



**FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA
KARBON KUANTUM NOKTALARIN
HÜCRE İÇİ LOKALİZASYONLARININ
BELİRLENMESİ**

Ayshan NOVRUZOVA

Yüksek Lisans Tezi

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Özlem BARIŞ

2019

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA KARBON KUANTUM
NOKTALARIN HÜCRE İÇİ LOKALİZASYONLARININ
BELİRLENMESİ**

Ayshah NOVRUZOVA

**NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2019**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA KARBON KUANTUM
NOKTALARIN HÜCRE İÇİ LOKALİZASYONUNUN BELİRLENMESİ**

Prof. Dr. Özlem BARIŞ danışmanlığında, Ayshan NOVRUZOVA tarafından hazırlanan bu çalışma 25/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı – Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Özlem BARIŞ

İmza:

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK

İmza:

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KARATAŞ

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 31.01.2019 tarih ve 05 / 26 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA KARBON KUANTUM NOKTALARIN HÜCRE İÇİ LOKALİZASYONLARININ BELİRLENMESİ

Ayshan NOVRUZOVA

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Karbon kuantum noktalar özellikle kolay sentezlenebilmeleri, düşük toksisiteleri ve fotostabil özellikleri ile son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Boyutlarına bağlı olarak farklı dalga boylarında emisyon vermeleri karbon kuantum noktaları hücre görüntüleme ve ilaç taşıma gibi alanlarda da kullanılabilir yapmakta ve ilgili araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bu çalışma da hücre ve hücre kısımlarının boyanması ve / veya işaretleme amacıyla modifiye Hummers metodu ile sentezlenen karbon kuantum noktaların kullanılabilirliği araştırılmıştır. Farklı kanser hücre hatları (MCF-7 ve CaCO₂) kullanılarak floresan ve konfokal mikroskoplar yardımı ile görüntülemeler yapılmıştır. Ayrıca yaygın kullanılan iki boya olarak Hoechst 33342 ve Propidium Iodide ile karbon kuantum noktaların birlikte kullanımları değerlendirilmiştir. Hücre hatlarında yapılan uygulamalar sonucunda karbon kuantum noktaların sentez metodolojisine bağlı olarak boyut ve yüzey farklılıklarının hücre içi lokalizasyonlarda farklılık oluşturabildiği gözlemlenmiştir. Kullanım amacına uygun olarak sentez yöntemlerinin optimize edilmesi ve hücre ile ilgili uygulamaların devam etmesi gerekmektedir.

2019, 61 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karbon Kuantum Nokta, Hücre Kültürü, Konfokal Görüntüleme, Floresan İşaretleme

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF THE CELL LOCALIZATIONS OF CARBON QUANTUM DOTS IN DIFFERENT CANCER CELL LINES

Ayshah NOVRUZOVA

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Nanoscience and Nanoengineering
Science of Nanobiotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Carbon quantum dots are especially notable for their easy synthesis, low toxicity and photostable properties. Emission of different wavelengths depending on their size makes carbon quantum dots available in areas such as cell imaging and drug transport and related research is increasing day by day. In this study, the usability of carbon quantum dots synthesized by the modified Hummers method for the staining and / or processing of the cell and cell parts was investigated. Imaging was performed using fluorescence and confocal microscopes using different cancer cell lines (MCF-7 and CaCO₂). In addition, two commonly used paints were evaluated together with Hoechst 33342 and Propidium Iodide with carbon quantum dots. As a result of the applications in the cell lines, it has been observed that the size and surface differences of the quantum dots may differ in intracellular localization depending on the synthesis methodology. In accordance with the intended use, synthesis methods should be optimized and cell-related applications should be continued.

2019, 61 pages

Keywords: Carbon Quantum Dot, Cell Culture, Confocal Imaging, Fluorescence Marking

TEŞEKKÜR

Lisans ve Lisansüstü eğitimim sırasında yanımda olan, bu araştırmaya beni yönlendiren Sayın Hocam Prof. Dr. Özlem BARIŞ'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleriyle desteğini gördüğüm, laboratuvar çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferhunde AYSIN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını aldığım Fen Fakültesi Kimya bölümü Anorganik Kimya laboratuvarı çalışanı Zafer EROĞLU'na teşekkür ederim.

Yüksek Lisans çalışmamın laboratuvar aşamasını gerçekleştirmem için bana kapılarını açan ve her türlü imkanı sağlayan Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) Müdürü Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a, Atatürk Üniversitesi, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na ve tez düzenlenmesinde katkıları nedeniyle Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KARATAŞ teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen aileme de çok teşekkür ederim.

Ayshan NOVRUZOVA

Ocak, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1. Nanopartiküller.....	6
2.2. Nanopartiküller Örenkleri	7
2.2.1. Altın nanopartiküller	8
2.2.2. Gümüş nanopartiküller	8
2.2.3. Silika nanopartiküller	9
2.2.4. Lipoparçacıklar.....	9
2.2.5. Manyetik nanopartiküller	10
2.2.6. Paramanyetik nanopartiküller.....	10
2.2.7. Süpermanyetik nanopartiküller	10
2.2.8. Floresan nanopartiküller.....	11
2.3. Kuantum Noktalar	11
2.3.1. Karbon kuantum noktaları ve uygulamaları.....	14
2.4. Biyogörüntüleme	19
2.4.1. Biyogörüntüleme çeşitleri	20
2.4.2. Biyogörüntülemelerde kullanılan işaretleyiciler ve/veya boyalar	22
2.5. Hücre Kültürleri	23
2.5.1. Hücre kültürlerinin uygulamaları ve önemi	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kullanılan cihazlar	27
3.1.2. Kimyasal maddeler ve Sarf malzemeler.....	28
3.1.3. Hücre hatları	28

3.1.4. Hücre besiyeri ve elemanları	29
3.1.5. Kullanılan diğer kimyasal maddeler.....	31
3.1.6. Hücre kültürü.....	32
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Hücre soylarının stoktan çıkartılması	33
3.2.2. Hücre soylarının pasajlanması.....	34
3.2.3. Hücre soylarının stoklanması	34
3.2.4. Hemositometre ile hücrelerin sayımı	35
3.2.5. (+) Yüklü lamlara hücre ekimi	35
3.2.6. Hoechst 33342, propidiyum iyodür ile ikili boyama yöntemi.....	36
3.2.7. Karbon kuantum nokta (CQD) sentezi	37
3.2.8. Sentezlenen CQDlerin absorbands ve emisyon özelliklerinin belirlenmesi	38
3.2.9. Sentezlenen CQDlerin TEM görüntülerinin alınması	38
3.2.10. CQD kullanılarak hücrelerin floresan ve konfokal mikroskopta görüntülenmesi	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	40
4.1. Sentezlenen CQDlerin Absorbans ve Emisyon Özellikleri.....	40
4.2. Sentezlenen CQDlerin TEM görüntüleri.....	41
4.3. Floresan Mikroskop Görüntüleri	42
4.4. Konfokal Mikroskop Görüntüleri.....	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	51
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	62

