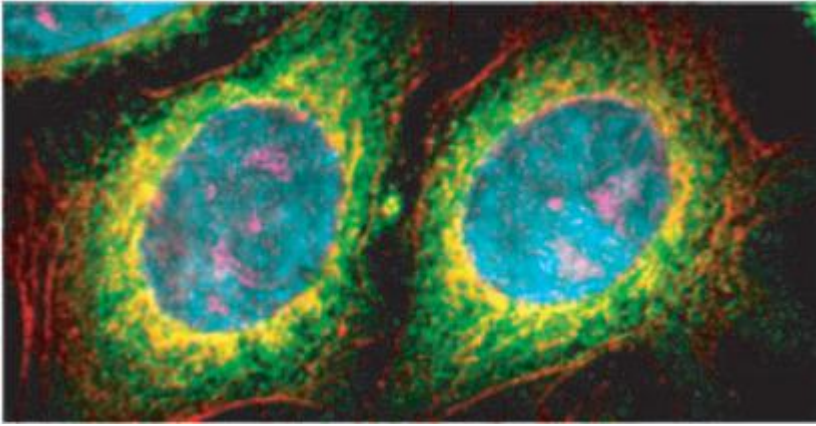
Şekil 1.4. Kuantum nanoparçacıklarının foto-sönümleyeme karşı olan resistansı. Üst sütunda; 3T3 hücrelerinin nükleer antijenleri kuantum nanoparçacık-streptavidin 630 konjugatı ile (kırmızı) ve aynı anda mikrotübülleri AlexaFluor 488 (yeşil) ile işaretlenmiştir. Alt sütunda; mikrotübüller kuantum nanoparçacık-streptavidin 630 konjugatı (kırmızı) ile, nükleer antijenler AlexaFluor 488 (yeşil) ile işaretlenmiştir (Wu et al. 2003).

Kuantum nanoparçacıklarının uzun ömürlü uyarılmış halleri, kuantum parçacıklarının floresans sinyalinin, arka zeminin oto-fluoresansından ayrılmasını sağlar (Jakobs et al. 2000). Şekil 1.3.c’de kuantum nanoparçacıkları ile organik boyaların uyarılmış hallerinden bozulma eğrilerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Başlangıç uyarılma halinde her iki molekülün floresans şiddetlerinin aynı olduğunu kabul edersek ($t=0$) $I_{QD}/I_{organik\ boya}=1$ iken 10 ns ($t=10\ ns$) sonra şiddetler arasındaki bu oran $I_{QD}/I_{organik\ boya}=100$ ’e çıkacaktır. Yani, kuantum nanoparçacıklarıyla elde edilecek görüntü kontrastı çok daha fazla yüksek olacaktır. Çünkü kuantum nanoparçacıklarının uyarılma halinden bozulmaları süresince arka zeminin oto-fluoresansı sönümlenmiş olacağından sinyalin arka zemine göre (signal-to-background) oranı artacaktır.

Fluoresans moleküllerin uyarım dalga boyu ile emisyon dalga boyu arasındaki uzaklığa ‘*Stokes kayması*’ denmektedir. Kuantum nanoparçacıkları daha geniş Stokes kaymalarına sahiptirler. Bu özellik oto-fluoresansın yüksek olduğu kompleks biyomedikal örneklerle ilişkin *in vivo* görüntüleme çalışmalarında büyük önem arz etmektedir. Şekil 1.3.d’de görüleceği üzere kuantum nanoparçacıkları için Stokes kaymaları uyarılma dalga boyuna göre 300-400 nm aralığında olabilmektedir. Organik boyalar ise kısa Stokes kaymalarına sahip olduklarından dolayı şiddetleri, dokuların yoğun oto-fluoresansı arasında kaybolmaktadır. Fakat, kuantum nanoparçacıkları geniş Stokes kaymalarından dolayı arka zeminin sinyalinden rahatlıkla ayırt edilebilmektedirler. Bu ‘renk kontrastları’ sadece kuantum nanoparçacık temelli problemlerde mevcuttur, yani

dalga boyu çözümlemelerinden gerçek sinyal, arka zemin sinyalinden ayırt edilebilmektedir (Gao et al. 2004).

Kuantum nanoparçacıklarının bir diğer avantajı ise boyutlarına bağlı olarak farklı dalga boylarında emisyon vermelerinden, bir başka deyişle çok renkli yapılarından dolayı çoklu hedeflerin aynı anda izlenmesine olanak tanınmasıdır. Bu önemli bir özelliktir, çünkü çoğu kanser ve aterosklerosis gibi kompleks insan hastalıklarında birçok gen ve protein yer almaktadır. Moleküler markörlerin aynı anda izlenmesi bilim adamlarına kompleks hastalıkları anlama, tanımlama ve ayırt edebilme şansı vermektedir (Gao et al. 2003). Manyetik rezonans, pozitron emisyon tomografi ve X-ışınları gibi görüntüleme tekniklerinde çoklu parametrelerin incelenmesi büyük bir sorun teşkil etmektedir. Fakat floresans görüntüleme ise hem sinyal yoğunluğu hem de çoklu dalga boyları hakkında bilgi vermesi ve renklerin ayırt edilebiliyor olması açısından aynı anda çoklu görüntülemeye olanak sağlamaktadır. Böylelikle, hücre içi ya da hücreye ait farklı moleküller farklı renkte emisyon veren kuantum nanoparçacıklarıyla hedeflenebilmektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. İnsan epitel hücrelerinin 5 farklı kuantum nanoparçacığı ile işaretlenerek çoklu görüntülemenin yapılması. Siyan renk, nükleusun işaretlendiği 655 nm-kuantum nanoparçacığı, magenta Ki-67 proteinin işaretlendiği 605 nm- kuantum nanoparçacığı, turuncu mitokondrinin boyandığı 525 nm- kuantum nanoparçacığı, yeşil mikrotübülün boyandığı 565 nm- kuantum nanoparçacığı, kırmızı ise aktin filamentlerinin boyandığı 705 nm- kuantum nanoparçacığı aittir (Quantum Dot Corp.) (Medintz et al. 2005).

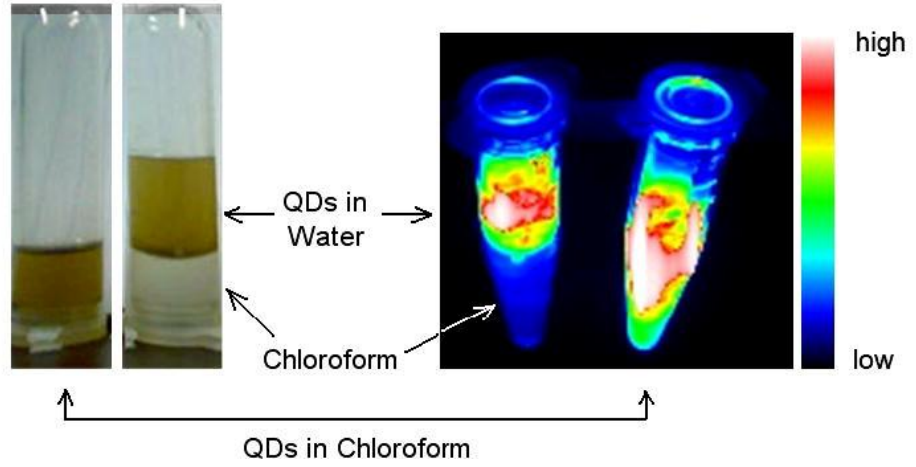
Özet olarak, geniş absorpsiyon profilleri sayesinde kuantum nanoparçacıkları, tek bir dalga boyunda uyarılma ile partikül boyutuna ve kimyasal bileşenlerine göre farklı renkte ışımaya yapmaktadırlar. Böylece organ ve

damarların yüksek hassasiyette çoklu moleküler profillerinin çıkarılmasında başarılı bir şekilde kullanılabilmektedirler (Gao et al. 2003).

1.4 Kuantum Nanoparçacıklarının Suda Çözünürleştirilmesi

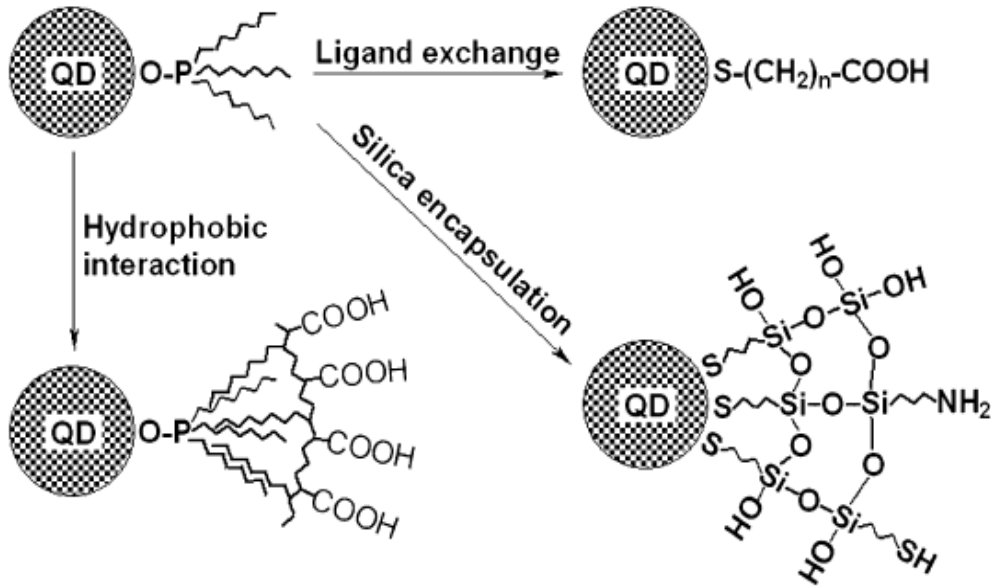
Kuantum nanoparçacıkları organik fazda sentezlenebildikleri gibi su fazında da daha düşük sıcaklıklarda sentezlenebilmektedirler. Fakat, suda sentezlenen kuantum nanoparçacıklarının kuantum verimi daha düşük olmakla beraber boyut dağılımları çok sınırlıdır. Buna ek olarak sentezlenen kuantum nanoparçacıklarının boyutları homojen olmamaktadır. Uygulamada getirdikleri üstün foto-lüminesans özelliklerinden dolayı organik fazda sentezlenen kuantum nanoparçacıkları tercih edilmektedir. Fakat, organik çözgen sistemlerinde sentezlenen kuantum nanoparçacıklarının da faz-transfer reaksiyonları ile su fazına transfer edilmeleri gerekmektedir (Şekil 1.6).

Water transfer of oleic acid-capped NIR-emitting PbS QDs via glutathione



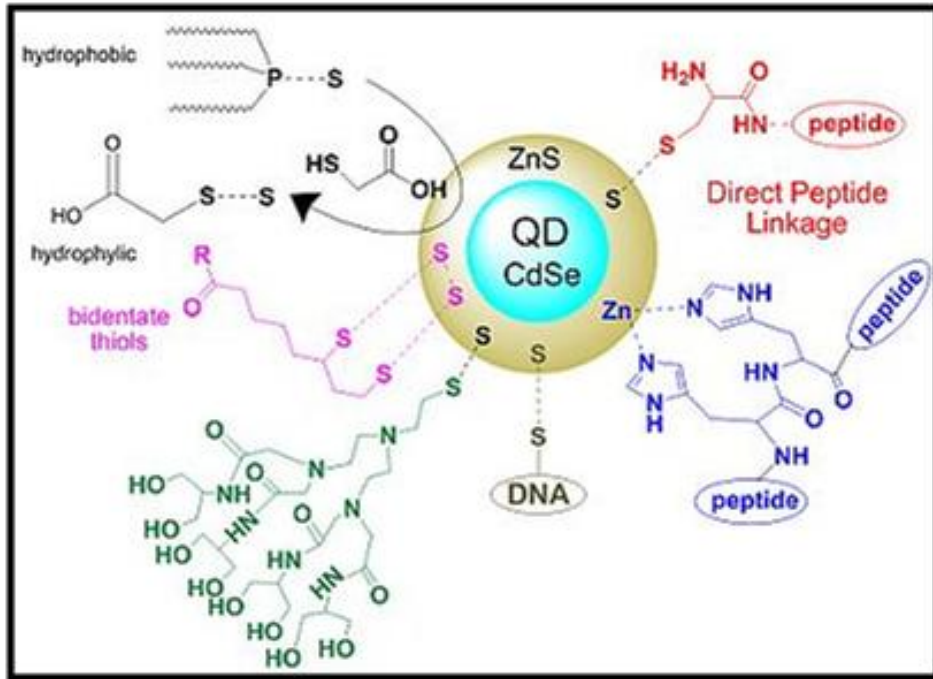
Şekil 1.6. Oleik asit kaplı organik fazdaki kuantum nanoparçacıkların glutatyon ile modifikasyonu sonrasınan organik fazdan su fazına transfer edilmesi (Deng et al. 2012).

Bunun için yüzeylerine çözünürlüğü sağlayacak amin ($-NH_2$), karboksil ($-COOH$), sülfidril ($-SH$) veya hidroksil ($-OH$) gibi polar grupların ilave edilmesi gerekmektedir. Bu yüzey modifikasyonu genel olarak 3 farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Kuantum nanoparçacıklarının ligand yerdeğiştirme, silika enkapsülasyon ve hidrofobik etkileşimlerle yüzeylerinin modifiye edilmesi ve sonucunda suda çözünürleştirilmesi.

a) **Ligand yer değiştirme reaksiyonları**



Şekil 1.8. Kuantum nanoparçacık yüzeyinin olası moleküllerle ligand yerdeğiştirme yöntemi ile modifikasyonu

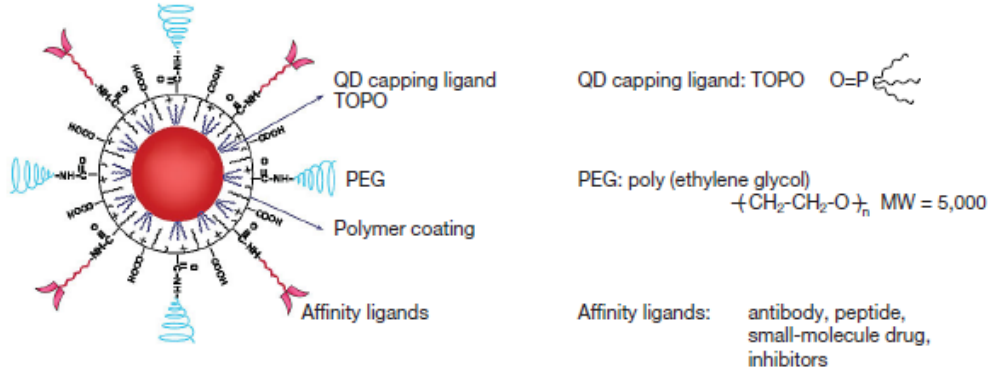
Ligand yer değiştirme reaksiyonlarında, kuantum nanoparçacık yüzeyindeki orjinal ligand (TOPO, TOP, HDA,..vs) suda çözünür başka bir bifonksiyonel ligand ile yer değiştirir (Şekil 1.8). Bu bifonksiyonel molekülün bir ucu kuantum nanoparçacığın yüzeyine temas ederken serbest kalan diğer ucu hidrofilik olduğundan suda çözünürlüğü sağlamaktadır.

b) Hidrofobik etkileşimlerle misel oluşturulması

1,2-dipalmitol-*sn*-glisero-3-fosfoetanolamin –*N*-[metoksi(polietilen glikol)] ya da 1,2-dipalmitol-*sn*-glisero-3-fosfokolin gibi fosfolipidler hem hidrofobik hem de hidrofilik gruplar içermektedirler. Bunlar kuantum nanoparçacıklarını merkezlerinde enkapsüle ederek su içinde yağ molekülleri oluştururlar. Enkapsülasyon fosfolipidlerin hidrofobik uç grupları ile kuantum nanoparçacıklarının yüzey hidrofobik grupları arasındaki etkileşimlere dayanır ve fosfolipitlerin açıkta kalan hidrofilik uç grupları kuantum nanoparçacıklarına çözünürlük sağlar (Dubertret et al. 2002; Fan et al. 2005).

Bir diğer yöntem ise uzun zincirli amfifilik polimerlerin misel benzeri yapıların oluşturulmasında kullanılmasıdır ve bu yöntem fosfolid kullanıma göre daha avantajlıdır. Bir çalışmada poliakrilik asite, oktil amin grupları EDC ile kısmi olarak ilave edilmiştir. Elde edilen amfifilik polimer kuantum nanoparçacıklarının enkapsülasyonunda kullanılarak açıkta kalan –COOH grupları sayesinde kuantum nanoparçacıkları suya transfer edilmiştir (Wu et al. 2003). Sudaki çözünürlüğü arttırmak ve yapısal kararlılığı kuvvetlendirmek için –COOH grupları sonrasında amino uçlu PEG poli(etilen glikol) grupları ile EDC kullanılarak kısmi olarak modifiye edilmiştir.

Nie ve arkadaşları polibütillakrilat, polietilakrilat ve polimetilakrilik asitten oluşan triblok polimerlerinin kullanımını rapor etmiştir. Burada metilakrilik asit birimleri kısmi olarak oktilamin ve PEG-NH₂ ile modifiye edilmiştir (Gao et al. 2004). Bir başka çalışmada, poli(maleik anhidrid-*alt*-1-tetradesen) kuantum nanoparçacıklarının suda çözünürleştirilmesinde kullanılmıştır ve polimerin bis(6-aminohegzil)amin ile çapraz bağlanması sonucunda nanoparçacıklarının kararlılığı arttırılmıştır (Pellegrino et al. 2004).



Şekil 1.9. TOPO yüzey kaplayıcı ajan, enkapsüle edici kopolimer tabakası, biyouyumluğu sağlayan PEG ve antikor, peptid, inhibitör gibi tümör spesifik molekülden meydana gelen, multifonksiyonel kuantum nanoparçacık probunun yapısal şekli (Gao et al. 2004).

Amfifilik polimerlerin kullanımı ile kauntum nanoparçacıklarının suya transferi ligand yer değiştirme reaksiyonlarının kullanıldığı duruma göre daha elverişlidir. Çünkü kuantum nanoparçacıklarının yüzeyindeki atomlar ile direkt bir etkileşim söz konusu değildir ve böylece orjinal kuantum verimi maksimum seviyede korunmuş olur. Bir diğer sebep ise; polimerin çok sayıdaki hidrofobik grupları nanoparçacıklar ile olan hidrofobik etkileşimleri güçlendirerek daha stabil nanoparçacıkların oluşmasını sağlar. Son olarak, bu amfifilik polimerler ucuza mal edilmektedirler (PEG-NH₂ hariç) ve bu onları proteinler ya da fosfolipidlere göre büyük ölçekli üretimlerde daha elverişli kılmaktadır (Yu et al. 2006).

c) Silika Enkapsülasyonu

Kuantum nanoparçacıkları silika tabakaları arasına enkapsüle edilerek biyouyumlu hale getirilmektedirler (Mulvaney et al. 2000; Nann et al. 2004). -NH₂ ya da -SH grupları içeren fonksiyonel organosilikon molekülleri dış kabuk yapıya (yüzeye) dahil edilerek biyomeküler uygulamalarda fonksiyonellik sağlamaktadırlar. Bu yöntem avantajları açısından yukarıda bahsedilen iki yöntem arasında yer alsa da daha çok ligand yer değiştirme yöntemine yakındır. Kuantum nanoparçacıklarının yüzeyi, organosilikon moleküllerinin ilavesi ile değişmektedir ve bu da kuantum veriminin düşmesi ile sonuçlanmaktadır (Rogach et al. 2000). Nanoparçacıkların kontrol edilebilir silika tabakaları ile kaplanma prosedürü diğer yöntemlere göre daha komplikedir. Bir diğer kısıtlama da silika kaplamanın çok seyreltik ortamlarda gerçekleşmesi gerekmektedir ve bu da büyük

miktarlı üretimlere sınırlama getirmektedir (Gerion et al. 2001). Buna rağmen, Ying ve arkadaşları ters mikroemülsiyon yöntemi ile kuantum nanoparçacıklarını silika ile kaplamanın kolay bir yolunu bulmuşlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre silika tabakanın kalınlığı düşürüldükçe, kaplamanın süresi/uzunluğu kontrol edilebildikçe ve farklı başlangıç materyalleri (merkaptopropil trimetoksisilan yerine aminopropil trimetoksisilan) kullanıldıkça kuantum veriminin artabileceği sonucuna varmışlardır (Selvan et al. 2005).