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Derece (Sıcaklık)
a,b,c	Örgü parametreleri
A549	İnsan akciğer kanseri hücresi
ASTM	American Society for Testing and Materials
CLSM	Konfokal lazer tarama mikroskopları
CQD	Karbon kuantum noktalar
CRP	C reaktif proteinin
CT	Bilgisayarlı tomografi
DAPI	DiAminoPhenilIndol
DAYTAM	Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ESEM	Çevresel taramalı elektron mikroskobu
FRAP	İki fotonlu floresan uyarma mikroskobu, foto-ağartma
MCF-7	İnsan meme kanseri hücresi
ml	Mililitre (10^{-3})
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NIR	Yakın kızıl ötesi ışın bölgesi
nm	Nanometre (10^{-9})
PET	Pozitron emisyon tomografi
PI	Propidyum iyodür
QD	Kuantum noktalar
RhB	Rodamin B
ROS	Reaktif oksijen türlerini
rpm	Dakikada devir sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. İnvert mikroskopta hücre hatlarının normal görüntüleri a) MCF-7 10x, b) CaCO ₂ 10x.....	29
Şekil 3.2. Floresan Mikroskobu (a), Konfokal Mikroskobu (b)	39
Şekil 4.1. Su içinde dispers edilmiş CQD'lerin UV-Vis spektrumu.....	40
Şekil 4.2. Su içinde dispers edilmiş CQD'lerin 320 nm'de PL spektrumu	41
Şekil 4.3. Su içinde dispers edilmiş CQD'lerin TEM görüntüleri.....	41
Şekil 4.4. CaCO ₂ hücrelerinin Hoechst 33342 boyama sonrasındaki floresans mikroskop görüntüsü – Çekirdek	43
Şekil 4.5. CaCO ₂ hücrelerinin CQD ile muamelesi sonrasındaki floresans mikroskop görüntüsü – Sitoplazma.	43
Şekil 4.6. CaCO ₂ hücrelerinin CQD ile muamelesi sonrasındaki floresans mikroskop görüntüsü – Sitoplazma	44
Şekil 4.7. CaCO ₂ hücrelerinin CQD ile muamelesi sonrasındaki floresan mikroskop görüntüsü – Çekirdekçik.....	44
Şekil 4.8. CaCO ₂ hücrelerinin CQD ile muamelesi sonrasındaki floresan mikroskop görüntüsü – Çekirdekçik.....	45
Şekil 4.9. MCF-7 hücrelerinin aydınlık alan (A), PI ile boyanması sonrasındaki tek ve aydınlık alan görüntüsü (B) ile kombine edilmiş (C) konfokal mikroskopu görüntüler	46
Şekil 4.10. MCF-7 hücrelerinin aydınlık alan (A), CQD ile muamelesi sonrasındaki tek (B) ve kombine edilmiş (C) konfokal mikroskopu görüntüleri	47
Şekil 4.11. MCF-7 hücrelerinin PI boyası (A), CQD ile muamelesi sonrasındaki tek (B) ve kombine edilmiş (C) konfokal mikroskopu görüntüleri	48
Şekil 4.12. MCF-7 hücrelerinin CQD (A), Hoechst 33342 (B) ile muamelesi sonrasındaki tek ve kombine edilmiş (C) konfokal mikroskopu görüntüleri	49
Şekil 4.13. MCF-7 hücrelerinin CQT (A), Hoechst 33342 (B) ile muamelesi sonrasındaki tek ve kombine edilmiş (C) konfokal mikroskopu görüntüleri	50

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, maddenin en küçük birimi olan atom ve molekülleri ifade etmekte olup, yapılan çalışmalarla makineleşmede hassasiyetin teorik sınırlarına ulaşması sebebiyle, günümüzde en ileri üretim teknolojisi olmaktadır. Makromoleküler, moleküler ve ya atomik boyut da (1-100 nm) farklı özellik ve fonksiyon gösteren malzemelerin (bu boyut da malzemenin özellikleri büyük boyutlardan oldukça farklı olabilir) işlenmesi ve oluşumu için yapılan temel bilgi araştırmaları Nanobilim olarak isimlendirilmektedir. Bu bilgiler ışığında, yapı kontrolü ile birlikte nanometre boyutunda sistemler, cihazların üretimi, yapılar, onların karakterize edilmesi ve dizaynı nanoteknoloji olarak isimlendirilmektedir (Berlatsky 2014). Maddeler için 100 nm'den daha küçük boyutlarda gerçekleştirilen işleme, modelleme, ölçüm ve düzenleme gibi çalışmalar nanoteknoloji çalışmaları olarak nitelenmektedir. Nano boyuttaki malzemeler görüntüleme, modelleme, fiziksel özelliklerini ölçerek kontrol etme, sentezleme yaparak teknolojik uygulamalar geliştirme, nanoteknoloji kapsamına girmektedir (Binns 2010).

Nanoteknoloji vizyonunun ortaya çıkışını Feynman'ın cihaz ve malzemelerin moleküler boyutlarda üretimi ile başarılabilecekleri üzerine yapılmış olan konuşmasına kadar dayandırılabilir. Feynman bu konuşmasında nano yapıların ölçülebileceği ve yeni amaçlar doğrultusunda minyatürize edilmiş enstrümanlar ile kullanılabileceğinin altını çizmiştir (Ramsden 2016). Richard Feynman 1959 yılındaki konferansı sırasında atomik blokların moleküler seviyede düzenlenmesini tartışmış, ilk defa maddenin nanoboyutta kullanılma ihtimalini ortaya atmıştır. Feynman konuşmasında; “Görebildiğim üzere, fizik prensipleri nesnelerin atom seviyesinde maniple edilmesine karşı değildir. Bu, herhangi bir kanunu ihlal girişimi olmayıp, prensipte yapılabilir olan ancak biz çok büyük olduğumuz için pratik olarak şimdiye kadar yapılmamış olan bir şeydir” demiştir (Feynman 1992).

Böylece “nanoteknoloji” terimi ilk kez olarak Tokyo Science Üniversitesi'nden Profesör Norio Taniguchi'nin 1974 yılında yayınladığı makalede “Nanoteknoloji, maddenin tek bir atom ve ya tek bir molekül düzeyinde ayrılmamış birleştirilmesi ve deforme edilmesi

süreçlerinden oluşmaktadır” şeklinde tanımlanmıştır. Fikir olarak, Nanoteknoloji kelimesi ortaya çıkmadan önce dile getirilmiştir (Drexler 1986).

Nanoboyutta malzemelerin makrodünyadan farklı davranmaları, nanoteknolojiyi bu kadar ilginç kılan unsurdur. Tek bir malzemedan hazırlanan partikül bile farklı boyutlara göre farklı nitelikler arz edebilir. Örneğin, başka maddelerle reaksiyona girmek istemeyen külçe şeklindeki altın, nanoboyuttayken bu durumun tam tersini göstermektedir. Kuantum etkileri yüzünden maddeler, nanoboyutta farklı özellikler göstermektedir. Bu özellik sebebiyle, bilim araştırmacıları malzemelerin nanoboyuttaki davranışlarını araştırıp, sorunlara çözüm bulmaya çalışmaktadırlar (Drexler 1986).

Son yıllarda birçok alanın fazlasıyla dikkatini çeken nanoteknoloji; kimya, fizik, biyoloji ve mühendislik gibi disiplinler arası konuma sahip olmasının yanı sıra, uzay, tarım, endüstri, elektronik, ilaç ve sağlık gibi bütün alanlara potansiyel etkileri bulunmaktadır. Bu kadar önem arz eden disiplin olan nanoteknoloji, birçok gelişmiş olan ülke tarafından, en kritik araştırma alanı olarak desteklenmektedir. Bununla beraber tüm insanlık için kökten değişim ve dönüşümleri beraberinde getirecek potansiyele sahip olmaktadır.

Nanoteknoloji özellikle boyut ile ilgili olup, ancak malzemenin niteliği fonksiyonu doğrudan etkilemektedir. Son yıllarda tek başına mühim bir alan olma doğrultusunda büyük bir gelişim gösteren nanoboyutlu malzemeler üzerine çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Rogers *et al.* 2013). Aynı tür malzemedan yapılmış nanoboyutlu malzemenin özellikleri makroboyutlu olanlardan farklıdır. Nanoboyutlu parçacıklar boyut ve yapıya bağımlı fiziksel, kimyasal, elektriksel, mekanik ve optik özelliklere sahiptirler. Malzeme boyutlarının küçültülmesi sonucunda fiziksel özelliklerin de değişiyor olması, nanoteknoloji uygulamalarının temelinde vardır. Nanoboyutlu malzemeler üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda tek başına önemli bir alan olma konusunda büyük bir gelişim göstermektedir. Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar; nanopartiküller, nanoteller, nanotüpler, nanokristaller, nano ince filmler veya nanoçubuklar gibi farklı sınıflara göre ayrılmaktadır. Maddelerin belli boyut aralığında

hacimsel yapılarından farklı olarak olağandışı işlevsellik ve özellikler sergilemeleri, bu konu üzerine ilginin yoğunlaşmasının temel sebebidir (Heiligtag *et al.* 2013).

Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapıların en önemlisi nanopartiküllerdir. Nanopartiküller ise boyutları 100 nm ve altında olup, nanoboyutlu malzemelerin dolayısıyla nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır. Bu partiküllerin diğer ticari malzemelere kıyasla daha farklı ve üstün kabul edilir özellik sergiledikleri bilinmektedir (Horiba Scientific 2016). Nanopartikül özelliklerinin sıkça belirtilen cazibesinin günümüzde bilinen nedenleri ise; yüzey atomlarının eşsiz özellikleri, yüksek yüzey/hacim oranı ve kuantum boyut etkileri olarak ön plana çıkmaktadır. Nanopartikül sentezi bu yapıların sunmuş oldukları olağandışı özellikler sebebiyle, özel teknolojik malzemeler ile birlikte optik uygulamalar için süperiletkenler, yüksek aktiviteli katalizörler, aşınmaya karşı katkılar, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri, yüzey aktif maddeleri gibi birçok farmakolojik ve teknolojik ürünlerin hazırlanmasının önünü açmıştır. Ayrıca kendine has işlevselliğe sahip olmakla birlikte, malzemelerin nanoboyutta kontrolü nanomakinalar, nanotaşıyıcılar, yüksek yoğunluklu veri depolama hücreleri ve sensörler gibi minyatürleşmiş aygıtların oluşumuna izin vermektedir. Açıkça görülmektedir ki, nanopartiküllerin üretimi nanoteknoloji alanındaki yeni gelişimler için vazgeçilmez ilk adım olmaktadır. Bu yeni gelişmeler nanoyapılı cihazların ve malzemelerin üretimini, tasarımını ve işlevsel olarak kullanımını kapsamaktadır (Graf *et al.* 2015).

Nanopartiküllerdeki yüzey alanından hacim oranına nanopartiküllerin özellikleri üzerinde önemli bir etkisi vardır. İlk olarak, nanopartiküller malzemenin aynı hacmi ile karşılaştırıldığında nispeten daha büyük bir yüzey alanına sahiptir (Sumita 2013). Bu özelliikle şu şekilde formulize edilebilir: Kürenin yüzey alanı = $4\pi r^2$; Kürenin hacmi = $\frac{4}{3}(\pi r^3)$ ile hesaplanmaktadır. Yüzey alanı / Hacim oranı $\frac{4\pi r^2}{\frac{4}{3}(\pi r^3)} = \frac{3}{r}$ olarak sadeleştirilebilmektedir.

Verilen hacmin daha küçük bir parçaya bölünmesi durumunda yüzey alanının arttığı sonucuna varılabilir. Bu nedenle, parçacık boyutu azaldıkça, atomların daha büyük bir kısmı, içeridekilere kıyasla yüzeyde bulunur. (Ratner *et al.* 2013). Örneğin, 3 nm

büyükluğündeki bir parçacık, yüzeyindeki atomlarının %50'sine, atomlarının 10 nm %20'sine ve 30 nm'de yüzeyinde atomlarının %5'ine sahiptir. Bu nedenle, nanopartiküller, daha büyük parçacıklara kıyasla birim hacimde çok daha büyük bir yüzey alanına sahiptir. Nanopartiküllerin kimyasal olarak daha reaktif olmasına yol açar. Büyüme ve katalitik kimyasal reaksiyon yüzeylerde gerçekleştiği için, belirli bir nanomalzeme kütlesi büyük parçacıklardan oluşan aynı malzemeden çok daha reaktif olacaktır. Ayrıca, yığın halindeki inert olan malzemelerin nano ölçekli formlarında üretildiklerinde reaktif oldukları ve özelliklerinin geliştirilebileceği bulunmuştur.

Nanopartikülleri bu kadar eşsiz kılan özelliği maddelerin belli boyut aralığında hacimsel yapılarından daha farklı olarak olağandışı özellikler ve görevler üstlenmesidir. Kanser teşhis ve tedavisinde, hedefli ilaç salımında nanopartiküller biyosensörler gibi tıp ve biyoteknoloji alanlarında kullanılmaktadırlar (D'Almeida *et al.* 2016).

Nanoteknolojide kullanılan nanopartiküller; "American Society for Testing and Materials (ASTM)"ın standart tanımlamasına göre partikül boyutları iki ya da üç boyutlu olarak 1-100 nm uzunluktaki parçacıklar olarak tanımlanmaktadır.

Nanopartiküllerin mevcut bir sınıflandırılması bulunmamaktadır, fakat genel anlamda işlevlerine, içeriklerine, şekillerine, öz niteliklerine, fonksiyonlarına, boyut, morfoloji, fiziksel ve kimyasal özelliklerine, birlikte kullanımlarına göre sınıflandırılmaları yaygın olarak yapılmaktadır. Nanopartiküllerin farklı özelliklerine göre farklı sınıflandırmalar bulunmaktadır. Basitce metalik, ametalik nanopartiküller olarak sınıflandırılabilen gibi fonksiyonel özelliklerine göre (manyetik, floresan vb.) olarak da sınıflandırılabilir. Kullanım amacına göre istenilen sınıflandırma yöntemi değerlendirilebilmektedir. Gözlem yapma kolaylığı nedeniyle özellikle hücre görüntüleme ve ilaç taşıma gibi çalışmalarda floresan özellik önem kazanmaktadır.

Floresans gibi optik özellikler partikül boyutunun bir fonksiyonu haline gelmektedir. Kadmiyum selenitten yapılanlar gibi benzer yarı iletken nanopartiküllerde, boyuttaki küçük farklılıklar, farklı dalga boylu ışıkların emilimine ve yayılmasına yol açarak,

bunları floresan izleyiciler olarak faydalı hale getirmektedir (Ramsden 2016). Örneğin floresan nanopartiküller boyutlarıyla, absorbanlarıyla ve emisyonlarıyla değişir. Buna göre farklı tip floresans nanopartiküller sentezlenebilir. Floresan nanopartiküller hem optik veri depolama hem de biyokimyasal, biyoanalitik ve tıbbi alanlarda diğer teknik uygulamalar için umut verici araçlardır. Mevcut tıbbi ve biyolojik floresan görüntüleme yöntemleri, esas olarak, molekül başına ışık emisyonu ve fotostabilite ile sınırlı olan boya işaretleyicilerine dayanmaktadır. Floresan nanopartiküller, stabil özellikleri nedeniyle diğer floresan işaretleyicilerin dezavantajlarına sahip değildir ve çeşitli immünolojik testler için başarıyla kullanılabilir (Ratner *et al.* 2013).