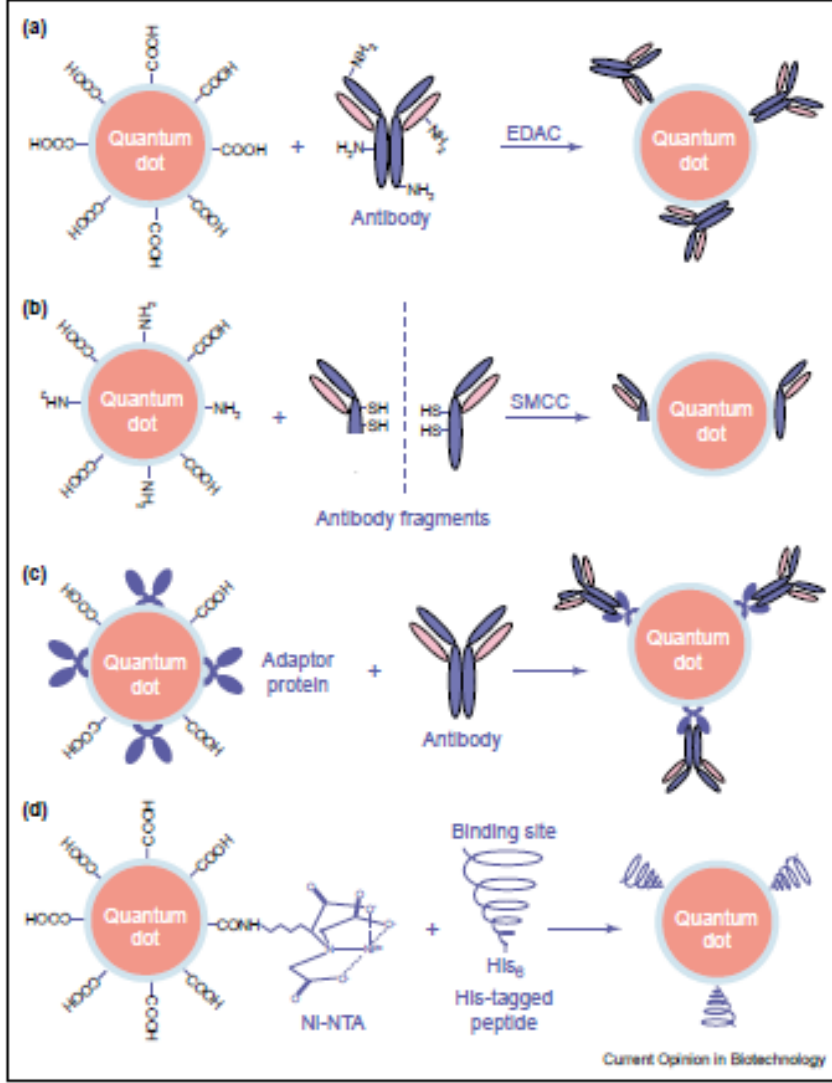
Kıyaslama yapacak olursak, silika kaplama yapısal olarak stabil nanoparçacıklar üretiyor olsa da elde edilen molekülerin boyutu onlarca nanometreden mikrometre seviyesine kadar çıkmaktadır. Öte yandan, ligand yer değiştirme ve misel oluşumu büyük ölçekli üretimler için daha uygun olmakla beraber total partikül boyutunu çok değiştirmemektedirler. İlave olarak, misel oluşumu kuantum verimini korurken yapıya PEG ilavesi kararlılığı ve suda çözünür formdaki kuantum nanoparçacıklarının kanda dolaşım süresini arttırmaktadır (Yu et al. 2006).

Bu üç yöntem kuantum nanoparçacıklarını yüzey fonksiyonel grupları açısından farklılaştırmakla beraber uygun biyokonjugasyon teknikleri ile peptid, antikor ve nükleik asit gibi biyomoleküllerle etkileşime girmelerini sağlamaktadır. *In vivo* ve *in vitro* biyomedikal uygulamalarda yukarıdaki yöntemlerle elde edilen kuantum nanoparçacıklarının, görüntüleme ve tayinde birçok uygulama örnekleri mevcuttur.

1.5 Kuantum Nanoparçacıklarının Biyokonjugasyonu

Yüzeyleri modifiye edilerek biyolojik uygulamalara hazır hale getirilen kuantum nanoparçacıkları pasif adsorpsiyon, multivalent şelatlama ya da kovalent bağlama gibi farklı yöntemlerle biyolojik moleküllerle amaca uygun olarak konjuge edilirler. Şekil 1.10.'da özetlenen metotlarda; a) EDAC (etil-3-dimetil amino propil karbodiimid) katalistinin kullanıldığı klasik çapraz bağlama yöntemi, b) indirgenmiş antikor fragmentlerinin SMCC (süksinimidil-4-*N*-maleimidometil-siklohekzan karboksilat) aracılığı ile sülfidril-amin çapraz bağlama yolu ile bağlanması, c) adaptör protein aracılığı ile bağlanması, d) histidin bağlı protein ya da peptidlerin Ni-NTA (nikel-nitrilotriasetik asit) ile

modifiye edilen kuantum nanoparçacıklarına kontrol edilebilir ligand:kuantum nanoparçacık oranlarında bağlanması gösterilmektedir (Gao et al. 2005).



Şekil 1.10. Kuantum nanoparçacıklarının biyomoleküllerle konjuge edilme metotları

Bu yöntemler arasında en popüler olanları, karbodiimid ile aktive edilmiş amid oluşumu ve aktif ester maleimid oluşumu üzerinden gerçekleştirilen amin-sülfidril bağlanmasıdır. Karboksil-amin gruplarının çapraz bağlandığı yöntemin en büyük avantajı, bütün proteinlerin primer amin ve karboksilik asit gruplarına sahip olmaları ve kuantum nanoparçacıkları ile konjugasyonları öncesinden herhangi bir modifikasyona ihtiyaç duymuyor olmasıdır. Bunun aksine, sülfidril

grupları doğal biyomoleküllerde çok daha az miktarlarda bulunurlar ve oksijen varlığında stabil değildirler.

Amin, karboksilik asit ve sülfidril gruplarının dışında yapıda bulunun diğer foksiyonel gruplar da konjugasyonlarda kullanılabilirler. Örneğin, Pellegrino ve grubu önceden aktive edilmiş nanoparçacık çözünürleştirilmesinde kullanılabilir bir amfifilik polimer geliştirmiştir (Pellegrino et al. 2004). Bu polimer içerisindeki anhidrid grupları, primer amin gruplarına yüksek reaktivite gösterdiklerinden dolayı konjugasyon süresince herhangi bir ajanın kullanılmasına gerek kalmamıştır. Polianhidrit grupları ilaç taşımada ve doku mühendisliğinde yoğun olarak kullanıldıklarından dolayı (Ron et al. 1993) bu çalışma büyük bir önem arz etmektedir.

Kuantum nanoparçacık yüzeylerinin modifikasyonunda ligand moleküllerinin oryantasyonu ve molar oranlarının manipüle edilmesi konusunda birçok strateji geliştirilmiştir. Fakat doğru ligand oryantasyonuna ve molar oranına sahip ‘en iyi’ kuantum nanoparçacığı henüz bulunamamıştır. Goldman ve grubu bir füzyon proteinini, immünoglobulin G konjugasyonu için adaptör olarak kullanmışlardır (Goldman et al. 2002). Adaptör protein pozitif yüklü lösin gruplarına sahiptir ve antikorun Fc bölümüne bağlanan protein G ile kuantum nanoparçacığı arasında elektrostatik etkileşimler oluşturmaktadır (Bkz. Şekil 1.10.c). Bu yöntem nanoparçacık yüzeyinde kontrol edilebilir oryantasyon sağlamaktadır. Öte yandan histidin bağlı şelatalayıcı ajanların kullanımı (Ni-NTA) Şekil 1.10.d’de verildiği üzere kontrol edilebilir ligand oryantasyonlarının yanında kontrol edilebilir molar oranları da sağlamaktadır. Ayrıca, bu yöntemin bağlanma verimini etkileyen probun total boyutunun ayarlanabilir olması, direkt bağlanma ve hızlı saflaştırmadan gelen ucuz üretim maliyetleri gibi avantajları da bulunmaktadır (Gao et al. 2005).

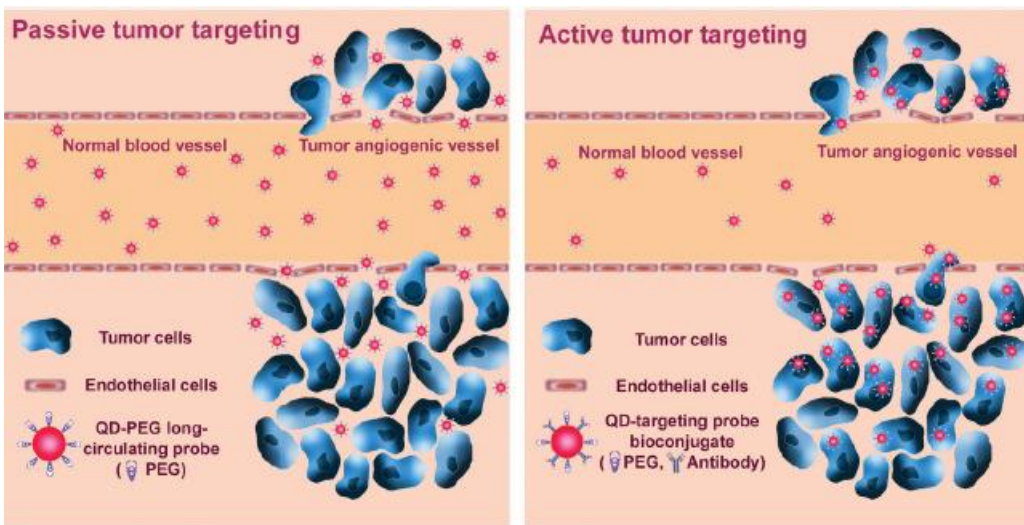
1.6 Kuantum Nanoparçacıklarının Biyolojik Uygulama Alanları

Kuantum nanoparçacıklarının biyomedikal kullanımlarını ele alan birçok makale yayımlanmıştır (Chan et al. 2002; Alivisatos 2004; Medintz et al. 2005; Michalet et al. 2005; Parak et al. 2005; Biju et al. 2010). Bunlardan bazıları kantitatif 3D tekniği ile arterial duvarların analizi (Ferrara et al. 2006), kendiliğinden aydınlanan (self-illuminating) kuantum nanoparçacıkların

biyoluminesans rezonans enerji transferine (BRET) bağı olarak derin doku görüntülemeye kullanılması (So et al. 2006) ve çoklu gen ekspresyon analizlerinde kuantum nanoparkodlarının kullanılmasıdır (Eastman et al. 2006). Bunlar dışında en yaygın bilinen uygulama alanları hücre dışı ve hücre içi biyomedikal öneme sahip moleküllerin, nükleik asitlerin izlenmesinde ve fototerapide kullanılmalarıdır.

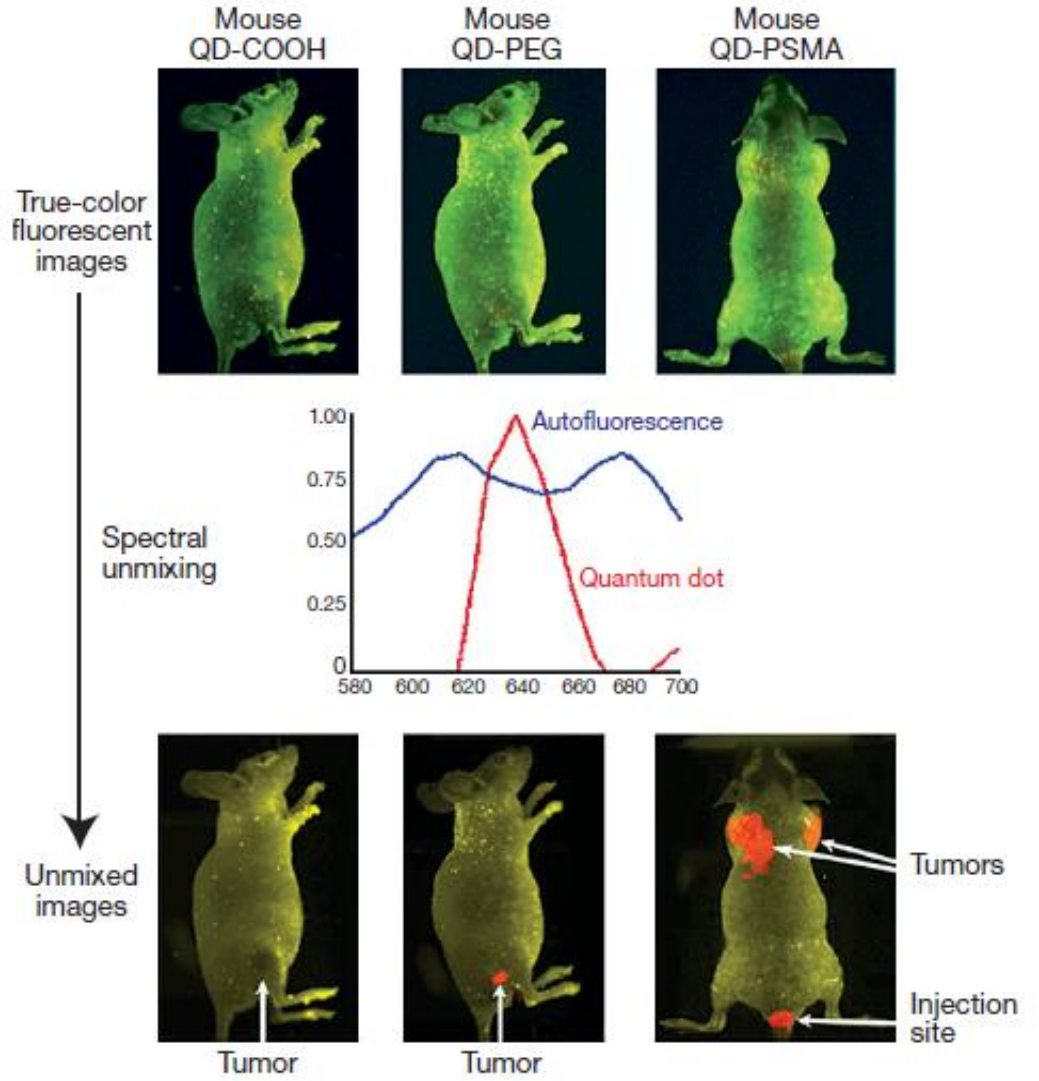
1.7 Tümör Hedefleme ve Görüntüleme

In vivo koşullarda, kuantum nanoparçacıkları tümürlü dokuya gerek aktif gerekse pasif hedefleme mekanizmaları ile alınmaktadır. Pasif modelde, makromoleküller ya da nanometre boyutlarındaki parçacıklar gelişmiş nüfuz etme ve tutulma güçleri sayesinde tercihen tümör bölgelerinde birikirler (Jain 1999; Jain 2001). Bu etkinin dayanağını iki faktör oluşturmaktadır. İlki; anjiyogenik tümörler vasküler endotelial büyüme faktörleri üretirler. Bu faktörler, tümörle ilişkili yeni oluşan damarların geçirgenliğini artırır ve dolaşım halindeki parçacıklarının içeri sızmasına sebep olurlar. İkincisi; tümörler etkin bir lenfonik drenaj (boşaltım) sisteminden yoksundurlar ve bu da nanoparçacıkların akümülyasyonuna sebep olur. Aktif tümör hedeflemede ise, reseptör-ligand etkileşimleri baz alınır. Nanoparçacıklar hücre yüzeyindeki spesifik bir reseptör ile etkileşecek antikor, peptid, ya da nükleik asit ile işaretlenirler (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Tümürlü hücrelerin aktif (sağdaki) ve pasif (soldaki) hedeflenme mekanizmaları

Aktif hedefleme pasif hedeflemeye göre daha etkin ve daha hızlıdır. Gao çalışmasında, prostat spesifik membran antijeninin (PSMA) işaretlenmesi için antikor ile hedeflenmiş kuantum nanoparçacıkları kullanmıştır (Gao et al. 2004). PSMA antikorunun tümör büyüme bölgesinde birikmesi ve tutulumu insan prostat kanser metastasının hedeflenmiş terapisinde kilit rol oynamaktadır (Şekil 12).



Şekil 1.12. Triblock kopolimer/PEG grupları ile enkapsüle edilen kuantum nanoparçacıkları ile prostat spesifik membran reseptörlerinin aktif olarak hedeflenmesi sonucunda prostat tümörü taşıyan farelere ilişkin alınan floresans görüntüler (Gao et al., 2004)

Akerman ve grubu kuantum nanoparçacık-peptit konjugatları ile ilk kez tümör damar sistemini hedeflemişlerdir fakat konjugatlar canlı hayvanlarda

görüntülenememiştir (Akerman et al. 2002). Buna rağmen, *in vitro* histolojik sonuçlar, peptitler aracılığı ile kuantum nanoparçacıklarının tümör damarlarına kadar ulaşabildiğini ve retikuloendotelial sistem (RES) tarafından bertaraf edilmekten kurtulduğunu göstermektedir. Gao ve ekibi, çoklu tümörlerin canlıda görüntülenmesine imkan tanıyacak yeni bir tür kuantum probunu geliştirmişlerdir (Gao et al. 2004). Amfifilik triblok kopolimerden oluşan bu prob, antijen-antikor etkileşimleri sayesinde tümörlü hücreye bağlanırken yapıdaki çoklu PEG grupları biyouyumluluğu ve kanda dolaşımı arttırmaktadır. Çalışmada triblok kopolimer kullanımı *in vivo* koşulda probu korurken, agregasyonu ve floresans şiddetin azalmasını engellemiştir.

1.8 Kuantum Nanoparçacıklarının Sitotoksitesi

Kuantum nanoparçacıkları kadmiyum (Cd^{+2}) ve kurşun (Pb^{+2}) gibi toksik bileşenlerden meydana gelmektedir. Bu elementler zamanla kuantum nanoparçacıklarından salınarak hücreye zarar verebilirler. Belirli bir zaman dilimi boyunca UV ışımaya maruz bırakılan kuantum nanoparçacıklarının kültür hücrelerine toksik etki gösterdiği ispatlanmıştır (Derfus et al. 2004). UV ışımalarının enerjisi kovalent kimyasal bağın enerjisine yakındır ve yarı-iletken parçacıkları foto-degradasyona uğratarak yapısal olarak bozabilir. Böylece yapıda bulunan toksik Cd^{+2} iyonları kültüre salınarak ölümcül etki oluştururlar. UV ışımının yokluğunda ise kuantum nanoparçacıklarının stabil bir polimer ile kaplanması dahilinde hücrelerin ATP üretimine ya da hücre bölünmesine herhangi bir olumsuz etki sergilemediği görülmüştür.

Nanoparçacıkları biyolojik olarak inert hale getirmenin direkt yolu yüzeylerini en uygun şekilde modifiye etmekten ibarettir. Kaplama materyalleri, düşük ya da hiç toksik etki göstermeyecek PEG gibi organik moleküller/polimerler ya da silika ve ZnS gibi inorganik tabakalar olabilir. Etkisiz yüzey kaplama yöntemi ve zayıf saflaştırma sonucunda kuantum nanoparçacıklarının Cd^{+2} salınımına bağlı olarak ekstraselüler toksisite gösterdiği kanıtlanmıştır (Derfus et al. 2004). Merkaptasetik asit, merkaptopropiyononik asit, 11-merkaptoundekanoik asit ve 2-aminoetantiyol gibi basit moleküller ile kaplanan kuantum nanoparçacıkları silika kaplı olanlara oranla daha fazla toksik etki göstermektedirler. Silika tabakası diğer olası yüzeylere göre daha kalın olduğundan fizyolojik koşullarda kadmiyum ya da kurşun iyonlarının salınımını

engelleyerek toksik etkiyi azaltmaktadır (Hoshino et al. 2004). Öte yandan Chang ve grubu, kuantum nanoparçacıklarının endositozis yoluyla hücre içerisine alınarak yüzey fonksiyonel grupları ne olursa olsun hücre içerisine alınan miktarla direkt ilişkili olarak toksik etki yarattıklarını ispatlamışlardır (Chang et al. 2006). Yine de, yüzey yapısı kuantum nanoparçacıklarının hücre içerisine alınımı etkileyerek intraselüler sitotoksiteyi dolaylı olarak etkilemektedir (Chang et al. 2005).

Biyomedikal görüntüleme ve tayin alanında kullanılan, yüzeyleri kompleks moleküllerle modifiye edilen kuantum nanoparçacıklarının fark edilebilir düzeyde bir toksik etki gösterdiği yapılan çalışmalarda kanıtlanamamıştır (Michalet et al. 2001; Alivisatos 2004; Ballou et al. 2004). Yapılan bir çalışmada, kuantum nanoparçacıkları ile işaretlenen tümör hücreleri dolaşıma katılıp doku içersine temas ederek tıpkı işaretlenmemiş hücrelerde olduğu gibi farelerin 40 gün sonrasında tümör oluşturma yeteneklerinde olumsuz bir etki yaratmamışlardır. Böylelikle kuantum nanoparçacıklarının taşıyıcı canlıda ve hücrede tersi fizyolojik bir etkiye sebep olmadığı kanıtlanmıştır (Voura et al. 2004). Yu ve ekibi tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada, PEG içeren amfilik polimerler ile kaplanmış kuantum nanoparçacıklarının 100 nM ve altındaki konsantrasyonlarda çok az hücre ölümlerine (< %15) sebep olduğunu tespit etmişlerdir (Yu et al. 2007).