Floresan NP'ler içerisinde kullanışlı ve çok araştırılan malzemelerden biri olarak karbon tabanlı Kuantum noktalar dikkat çekmektedir. Floresan karbon nanopartiküller veya karbon kuantum noktaları (CQDs), kısa bir süre önce ortaya çıkan ve geleneksel yarıiletken kuantum noktalarına potansiyel rakip olarak çok ilgi toplayan yeni bir karbon nanomalzeme sınıfıdır. Optik özelliklerine ek olarak, CQD'lerin düşük toksisite, çevre dostu olma maliyeti ve basit sentetik yollardan istenen avantajları vardır. Dahası, CQD'lerin yüzey pasivasyonu ve fonksiyonel hale getirilmesi, bunların fizikokimyasal özelliklerinin kontrolüne izin verir. Onların keşfinden bu yana, CQD'ler kimyasal algılama, biyoalgılama, biyo-görüntüleme, nanotıp, fotokataliz ve elektrokataliz alanlarında birçok uygulama bulmuşlardır. Bu makale, bu heyecan verici ve ümit vaat eden alandaki zorluklar ve perspektifler üzerine bir tartışma ile birlikte sentez, fonksiyonelleştirme ve teknik uygulamalara vurgu yaparak, CQD'lerin araştırma ve geliştirilmesindeki ilerlemeyi gözden geçirmektedir (Shi *et al.* 2015).

Bu çalışma ile floresan özellik gösteren CQD ile farklı kanser hücre hatlarında işaretleyici olarak kullanım potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda MCF-7 ve CaCO₂ hücre hatları kullanılmış, görüntüleme için floresan ve konfokal mikroskopları ile hoechst ve PI boyaları eşliğinde etkileşimleri incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Nanopartiküller

Nanoparçacıklar, bir nanometre ölçeğinde (yani en az bir boyutta 100 nm'nin altında) bulunan parçacıklardır. Malzemeler bilimi ve biyolojisinde onları istenen hale getiren homojenlik, iletkenlik veya özel optik özellikler gibi fiziksel özelliklere sahip olabilirler. Nanoparçacık araştırması şu anda biyomedikal, optik ve elektronik alanlardaki çok çeşitli potansiyel uygulamalardan dolayı yoğun bir bilimsel araştırma alanıdır. Çeşitli tiplerde nanopartiküller vardır. Nanoteknolojide kullanılan nanopartiküller "American Society for Testing and Materials (ASTM)"ın standart tanımlamasına göre partikül en az bir boyutta 1-100 nm ölçeği içerisinde olan parçacıklar olarak tanımlanmaktadır (Batista *et al.* 2015).

Nanopartiküller nanomateryallerin büyük kısmını oluşturur, örneğin altın gibi farklı malzemelerden yapılabilir. Nanopartiküller 1 ile 100 nm boyutlarında olan kolloidal yapılardır. Bu boyutlarda her parçacık büyüklüğüne bağlı olarak değişen yeni özelliklere sahiptir. Madde nano boyutta küçülürken, elektronik ve diğer özellikler radikal bir şekilde değişebilir. Nanoparçacıklar, malzeme özelliklerini önemli ölçüde değiştirebilen olağandışı yapısal farklılık formları içerebilir ve bu nedenle sadece küçük miktarlarda bulk material malzeme olarak kabul edilemez. Her ikisi de saf altından yapılmış olan iki nanopartikül, diğerinden daha büyükse, farklı sıcaklık davranışları, farklı elektriksel iletkenlik ve farklı renkler sergileyebilir. Bu, malzemelerin özelliklerini kontrol etmek için yeni bir yolun açılması, yani kompozisyonu değiştirmek yerine, boyutun değiştirilebileceği anlamına gelir (Niklasson *et al.* 1999). Nanopartiküllerin bazı uygulamaları, malzeme daha küçük boyutlara ayrıldığında daha fazla yüzey alanının ortaya çıkmasından yararlanılabilmektedir (Buzea *et al.* 2007).

Nanoteknoloji ile ilgili ilk değerlendirilen olgu boyut olmaktadır, ancak malzemenin niteliği fonksiyonu doğrudan etkilemektedir. Nanopartiküller genellikle nanoboyutta olmasıyla karakterize edilse de, bu boyuttayken değişen nitelikleri nanopartiküllerin en

önemli özellikleridir. Nanomalzemeler ve bulk materyaller arasındaki fark, nanomalzemelerin boyutlarının en az bir boyutta 1-100 nm aralığında olması, buna karşılık bulk malzemelerin boyutlarının her boyutta 100 nm'nin üzerinde olmasıdır (Khan *et al.* 2012).

Nanoboyutlu malzemeler üzerine gerçekleştirilen çalışmalar son yıllarda tek başına önemli bir alan olma doğrultusunda büyük bir gelişme göstermektedir. Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapıların en önemlisi nanopartiküllerdir; nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar ve ya nano ince filmler gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır (Crisponi *et al.* 2017).

Kuantum noktalar da nano boyutlu kristallerdir ve yarı iletkenler ve uygulamalarda kullanılan kuantum noktaların çapları genellikle 2-15 nanometre (10-75 atom) uzunluğundadır (James *et al.* 2012).

Nanopartiküller çok büyük yüzey alanı/hacim oranına sahiptirler. Buna bağlı olarak floresans gibi optik özellikler partikül çapının bir fonksiyonu haline gelirler. Nanopartiküller kullanılarak yapılan malzemelerde sertlik ve elastikiyet özellikleri değişir. Geleneksel polimer yapıların nanopartiküller kullanılarak güçlendirilmesi mümkündür. Böyle nanoteknolojik olarak güçlendirilmiş materyallerin ağırlığı azalırken dayanıklılık ve fonksiyon çeşitliliği artmaktadır (Martinez 1998).

2.2. Nanopartiküller Örenkleri

Nanopartiküllerin mevcut bir sınıflandırılması yoktur, ancak genel anlamda işlevlerine, içeriklerine, şekillerine, öz niteliklerine, fonksiyonlarına, boyut, morfoloji, fiziksel ve kimyasal özelliklerine, birlikte kullanımlarına göre sınıflandırılmaları yaygın olarak yapılmaktadır (Saeed *et al.* 2017).

Farklı özelliklerine göre farklı sınıflamalar bulunmakla birlikte basit olarak şu şekilde sınıflandırılabilir:

1. Karbon bazlı nanopartiküller (fullerenes, karbon nanotübler vb.),
2. Metal bazlı nanopartiküller (altın, demiroksit nanopartiküller vb.),
3. Yarı iletken bazlı nanopartiküller (kuantum noktaları vb.)

Bu boyutlarda her parçacık büyüklüğüne bağlı olarak değişen yeni özelliklere sahiptir. Madde nano boyutta küçülürken, elektronik ve diğer özellikler radikal bir şekilde değişiyor. Nanoparçacıklar, malzeme özelliklerini önemli ölçüde değiştirebilen olağandışı yapısal bozukluk formları içerebilir ve bu nedenle sadece küçük miktarlarda bulk malzeme olarak kabul edilemez. Her ikisi de saf altından yapılmış olan iki nanopartikül, diğerinden daha büyükse, farklı sıcaklık davranışları, farklı elektriksel iletkenlik ve farklı renkler sergileyebilir. Bu, malzemelerin özelliklerini kontrol etmek için yeni bir yol yaratır. Kompozisyonu değiştirmek yerine, boyut değiştirebilir. Nanopartiküllerin bazı uygulamaları, malzeme daha küçük boyutlara ayrıldığında daha fazla yüzey alanının ortaya çıkmasından yararlanır (Couvreur *et al.* 1995).

2.2.1. Altın nanopartiküller

Bilinen en eski ve en çok çalışılan parçacık olarak altın nanopartiküller estetik nitelikleri için geçmişten günümüze kullanılmış ve son zamanlarda optik – elektronik özelliklerine yönelik çok çeşitli yüksek teknoloji kullanımları bulunmaktadır. DNA molekülleri, özel olarak tasarlanmış diğer DNA parçalarıyla mavi görünen kümelere dönüşen altın nanopartiküllerine bağlanır. Kurşun varlığı, bağlanan DNA'nın parçalanmasına neden olur. Bu, bireysel altın nanopartiküllerini keser ve rengi maviden kırmızıya değiştirir. Altın nanoparçacıklar da hastalık tespit etmek için biyosensörler oluşturmak için bir bağlantı noktası olarak kullanılır (Dykman *et al.* 2008).

2.2.2. Gümüş nanopartiküller

Genellikle "gümüş" olarak tanımlanırken, bazıları yüzeyden demirli gümüş atomlarına oranla büyük oranda gümüş oksitten oluşur. Eldeki uygulamaya bağlı olarak çok sayıda nanopartikül şekli oluşturulabilir. Yaygın olarak küresel gümüş nanopartiküller kullanılır,

ancak elmas, sekizgen ve ince tabakalar da popülerdir (Zhang *et al.* 2016). Son derece geniş yüzey alanları çok sayıda ligandın koordinasyonuna izin verir. İnsan tedavilerine uygulanabilir gümüş nanopartiküllerin özellikleri laboratuvar ve hayvan çalışmalarında araştırılmaktadır, potansiyel etkinlik, toksisite ve maliyetleri değerlendirmektedir (Jain *et al.* 2005).

2.2.3. Silika nanopartiküller

Silika durumunda, diatom kabuğu veya sünger kafasının oluşumu, son on yılda, yeniden yapılandırılmış materyalleri ve nano-cihazlarını detaylandırmak için önemli bilgiler sağlayabileceğinden çok dikkat çekmiştir. Mineral fazın, biyomoleküler şablonların varlığında, seyreltilmiş öncü çözeltilerden *in vivo* olarak üretilen nanopartiküllerin kontrollü bir şekilde toplanmasıyla oluştuğu düşünülmektedir. Silisleyici organizmalarda bulunan biyomoleküller ekstrakte edilerek tanımlanmıştır (Liu *et al.* 2011). Silikon parçacıkları 25 ila 1.000 nm arasında değişir. Biyomimetik yaklaşımlar, canlı organizmaların hücre içi bölümlerinde bulunanlara çok benzeyen koşullarda silika oluşumunu aktive edebilen çeşitli doğal veya sentetik moleküllerin tanımlanmasına yol açmıştır. Ek olarak, bu sistemlerin birçoğu, boyut aralığı ve sınırlı polidispersitesi kolloidal biyosilikayı yeniden üreten silika nanoparçacıklarını oluşturabilmektedir. Bununla birlikte, canlı organizmalardan biyosilikatör moleküllerin ekstraksiyonu ve karakterizasyonu hala sınırlıdır. Silikon nanopartiküller ilaç dağıtımında ve gen terapisinde kullanılmıştır (Liu *et al.* 2010).

2.2.4. Lipoparçacıklar

Lipoparçacıklar, bir lipit çift katmanı tarafından çevrelenmiş ve konformasyonel olarak bütünleşik zar proteinleri ile gömülü nanometre büyüklüğündeki kürelerdir. İntegral membran proteinleri, mevcut ilaç hedeflerinin > %50'sini oluşturan bir biyolojik moleküller ailesidir. İntegral membran proteinlerini çözme yeteneği mikroakışkanlar, biyosensörler, yüksek verimli tarama, antikör gelişimi ve kompleks reseptörlerin yapısal

alışmaları için uygulamalara sahip olup, ilaç keşfinde kullanılmaktadır (Chen *et al.* 2013).

2.2.5. Manyetik nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller için, stigmalar eksikliği parçacıkların büyüklüğü dikkate alınarak dikkate değer derecede güçlü manyetik alanlar üretmektedir. Nanopartiküller de o kadar kktr ki, çoğunda atomlar tek bir stigma olmadan mükemmel kristaller halinde sıralanmaktadır (Deng *et al.* 2017).

2.2.6. Paramanyetik nanopartiküller

Paramanyetik parçacıklar, hücre ayırma, protein ayırma ve tek moleküllü ölçümler için önemli araçlardır. Bu uygulamalarda kullanılan parçacıklar aşağıdaki gereksinimleri karşılamalıdır: boyutta düzgün, yüksek oranda paramanyetik, fizyolojik tuz tamponu içinde kararlı, işlevsel ve 100-1.000 nm büyüklüğünde olmalıdır. Model patojenlerin tespiti için kullanılmıştır. Antikorlara bağlı olan paramanyetik nanopartiküller, oldukça spesifik biyolojik hücre ayırmalarını mümkün kılmaktadır (Pankhurst *et al.* 2003).

2.2.7. Spermanyetik nanopartiküller

Uygun yüzey kimyası ile süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (SPIONs), MRI kontrast artışı, doku onarımı, immünolojik test, biyolojik sıvıların detoksifikasyonu, hipertermi, ilaç verme ve hücre ayırımı gibi birçok *in vivo* uygulama için deneysel olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Bu uygulamalar, nanoparçacıkların, fiziksel ve kimyasal olarak tekdüze olmaları için, toplam dar parçacık boyutu dağılımı ile 100 nm'den daha kkk ve yüksek mıknatıslanma değerlerine sahip olmasını gerektirir. Buna ek olarak, bu uygulamaların manyetik parçacıkların özel yüzey kaplaması gereklidir, bu da sadece toksik olmayan ve biyo-uyumlu olmakla kalmaz, aynı zamanda belirli bir alanda parçacık lokalizasyonu ile hedeflenebilir bir verime izin vermelidir. Nanopartiküllerin yüzey kaplamalarının doğası, sadece koloitin toplam büyüklüğünü değil, aynı zamanda

vücuttaki nanopartiküllerin biyokinetiği ve biyo-dağılımında da önemli bir rol oynamaktadır. Manyetik nanoparçacıklar, ilaçlara, proteinlere, enzimlere, antikorlara veya nükleotidlere bağlanabilir. Bir dış manyetik alan kullanılarak bir organ, doku veya tümöre yönlendirilir veya hipertermide kullanım için alternatif manyetik alanlarda ısıtılabilir (Mahmoudi *et al.* 2011). Hücrelerin manyetik etiketlenmesi, MRI ile *in vivo* temporal-spatial migrasyonunu izleme olanağı sağlamaktadır. SPIONs kullanarak hücreleri manyetik olarak etiketlemek için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Kök hücrelerin ve diğer memeli hücrelerinin manyetik olarak etiketlenmesi, insanlarda gelecekteki hücre bazlı tedavilere rehberlik etme ve hastalık modellerinde hücre bazlı tedavi etkilerinin değerlendirilmesi için potansiyele sahiptir (Amstad *et al.* 2009).

2.2.8. Floresan nanopartiküller

Floresan nanopartiküller, iki-foton uyarım tahlil teknolojisi kullanılarak C reaktif proteinin (CRP) immünometrik analizi için etiket olarak kullanılabilir. Bu yeni test tekniği, yüksek duyarlılığa sahip mikrovolluslardan çoğullanmış, ayırtırmayan biyo-aparatlık analizleri sağlamaktadır. CRP'nin tahlili, 75 nm çapındaki bir nanopartikülün floresan işaretleyici kullanılarak CRP taban seviyelerinin değerlendirilmesi için optimize edilmiş ve analiz performansı, aynı fluorofor çekirdeğinin bir moleküler raportörüne dayanan CRP analiziyle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, işaretleyici olarak floresan nanopartiküllerin, moleküler etiket kullanmadan 2 kat daha büyük bir hassasiyetle daha iyi duyarlılık sağladığını gösterirken, farklı analiz türlerinin hassas profilleri arasında hiçbir fark bulunmadığını göstermektedir. Yeni test yöntemi, görünüşte sağlıklı bireylerin serumlarında CRP'nin temel düzeylerinin değerlendirilmesi için uygulanmıştır. Bunlar moleküler diagnostik uygulamaları için araştırılmaktadır (Mangeolle *et al.* 2018).