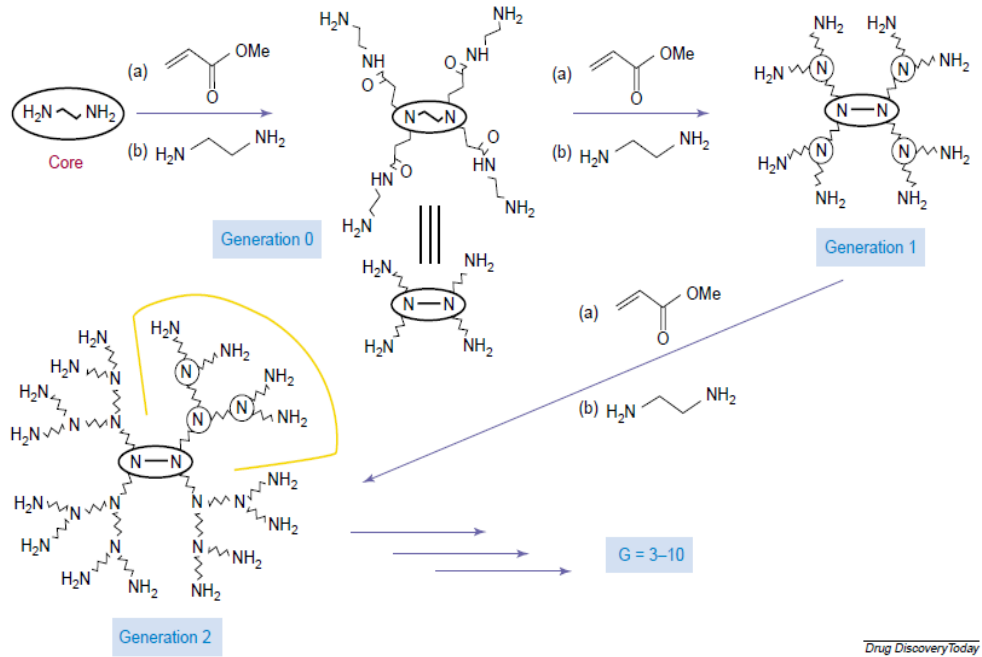
Uygun yüzey modifikasyon stratejileri ile kuantum nanoparçacıklarının toksik etkilerinin giderilmeye çalışılmasının haricinde toksik bileşenler içermeyen yüksek kaliteye sahip yeni kuantum nanoparçacıkları sentezlenmektedir. Peng ve grubu, 470-600 nm aralığında emisyonu sahip, kabul edilebilir kuantum verimi gösteren (%10-30) bakır (Cu) ya da çinko (Zn) gömülü ZnSe kuantum nanoparçacıkları sentezlemişlerdir (Pradhan et al. 2005). Bu yeni kuantum nanoparçacıkların olası toksik etkileri böylece düşürülebilecektir. Fakat, kuantum nanoparçacıklarının toksik etkisi bileşenleri ya da yüzey gruplarından değil de sadece kendi doğallıklarından da geliyor olabilir. Bu kuantum nanoparçacıkları absorbe olan optik enerjiyi yakınlarındaki oksijen molekülüne tranfer ederek hidroksil $\cdot\text{OH}$, süperoksit $\cdot\text{O}_2$ ve singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) gibi serbest radikaller olan reaktif oksijen türleri (ROS) oluştururlar ve sonuç olarak hücre ölümlerine sebep olurlar. Reaktif oksijen türleri CdS, CdSe, CdSe/ZnS (Ipe et al. 2005) ve CdTe (Lovric et al. 2005) gibi birçok kuantum nanoparçacık sisteminde tespit edilmiştir.

DNA'nın karanlık koşullar altında bile CdSe nanoparçacıkları tarafından üretilen serbest radikaller tarafından parçalandığı da kanıtlanmıştır (Green et al. 2005). Öte yandan üretilen bu reaktif oksijen türleri kuantum nanoparçacıklarını fotodinamik terapide (PDT) kullanılabilecek mükemmel problemler haline getirmektedir (Samia et al. 2003).

Toksisitenin yanında kuantum nanoparçacıklarının vücuttan atılımı ayrı bir araştırma konusudur ve bugüne kadar iyi bir şekilde aydınlatılamamıştır. Kuantum nanoparçacıkları uygulamadan en az 4 ay sonrasına kadar fare kemik iliğinde, dalağında ve karaciğerinde akümüle olmaktadır (Ballou et al. 2004). 50 nm ve altında boyuta sahip olan nanoparçacıklar böbrekten kolaylıkla temizlenmektedirler ve negatif yüklü nanoparçacıkların böbrekten temizlenme boyu daha düşüktür (Patrakka et al. 2002). Büyük ve stabil nanoparçacıkların hayvan ve insanlardan temizlenmesi ise karaciğerde gerçekleşiyor olabilir (Moghimi et al. 2001).

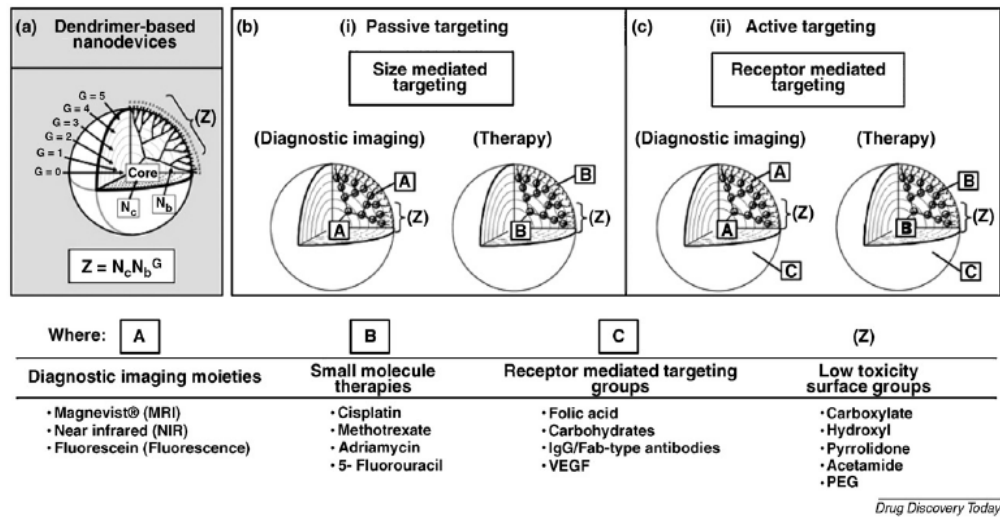
1.9 Poliamidoamin (PAMAM) Dendrimerleri

PAMAM dendrimerleri yüksek derecede dallanmış makromoleküllerden oluşmaktadırlar. Bu dallanmış yapıların çekirdeğini oluşturan en yaygın kullanılan başlangıç maddesi etilendiamindir (EDA). Çekirdek yapının etrafında 4 tane uzanan kol mevcuttur. Metil akrilatın (MA) tekrarlı reaksiyon zincirlerinden oluşan Michael katılımı ve EDA'nın aşırı ilavesi ile oluşan esterin amidasyonu sonucunda jenerasyonlar oluşur (Şekil 1.13) (Tomalia et al. 1985). Jenerasyon numarası reaksiyonun gerçekleşme oranına bağlı olarak değişir. Reaksiyon sırasının terminasyonuna göre bir diğer deyişle terminal grubun türüne göre O'dan başlayan jenerasyonlar tam (1, 2, 3, 4, vs) ya da yarım (1.5, 2.5, 3.5 vs) ile biten rakamlarla numaralandırılır. Herbir başarılı reaksiyon sonrasında herbir daldaki yüzey fonksiyonel gruplarının sayısı ikiye katlanır. Böylece jenerasyon sayısı arttıkça total yüzey grup sayısı eksponansiyel olarak artmış olur.



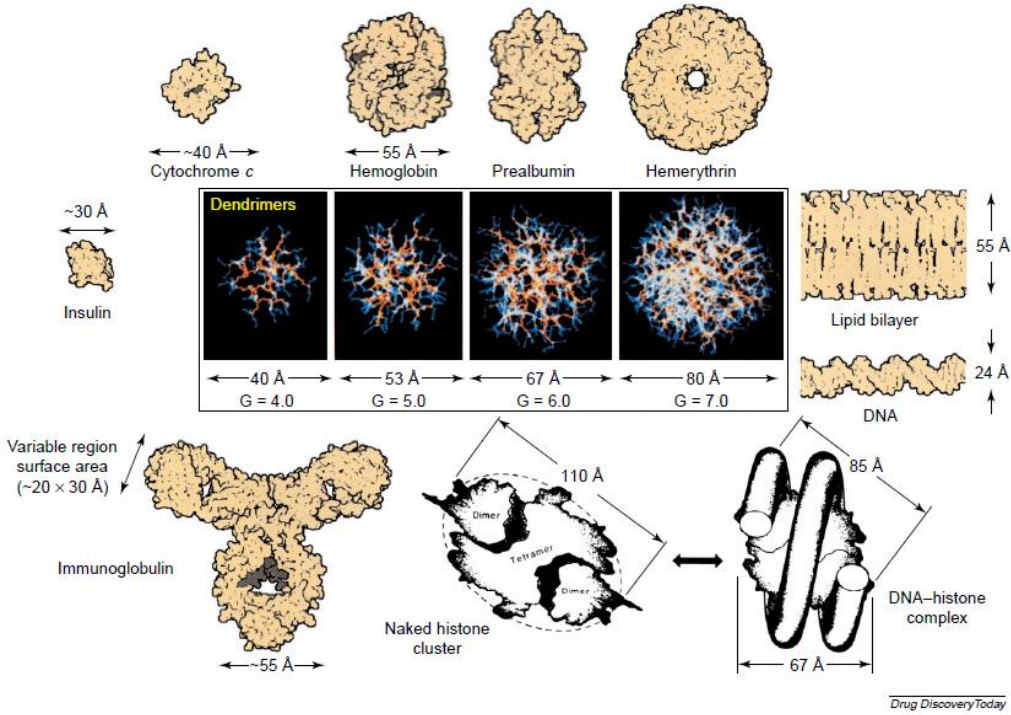
Şekil 1.13. Amin ve metil gruplarının Michael katılımı sonrasında tetra-fonksiyonel PAMAM dendrimerlerinin sentezi (Tomalia et al., 2010)

PAMAM dendrimerleri hedeflenmiş ilaç ve görüntüleme ajanlarının taşınımında kullanılmaya başlandıklarından beri kanser temelli araştırmalarda büyük ilgi görmektedirler (Stiriba et al. 2002; Majoros et al. 2005).



Şekil 1.14. Dendrimer yapıları ve hedefleme türleri. a)çekirdek(i), iç yapı (ii) ve terminal yüzey gruplarından (Z) (iii) oluşan dendrimerin genel topolojisi. b)Pasif hedefleme: görüntüleyici prob (A), terapi ajanı (B) ve düşük toksisiteye sahip terminal grubundan (Z) oluşan dendrimer temelli diyagnostik nanoyapılar. c) Aktif reseptör temelli hedefleme: görüntüleyici prob (A), terapi ajanı (B), reseptör hedefleyici grup ve düşük toksisiteye sahip yüzey grubundan (Z) oluşan dendrimer temelli diyagnostik nanoyapılar (Tomalia et al. 2010).

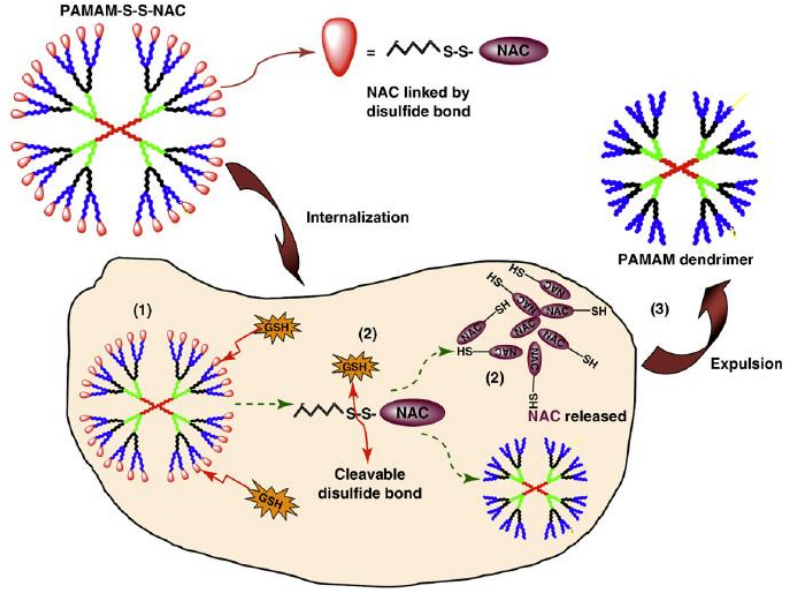
Karakteristik olarak toksik olmamaları onları biyolojik sistemlerde biouyumlu hale getirerek, kemotörapatik ilaçların kontrollü salınımda kullanılan diğer materyallere karşın avantajlı konuma getirmektedir (Malik et al. 2000). Dendrimer temelli nanocihazlar, multifonksiyonel ve biouyumlu olmalarından dolayı hedeflenmiş ilaç ve görüntüleme ajanlarının taşınım mekanizmalarının geliştirilmesinde önemli role sahiptirler (Şekil 1.14).



Şekil 1.15. Jenerasyon 4-7 PAMAM dendrimerlerinin boyutlarının çeşitli protein, membran lipid tabakaları ve DNA ile kıyaslanması (Tomalia et al. 2010)

Sonuç olarak çok sayıda yüzey fonksiyonel gruplarına sahip dendrimerler amaca uygun olarak biyolojik materyallerle aktive edilebilirler. Jenerasyon 7 (G7) ve altındaki PAMAM dendrimerleri biyomoleküllerin boyutlarına çok yakın olduklarından dolayı insan ve hayvan sistemlerinde multifonksiyonel taşıyıcı ajan olarak kullanılırlar (Şekil 1.15). PAMAM dendrimerinin iç kısmında bulunan tersiyer ve yüzeyinde bulunan primer amino grupları sayesinde pH bağımlı cevap oluşturmalarından dolayı düşük pH koşullarında spesifik olmayan

hedeflenmiş kontrollü ilaç taşıyım sistemlerinde uygulanmışlardır (Paleos et al. 2004).



Şekil 1.16. N-asetil sisteine disülfid bağı ile bağlanan 4. Jenerasyon (G=4) PAMAM dendrimerinin şematik gösterimi. Dendrimer ilacı intraselüler olarak hücre içersine alınır.Yapıdaki disülfid bağları intraselüler glutatiyon ile tiyol redoks yer değıştirme reaksiyonları sayesinde parçalanır. İlaç serbest kalırken dendrimer hücre dışına salınır (Tomalia et al. 2010).

PAMAM dendrimeri ile kuantum nanoparçacıklarının modifikasyonu

Yüksek derecede dallanmış yapıya sahip PAMAM dendrimerleri, sentetik yaklaşımlar için çoklu fonksiyonel uç grupları sayesinde eşsiz avantajlar sunmaktadırlar. Çoklu konjugasyon grupları hem yoğun olarak fonksiyonlandırılmış hem de yapısal açıdan stabilize edilmiş nanoyapılar oluşturular (Tomalia et al. 2010). Farklı fonksiyonel uç gruplara sahip PAMAM molekülleri bu nedenlerden dolayı rahatlıkla kuantum nanoparçacık yüzeylerine uygulanabilirler. Amin yüzey gruplarına sahip dendrimerlerin, polielektrolit doğalarından kaynaklanan elektrostatik stabilizasyon etkisi, hücreye yüksek bağlanma kapasitesi, özellikle yüksek jenerasyonların yüksek membran geçirgenliği (Chauhan et al. 2004; Khandare et al. 2005) ve nanoparçacıkların endozomal kaçışlarını sağlayacak yüksek tamponlama kapasitesi gibi avantajları vardır. Hücre içersine alınan kuantum nanoparçacıkları sitozole

giremediklerinden dolayı veziküllerde depolanırlar. QD nanoparçacıklarının yüzeyindeki PAMAM'a ait tersiyer ve primer amin gruplarının yüksek tamponlama kapasitesi sayesinde PAMAM, nanoparçacıkların veziküllerden kurtularak sitozole geçmesini sağlar (Boussif et al. 1995; Verkman et al. 2003; Langer et al. 2005; Higuchi et al. 2011). Bu endozomal kaçışa ek olarak, QD nanoparçacıkları asidik koşullarda floresans özelliklerini kaybetmektedirler. İçeriği asidik olan veziküllerde PAMAM dendrimeri, kuantum parçacıklarının stabilizasyonunu sağlayarak kuantum verimliliklerini korumaya yardımcı olur (Silver et al. 2005).

Bu zamana kadar üzerinde yoğun çalışmalar yapılmış olup yapısal açıdan tamamen kesinleştirilmiş nano-yapılar sunan dört adet nanoteknoloji platformu vardır: i) nanotüpler, ii) fullerener, iii) kuantum nanoparçacıklar ve iv) dendronlar/dendrimerler (Santos et al. 2011). Bu çalışmada dendrimerlerin yukarıda bahselin avanjalı karakterlerinden ve CdSe/ZnS kuantum nanoparçacıklarının etkin floresans özelliklerinden yararlanılarak iyi bir şekilde karakterize edilmiş polar fazda çözünebilen PAMAM/QD komplekslerinin oluşturulması amaçlanmıştır. Bildiğimiz kadarıyla PAMAM dendrimerlerinin QD yüzey modifikasyonunda kullanılmaları çok günceldir (Higuchi et al. 2011; Santos et al. 2011). Genellikle nanokristallerin enkapsülasyonunda tiyol uç gruplarına sahip dendron/dendrimerler kullanılmıştır (Peng et al. 2002; Tomalia et al. 2005; Ren et al. 2010; Santos et al. 2011). Fakat tiyol grupları foto-oksidasyona çok eğilimli olduklarından dolayı (Peng et al. 2002), stabilizasyonu arttıracak amin, karboksil, hidroksil, fosfin oksit ya da fosfonik asit gibi farklı fonksiyonel gruplar ilgi alanındadır. Yakın zaman öncesinde Zhao ve grubu (2010), folat-PEG-PAMAM ile modifiye edilmiş QD nanoparçacıklarının HeLa hücreleri tarafından spesifik alınımını incelemiştir. Bu çalışma literatürde QD yüzeylerini amin-fonksiyonlu PAMAM dendrimeri ile modifiye eden ilk çalışma olarak kaydedilmiştir (Zhao et al. 2010). Fakat çalışmada ayrıntılı yüzey karakterizasyonuna ilişkin (dendrimer bağlanma oranı ve verimi, ligand yoğunluğu) denemeler mevcut değildir. Sonuç olarak QD yüzeylerinin amin gruplarına sahip PAMAM dendrimerleri ile modifikasyonunun yüzey kimyası ve yüzey kimyasının hücreler ile olan etkileşimi nasıl etkilediğine dair ayrıntılı çalışmalar henüz yayınlanmamıştır.