2.3. Kuantum Noktalar

Kuantum noktalar (Quantum Dots = QD), bir lazer gibi bir ışık kaynağı tarafından uyarıldığında parıltıyan yarı iletken malzemenin nano ölçekli kristalleridir. QD'nin boyutu, düşük enerji ışığıyla ışınlığında ortaya çıkan ışık frekansını belirler. QD'lerin

başlangıçta kararsız ve çözelti içinde kullanılması zor bulunmuştur (Gorbachev *et al.* 2016). Biyolojik deneyler için renkli optik kodlama tam olarak kontrol oranları polimerik mikro-taneler, farklı büyüklükteki QD'lerin içine gömülmesiyle elde edilmiştir. Onların yeni optik özellikleri (örneğin, boyut ayarlanabilen emisyon ve eşzamanlı uyarma) bu son derece parlak QD'leri dalga boyu ve yoğunluklu çoğullama için ideal floroforlar haline getirmiştir. 10 yoğunluk seviyesinin ve 6 rengin kullanımı teorik olarak 1 milyon nükleik asit veya protein dizisini kodlayabilmektedir. Görüntüleme ve spektroskopik ölçümler, QD-etiketli taneciklerin son derece muntazam ve tekrarlanabilir olduğunu ve uygun koşullarda %99.99 gibi yüksek bir oranda tanımlama doğruluğu sağladığını göstermektedir. Bu spektral kodlama teknolojisinin gen ekspresyonu çalışmalarında, yüksek verimli taramalarda ve tıbbi teşhislerde yeni fırsatlar açması beklenmektedir (Ramirez *et al.* 2015).

Mikroemülsiyon-gazın oda sıcaklığında temas ettirilmesi ile lüminesan QD'lerin kontrollü sentezi için ölçeklenebilir bir yöntem bildirilmiştir (Karanikolos *et al.* 2004). Teknik, birçok benzer nanoreaktör oluşturmak için bir mikroemülsiyonun dağınık fazını kullanmıştır. Bu yaklaşımda, ZnSe QD'ler, hidrojen selenid gazı, formamid içinde bir poli - (etilen oksit), poli - (propilen oksit), poli - (etilen oksit) amfifilik blok kopolimerin kendiliğinden birleşmesiyle oluşturulan bir mikroemülsiyonun heptan nanodropletlerinde çözünmüş dietil çinko ile reaksiyona sokularak sentezlenmiştir. Her nanodropda tek bir nanokristal üretilir, böylece heptandaki başlangıç dietil çinko konsantrasyonunun manipülasyonu ile partikül boyutunun iyi kontrol edilmesi sağlanmıştır. ZnSe nanokristalleri, boyut bağımlı lüminesans ve mükemmel fotostabilite sergilemiştir. Parçacık yüklü emülsiyonlar aylar boyunca depolanmada oldukça stabil olduğu bildirilmiştir (Lee *et al.* 2002).

Nano ölçekli yarıiletken QD'lerin çeşitli renkleriyle doldurulmuş lateks boncuklar, herhangi bir sayıda farklı prob için benzersiz etiketler olarak kullanılabilir. Işığa maruz kaldığında, boncuklar kendilerini ve onların bağlı problemlerini, farklı bir renk spektrumunda ışık yayarak bir çeşit spektral barkod tanımlanabilir. QD'lerin şekli ve boyutu, belirli renkleri floresana göre ayarlanabilir. Protein ve DNA'yı aydınlatmak için

kullanılan akım boyları hızlı bir şekilde azalmaktadır, ancak QD'ler canlı hücrelerde günlerce veya daha uzun süre biyolojik reaksiyonların izlenmesine izin verilebilir (Tsoi *et al.* 2013).

QD'ler güçlü bir manyetik alana da yerleştirilebilir, bu da alanın gücüne bağlı olan bir enerji boşluğu ile ayrılan iki nokta enerji noktasında bir elektron vermektedir. Elektron, bir uzak kızıl ötesi fotonun enerjisine karşılık gelecek şekilde, alanı değiştirerek, ayarlanabilen bir enerjinin tam bir fotonu emerek boşluğu atlayabilmektedir. Bir foton emilimi ile uyarıldıktan sonra, elektron tek elektronlu bir transistörün terminaline atlayabilir, burada “anahtarı atar” ve algılanabilmektedir (Fischer *et al.* 2010).

Saf parlaklığı ve yüksek fotostabilitesi nedeniyle, QD'ler moleküler işaretçi olarak hareket etme yeteneğine sahip olmaktadır. İlgili bileşiklere veya proteinlere eklendiğinde, QD'ler araştırmacılara biyolojik medyanın veya tüm organizmaların hareketlerini takip etmelerini sağlamakta olup, tıp uzmanlarının hastalıkları çalışma, teşhis ve tedavi etme şeklini önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Walling *et al.* 2009). QD'lerin uygulamaları:

- Yaşam bilimleri araştırması - canlı hücrelerde proteinlerin izlenmesi
- Flüoresan tespiti — mikroskopi, biyosensörler, çok renkli akış sitometrisi
- Moleküler teşhis
- *Ex vivo* canlı hücre görüntüleme
- PET ve MRI ile izlenen hücrelerin, dokuların ve tümörlerin *in vivo* hedeflenmesi
- Yüksek verimli tarama olarak sıralanabilir (Wang *et al.* 2014; Fernando *et al.* 2015; Shi *et al.* 2015; Yang *et al.* 2013; Saeed *et al.* 2017; Shi *et al.* 2011; Chandra *et al.* 2013).

Deneyisel kullanımlarının son örnekleri, canlı nöronlarda bireysel glisin reseptörlerinin difüzyonunun gözlemlenmesi ve cerrahi sırasında yakın kızılötesi (NIR) emisyon ile canlı hayvanlarda lenf düğümlerinin tanımlanmasını içermektedir. Yeni nesil QD'lerin, tek molekül seviyede hücre içi süreçler, yüksek çözünürlüklü hücresel görüntüleme, hücrelerin uzun vadede *in vivo* gözlemi, tümör hedeflemesi ve tanılama çalışmaları için geniş bir potansiyeli olmaktadır (Michalet *et al.* 2005).

Floresan karbon noktaları (CQD'lar), son yıllarda fiziksel ve kimyasal özellikleri, biyouyumluluk, optik emiciliği, düşük toksisite, kimyasal stabilite, biyomedikal görüntüleme, tıbbi tanı ve teşhis, kataliz, sensörler, ilaç iletimi gibi çok çeşitli uygulamalarda umut verici bir aday haline gelmektedir. Son zamanlarda, biyo-görüntüleme, biyosensör, boya duyarlı güneş pilleri dahil olmak üzere teknolojik toplumda optik, elektrokimyasal lüminesans ve foto-indüklenmiş elektron transfer özellikleri nedeniyle çeşitli karbon noktalarına dayalı nanomalzemeler hazırlanmıştır. CQD'leri üretmek için yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yöntemler kullanılmıştır. Son zamanlarda, CQD'lerin üretimi için tek adımlı stratejiler, sürecin basit ve verimli olması nedeniyle araştırmacıları etkilemiş olup, karbon materyallerine kolayca erişebilme yollarını bulmaktadırlar (Jin *et al.* 2018).

2.3.1. Karbon kuantum noktaları ve uygulamaları

Floresan karbon nanopartiküller veya CQD, kısa bir süre önce ortaya çıkan ve geleneksel yarıiletken kuantum noktalarına potansiyel rakip olarak çok ilgi toplayan yeni bir karbon nanomalzeme sınıfıdır. Karşılaştırılabilir optik özelliklerine ek olarak, CQD'lerin düşük toksisite, çevre dostu olma maliyeti ve basit sentetik yollardan istenen avantajları bulunmaktadır. Bununla birlikte, CQD'lerin yüzey pasivasyonu ve fonksiyonel hale getirilmesi, bunların fizikokimyasal özelliklerinin kontrolüne izin vermektedir. Onların keşfinden bu yana, CQD'ler kimyasal algılama, biyoalgılama, biyo-görüntüleme, nanotıp, fotokataliz ve elektrokataliz alanlarında birçok uygulama bulmuşlardır (Shi *et al.* 2015).