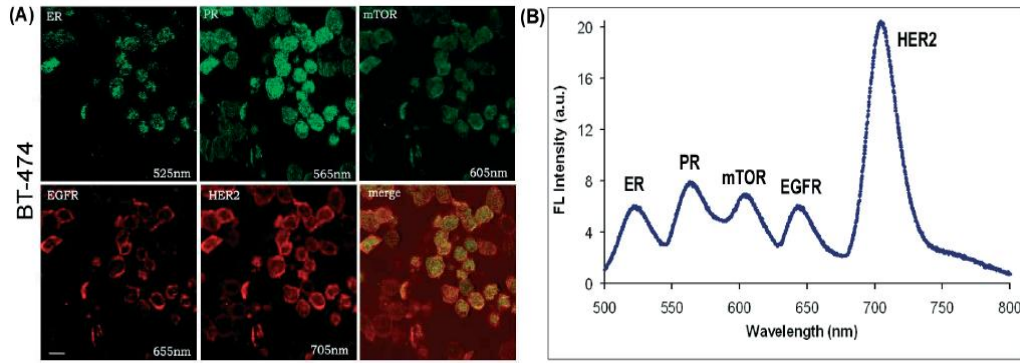
1.10 Human Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2 (HER2) Spesifik Hedefleme

Reseptör tirozin kinaz (RTK) sınıfından erbB ailesi, erbB1 (klasik EGF reseptörü, EGFR), erbB2, erbB3 ve erbB4'ten oluşmaktadır. Bu transmembran proteinlerinin aktivasyonu, kaskat sinyal iletim mekanizması oluşturarak DNA replikasyonu gibi birçok hücresel prosesi kontrol etmektedir (Yarden et al. 2001). Ligand bağlanması, sitoplazmik protein kinazların oto ve transaktivasyonuna neden olur. Buna cevap olarak homo ve hetero RTK monomeleri oluşur ya da yeniden oryante olurlar (Sako et al. 2000). Aktive edilmiş reseptörlerin sonrasındaki akıbetleri karışıktır: endositozis, kovalent modifikasyon (enzimatik deforforilasyon ve ubikitinasyon ile deaktivasyon) ve proteosomal ve/veya lisosomal degradasyon ya da plasma membranlarına geri dönüşmeleri söz konusudur.

erbB ailesinin özellikle erbB2'nin fazlaca ekspresyonu ve/veya bastırılmış aktivasyonu birçok kanser türünde meydana gelmektedir (Sako et al. 2000; Hynes et al. 2001). HER-2 (erbB-2, Human epidermal büyüme faktör reseptörü-2) geni 185,000 Da'luk transmembran glikoproteinini kodlamaktadır. Mitogenezis, apoptozis, anjiyogenezis ve hücre farklılaşması ile sonuçlanan lateral sinyal iletimini yönetir (Menard et al. 2000). İmmunoterapi alanında bu reseptör büyük önem taşıyan bir moleküldür. HER2 reseptörünün fazlaca ekspresyonu özellikle göğüs ve ovaryum kanserinde (Slamon et al. 1989) görülmektedir ve klinik araştırmalar henüz yetersiz düzeydedir. Meme kanser vakalarının %20-30'unda HER2 reseptörü fazlaca üretilmektedir (Slamon et al. 1989). HER2 reseptörünün tümör hücrelerinde fazlaca üretimi, HER2 temelli hedeflenmiş terapinin, ilaç taşınım ve görüntüleme ajanlarının geliştirilmesinde çok büyük bir potansiyel oluşturmaktadır. Buna ilave olarak HER2 reseptörünün ekstraselüler domaini, reseptör-temelli ilaç taşınım sistemlerinin geliştirilmesi için ideal bir hedeflenme molekülüdür. HER2 reseptörüne spesifik monoklonal antikolar (anti-HER2) HER2 üreten kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiklerinden dolayı HER2 hedefli terapilerde önemli stratejiye sahiptirler.

Meme kanser hücrelerinin floresans probalar ile spesifik olarak işaretlenmelerinde HER2 reseptörünün yanında nükleer östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörleri, sitoplazmik antijen olan mTOR (Mammalian

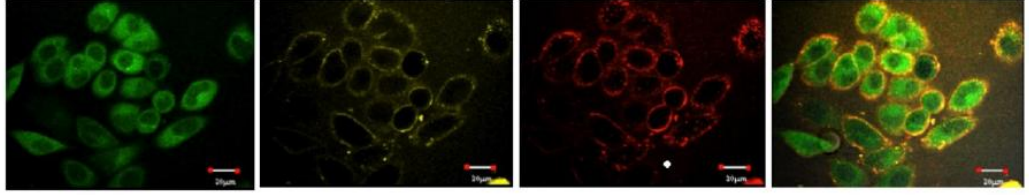
Target of Rapamycin), hücre yüzey reseptörü olan EGFR ve metadherin reseptörleri de hedef olarak kullanılmaktadırlar. Yezhelyev ve grubu, antikor ile modifiye ettikleri kuantum nanoparçacıklarını meme kanser hücrelerinde 5 farklı reseptörün kantitatif tayininde kullanmışlardır (Yezhelyev et al. 2007). Elde edilen fluoresans şiddetlerine göre BT-474 meme kanser hücrelerinde HER2 reseptörlerinin diğer reseptörlere göre daha fazla eksprese edildiğini ileri sürmüşlerdir (Şekil 1.17).



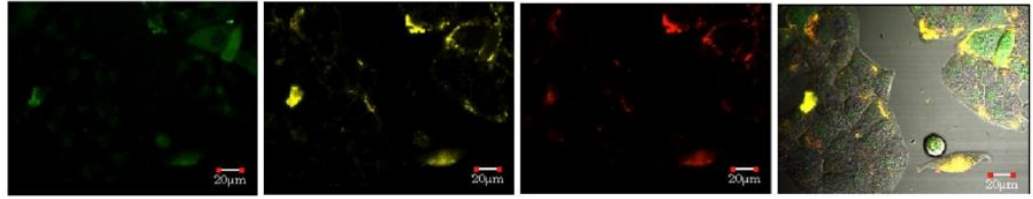
Şekil 1.17. BT-474 meme kanser hücrelerinin nükleer hormon reseptörlerinin (estrogen (ER) ve progesteron reseptörü (PR), hücre membran yüzeyi antijenlerinin (HER2, EGFR) ve sitoplazmik mTOR proteinin antikor işaretli kuantum nanoparçacıkları ile işaretlenmesi. A) BT-474 hücrelerinin belirtilen 5 reseptörü de ürettiğini gösteren pozitif işaretleme, B) tümör ilişkili reseptörlerin farklı oranlarda eksprese edildiğini gösteren kuantum nanoparçacık emisyonları (Yezhelyev et al. 2007)

Bir başka çalışmada, yine HER2 spesifik antikor ile işaretlenen üç farklı dalga boyuna sahip kuantum nanoparçacıkları, KPL-4 meme kanser hücrelerinin işaretlenmesinde kullanılmışlardır. Reseptör-spesifik işaretlenmenin etkinliği kontrol hücre grubu kullanılarak (HeLa hücreleri) incelenmiştir (Jin et al. 2009). Beklendiği üzere HER2 reseptörünü fazlaca eksprese eden KPL-4 hücreleri spesifik olarak görüntülenirken, HeLa hücrelerinde etkin bir bağlanma gözlenmemiştir (Şekil 1.18).

a) KPL-4 cells



b) HeLa cells



HER2Ab-QD (540 nm) HER2Ab-QD (585 nm) HER2Ab-QD (650 nm)

Merge

Şekil 1.18. HER2 spesifik antikor (HER2Ab) ile işaretli kuantum nanoparçacıkları (540 nm-yeşil, 585 nm-sarı, 650 nm kırmızı) ile işaretlenmiş KPL-4 hücrelerine ilişkin alınan konfokal mikroskobu görüntüleri. Hücreler HER2Ab-QD nanoparçacıkları ile 37 °C’de 30 dk boyunca inkübe edilmişlerdir (Jin et al. 2009).

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Kimyasallar

PAMAM dendrimer (P-G5; etilendiamin çekirdek, jenerasyon 5,0), Etil asetat ($\geq$ % 99,8), Tetrametilamonyum hidroksit sölüsyonu (% 25 wt metanolde), N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorit (EDC), N-Hidroksisüksinimid (NHS) ve CdSe/ZnS (560 nm, 5mg/mL tolüende) Sigma-Aldrich'ten satın alındı. pH 7,4 fosfat tampon tuzu (Phosphate buffer saline; PBS) % 0,8 sodyum klorit, % 0,02 potasyum klorür, % 0,144 disodyum hidrojen fosfat ve % 0,024 potasyum dihidrojen fosfat kullanılarak hazırlandı. Anti-HER2 (c-erbB-2) klon TAB250 ve Minimum Esansiyel Medium tozu (MEM) Invitrogen firmasından temin edildi. Dulbecco's Modified Eagle's Medium tozu (yüksek glukoz içerikli) (DMEM), human insulin sölüsyonu ve 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromit (MTT) Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Sodyum dodesil sülfat (SDS) Applichem'den temin edildi. Diğer bütün hücre kültürü ortam bileşenleri PAA Laboratories GmbH firmasından satın alındı. MCF-7 (meme adenokarsinoma hücre hattı), A-549 (akciğer adenokarsinoma hücre hattı), HEP-G2 (karaciğer adenokarsinoma hücre hattı) DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) firmasından sipariş edildi.

2.2 Kuantum Nanoparçacıklarının PAMAM Dendrimeri ile Modifikasyonu (P/QDs konjugatlarının sentezi)

Hegzadesilamin (HDA) ile stabilize edilmiş tolüen içerisindeki CdSe/ZnS kuantum nanoparçacık (QDs) çözeltisi (560 nm, 0,5 mL, 5.0 μ M) içersine, 0,5 mL PAMAM G5 dendrimeri (150 μ M, metanol içersinde) çözeltisi damla damla ilave edildi. Sonrasında fazların karışımını kolaylaştırmak ve reaksiyonu hızlandırmak için ortama 150 μ L tetrametilamonyum tuzu ilave edilerek karışım 30 °C ve 1000 rpm'de 15 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyon bitiminde ortama 1:3 (w/w) oranında etilasetat ilave edilerek PAMAM/QD nanokompleksleri 30 dk, 10.000 rpm'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöktürülen nanokompleksler etilasetat ile 2 kez yıkandı (5 dk, 10.000 rpm). Saflaştırılan PAMAM ile modifiye edilmiş kuantum nanoparçacıkları (P/QDs) pH 7,4 PBS tamponunda çözüldü. Reaksiyon sonucunda, hegzaadesilamin (HDA) ile stabilize edilmiş kuantum nanoparçacıklarının yüzeyindeki amin grupları, PAMAM dendrimerinin amin

grupları ile yer değiştirerek QD yüzeyleri PAMAM molekülleri ile kaplanmıştır. Bağlanmayan PAMAM molekülleri 50 kDa por çapına sahip membran filtreler (Millipore Amicon Ultra 0,5 ml, USA) kullanılarak ortamdan uzaklaştırıldı.

2.3 Bradford Reaktifi ile PAMAM Moleküllerinin Tayini

Bradford reaktifinin bileşeni olan Coomassie Blue kimyasalı, negatif yüklü sülfonik asit grupları aracılığı ile proteinlerin pozitif yüklü amin gruplarına iyonik etkileşimlerle ve yanı sıra Van der Waals etkileşimleri ile bağlanarak 595 nm’de renk değişimi verir. Bu yöntem protein tayininde kullanılmaktadır. PAMAM dendrimerleri çok sayıda pozitif yüklü amin grubuna sahip olduklarından dolayı bu reaktife cevap vermektedirler. Bu sebeple, kuantum nanoparçacıklarının yüzeyine bağlanan PAMAM moleküllerinin sayısı Bradford yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Bunun için, 10 µL örnek, 200 µL reaktif ile karıştırılarak 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 595 nm’deki absorbanslar mikropłaka okuyucuda (Model 680, BioRad) kaydedildi. PAMAM molekülüne ilişkin çizilen lineer aralık grafiğı kullanılarak kuantum nanoparçacık yüzeyine bağlanan PAMAM molekül sayısı hesaplandı.

2.4 Anti-HER2 Antikorumun P/QDs Konjugatlarına Çapraz Bağlanması (P/QDs-AntiHER2)

HER2 spesifik antikorun PAMAM modifiye kuantum nanoparçacıklarına (P/QDs) çapraz bağlanmasında EDC/NHS kimyası kullanıldı. Antikorum karboksil grupları EDC ile aktiveştirilerek kuantum nanoparçacığına bağlı PAMAM dendrimerinin amino grupları NHS varlığında antikorum karboksil gruplarına çapraz bağlandı. Bunun için; 25 mM pH 6,0 MES tamponunda hazırlanmış 0,1M EDC ve 0,25 M NHS çözeltileri Anti-HER2 solüsyonuna (0,01 mg/ml) ilave edilerek 30 dk oda sıcaklığında karıştırıldı. İnkübasyon sonrasında P/QDs (pH 7,4 PBS) çözeltisi ortama damla damla ilave edilerek 2 saat oda koşullarında karıştırıldı. Reaksiyon bitiminde fazla EDC ve NHS, bağlanmayan P/QDs konjugatları ile antikor molekülleri 300 kDa por çapına sahip membran filtreden (VWR Nanosep Omega, Almanya) geçirilerek ortamdan uzaklaştırıldı.

2.5 Floresans Ölçümler

QDs konjugatlarına ilişkin floresans ölçümler 2,0 µL örnek kullanılarak Nanodrop 3300 (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) spektrofotometre ile yapıldı. Nanoparçacıkların eksitasyonu (uyarılması) 460 ± 10 nm’de gerçekleştirildi. PAMAM ile modifikasyon öncesi ve sonrasında floresans spektrumlar alınarak konjugasyonun, kuantum nanoparçacıklarının floresans özelliğine olan etkisi incelendi. Ayrıca PAMAM ve P/QDs moleküllerine ilişkin absorbans profilleri alınarak konjugasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği (NanoDrop 1000 spektrofotometre, Thermo Fisher Scientific Inc. USA) tayin edildi.

2.6 Boyut Analizleri

PAMAM ve PAMAM ile modifiye edilmiş kuantum nanoparçacıklarına (P/QDs) ilişkin boyut analizleri, dinamik ışık saçılımı (dynamic light scattering, DLS, Malvern Nano-ZS, 633 nm He/Ne lazer) ve taramalı elektron mikroskopi (scanning electron microscopy, SEM, JSM 6700F NT) yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi. 3,4 nm boyuta sahip olan CdSe/ZnS nanoparçacıklarının PAMAM ile modifikasyon sonrasında boyutunda meydana gelen artış incelendi. DLS ölçümleri PBS 7,4 tamponunda gerçekleştirildi. Ölçümlerde baz alınan refraktif indeks değerleri; PBS için 1,374; kuantum nanoparçacıkları için 2,4; PAMAM için 1,348; ayrıca materyal absorpsiyonu 545 nm ve çözelti viskozitesi 0,8882 olarak ele alınmıştır.

2.7 Hücre Kültürü Çalışmaları

MCF-7 meme kanser hücreleri, % 10 fetal buzağı serumu, 1,0 mM sodyum piruvat, 2,0 mM L-glutamin, 10 µg/mL insulin, % 1,0 esansiyel olmayan amino asit ve 10 mL/L penicilin/streptomisin ilavesiyle hazırlanan Minimum Esansiyel Eagle (MEM) ortamında yetiştirildi. A-549 akciğer ve HEP-G2 karaciğer kanser hücre hatları ise % 10 fetal buzağı serumu ile 10 mL/L penicilin/streptomisin içeren Dulbecco ile modifiye edilmiş Eagle’s ortamı (DMEM) içerisinde yetiştirildi. Hücreler, 37 °C’de % 5,0 CO₂ içeren nemli atmosferde 4 saat inkübe edildi. Floresans mikroskopi ve sitotoksite çalışmaları sırasında aynı

inkübasyon koşulları uygulandı. Örnek uygulama aşamalarından önce ortam uzaklaştırılıp hücreler 2 kez 100 µL PBS tamponu ile yıkandı.

2.8 Toksisite Testi

P/QDs konjugatlarının konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkileri MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid) testi uygulanarak incelendi. Özetle, MCF-7(meme) ve model olarak seçilen; A-549 (akciğer) ile HEP-G2 (karaciğer) kanser hücre hatları 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,02; 0,01 ve 0,002 µM kuantum nanoparçacık içeren P/QDs konjugatları ile 96 kuyucuklu mikrotiplalarda 37 °C’de 4 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler PBS ile 2 kez yıkandı. Sonrasında kuyucuklara 110 µL MTT ilave edilerek hücreler 4 saat boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Ardından 100 µL % 1,0 HCl içerisinde hazırlanan % 10’luk SDS çözeltisi ilave edilerek 24 saat boyunca hücreler yeniden inkübe edildi. Metabolik aktiviteye sahip hücreler, sarı renkteki MTT reaktifini hücre içerisinde mor renkli formazan kompleksine dönüştürürler. Ortama SDS ilavesi ile bu hücre içerisindeki mor kristaller çözünerek çözeltiye renk verirler. Bu prensiple, 570 nm’deki (630 nm referans dalga boyuna karşın) absorbans değerleri mikrotipla okuyucu (Model 680, BioRad) ile kaydedilerek hücrelerin viyabiliteleri hesaplanmıştır. Viyabilite hesabında; örnek ile muamele edilmeyen hücrelerin verdiği absorbans kör değerinden çıkarılarak 100 olarak değerlendirilip, örnek uygulanan kuyucuklara ilişkin absorbanslar değerleri bu referans değere göre oranlanarak % viyabilite sonuçlarına ulaşılmıştır.

Ayrıca eksponansiyel regresyon analizleri kullanılarak, MTT verilerinden IC50 (% 50 inhibisyon konsantrasyonu, µM), NOAEC (görünür bir etkinin bulunmadığı konsantrasyon değeri, µM) ve TLC (total ölüm konsantrasyonu, µM) değerleri hesaplandı. Bu hesaplamalarda $(y = 1 - \frac{1}{1 + e^{a \times (b - x)}})$ eşitliğinden yararlanıldı. Bu eşitlikte a ; normalize edilmiş maksimum hücre viyabilite değerini, b ; eğimi ve x ; örnek konsantrasyonunu simgelemektedir (Lestari et al. 2006).

2.9 Floresans Mikroskobu Uygulamaları

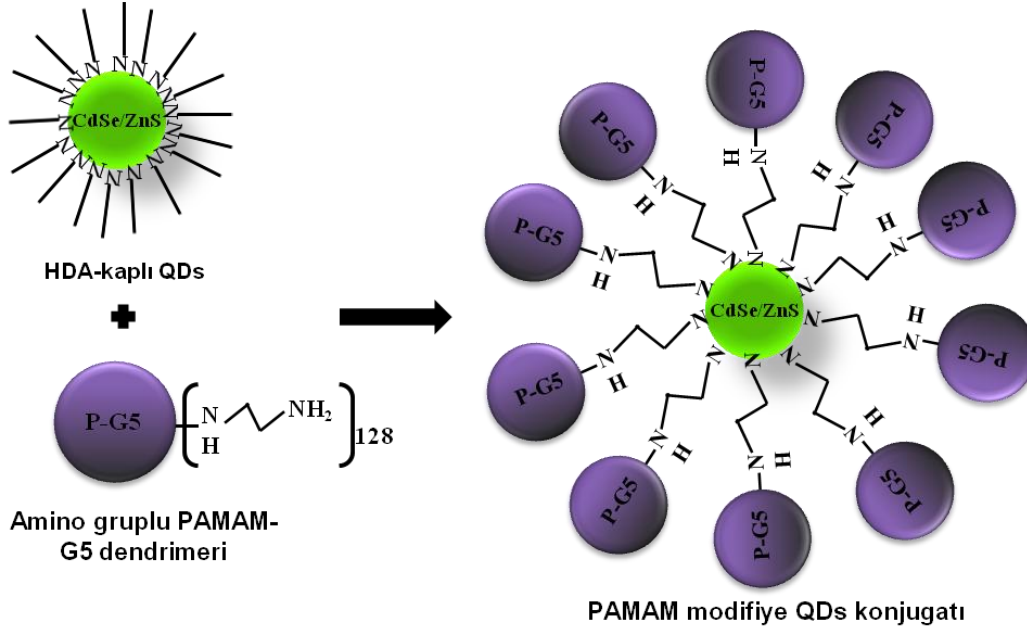
Floresans mikroskobu görüntüleri, dijital kamera (Olympus, C3040-ADU, Japonya) ile entegre edilen, Olympus IX50 (Olympus Amerika Inc.) görüntüleme

sistemi ile kaydedildi. Görüntüler Cell^B yazılımı (Olympus, Japonya) kullanılarak analizlendi. Floresans işaretli hücrelerin görüntülenmesinde U-MNB (filtre), DM500 (dikronik ayna), BP470-490 (eksitasyon) ve BA515 (bariyer) filtreleri kullanıldı. 96 kuyucuklu mikrolakalarda yetiştirilen MCF-7 hücreleri, HER2 reseptör spesifik antikor ile modifiye edilmiş (PQDs/HER2) ve edilmemiş P/QDs (100 µL) konjugatları ile muamele edildi. Hücreler 4 saat 37 °C de inkübe edildikten sonra 2 kez PBS tamponu ile yıkandı. Yıkama sonrasında hücrelere 50 µL PBS ilave edilerek floresans mikroskobunda görüntüler alındı.