CQD'ler, geçtiğimiz on yılda önemli bir ilgi çeken yeni bir nanomalzeme sınıflarıdır. Flüoresans emisyonlarının kesin kökenleri tartışmasız kalsa da ve floresan emisyonlarının mekanizmalarının daha net bir resmini çizmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulsa da, CQD'ler için iki sınıf floresan emisyon mekanizması önerilmiştir. Flüoresan emisyon mekanizmasının birinci sınıfı, konjuge p bölgelerinin neden olduğu bant aralığı geçişleri iken, ikinci sınıf, CQD'lerde yüzey kusurlarıyla ilişkili daha karmaşık kökenleri içermektedir (Shi *et al.* 2015).

CQD yüzeyine bağlı poli (propiyonil etilenimin-ko-etilenimin) (PPEI-EI) gibi organik veya polimerik malzemelerle yüzey pasivasyonu üzerine, yüzey kusurları stabilize edilir ve hem çözelti benzeri süspansiyonda hem de katı halde güçlü floresans emisyonları tespit edilir. Bu gibi pasifleştirilmiş CQD'lerin emisyonları, geniş bir görünür bölge bölgesini kapsamakta ve yakın kızılötesi (NIR) bölgeye uzanmaktadır (Wang *et al.* 2014). Kullanılan yüzey pasifleştirme ajanlarının görünür ve NIR bölgelerinde yayıcı olmadığına dikkat edilmelidir, bu nedenle gözlemlenen herhangi bir floresan emisyonunun yüzey aktifleştirilmiş CQD'lerden kaynaklanmış olması gerekir. PPEI-EI pasifleştirilmiş CQD'lerin floresan spektrumlarından, emisyonların geniş ve uyarma dalga boyuna bağlı olduğu açıktır. Yüzey-pasifleştirilmiş CQD'lerin ayarlanabilir emisyonları, CQD'lerin farklı boyutlarındaki partiküllerin çeşitli floresan karakteristiklerinin ve CQD'lerin yüzeyinde farklı yayıcı alanların dağılımının bir sonucu olabilir. Tartışmalı sonuçlar sıklıkla gözlemlendiğinden deneysel gözlemler yararlı değildir. Ayrıca, CQD'lerin optik özellikleri, preparatlarında kullanılan sentetik yollarla yakından ilişkilidir (Wang *et al.* 2014). Örneğin, Sun ve ekibi (2015) floresan emisyonlarını, CQD'lerin yüzey enerji tuzaklarının eksitonlarının ışıma rekombinasyonuna bağladılar. Yüzey pasivasyonu üzerine, bu enerji kapanları stabilize edilir ve bu nedenle salımsal hale gelir - yarıiletken kuantum noktalarında gözlenen bir olaydır. CQD'lerin yüzeyinde salımsal enerji tuzaklarının kuantum hapsi etkisi olması gerektiğini öne sürmüşlerdir (Sun *et al.* 2015).

Ek olarak, birkaç rapor CQD'lerin floresan emisyonlarının pH'a bağlı olduğunu göstermiştir. Liu ve arkadaşları (2010) CQD'lerinin floresan yoğunluğunun, pH'ın artırılıp azaltılmadığına bakılmaksızın, solüsyonun pH değerinin 7,0 optimal değerinden kaydığı zaman azaldığını fark etti. Başka bir raporda, CQD'lerin floresan yoğunluğunun, çözeltinin pH değerinin 5'den 9.33'e değiştirildiği zaman sadece %3'lük bir azalma gösterdiği gözlemlenmiştir (Liu *et al.* 2010). Jia ve arkadaşları (2014) askorbik asit çözeltisinin doğrudan ısıtılmasından hazırlanan CQD'lerin pratik olarak lineer olduğunu bildirmişlerdir. Çözeltinin pH'sine bağımlılığı 4.0 ila 8.0 aralığındadır. Floresan yoğunluğu, pH 4.0 ila 8.0 arasında %90'a kadar azaldı. Karboksil gruplarının CQD'lerin yüzeyindeki deprotonasyonuna karşılık gelen 4.0 ila 8.0 arasındaki çözeltinin pH'ının

değiştirilmesi, CQD'lere elektrostatik doping / şarja neden olabilir ve Fermi seviyesini değiştirebilir (Jia *et al.* 2014). Yukarıda görüldüğü gibi, çözeltinin pH'sı ile floresan yoğunluğunun ve CQD'lerin hazırlanmasında kullanılan sentetik yolların önemli ölçüde büyük varyasyonu, geniş çapta kabul edilen bir floresan emisyon mekanizmasının bulunmasında ek karmaşıklık katmaktadır.

Daha önce tartışıldığı gibi, CQD'lerin karşılaştırılabilir optik özellikleri ve iyi kimyasal ve fotokimyasal stabilitesi de dahil olmak üzere yarıiletken kuantum noktaları üzerinde birçok avantajı bulunmaktadır. Bununla beraber karbon büyük ölçüde toksik değildir ve çevre dostudur. Bu özellikler CQD'leri, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak biyolojik sistemleri görselleştirmek için yarıiletken kuantum noktalarına alternatif olarak çok cazip hale getirir. Genel olarak, CQD'lerin karbon çekirdekleri toksik değildir ve CQD'lerin herhangi bir sitotoksitesi esas olarak CQD yüzeyi üzerindeki yüzey pasifleştirici maddelere bağlıdır. Düşük sitotoksiteye sahip yüzey pasifleştirici maddelerin *in vivo* görüntüleme için yüksek konsantrasyonlarda güvenle kullanılabileceği gösterilmiştir (Zhang *et al.* 2016).

Organik boya-konjuge CQD'lerin H₂S için etkili floresan problemleri olduğu ortaya çıkmıştır. Organik boya-konjuge CQD'lerin mavi emisyonunu yeşile çeviren eser miktarda H₂S varlığında bir FRET işlemi gerçekleştirilmiştir. Önceki çalışmalar, H₂S'nin basit bir difüzyon ile hücre zarına nüfuz edebileceğini kanıtlamıştır. Bir floresan mikroskopu kullanarak, organik boya konjuge CQD'lerin canlı hücrelerde fizyolojik olarak ilgili H₂S seviyelerindeki değişiklikleri görselleştirebilme yeteneği değerlendirilmiştir. H₂S ile muamele edilmeden önce ve sonra organik boya-konjuge CQD'ler ile inkübe edilmiş HeLa ve L929 hücrelerinin floresan görüntülerini gösterir. 37°C'de 30 dakika boyunca H₂S'ye maruz bırakılan organik boya ile konjuge CQD ile boyanmış hücrelerin hücre içi floresanı yeşile dönmüştür, bu da organik boya konjuge CQD'lerin canlı H₂S seviyesi değişikliğini izlemek için umut verici floresan problemler olduğunu açıkça göstermektedir (Khazaei *et al.* 2012). Başka bir örnekte, bir karbon kaynağı olarak N- (b-aminoetil)-g-aminopropil metil-dimetoksisilan kullanılarak sentezlenen CQD'ler, yüzeylerindeki kalıntı etilendiamin grupları nedeniyle Cu⁺² ile seçici bir şekilde etkileşime girmiştir. Ek

olarak, $\text{Cu}_2 +$ için çift emisyonlu sondalar, bu gibi CQD'leri, Rodamin B (RhB) katkılı silika nanopartiküllerin yüzeyine kaplayarak hazırlandı. CQD'lerin flüoresanı, $\text{Cu}_2 +$ ile verimli bir şekilde söndürülürken, RhB'nin ihmal edilebilirliği etkilendi. Bu problemleri kullanarak canlı hücrelerde *in vivo* olarak görüntülemeye başarılı girişimler yapıldı (Cherukula *et al.* 2016).