3. SONUÇLAR VE YORUMLAR

3.1 Kuantum Nanokristallerinin PAMAM Dendrimeri İle Modifikasyonu (P/QDs sentezi)

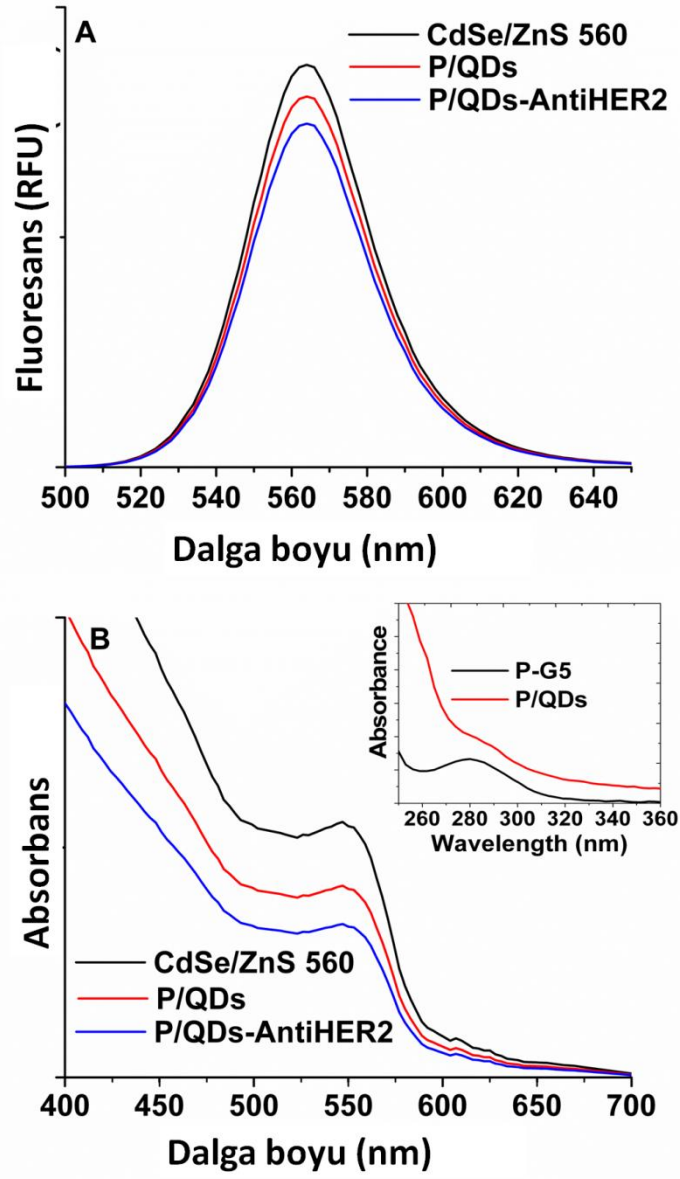
Toluen içersinde hegzadesilamin (HDA) ile stabilize edilmiş kuantum nanoparçacıkları, PAMAM dendrimeri ile faz değiştirme reaksiyonu sonucunda suda çözünür forma getirildi. HDA molekülünün amino grubu PAMAM molekülünün amino grubu ile yer değiştirerek, kuantum nanoparçacıklarının etrafı PAMAM dendrimerleri ile kaplanmıştır (Şekil 3.1). Bu yer değiştirme reaksiyonu çinko (Zn) atomlarının amin gruplarına karşı olan affinitesine dayanmaktadır. Elde edilen PAMAM ile modifiye edilmiş kuantum nanoparçacıkları (P/QDs) suda çözünür formdadır. Ligand yer değiştirme reaksiyonunda, aynı ligantlar yer değiştirildiğinde (HDA'nın amin grubu ile PAMAM'ın amin grubu) modifikasyonun daha etkin bir şekilde gerçekleştiği ve yapısal açıdan daha stabil komplekslerin oluştuğu tahmin edilmektedir (Duan et al. 2007). Bunu incelemek için yüzeyi TOPO/HDA karışımı ile stabilize edilmiş CdSe/ZnS (640 nm) kuantum nanoparçacıkları aynı faz-değiştirme reaksiyonuna maruz bırakıldı. Reaksiyon sonrasında saflaştırılan konjugatlar polar faza alındıklarında ortamda ciddi derecede agregatlaşmalar meydana geldi. Bu agregat oluşumunun olası nedenlerinden biri; TOPO ile PAMAM grupları arasında etkin bir şekilde gerçekleşmeyen ligand-yerdeğiştirme reaksiyonu sonrasında yüzeyde kalan TOPO ligandları arasında hidrofobik etkileşimlerin gerçekleşmiş olmasıdır. Bir diğeri de amin grupları, $-P$ ve $P=O$ gruplarına ilgi duymaktadırlar. Bu da, PAMAM moleküllerinin TOPO yüzeylerinde gelişi güzel adsorpsiyonuna ve büyük konjugat kümelerinin oluşmasına neden olmuş olabilir. Bu deneme sonucunda, CdSe/ZnS yüzeylerinin kontrollü bir şekilde ligand-yer değiştirme reaksiyonu sonucunda PAMAM dendrimeri ile modifiye edildiğini iddia edebiliriz.



Şekil 3.19. HDA ile stabilize edilen CdSe/ZnS kuantum nanoparçacıkları ile PAMAM dendrimeri arasında meydana gelen ligand-yer değiştirme reaksiyonu; HDA molekülünün terminal amin grupları, PAMAM molekülünün terminal amin grupları ile yer değiştirmektedir. Elde edilen PAMAM/QDs (P/QDs) nanokompleksleri, sonrası karakterizasyon ve uygulama adımları için PBS 7,4 tamponunda çözüldü.

3.2 P/QDs Konjugatlarının Karakterizasyonu

Kuantum nanoparçacıklarının (QDs) PAMAM ile modifikasyonu sonrasında karakterizasyonu, floresans ve absorbans profillerine bakılarak gerçekleştirildi. Floresans spektrumunda, modifiye edilmemiş CdSe/ZnS nanokristalleri 563 nm’de maksimum emisyon göstermektedirler. PAMAM molekülleri ile yüzey modifikasyonu sonrasında, QD molekülünün floresans spektrumu yeniden incelendiğinde maksimum emisyon pikinde herhangi bir kayma meydana gelmediği gözlemlendi (Şekil 3.2.a). Bu sonuç, QD yüzeyinde meydana gelen yapısal değişikliğin, kuantum nanoparçacığın floresans özelliğine herhangi bir olumsuz etki göstermediğini kanıtlamaktadır. Öte yandan, QDs ve serbest PAMAM molekülleri, sırası ile 545 ile 280 nm’de maksimum absorbansa sahiptirler. Konjugatlara ilişkin UV-görünür bölgede alınan absorbans profillerine bakıldığında, aynı piklerin (yani 280 nm’de PAMAM’a ilişkin ve 545 nm’de QD’a ilişkin) var olduğunu görmekteyiz. Bu sonuçlar bize konjugasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamaktadır (Şekil 3.2.b).



Şekil 3.20. Modifiye edilmemiş CdSe/ZnS nanoparçacıkları (siyah) ile PAMAM (kırmızı) ve PAMAM/AntiHER2 ile modifiye edilen (mavi) kuantum nanoparçacıklarına ilişkin A) floresans, B) UV-görünür bölge spektrumları (CdSe/ZnS nanoparçacıkları 460 ± 10 nm de uyarıldı; B) İç kısımda yer alan grafik 280 nm’de serbest PAMAM ve PAMAM modifiye QDs nanoparçacıklarına ilişkin absorban spektrumunu göstermektedir).

Ayrıca Şekil 3.2.a’ da görüldüğü üzere, yapıya antikor ilavesi, kuantum nanoparçacıklarının optik özelliklerinde ilave bir değişikliğe neden olmamıştır. Fakat burada belirtilmesi gereken şudur ki, yüzey modifikasyonu sonrasında QD moleküllerinin floresans şiddetinde azalmalar meydana gelmiştir. Kuantum nanoparçacıklarının organik fazda sentezi sırasında yüzeylerinde defekte olmuş

noktalar meydana gelmektedir. Yüzey modifikasyon işlemleri sonrasında nanoparçacıklar polar faza transfer edildiklerinde bu defekte olmuş noktalar kuantum verimlerinin düşmesine neden olmaktadır. Bilindiği üzere organik fazda sentezlenen QD nanokristallerinin quantum verimlilikleri, polar fazda sentezlenen ya da sonrasında faz değiştirme reaksiyonları ile yüzey modifikasyonuna maruz bırakılan QD'lardan her zaman daha yüksektir. Bu doğrultuda, PAMAM ile modifikasyon sonrası kuantum nanoparçacıklarının floresans şiddetlerinin düşmesi beklenen bir sonuçtur. Öte yandan, temel optik özelliklerin korunmuş olması ve QDs'ların foto-sönümlmeye karşı olan yüksek dayanıklılıkları, kuantum nanokristallerinin hücre görüntüleme denemelerinde başarılı bir şekilde kullanılmasına olanak sağlamıştır.

3.3 Bağlanan PAMAM Moleküllerinin Bradford Testi İle Tayini

QD nanokristalleri, 10, 20, 30 ve 50 kat fazla mol oranına sahip PAMAM molekülleri ile modifiye edildi. QD molekülüne bağlanan PAMAM sayısı Bradford yöntemi kullanılarak tayin edildi. Bradford testi genellikle protein tayininde kullanılan, Coomassie Brilliant Blue boyasının, tayini yapılmak istenen moleküle bağlanması sonrasında absorbandsında meydana gelen sapmayı temel alan kolorimetrik bir yöntemdir. Boya ile tayin edilen bileşen arasında kompleks oluşumunu sağlayan etmenlerden biri, molekülün pozitif grupları ile boyanın negatif grupları arasında meydana gelen iyonik etkileşimlerdir. Dolayısıyla bu yöntem pozitif yüklü PAMAM moleküllerinin tayininde de büyük bir hassasiyetle kullanılabilir. PAMAM molekülüne ilişkin elde edilen standart kalibrasyon grafiğinin aralığı 0,1- 2,5 μ M olup eğri denklemi: $y = 0,994 - 0,005 (R^2 = 0,999)$ şeklindedir. Bu denklem aracılığı ile hesaplanan PAMAM miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Sonuç olarak, QD molekülüne ortalama maksimum 28 adet PAMAM molekülünün bağlandığı hesaplandı ve bu da demektir ki kuantum nanoparçacık yüzeyi yaklaşık 28 PAMAM molekülü ile doymuş hale gelmektedir. Doymuşluk noktasına ulaşıncaya kadar bağlanma verimi giderek azalmaktadır. PAMAM mol oranı 50'ye çıkartıldığında ise bağlanma veriminin (% 51,4) iyice düşerek ortalama 26 PAMAM molekülünün bağlandığını görmekteyiz.

PAMAM molekül boyutunun (5,6 nm), kuantum nanoparçacığının boyutundan (3,7 nm) daha fazla olduğunu göz önünde bulundurursak, 28 PAMAM molekülünün QD yüzeyine bağlanabiliyor olması bu noktada düşündürücü olabilir. Çünkü yüzey modifikasyonu sterik etkilerle kontrol ediliyor olmalıdır. Fakat öte yandan PAMAM moleküllerinin iç boşluklu yapıları sayesinde bu boşluklar arası meydana gelebilecek PAMAM-PAMAM etkileşimleri bu sterik etkileri dengeliyor olmalıdır.

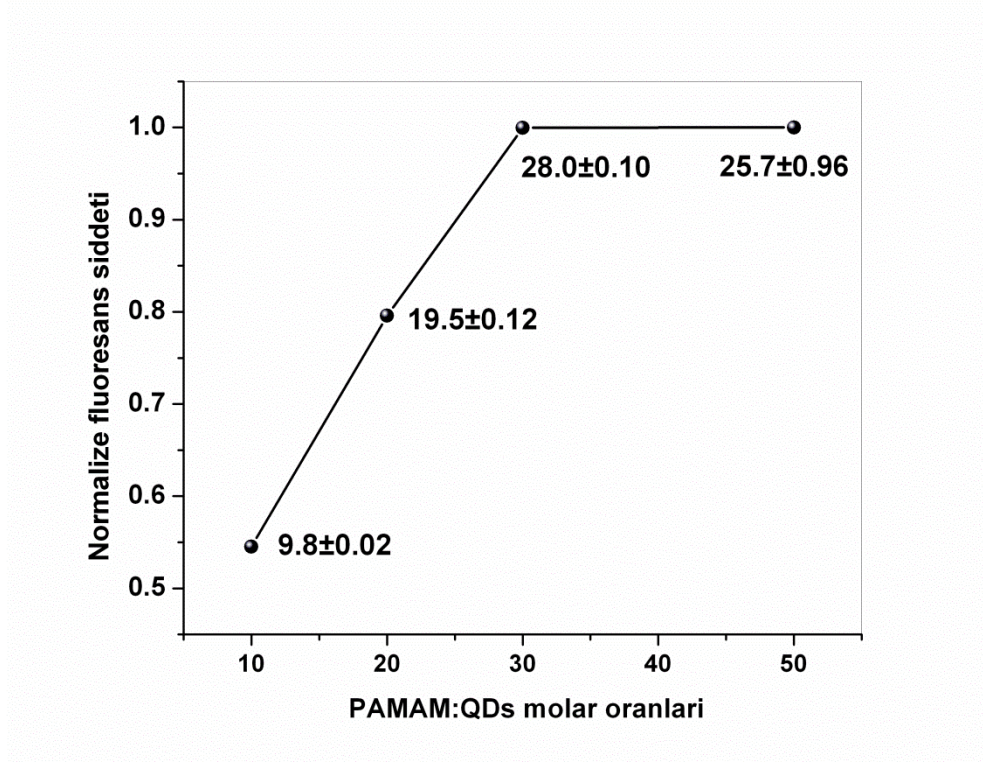
Çizelge 1. Kuantum nanoparçacığına bağlanan PAMAM moleküllerinin Bradford testi ile hesaplanması; 10, 20, 30 ve 50 kat PAMAM ile muamele edilen QD nanoparçacıklarına sırası ile 9,8; 19,5; 28 ve 25,7 PAMAM molekülü bağlanmıştır. Bağlanma verimi bağlanan PAMAM moleküllerinin başlangıç PAMAM miktarına oranlanmasıyla elde edilmiştir (veriler N=3 için ortalama±standart hata şeklinde verilmektedir).

PAMAM molekülünün molar oranı	Kuantum nanoparçacık başına bağlanan PAMAM sayısı	Bağlanma verimi %
10	9,8 ± 0,002	98
20	19,5 ± 0,12	97,5
30	28,0 ± 0,10	93,3
50	25,7 ± 0,96	51,4

Yukarıda belirtilen PAMAM mol oranları ile modifiye edilen QD nanokristallerine ilişkin floresans şiddetler Şekil 3.3'de verilmiştir. QD molekülüne bağlanan PAMAM sayısı arttıkça konjugatlara ilişkin floresans şiddet de artış göstermiştir. Bu sonuç bize PAMAM oranı arttıkça suya transfer edilen QD molekülünün de oranının arttığını göstermektedir. QD yüzeyi maksimum bağlanma kapasitesine ulaştığında ise daha fazla QD molekülü suya transfer olamadığı için nanokristallerin floresans şiddeti sabit bir değere ulaşmaktadır. Ayrıca, bağlanan PAMAM molekülü sayısı arttıkça buna zıt olarak agregat oluşumu da büyük ölçüde azalmaktadır.

Kuantum nanoparçacıklarının faz transfer reaksiyonlarında, ligand-yer değiştirme stratejisi uygulandığında, nanoparçacık yüzeyinin kontrol edilebilir ligand oranlarında ve istenilen oryantasyonda modifiye edilmesi yani yüzey mühendisliği çok zordur. Yapılan karakterizasyon çalışması sonuçlara göre rahatlıkla vurgulayabiliriz ki; QD yüzeyine uygulanan modifikasyon stratejisi ile PAMAM molekülleri nanoparçacık yüzeyine kontrollü bir şekilde bağlanmıştır.

Görünüşe göre dendrimerin bağlanma miktarı reaktant oranlarının değiştirilmesi ile istenilen düzeyde amaca yönelik olarak kontrol edilebilmektedir.

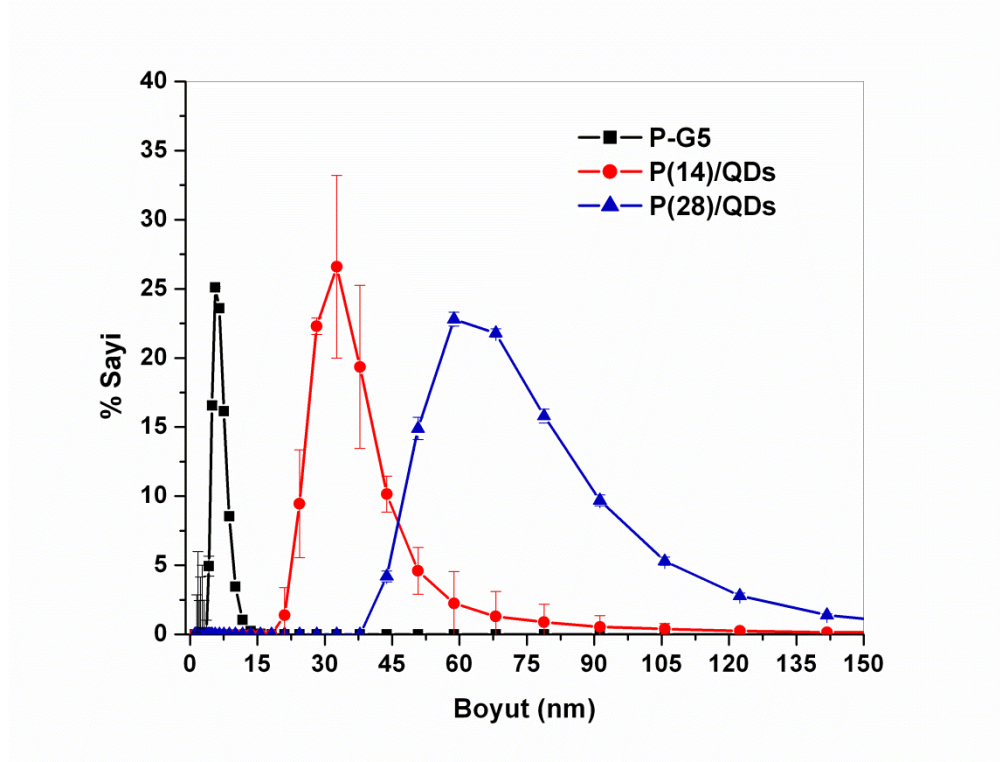


Şekil 3.3. 10, 20, 30 ve 50 kat fazla PAMAM molekülü ile muamele edilen QD nanoparçacıklarına ilişkin normalize edilmiş floresans şiddetleri ve bunlara karşılık gelen bağlanan PAMAM molekül sayısı.

3.4 Boyut Analizi

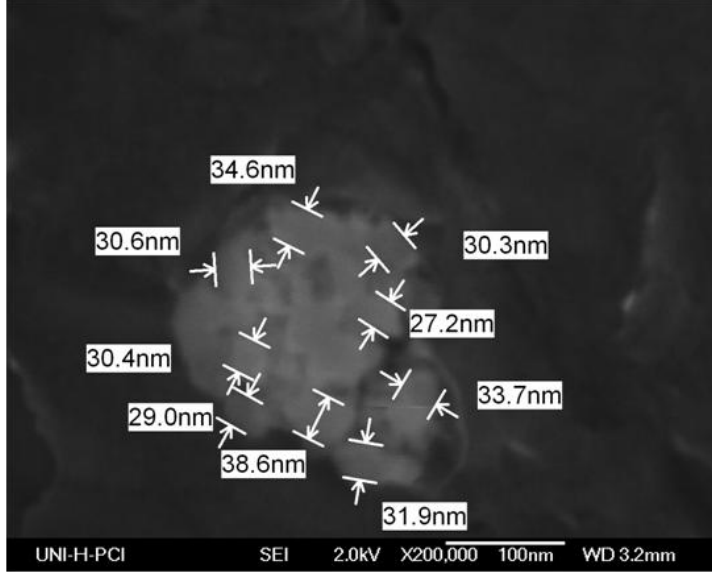
Serbest PAMAM molekülüne (P-G5), yüzeyi 14 ve 28 adet PAMAM molekülü ile kaplanmış kuantum nanoparçacıklarına (sırasıyla P14/QDs ve P28/QDs) ilişkin hidrodinamik boyutlar sırası ile $5,6 \pm 0,0003$ nm, $32,7 \pm 0,216$ nm ve $58,8 \pm 0,029$ nm olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.4). Modifiye edilmemiş QD nanokristalleri ise 3,7 nm (Sigma-Aldrich) boyutundadırlar. Serbest PAMAM için elde edilen değer (5,6 nm) literatür bilgisiyle (5,7 nm) uyuşmaktadır (Tomalia et al. 2010) Kuantum nanoparçacık yüzeyini saran PAMAM molekül sayısı 14'ten 28'e çıkarıldığında hidrodinamik boyuttaki artış, nanoparçacıkların hidrate olan yüzey alanı arttığı için beklenen bir sonuçtur. Öte yandan PAMAM molekül sayısındaki artışa bağlı olarak DLS eğrisinde platolaşma oluşmuştur. Bu da P28/QDs moleküllerinin boyut dağılımlarının P14/QDs konjugatlarının boyut

dağılımlarına göre daha az homojen olduğunu ve göreceli olarak daha geniş bir aralıkta dağılım gösterdiklerini ifade etmektedir.



Şekil 3.4. Serbest PAMAM, 14 ve 28 PAMAM molekülü ile kaplanmış kuantum nanoparçacıklarına ilişkin hidrodinamik boyut analizleri. Molekül boyutları sırası ile PAMAM dendrimeri için $5,6 \pm 0,0003$; P14/QDs konjugatı için $32,7 \pm 0,216$ nm; P28/QDs konjugatları için de $58,8 \pm 0,029$ nm olarak hesaplanmıştır (Veriler N=3 için ortalaması $\pm$ standart hata şeklinde verilmektedir. Ölçümler PBS pH 7,4 tamponunda gerçekleştirilmiştir).

Liyofilize formdaki P14/QDs konjugatlarına ilişkin SEM görüntüsü Şekil 3.5'te verilmiştir. 200.000 magnifikasyonda alınan görüntüde ortalama konjugat boyutu $31,81 \pm 3,40$ nm olarak hesaplanmıştır. Her ne kadar hidrodinamik boyutlar, parçacıkların gerçek boyutlarını ifade etmiyor olsalar da, DLS ile SEM analizlerinin birbiri ile örtüştüğü görülmektedir. Sonuç olarak DLS ölçümlerinin 10 nm ve altında parçacıklar için güvenilir sonuçlar vermediği düşünülüyor olsa da, gerek literatür bilgisi ile uyuşan değerler gerek de SEM analizleri ile de desteklenen sonuçlar, uygulanan DLS yönteminin güvenilir olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.5. Yüzeyi 14 adet PAMAM molekülü ile modifiye edilmiş QD nanoparçacıklarına (P14/QDs) ilişkin SEM analizi. Ortalama konjugat boyutu $31,81 \pm 3,40$ nm olarak hesaplanmıştır.

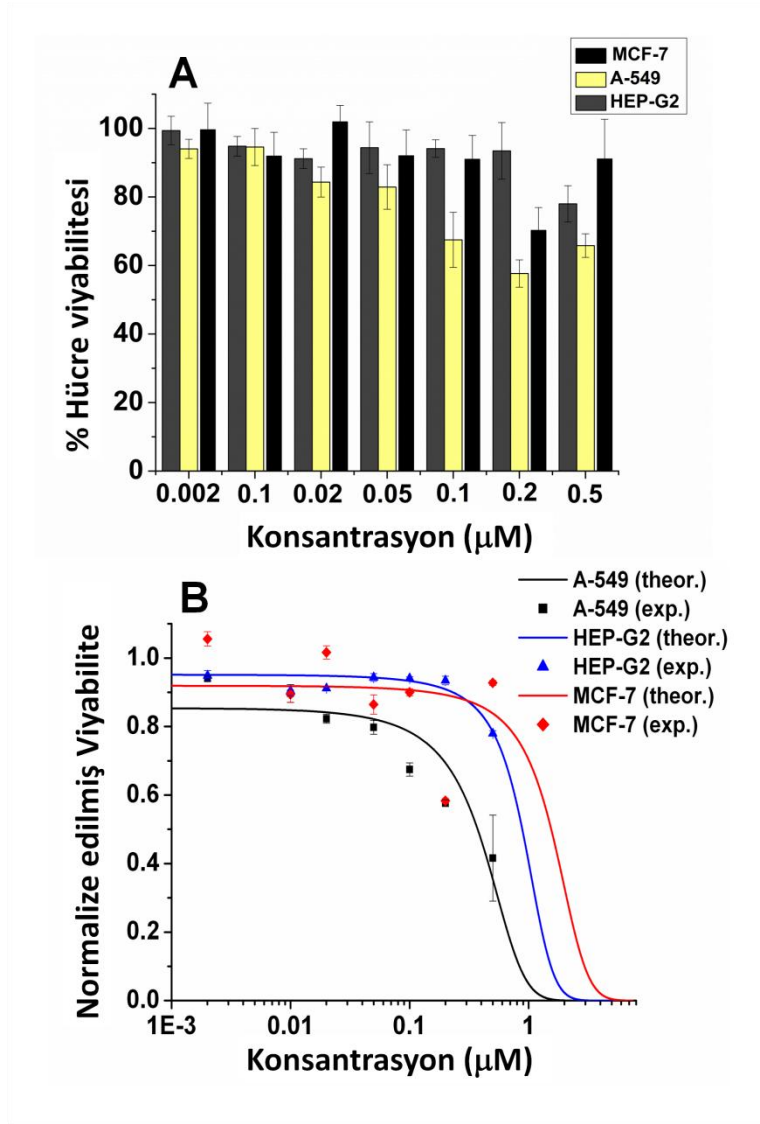
3.5 Kararlılık

Transport mekanizmalarının ve/veya hücre içi ya da membran bağlı tekli moleküllerin izlenmesi gibi uzun süreli görüntüleme gerektiren çalışmalarda kullanılacak nanokristallerin foto-kararlılıklarının yüksek olması beklenmektedir (Dahan et al. 2003). Kuantum nanokristallerinin klasik organik temelli floroforlara göre avantajlı olmalarının en temel sebeplerinden biri, daha stabil olmalarıdır. Kloroform ya da toluen gibi organik çözügenlerde sentezlenen QD nanoparçacıkları foto-sönümlenmeye karşı çok dirençliyken, sulu faza transfer edilen QD'lar foto-oksidasyona uğradıklarından dolayı o kadar fotostabil değildirler. Polimer kaplamanın, QD yüzeyindeki defekte olmuş noktalardan foto-oksidasyonu hızlandırdığı bilinmektedir (Nann 2005). PAMAM dendrimerleri ile kaplanan QD nanoparçacıklarına ilişkin foto-kararlılık çalışması, karanlıkta 30 gün boyunca bekletilen konjugatlara ilişkin floresans ölçümler alınarak gerçekleştirildi. 30 gün sonunda konjugatın floresans şiddetinde herhangi bir düşme gözlemlenmedi. Sonuç olarak, pozitif gruplara sahip PAMAM molekülünün, protonik solventlerde kuantum nanoparçacıklarını elektrostatik olarak stabilize ettiğini söyleyebiliriz (Nann 2005). Ayrıca, PAMAM dendrimerlerinin iç boşluk yapılarından kaynaklanan dendrimerler arası etkileşimler (Tomalia et al. 2010), buna ilave olarak PAMAM molekülünün

terminal $-NH_2$ grupları arasında meydana gelen hidrojen bağları yüzeyde daha sıkı bir yapı oluşturmuş olabilir (Santos et al. 2011). Dendrimerin yapısında bulunun çoklu zincirler de, QD yüzeyinde sterik engel yaratarak daha düzenli ve kompakt yapıda nanokristal oluşmasına yardımcı olmaktadır (Peng et al. 2002). Tüm bu ön görülen mekanizmalar, PAMAM modifiye QD moleküllerinin yüksek stabilizasyonuna açıklık getirme niteliğindedir. Son olarak CdSe/ZnS yapısındaki Zn atomları kuvvetli asit iken PAMAM'ın yapısındaki primer amin grupları kuvvetli baz olarak davranırlar. Bilindiği üzere kuvvetli asit-kuvvetli baz etkileşimleri zayıf asit-baz etkileşimlerinden (TOPO- NH_2 etkileşiminde olduğu gibi) çok daha fazla kuvvetlidirler. Bu kuvvetli asit-baz etkileşimleri QD nanoparçacıklarının ligand –yer değiştirme reaksiyonlarının temelini oluşturmakla beraber, elde edilen komplekslerin kararlılığında da önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

3.6 Sitotoksiste

P14/QDs konjugatlarının MCF-7 (meme) ve model olarak seçilen A-549 (akciğer) ile HEP-G2 (karaciğer) hücrelerine karşı olan konsantrasyon bağımlı toksik etkileri, MTT testi uygulanarak incelendi. Nanokristallerin toksik etkileri kendilerinden kaynaklanabileceği gibi yapılarında bulunan yüzey gruplarından da kaynaklanabilmektedir (Hoshino et al. 2004). Katyonik nanoparçacıklar, negatif yüklü hücre membranının glikokaliks yapısı ile elektrostatik etkileşime girdiklerinden dolayı toksik etki yaratma potansiyeline sahiptirler (Fischer et al. 2003). Bu yüzden etrafı pozitif yüklü PAMAM molekülleri ile kaplı QD nanokristallerinin toksik etkisinin araştırılması önemlidir. Şekil 3.6.a'da MTT testinden elde edilen verilere göre hesaplanan viyabilite sonuçları verilmiştir. Jevprasesphant ve grubunun yaptığı bir çalışmada, $5,0 \mu M$ ve üzeri konsantrasyona sahip PAMAM moleküllerinin hücrede toksik etki yarattıkları ifade edilmiştir (Jevprasesphant et al. 2003). Oysaki kuantum nanokristalleri çok daha düşük düzeylerde ölümcül etki yaratmaktadırlar. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre ise $0,5 \mu M$ QDs içeren (konjuge PAMAM konsantrasyonu $7,0 \mu M$) P14/QDs konjugatları, MCF-7 ve HEP-G2 hücreleri ile 4 saatlik bir inkübasyon sonrasında hücrelerde herhangi bir toksik etki sergilememiştir. Fakat A-549 hücreleri $0,1 \mu M$ ve üzeri konsantrasyonda QD içeren P14/QDs konjugatları ile muamele edildiklerinde hücrelerin yaşamsal faaliyetlerinde (hücre bölünmesi ya da ATP üretimi) % 40'a varan azalmalar meydana gelmiştir.



Şekil 3.6. 0,002;0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 ve 0,5 μM kuantum nanoparçacık içeren P14/QDs konjugatlarının 4 saatlik inkübasyon süresi sonrasında MCF-7, A-549 ve HEP-G2 hücrelerinin yaşamsal faaliyetlerine olan etkilerinin incelenmesi; **A)** P/QDs konjugatlarına ilişkin MTT testi sonuçları, **B)** MTT sonuçlarına göre tahmin edilen konsantrasyon bağımlı teorik sitotoksikite grafikleri (veriler N=4 için ortalama $\pm$ standart hata şeklinde verilmektedir).

MTT verileri kullanılarak hesaplanan IC₅₀ (% 50 inhibisyon konsantrasyonu), NOAEC (görünür bir etkinin bulunmadığı konsantrasyon değeri) ve TLC (total ölüm konsantrasyonu) değerleri Çizelge 2’de verilmiştir. Bu tablo değerlerine göre, 1,549 μM ve 0,885 μM üzeri QDs konsantrasyonu içeren P14/QDs konjugatları sırayla MCF-7 ve HEP-G2 hücrelerinde toksik etkiye sahipken, bu toksik etki değeri A-549 hücreleri için 0,373 μM ’a kadar düşmektedir. Elde edilen bu sonuçlar MTT verilerini desteklemektedir. Böylece

P14/QDs konjugatlarının A-549 hücrelerinin yaşamsal faaliyetlerine karşı toksik etki gösterdiği kanıtlanmıştır.

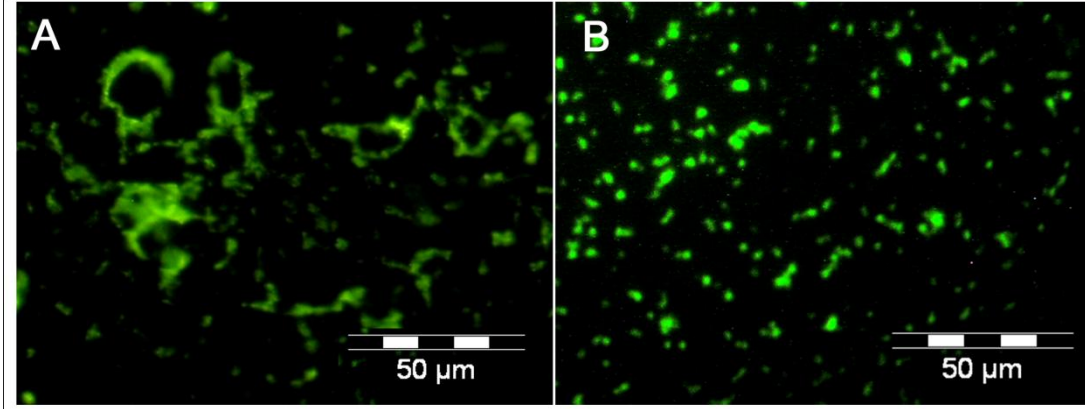
Çizelge 2. MTT verilerinden yola çıkılarak hesaplanan tahmini teorik sitotoksosite değerleri. Sitotoksosite değerleri IC₅₀ (% 50 inhibisyon konsantrasyonu), NOAEC (görünür bir etkinin bulunmadığı konsantrasyon değeri) ve TLC (total ölüm konsantrasyonu) değerleri şeklinde tanımlanmışlardır. Sonuçlara göre P14/QDs konjugatlarının IC₅₀ 0,373 µM değeri ile A-549 hücreleri üzerinde toksik etki göstermektedir.

Hücre hattı	IC ₅₀ (µM)	NOAEC (µM)	TLC (µM)
MCF-7	1,549	0,320	3,427
A-549	0,373	0,065	0,996
HEP-G2	0,885	0,218	1,762

Hücrelerin nanoparçacıklara verdikleri cevaplar ya da tepkiler hücrelerin yüzey morfolojisine, hücre yüzey reseptörlerine ve bu reseptörlerin dağılımlarına göre farklılık göstermektedir. Elde edilen hücre viyabilitesi sonuçlarına göre A-549 hücrelerinin farklı yüzey morfolojileri ve fizyolojilerinden dolayı P14/QDs konjugatlarına karşı diğer hücre hatlarının olduğundan çok daha fazla hassasiyet göstermişlerdir (Şekil 3.6). Bu bulgular benzer çalışmalarla da desteklenmektedir. Örneğin Patra ve grubu altın nanoparçacıklarının (GNP) A-549 hücrelerinin ölümüne yol açtığını rapor etmişlerdir. Çalışmada test edilen diğer hücre hatlarının; BHK21 (yavru hamster böbrek hücreleri) ve HEP-G2'nin GNP muamelesinden etkilenmediğini gözlemlemişlerdir (Patra et al. 2007). Diğer bir çalışma da Choi ve ekibi tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmaya göre PEG ile türevlendirilen fosfolipid kaplı Fe₃O₄ and MnO metal oksit nanoparçacıklarının, A-549 hücreleri için MCF-7 hücrelerine oranla daha fazla toksik etki gösterdiği bulunmuştur (Choi et al. 2010). P14/QDs konjugatlarının toksik etkilerine ilişkin bu sonuçlar umut verici olsa da bu verilerin *in vivo* denemelere uygulanmasında henüz net bulgular söz konusu değildir.

3.7 *In vitro* Uygulamalar

Kuantum nanokristalleri antikorlar ile modifiye edildiklerinde reseptör-ligand etkileşimleri sonucunda endositozis prosesi ile hücre içerisine alınırlar. Bunun haricinde, polikasyonik ligantlarla kaplı kuantum nanoparçacıkları spesifik olmayan etkileşimlerle de hücre içerisine alınabilmektedirler. PAMAM modifiye QD konjugatları, dendrimerin pozitif yüklü amino gruplarından dolayı elektrostatik etkileşimlerle hücrelere bağlanabilmektedir (Shukla et al. 2005). Bazı araştırma grupları bu olası istenmeyen etkileşimlerin üzerinden, dendrimeri kısmi asetilleyerek (Majoros et al. 2005; Shukla et al. 2005; Majoros et al. 2006; Shukla et al. 2006) ya da PEG gibi biyouyumlu polimerlerle kombine ederek (Duan et al. 2007) üstesinden gelmeye çalışmışlardır. Burada P/QDs konjugatlarının hücrelerle olası spesifik olmayan etkileşimleri, yüzeyi 14 (P14/QDs) ile 28 (P28/QDs) PAMAM molekülü ile modifiye edilmiş QD konjugatlarının MCF-7 hücrelere uygulanmasıyla incelendi. Konjugatlarla 4 saat boyunca inkübe edilen MCF-7 hücrelerine ilişkin floresans mikroskobu görüntüleri Şekil 3.7' de verilmiştir.



Şekil 3.7. P/QDs konjugatlarının MCF-7 hücreleri ile spesifik olmayan etkileşimlerinin nanoparçacık yüzeyindeki ligand yoğunluğuna göre incelenmesi. A)Yüzeyi 28 PAMAM molekülü ile modifiye edilen QD konjugatı (P28/QDs) ile, B) Yüzeyi 14,1 PAMAM molekülü ile modifiye edilen QD konjugatı (P14/QDs) ile işaretlenen MCF-7 hücrelerinin floresans mikroskobu görüntüleri (konjugatlar hücrelerle 37 °C'de 4 saat boyunca inkübe edilmişlerdir).

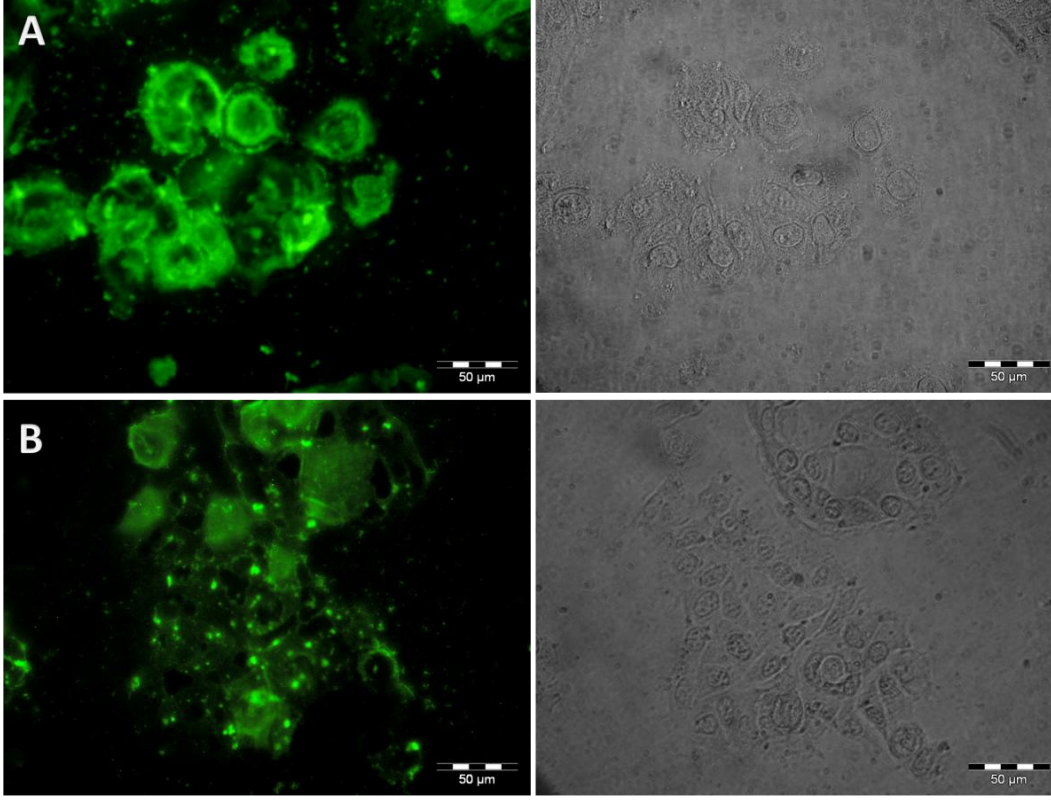
Kuantum nanoparçacıklarının hücreler ile olan etkileşimleri çoğunlukla nanoparçacıklarının yüzey yapılarına bağlıdır. Yüzeylerinde bulunan ligantlar ve bu ligantların sahip oldukları fonksiyonel gruplar, bu grupların yoğunluğu ve yük durumu nanoparçacıkların biyolojik uygulamalardaki kaderini belirleyen en temel

faktörleri oluşturmaktadırlar. Çalışmanın bu aşamasında, yüzey PAMAM moleküllerinin sahip olduğu pozitif yüklü amino gruplarının yoğunluğuna göre kuantum parçacıklarının MCF-7 hücreleriyle olan etkileşimlerinin nasıl değiştiği araştırılmıştır. 28 adet PAMAM molekülü ile yüzeyi modifiye edilen kuantum nanoparçacıkları (P28/QDs) daha fazla ligand miktarına ve daha fazla pozitif yüke sahip olduklarından dolayı, 14 PAMAM molekülü içeren QD konjugatlarına (P14/QDs) kıyasla hücrelerle daha fazla etkileşime girmişlerdir. Şekil 3.7.A'da MCF-7 hücreleri, P28/QDs konjugatlarının hücre membranıyla olan göreceli olarak yoğun elektrostatik etkileşimlerinden dolayı gözle görülebilir düzeydedir. Yüzeyi 14 PAMAM molekülü ile modifiye edilen kuantum nanoparçacıkları ise 4 saatlik bir inkübasyon süresi sonrasında hücrelerle gözlemlenebilir bir düzeyde etkileşime girmemiştir. Şekil 3.7.B'de de görüleceği üzere hücre yüzeyine geliş güzel adsorpsiyonlar mevcuttur. Sonuç olarak P14/QDs konjugatlarının spesifik olmayan etkileşimleri belirtilen uygulama koşulları içerisinde göz ardı edilebilecek düzeydedir. Fakat sonrasında uygulanabilecek kısmi yüzey nötralizasyon aşamaları ile bu etkileşimler elbette bütünüyle bertaraf edilebilir.

Bilindiği üzere parçacık boyutu ne kadar küçük olursa nanoparçacıkların hücre içi lokalizasyonu ve *in vivo* denemelerde RES sisteminden kurtularak hedef dokuda birikimleri bir o kadar kolaylaşır. Konjugatlara ilişkin boyut karakterizasyonu ve spesifik olmayan etkileşimler değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak, P14/QDs konjugatları, gerek daha küçük ve daha homojen boyut dağılımına sahip olmalarından dolayı gerekse MCF-7 hücreleri ile daha az spesifik olmayan etkileşimlere girmelerinden dolayı hücre görüntüleme çalışmalarında model olarak seçilmişlerdir. Bunun için, P14/QDs konjugatları MCF-7 hücrelerinin membranında bulunan HER2 reseptörlerini spesifik olarak tanıyabilecek Anti-HER2 antikorı ile modifiye edildiler. Elde edilen P/QDs-AntiHER2 biyokonjugatı MCF-7 hücreleri ile 4 saat 37 °C'de inkübe edilerek floresans işaretlenen hücreler floresans mikroskobu altında incelendi (Şekil 3.8). Görüntüleme çalışmalarında iki farklı konsantrasyonda QDs içeren (0,9 ve 0,5 μM) P/QDs-AntiHER2 biyokonjugatları kullanıldı.

HER2 spesifik antikor ile işaretlenen konjugatların hücre içerisine lokalizasyonun endositotik yollarla mı yoksa diğer spesifik olmayan etkileşimlerle mi gerçekleştiğini araştırmak amacıyla, MCF-7 hücreleri yine aynı biyokonjugatlarla 4 saat boyunca 4°C'de inkübe edildiler (Şekil 3.9). Kontrol

grubu olarak da 0,5 μM kuantum nanoparçacık içeren P14/QDs konjugatları kullanıldı.



Şekil 3.8. A) 0,9 μM ; B) 0,5 μM P/QDs-AntiHER2 biyokonjugatı ile 37 °C’de 4 saat inkübe edilen MCF-7 hücrelerine ilişkin alınan floresans mikroskobu görüntüleri. *Sağ panel:* hücrelerin beyaz ışık altındaki görüntülerini, *sol panel;* 460-480 nm aralığında uyarılan kuantum konjugatlarına ilişkin floresans görüntüleri göstermektedir (skala 50 μm).

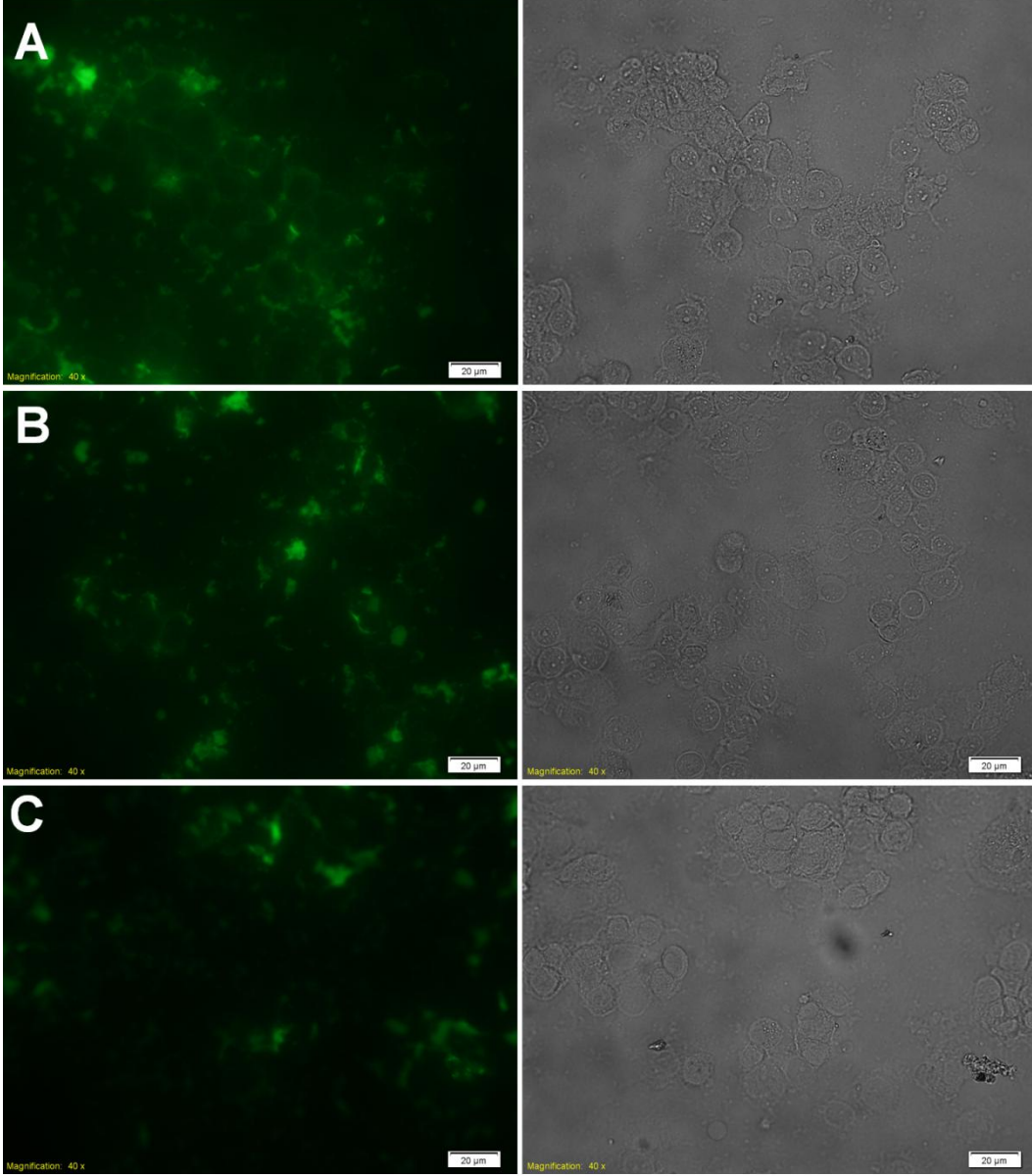
Katyonik polimerler yüksek derecede pH-tamponlama kapasitesine sahiptirler. İçeriği asidik olan endozomlara/veziküllere proton adsorpsiyonunu arttıırırlar. Bu da membrandaki oztomatik basıncın artmasına neden olur ve beraberinde endozomlarda tutuklu kalan katyonik moleküllerin kolaylıkla hücre sitozolüne difüzlenmesini sağlar. Bu olay literatürde ‘*endozomal kaçış*’ olarak ifade edilmektedir (Langer et al. 2005; Duan et al. 2007). Kuantum nanoparçacıkları endozomlarda hapsedildiklerinde, endozomlardaki asidik pH değerleri (4,0-5,0) yüzünden floresans özelliklerini kaybetmektedirler (Silver et al. 2005; Sun et al. 2006; Tamai et al. 2008). Kuantum nanokristallerinin hücresel hedeflemede ve ilaç taşınımı gibi çalışmalarda etkin olarak kullanılabilmeleri için bu sorunun üstesinden gelinmelidir. Bu çalışmada, QDs yüzeylerinin PAMAM

gibi yüksek tamponlama kapasitesine sahip dendrimerlerle modifiye edilmesi ile endozomal kaçışın aktiveleştirilip aynı zamanda QD'ların foto-sönümlenmesinin de engellemesi hedeflenmiştir. Böylece kuantum parçacıklarının artan sitoplazmik migrasyonu ve foto-kararlılığı ile kuantum nanokompleksleri uzun süreli görüntüleme çalışmalarında etkin olarak kullanılabileceklerdir.

Şekil 3.7.A'da 0,9 μM QDs konsantrasyonuna sahip P/QDs-AntiHER2 biyokonjugatlarıyla muamele edilmiş MCF-7 hücrelerine ait floresans görüntülerde, biyokonjugatların reseptör-ligand spesifik etkileşimleri ile hücre içine girdiğini ve endozomal kaçış sonrası sitozole dağıldıklarını görmekteyiz. 0,5 μM QDs konsantrasyonuna sahip biyokonjugatın floresans görüntülerinde ise bazı konjugatların 4 saatlik inkübasyon sonrasında hücre membranında kaldıkları görülmektedir (Şekil 3.7.B). Higuchi ve grubunun yaptığı bir çalışmada, PAMAM modifiye kuantum nanoparçacıklarının herhangi bir hedefleyici ajan olmaksızın elektrostatik etkileşimler aracılığı ile 13 saatlik inkübasyon sonrasında hücre membranını geçerek hücre içine lokalize olduğunu bulmuşlardır (Higuchi et al. 2011). Bu çalışmada ise, yapıya reseptör-spesifik biyomolekülün ilavesi ile P/QDs konjugatları, 4 saatlik bir dilim sonrasında tümürlü hücreler tarafından endositoz yoluyla hücre içerisinde lokalize olmuşlardır. Antikor yokluğunda P/QDs konjugatlarının hücreler ile olan etkileşimleri incelendiğinde ise 4 saatlik inkübasyon sonrasında hücre içi herhangi bir lokalizasyon gözlenmemiştir (Bkz Şekil 3.6.B).

4°C'de yapılan inkübasyon sonrasında MCF-7 hücrelerine ilişkin elde edilen floresans görüntülere bakıldığında, gerek HER2 spesifik antikor ile işaretlenen, gerek işaretlenmeyen P/QDs konjugatlarının hücre içine alınımı gerçekleşmemiştir (Şekil 3.8). Fakat görüntüler dikkatlice incelendiğinde 0,9 μM P/QDs-AntiHER2 biyokonjugatlarının hücre membranıyla etkileşime girdikleri görülmektedir (Şekil 3.8.A). 4°C'de endositoz mekanizması işlev görmüyor olsa da reseptör-ligand etkileşimleri hala faal olmaktadır. Dolayısıyla hücre membranının aktif reseptör-ligand etkileşimi üzerinden işaretlenmesi beklenen bir sonuçtur. Şekil 3.8.B'de P/QDs-AntiHER2 biyokonjugatlarının konsantrasyonu 0,5 μM 'a düşürüldüğünde hücre membranları azalmış miktarda olsa da görüntülenmektedir. Fakat hala hücre içerisine herhangi bir lokalizasyon yoktur. Kontrol grubu olarak sadece 0,5 μM P14/QDs konjugatlarının uygulandığı

durumda ise hücre yüzeylerinde gelişmiş güzel agregatlaşmalardan ve zayıf elektrostatik etkileşimlerden başka bir görüntü elde edilmemektedir (Şekil 3.8.C).



Şekil 3.9. A) 0,9 μM ; B) 0,5 μM P/QDs-AntiHER2 biyokonjugatı ve C) 0,5 μM P14/QDs konjugatı ile 4 $^{\circ}\text{C}$ 'de 4 saat inkübe edilen MCF-7 hücrelerine ilişkin alınan floresans mikroskobu görüntüleri. *Sağ panel:* hücrelerin beyaz ışık altındaki görüntülerini, *sol panel:* 460-480 nm aralığında uyarılan kuantum konjugatlarına ilişkin floresans görüntüleri göstermektedir (skala 25 μm).

Sonuç olarak, HER2 spesifik antikor ile meme kanser hücrelerine hedeflenen PAMAM-modifiye kuantum nanokristalleri, endositotik yollarla

spesifik olarak hücre içersine alınmış ve başarılı bir şekilde tümörlü hücrelerin fluoresans mikroskobu altında görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Kuantum nanoparçacıkların kullanımıyla floresans-prob dizaynı ve geliştirilmesine yönelik çalışmalar; QD nanokristallerinin sentezine, solübilizasyonuna ve hedefe spesifik ligantlarla modifiye edilmesine yoğunlaşmıştır. Nanoparçacık yüzeylerinin manipüle edilmesinde, ligand oranlarının ve oryantasyonlarının kontrol edilmesine yönelik birçok strateji uygulanmaktadır. Fakat henüz hala kontrol edilebilir ligand oranlarında ve oryantasyonunda ‘en iyi’ kuantum nanoparçacığını sunan yöntem bulunamamıştır. Bu çalışmada ligand-yer değiştirme reaksiyonları baz alınarak kuantum nanoparçacıklarının PAMAM dendrimerleri aracılığı ile polar faza transferi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yüzey modifikasyon stratejisi ile QD yüzeyleri kontrollü ligand oranlarında modifiye edilerek kolaylıkla karakterize edilmiştir. PAMAM molekülünün pozitif yüklü amin grupları kuantum nanoparçacıklarını elektrostatik etkileşimlerle stabilize ederken, PAMAM dendrimerinin çok dallı yapısı ile oluşturdukları sterik etki, dendrimerler arası inter-etkileşimler ve terminal gruplar arasında oluşan H bağı, kuantum kristallerini yapısal açıdan da stabilize etmektedir. Konjugasyona ilişkin alınan floresans spektrumlar, PAMAM modifikasyonunun kuantum nanoparçacıklarının floresans özelliklerinde bir değişikliğe neden olmadığını göstermektedir. Bradford yöntemiyle, kuantum nanoparçacıklara maksimum 28 PAMAM molekülünün bağlanabileceği hesaplanmıştır. Pozitif yüklü PAMAM/QDs moleküllerinin negatif yüklü hücre membranı ile olası spesifik olmayan etkileşimlerinin minimize edilmesi, ve hücre içine alınımının kolaylaştırılması adına daha küçük boyuta sahip, 14 PAMAM molekülü ile modifiye edilen kuantum nanoparçacıkları hücre görüntüleme çalışmalarında kullanılmıştır. *In vitro* hücre görüntüleme çalışmalarında HER2 spesifik antikor ile hedeflenen P/QDs konjugatları, endositozla MCF-7 meme kanser hücrelerinin içine alınmış, pozitif yüklü PAMAM dendrimeri sayesinde endozomlardan kaçarak hücre içerine dağılmıştır. MTT testiyle edilen sonuçlarda ise, P/QDs konjugatlarının 0,5 μM ’a kadar MCF-7 ve model olarak seçilen HEP-G2 (karaciğer) tümörlü hücrelerinde, hücresel faaliyetleri engelleyecek düzeyde toksik etki göstermediği fakat A-549 hücrelerinde 0,1 μM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığını düşürerek toksik etki gösterdiği gözlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen olumlu bulgular, gelecek vaat eden özelliklere sahip hedeflenmiş terapide ve moleküllerin hücre içi trafiklerinin izlenmesinde kullanılabilecek kuantum nanoparçacık temelli dendritik nano-cihazların geliştirilmesine ışık tutacak niteliktedir. Öte yandan bugüne kadar bu alanda kat edilen yol dışında ileriki çalışmalar; yüzey yükü, kolloidal kararlılık gibi kuantum nanoparçacıklarının hücre yüzeyi ile etkileşmelerini, endosite edilmelerini, endozomlardan kaçışlarını, nükleusa girmelerini etkileyen/belirleyen fiziksel parametrelerin daha iyi araştırılmasına yönelik olmaları önemlidir. Ayrıca elde edilecek sonuçların hücre tiplerine göre farklılaşacakları bir diğer dikkate alınması gereken parametredir (Nadeau et al. 2008). Sonuç olarak, tüm bu fiziksel parametrelerin hedef alınan hücre tipinin morfoloji ve fizyolojisine göre dikkate alınarak deneysel tasarımların gerçekleştirilmesi gereklidir. Bu tez kapsamında elde edilen çıktılar yukarıda belirtilen konulara ışık tutacak niteliktedir.

KAYNAK DİZİNİ

- Akerman, M. E., W. C. W. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia and E. Ruoslahti**, 2002, Nanocrystal targeting in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20): 12617-12621.
- Alivisatos, A. P.**, 1996, Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots, *Science*, 271(5251): 933-937.
- Alivisatos, P.**, 2004, The use of nanocrystals in biological detection, *Nature Biotechnology*, 22(1): 47-52.
- Ballou, B., B. C. Lagerholm, L. A. Ernst, M. P. Bruchez and A. S. Waggoner**, 2004, Noninvasive imaging of quantum dots in mice, *Bioconjugate Chemistry*, 15(1): 79-86.
- Biju, V., S. Mundayoor, R. V. Omkumar, A. Anas and M. Ishikawa**, 2010, Bioconjugated quantum dots for cancer research: Present status, prospects and remaining issues, *Biotechnology Advances*, 28(2): 199-213.
- Boussif, O., F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr**, 1995, A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in-Vivo - Polyethylenimine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16): 7297-7301.
- Bruchez, M., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss and A. P. Alivisatos**, 1998, Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels, *Science*, 281(5385): 2013-2016.
- Chan, W. C. W., D. J. Maxwell, X. H. Gao, R. E. Bailey, M. Y. Han and S. M. Nie**, 2002, Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging, *Current Opinion in Biotechnology*, 13(1): 40-46.
- Chang, E., N. Thekkek, W. W. Yu, V. L. Colvin and R. Drezek**, 2006, Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake, *Small*, 2(12): 1412-1417.
- Chang, E., W. W. Yu, V. L. Colvin and R. Drezek**, 2005, Quantifying the Influence of Surface Coatings on Quantum Dot Uptake in Cells, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 1(4): 397-401.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Chauhan, A. S., N. K. Jain, P. V. Diwan and A. J. Khopade**, 2004, Solubility enhancement of indomethacin with poly(amidoamine) dendrimers and targeting to inflammatory regions of arthritic rats, *Journal of Drug Targeting*, 12(9-10): 575-583.
- Choi, J. Y., S. H. Lee, H. Bin Na, K. An, T. Hyeon and T. S. Seo**, 2010, In vitro cytotoxicity screening of water-dispersible metal oxide nanoparticles in human cell lines, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(1): 21-30.
- Crouch, D., S. Norager, P. O'Brien, J. H. Park and N. Pickett**, 2003, New synthetic routes for quantum dots, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 361(1803): 297-310.
- Dabbousi, B. O., J. RodriguezViejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen and M. G. Bawendi**, 1997, (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites, *Journal of Physical Chemistry B*, 101(46): 9463-9475.
- Dahan, M., S. Levi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau and A. Triller**, 2003, Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking, *Science*, 302(5644): 442-445.
- Deng, D., J. Xia, J. Cao, L. Qu, J. Tian, Z. Qian, Y. Gu and Z. Gu**, 2012, Forming highly fluorescent near-infrared emitting PbS quantum dots in water using glutathione as surface-modifying molecule, *Journal of Colloid and Interface Science*, 367(1): 234-240.
- Derfus, A. M., W. C. W. Chan and S. N. Bhatia**, 2004, Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots, *Nano Letters*, 4(1): 11-18.
- Duan, H. and S. Nie**, 2007, Cell-penetrating quantum dots based on multivalent and endosome-disrupting surface coatings, *Journal of American Chemical Society*, 129(11): 3333-3338.
- Dubertret, B., P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou and A. Libchaber**, 2002, In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles, *Science*, 298(5599): 1759-1762.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Eastman, P. S., W. M. Ruan, M. Doctolero, R. Nuttall, G. De Feo, J. S. Park, J. S. F. Chu, P. Cooke, J. W. Gray, S. Li and F. Q. F. Chen**, 2006, Qdot nanobarcodes for multiplexed gene expression analysis, *Nano Letters*, 6(5): 1059-1064.
- Efros, A. L. and A. L. Efros**, 1982, Interband Absorption of Light in a Semiconductor Sphere, *Soviet Physics Semiconductors-Ussr*, 16(7): 772-775.
- Ekimov, A. I. and A. A. Onushchenko**, 1982, Quantum Size Effect in the Optical-Spectra of Semiconductor Micro-Crystals, *Soviet Physics Semiconductors-Ussr*, 16(7): 775-778.
- Fan, H. Y., E. W. Leve, C. Scullin, J. Gabaldon, D. Tallant, S. Bunge, T. Boyle, M. C. Wilson and C. J. Brinker**, 2005, Surfactant-assisted synthesis of water-soluble and biocompatible semiconductor quantum dot micelles, *Nano Letters*, 5(4): 645-648.
- Ferrara, D. E., D. Weiss, P. H. Carnell, R. P. Vito, D. Vega, X. H. Gao, S. M. Nie and W. R. Taylor**, 2006, Quantitative 3D fluorescence technique for the analysis of en face preparations of arterial walls using quantum dot nanocrystals and two-photon excitation laser scanning microscopy, *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 290(1): R114-R123.
- Fischer, D., Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Kriegelstein and T. Kissel**, 2003, In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis, *Biomaterials*, 24(7): 1121-1131.
- Gao, X. H., Y. Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung and S. M. Nie**, 2004, In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots, *Nature Biotechnology*, 22(8): 969-976.
- Gao, X. H. and S. M. Nie**, 2003, Molecular profiling of single cells and tissue specimens with quantum dots, *Trends in Biotechnology*, 21(9): 371-373.
- Gao, X. H., L. L. Yang, J. A. Petros, F. F. Marshal, J. W. Simons and S. M. Nie**, 2005, In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots, *Current Opinion in Biotechnology*, 16(1): 63-72.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Gerion, D., F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss and A. P. Alivisatos**, 2001, Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica-coated CdSe/ZnS semiconductor quantum dots, *Journal of Physical Chemistry B*, 105(37): 8861-8871.
- Goldman, E. R., G. P. Anderson, P. T. Tran, H. Mattoussi, P. T. Charles and J. M. Mauro**, 2002, Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays, *Analytical Chemistry*, 74(4): 841-847.
- Green, M. and E. Howman**, 2005, Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking, *Chemical Communications*,(1): 121-123.
- Higuchi, Y., C. Wu, K. L. Chang, K. Irie, S. Kawakami, F. Yamashita and M. Hashida**, 2011, Polyamidoamine dendrimer-conjugated quantum dots for efficient labeling of primary cultured mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, 32(28): 6676-6682.
- Hines, M. A. and P. Guyot-Sionnest**, 1996, Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-Capped CdSe nanocrystals, *Journal of Physical Chemistry*, 100(2): 468-471.
- Hoshino, A., K. Fujioka, T. Oku, M. Suga, Y. F. Sasaki, T. Ohta, M. Yasuhara, K. Suzuki and K. Yamamoto**, 2004, Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification, *Nano Letters*, 4(11): 2163-2169.
- Hynes, N. E., K. Horsch, M. A. Olayioye and A. Badache**, 2001, The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators, *Endocrine-Related Cancer*, 8(3): 151-159.
- Ipe, B. I., M. Lehnig and C. M. Niemeyer**, 2005, On the generation of free radical species from quantum dots, *Small*, 1(7): 706-709.
- Jain, R. K.**, 1999, Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 1: 241-263.
- Jain, R. K.**, 2001, Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function, *Journal of Controlled Release*, 74(1-3): 7-25.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Jakobs, S., V. Subramaniam, A. Schonle, T. M. Jovin and S. W. Hell**, 2000, EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy, *Febs Letters*, 479(3): 131-135.
- Jevprasesphant, R., J. Penny, R. Jalal, D. Attwood, N. B. McKeown and A. D'Emanuele**, 2003, The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers, *International Journal of Pharmaceutics*, 252(1-2): 263-266.
- Jin, T., D. K. Tiwari, S. I. Tanaka, Y. Inouye, K. Yoshizawa and T. M. Watanabe**, 2009, Synthesis and Characterization of Anti-HER2 Antibody Conjugated CdSe/CdZnS Quantum Dots for Fluorescence Imaging of Breast Cancer Cells, *Sensors*, 9(11): 9332-9354.
- Khandare, J., P. Kolhe, O. Pillai, S. Kannan, M. Lieh-Lai and R. M. Kannan**, 2005, Synthesis, cellular transport, and activity of polyamidoamine dendrimer-methylprednisolone conjugates (vol 16, pg 336, 2005), *Bioconjugate Chemistry*, 16(4): 1049-1049.
- Langer, R., A. Akinc, M. Thomas and A. M. Klibanov**, 2005, Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis, *Journal of Gene Medicine*, 7(5): 657-663.
- Leatherdale, C. A., W. K. Woo, F. V. Mikulec and M. G. Bawendi**, 2002, On the absorption cross section of CdSe nanocrystal quantum dots, *Journal of Physical Chemistry B*, 106(31): 7619-7622.
- Lestari, F., A. R. Green, G. Chattopadhyay and A. J. Hayes**, 2006, An alternative method for fire smoke toxicity assessment using human lung cells, *Fire Safety Journal*, 41(8): 605-615.
- Lovric, J., S. J. Cho, F. M. Winnik and D. Maysinger**, 2005, Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death, *Chemistry & Biology*, 12(11): 1227-1234.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Majoros, I. J., A. Myc, T. Thomas, C. B. Mehta and J. R. Baker, Jr.**, 2006, PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality, *Biomacromolecules*, 7(2): 572-579.
- Majoros, I. J., T. P. Thomas, C. B. Mehta and J. R. Baker, Jr.**, 2005, Poly(amidoamine) dendrimer-based multifunctional engineered nanodevice for cancer therapy, *Journal Medical Chemistry*, 48(19): 5892-5899.
- Malik, N., R. Wiwattanapatapee, R. Klopsch, K. Lorenz, H. Frey, J. W. Weener, E. W. Meijer, W. Paulus and R. Duncan**, 2000, Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of I-125-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo, *Journal of Controlled Release*, 65(1-2): 133-148.
- Medintz, I. L., H. T. Uyeda, E. R. Goldman and H. Mattoussi**, 2005, Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing, *Nature Materials*, 4(6): 435-446.
- Menard, S., E. Tagliabue, M. Campiglio and S. M. Pupa**, 2000, Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma, *Journal of Cellular Physiology*, 182(2): 150-162.
- Michalet, X., F. Pinaud, T. D. Lacoste, M. Dahan, M. P. Bruchez, A. P. Alivisatos and S. Weiss**, 2001, Properties of fluorescent semiconductor nanocrystals and their application to biological labeling, *Single Molecules*, 2(4): 261-276.
- Michalet, X., F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir and S. Weiss**, 2005, Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics, *Science*, 307(5709): 538-544.
- Moghim, S. M., A. C. Hunter and J. C. Murray**, 2001, Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice, *Pharmacological Reviews*, 53(2): 283-318.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Mulvaney, P., L. M. Liz-Marzan, M. Giersig and T. Ung**, 2000, Silica encapsulation of quantum dots and metal clusters, *Journal of Materials Chemistry*, 10(6): 1259-1270.
- Murray, C. B., D. J. Norris and M. G. Bawendi**, 1993, Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse Cde (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites, *Journal of the American Chemical Society*, 115(19): 8706-8715.
- Nadeau, J. L., S. J. Clarke, C. A. Hollmann and F. A. Aldaye**, 2008, Effect of ligand density on the spectral, physical, and biological characteristics of CdSe/ZnS quantum dots, *Bioconjugate Chemistry*, 19(2): 562-568.
- Nann, T.**, 2005, Phase-transfer of CdSe@ZnS quantum dots using amphiphilic hyperbranched polyethylenimine, *Chemical Communications (Camb)*, (13): 1735-1736.
- Nann, T. and P. Mulvaney**, 2004, Single quantum dots in spherical silica particles, *Angewandte Chemie-International Edition*, 43(40): 5393-5396.
- Nie, S. M. and W. C. W. Chan**, 1998, Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection, *Science*, 281(5385): 2016-2018.
- Paleos, C. M., D. Tsiourvas, Z. Sideratou and L. Tziveleka**, 2004, Acid- and salt-triggered multifunctional poly(propylene imine) dendrimer as a prospective drug delivery system, *Biomacromolecules*, 5(2): 524-529.
- Parak, W. J., T. Pellegrino and C. Plank**, 2005, Labelling of cells with quantum dots, *Nanotechnology*, 16(2): R9-R25.
- Patra, H. K., S. Banerjee, U. Chaudhuri, P. Lahiri and A. K. Dasgupta**, 2007, Cell selective response to gold nanoparticles, *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 3(2): 111-119.
- Patrakka, J., A. T. Lahdenkari, O. Koskimies, C. Holmberg, J. Wartiovaara and H. Jalanko**, 2002, The number of podocyte slit diaphragms is decreased in minimal change nephrotic syndrome, *Pediatric Research*, 52(3): 349-355.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Pellegrino, T., L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A. L. Rogach, S. Keller, J. Radler, G. Natile and W. J. Parak**, 2004, Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: A general route to water soluble nanocrystals, *Nano Letters*, 4(4): 703-707.
- Peng, X. G., Y. A. Wang, J. J. Li and H. Y. Chen**, 2002, Stabilization of inorganic nanocrystals by organic dendrons, *Journal of the American Chemical Society*, 124(10): 2293-2298.
- Peng, Z. A. and X. G. Peng**, 2001, Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor, *Journal of the American Chemical Society*, 123(1): 183-184.
- Pradhan, N., D. Goorskey, J. Thessing and X. G. Peng**, 2005, An alternative of CdSe nanocrystal emitters: Pure and tunable impurity emissions in ZnSe nanocrystals, *Journal of the American Chemical Society*, 127(50): 17586-17587.
- Ren, Q. S., Z. M. Li, P. Huang, R. He, J. Lin, S. Yang, X. J. Zhang and D. X. Cui**, 2010, Aptamer-conjugated dendrimer-modified quantum dots for cancer cell targeting and imaging, *Materials Letters*, 64(3): 375-378.
- Rogach, A. L., D. Nagesha, J. W. Ostrander, M. Giersig and N. A. Kotov**, 2000, "Raisin bun"-type composite spheres of silica and semiconductor nanocrystals, *Chemistry of Materials*, 12(9): 2676-2685.
- Ron, E., T. Turek, E. Mathiowitz, M. Chasin, M. Hageman and R. Langer**, 1993, Controlled-Release of Polypeptides from Polyanhydrides, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9): 4176-4180.
- Sako, Y., S. Minoguchi and T. Yanagida**, 2000, Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells, *Nature Cell Biology*, 2(3): 168-172.
- Samia, A. C. S., X. B. Chen and C. Burda**, 2003, Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy, *Journal of the American Chemical Society*, 125(51): 15736-15737.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Santos, L. S., D. A. Geraldo, E. F. Duran-Lara, D. Aguayo, R. E. Cachau, J. Tapia, R. Esparza, M. J. Yacaman and F. D. Gonzalez-Nilo**, 2011, Supramolecular complexes of quantum dots and a polyamidoamine (PAMAM)-folate derivative for molecular imaging of cancer cells, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(2): 483-492.
- Selvan, S. T., T. T. Tan and J. Y. Ying**, 2005, Robust, non-cytotoxic, silica-coated CdSe quantum dots with efficient photoluminescence, *Advanced Materials*, 17(13): 1620-+.
- Shukla, R., T. P. Thomas, J. Peters, A. Kotlyar, A. Myc and J. R. Baker Jr**, 2005, Tumor angiogenic vasculature targeting with PAMAM dendrimer-RGD conjugates, *Chemical Communications (Camb)*, (46): 5739-5741.
- Shukla, R., T. P. Thomas, J. L. Peters, A. M. Desai, J. Kukowska-Latallo, A. K. Patri, A. Kotlyar and J. R. Baker, Jr.**, 2006, HER2 specific tumor targeting with dendrimer conjugated anti-HER2 mAb, *Bioconjug Chem*, 17(5): 1109-1115.
- Silver, J. and W. Ou**, 2005, Photoactivation of quantum dot fluorescence following endocytosis, *Nano Letters*, 5(7): 1445-1449.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich and M. F. Press**, 1989, Studies of the Her-2/Neu Proto-Oncogene in Human-Breast and Ovarian-Cancer, *Science*, 244(4905): 707-712.
- Smith, A. M., H. W. Duan, A. M. Mohs and S. M. Nie**, 2008, Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11): 1226-1240.
- So, M. K., C. J. Xu, A. M. Loening, S. S. Gambhir and J. H. Rao**, 2006, Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging, *Nature Biotechnology*, 24(3): 339-343.
- Stiriba, S. E., H. Frey and R. Haag**, 2002, Dendritic polymers in biomedical applications: From potential to clinical use in diagnostics and therapy, *Angewandte Chemie-International Edition*, 41(8): 1329-1334.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Sun, Y. H., Y. S. Liu, P. T. Vernier, C. H. Liang, S. Y. Chong, L. Marcu and M. A. Gundersen**, 2006, Photostability and pH sensitivity of CdSe/ZnSe/ZnS quantum dots in living cells, *Nanotechnology*, 17(17): 4469-4476.
- Talapin, D. V., I. Mekis, S. Gotzinger, A. Kornowski, O. Benson and H. Weller**, 2004, CdSe/CdS/ZnS and CdSe/ZnSe/ZnS core-shell-shell nanocrystals, *Journal of Physical Chemistry B*, 108(49): 18826-18831.
- Tamai, N. and A. Mandal**, 2008, Influence of acid on luminescence properties of thioglycolic acid-capped CdTe quantum dots, *Journal of Physical Chemistry C*, 112(22): 8244-8250.
- Tomalia, D. A., H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder and P. Smith**, 1985, A New Class of Polymers - Starburst-Dendritic Macromolecules, *Polymer Journal*, 17(1): 117-132.
- Tomalia, D. A. and B. H. Huang**, 2005, Dendronization of gold and CdSe/cdS (core-shell) quantum functionalized dendrons dots with tomalia type, thiol core, poly(amidoamine) (PAMAM) dendrons, *Journal of Luminescence*, 111(4): 215-223.
- Tomalia, D. A., A. R. Menjoge and R. M. Kannan**, 2010, Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications, *Drug Discovery Today*, 15(5-6): 171-185.
- Verkman, A. S., N. D. Sonawane and F. C. Szoka**, 2003, Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes, *Journal of Biological Chemistry*, 278(45): 44826-44831.
- Voura, E. B., J. K. Jaiswal, H. Mattoussi and S. M. Simon**, 2004, Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy, *Nature Medicine*, 10(9): 993-998.
- Wu, X. Y., H. J. Liu, J. Q. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. F. Ge, F. Peale and M. P. Bruchez**, 2003, Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots, *Nature Biotechnology*, 21(1): 41-46.

KAYNAK DİZİNİ (devam)

- Xie, R. G., U. Kolb, J. X. Li, T. Basche and A. Mews**, 2005, Synthesis and characterization of highly luminescent CdSe-Core CdS/Zn_{0.5}Cd_{0.5}S/ZnS multishell nanocrystals, *Journal of the American Chemical Society*, 127(20): 7480-7488.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski**, 2001, Untangling the ErbB signalling network, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2): 127-137.
- Yezhelyev, M. V., A. Al-Hajj, C. Morris, A. I. Marcus, T. Liu, M. Lewis, C. Cohen, P. Zrazhevskiy, J. W. Simons, A. Rogatko, S. Nie, X. Gao and R. M. O'Regan**, 2007, In situ molecular profiling of breast cancer biomarkers with multicolor quantum dots, *Advanced Materials*, 19(20): 3146-+.
- Yu, W. W., E. Chang, R. Drezek and V. L. Colvin**, 2006, Water-soluble quantum dots for biomedical applications, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(3): 781-786.
- Yu, W. W., E. Chang, J. C. Falkner, J. Y. Zhang, A. M. Al-Somali, C. M. Sayes, J. Johns, R. Drezek and V. L. Colvin**, 2007, Forming biocompatible and nonaggregated nanocrystals in water using amphiphilic polymers, *Journal of the American Chemical Society*, 129(10): 2871-2879.
- Yu, W. W. and X. G. Peng**, 2002, Formation of high-quality CdS and other II-VI semiconductor nanocrystals in noncoordinating solvents: Tunable reactivity of monomers, *Angewandte Chemie-International Edition*, 41(13): 2368-2371.
- Yu, W. W., L. H. Qu, W. Z. Guo and X. G. Peng**, 2003, Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals, *Chemistry of Materials*, 15(14): 2854-2860.
- Zhao, Y., S. Liu, Y. Li, W. Jiang, Y. Chang, S. Pan, X. Fang, Y. A. Wang and J. Wang**, 2010, Synthesis and grafting of folate-PEG-PAMAM conjugates onto quantum dots for selective targeting of folate-receptor-positive tumor cells, *Journal of Colloid Interface Science*, 350(1): 44-50.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Mehriban AKIN

Doğum Tarihi: 01/07/1986

Doğum Yeri: Kırcaali/Bulgaristan

Medeni Hali: Bekar

Adres: Görükle Göç. Kon. Erciyes Apt. No:91 D:14
Nilüfer/BURSA

Telefon: 0224-470 0962

Mobil Telefon: 0541-289 3631

Email : mihribanakin86@gmail.com

Eğitim bilgileri

Yüksek Lisans (2009-2011): Ege Üniversitesi – Fen Bilimleri Ens. Biyokimya A.B.D

Lisans (2005-2009): Ege Üniversitesi – Fen Fak. Biyokimya Bölümü

Lise (2001-200): Bursa Erkek Lisesi – Fen Bilimleri Bölümü

Katıldığı Sempozyumlar

-Kanser Biyokimyası Sempozyumu, Ege Üniversitesi-EBİLTET, 2 Mart 2007, İzmir.

-Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu, Ege Üniversitesi-EBİLTET, 7 Mart 2007, İzmir.

Ulusal Kongreler

-23. Ulusal Kimya Kongresi, 16-20 Temmuz 2009, Sivas.

-24. Ulusal Kimya Kongresi, 29 Haziran – 2 Temmuz 2010, Zonguldak.

Uluslararası Kongreler

- 10th Workshop on (Bio)sensors and Bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis, 2011, Jena/Germany

- International Conference on Nanomaterials and Nanosystems, 2009, İstanbul/Turkey

Sunumlar

1. Poliamidoamin(PAMAM)/Sisteamine modifiye altın elektrodu temel alan alkol oksidaz biyosensörü ve karakterizasyonu, 23. Ulusal Kimya Kongresi Sivas (2009) – Poster Sunumu.
2. Alkol oksidaz Biyosensörünün Hazırlanması ve Akışa Enjeksiyonlu Analize (FIA) Yönelik Uygulamaları, 23. Ulusal Kimya Kongresi Sivas (2009) – Sözlü Sunum.
3. Modified Gold Arrays by Dendrimeric Structures for Multiplex Biosensing on Glucose and Ethanol in yeast culture, International Conference on Nanomaterials and Nanosystem (2009), Poster Sunumu.
4. Multianalit Tayinine Yönelik Akışa Enjeksiyonlu Biyoanaliz Sistemlerinin Tasarımı ve Uygulaması, 24. Ulusal Kimya Kongresi (2010), Sözlü Sunum.
5. Design of Dendrimer/Anti-antibody Conjugated Quantum dot for Fluorescence Sensing of Cancer Cells, 10th Workshop on (Bio)sensors and Bioanalytical

microtechniques in environmental and clinical analysis, 2011, Jena/Germany (poster sunumu)

6. Design and Impimentation of Modified Surfaces: Electrochemical Detection of Cancer Cells, 9th International Electrochemistry Meeting, 2011, Izmir/Turkey (en iyi 2. Poster ödülü)

Bilimsel Makaleler

1. Mehriban Akin, Merve Yuksel, Caner Geyik, Dilek Odaci, Arne Bluma, Tim Höpfner, Sascha Beutel, Thomas Scheper, Suna Timur, Alcohol Biosensing by Polyamidoamine(PAMAM)/ Cysteamine/ Alcohol Oxidase Modified Gold Electrode, Biotechnological Progress, 26 (3); 2010; 896-906
2. Merve Yuksel, Mehriban Akin, Caner Geyik, Dilek Odaci Demirkol, Caglar Ozdemir, Arne Bluma, Tim Höpfner, Sascha Beutel, Suna Timur, Thomas Scheper, Offline Glucose Biomonitoring in Yeast Culture by Polyamidoamine (PAMAM)/Cysteamine Modified Gold Electrodes, Biotechnological Progress, 27(2); 2010, 530-538
3. Fulya Ekiz, Funda Oğuzkaya, Mehriban Akin, Suna Timur, Cihangir Tanyeli and Levent Toppare, Synthesis and application of poly-SNS anchored carboxylic acid: a novel functional matrix for biomolecule conjugation, J. Mater. Chem., 2011, 21, 12337-12343
4. Akin Mehriban, Prediger Andreas, Yüksel Merve, Höpfner Tim, Demirkol Dilek, Beutel Sascha, Timur Suna, Scheper Thomas, A new set up for multi-analyte sensing: At-line bio-process monitoring, Biosensors and Bioelectronics 2011, 26(11) 4532-4537.
5. Mehriban Akin, Rebecca Bongartz, Johanna G. Walter, Dilek O. Demirkol, Frank Stahl, Suna Timur, and Thomas Scheper, PAMAM-functionalized water soluble quantum dots for cancer cell targeting, Journal of Materials Chemistry, 2012, accepted paper.

Görev Alınan Projeler

1. Development of multi analyte test systems for cell analysis, 108T293, Scientific and Technological Research Council of Turkey, TUBİTAK/ BMBF (Germany), Eylül/2008- Eylül/2010
2. Kanser Hücrelerine Spesifik, Tanıyıcı, Elektroaktif Yüzeylerin Oluşturulması, Karakterizasyonu ve In vitro Uygulamaları, Feyzi Akkaya Bilimsel Etkinlikleri Destekleme Fonu, Kasım/2010- Mayıs/2012
3. Architectures based on fluorescence labeled and complex structured polymers targeted to cancer cells as a new platform for cancer diagnosis and cell culture on a chip applications, 109T573, TUBİTAK/ BMBF (Germany), Şubat/2010- Mayıs/2012
4. Kanser hücrelerinin görüntülenmesine yönelik spesifik biyokonjugatların tasarımı, karakterizasyonu ve in vitro uygulamaları, Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Ege University, 2010/FEN/0053, Eylül/2010- Mayıs/2012

Alınan burslar

- Ahmet Pıştına Eğitim Vakfı bursu (2008-2009)
- Toplum Gönüllüleri Vakfı bursu (2008-2009)
- 109T573 (Türkiye-Almanya), TUBİTAK proje bursiyeri (2010-2012)
- 109T573 TUBİTAK projesi Almanya seyahat bursu (Nisan/2011-Mayıs/2011)

Lisans Tezi

Pamam (Poliamidoamin) ile Modifiye Edilmiş Alkol Oksidaz Enzimini Temel Alan Biyosensörlerin Optimizasyonu, Karakterizasyonu ve Fermentasyon Ortamına Uygulamaları, Ege Üniversitesi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Sunuş Tarihi: 29.05.2009, Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna Timur