Hsu ve arkadaşları (2014) tarafından elde edilen hücre görüntüleri, CQD'lerin çoğunlukla sitoplazma ve hücre zarında lokalize olduğunu göstermiştir. PPEI-EI ile pasifleştirilmiş suda çözünabilir CQD'lerin, MCF-7 hücrelerinin hücre membranını ve sitoplazmasını etiketleyebildikleri ve çekirdeğe ulaşmadıkları da gösterilmiştir. Bununla birlikte, aktif karbondan sentezlenen CQD'ler, hücre zarını ve COS-7 hücrelerinin sitoplazmasını seçici olarak işaretlemiştir. Diğer taraftan, silika-kapsüllenmiş CQD'lerle inkübe edilen hücrelerin, sitoplazmik alanda sadece parlak bir flüoresan sergiledikleri bulunmuştur (Hsu *et al.* 2014). Fowler ve meslektaşları (2012), amfifilik biyo-uyumlu bir polimerin içerisine yerleştirilmiş CQD'leri hazırladılar. Bunlar, daha sonra, Çin hamsteri yumurtalık hücresi membranı boyunca seyahat edip sitosol içine yerleştiler. Hu'nun ekibi (2012), %54.3'lük kuantum verimi ile b-PEI kaplı CQD'leri hazırladı ve bu CQD'lerin sitoplazma boyunca muntazam bir şekilde dağıldığı gözlemlendi. Bu örnekler açıkça göstermektedir ki, CQD'nin lokalizasyonu, yüzey pasifleştirici maddelerin seçimine ve yüzey pasifleştirme moduna bağlı olarak değişir (Fowler *et al.* 2012).

CQD'ler farklı dalga boylarında emisyonlar sergileyebilmektedir, bu da onları etiketleme ajanlarının çoğunluğundan ayıran büyük bir avantajdır. Bu, araştırmacıların uyarı ve emisyon dalga boylarını kontrol etmesini ve seçmesini sağlamaktadır. Şeker kamışı suyundan hazırlanan “Yeşil” CQD'ler de bakteri ve maya hücrelerinde farklı uyarım modları üzerine çok renkli emisyonlar sergilemiştir. Özellikle, Ray ve arkadaşları hücre görüntüleme için gerekli olan yüksek bir floresan yoğunluğunun elde edilmesi için yüzey pasivasyonunun gerekli olmayabileceğini ortaya koymuştur. Kurumun termal yanmasından hazırlanan ve asitle muamele edilmiş CQD'ler, herhangi bir yüzey pasifleştirici madde ile kaplanmamış olsalar bile, Ehrlich assit karsinom hücrelerine başarılı bir şekilde translokasyon yapabilmıştır (Ray *et al.* 2013).

Uyarma dalgaboyu yeterince kırmızı bölgeye, CQD'ler NIR bölgesinde yayılabilmektedir. NIR bölgesindeki emisyon nispeten zayıf olmasına rağmen, CQD'lerin *in vivo* floresans izleme çalışmaları için büyük bir potansiyeli olmaktadır, çünkü hayvan vücudu NIR bölgesinde pratik olarak saydam olmaktadır. Yang ve çalışma arkadaşları (2015), CQD'lerin canlı farelerde kontrast ajanları olarak yaşayabilirliğini araştıran ilk grup olmuştur. Deneylerinde PEG1500N pasifleştirilmiş CQD'ler farelere deri altından enjekte edilmiş ve enjeksiyondan 24 saat sonra sadece soluklaşan parlak floresan emisyonları gözlemlenmiştir. Eğer CQD'ler intravenöz olarak enjekte edilmiş, emisyonlar sadece mesane bölgesinde gözlenmiş, böylece intravenöz yolla sokulan CQD'ler için idrar çıkarma işleminin ana çıkış yolu olduğu düşünülmüştür. Aynı grup, ZnS katkılı CQD'leri kullanarak lenf damarlarındaki göçü de başarıyla izlemiştir (Yang *et al.* 2015).

Cao ve arkadaşları (2013), iyi kurulmuş CdSe / ZnS kuantum noktaları ile karşılaştırılabilir parlaklık gösteren farelerde *in vivo* görüntüleme için ZnS katkılı CQD'leri kullanmışlardır. Bununla birlikte, CQD ve CdSe / ZnS kuantum noktalarının farelere intradermal enjeksiyonundan sonra, her iki tipte kuantum noktasının aksiller lenf düğümlerine hareket etmesine rağmen, ilkinin ikincisinden çok daha yavaş bir hızda hareket ettiği gözlenmiştir. Bu, CQD ve lenf hücreleri arasındaki etkileşimi azaltan CQD yüzeyindeki PEG moleküllerine atfedilmiştir. CQD'lerin *in vivo* olarak CdSe / ZnS kuantum noktalarınıninkilere göre gözlemlenen rekabetçi performansı özellikle ilgi çekmektedir. Yukarıdaki sonuçlar, CQD'lerin biyo-görüntülemeye yönelik yeni bir yüksek performanslı ancak toksik olmayan madde sınıfı halinde geliştirilebileceğini göstermektedir (Cao *et al.* 2013).

Hücreler tarafından CQD tutulumunun kesin mekanizması açıklığa kavuşturulmalıdır, ancak artan deneysel kanıtlar, CQD'lerin hücre çekirdeğine önemli ölçüde sızıntı olmaksızın endositoz yoluyla hücre tarafından muhtemelen içselleştirildiğini göstermiştir. Ayrıca, CQD'ler üzerindeki koruyucu / fonksiyonel kaplamalar arasındaki etkileşimin, seçici hücre hedeflemesinde önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Gelecekte, CQD'lerin hücrelere ve hatta belki de çekirdeklere daha iyi hedefleme

kabiliyeti, CQD'lerin proteinleri veya peptitleri kolaylaştırarak konjuge edilmesiyle elde edilebilir ve bu da CQD'lerin hücre zarı bariyerini daha kolay geçmesini sağlar (Shi *et al.* 2015).

2.4. Biyogörüntüleme

Biyolojik görüntüleme, biyolojik süreçleri gerçek zamanlı olarak invaziv olmayan şekilde görselleştiren yöntemlerle ilgilidir. Biyolojik görüntüleme, yaşam süreçleriyle mümkün olduğunca az müdahale etmeyi amaçlamaktadır. Ayrıca, gözlemlenen örneğin 3-D yapısı üzerinde dışarıdan, yani fiziksel girişim olmaksızın bilgi edinmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Daha geniş anlamda, biyo-görüntüleme, gözlem için sabitlenmiş biyolojik materyali görselleştiren yöntemleri de içermektedir. Biyolojik görüntüleme, hücresel yapıların ve tüm hücrelerin, çok hücreli organizmaların tümüne kadar olan dokular üzerindeki gözlemini kapsar. Diğerleri arasında, görüntüleme için kaynak olarak ışık, flüoresan, elektron, ultrasonografi, röntgen, manyetik rezonans ve pozitron kullanılabilir (Wang *et al.* 2014).

Biyogörüntülemede son gelişmeler, süper-çözünürlük, iki fotonlu floresan uyarma mikroskobu, foto-ağartma (FRAP) ve floresan rezonans enerji transferi (FRET) sonra floresan kurtarma / yeniden dağıtım içermektedir. Son birkaç yılda moleküler biyoloji ve biyogörüntüleme arasındaki güçlü etkileşim birçok iyon ve metabolit için artan sayıda nanosensörün tasarımına yol açmıştır. Hücrelere dahil edildiğinde, bu hücreler söz konusu metabolit için işaretlenmiş bir yapı haline gelmektedir (Zhang *et al.* 2016).

Grafen kuantum noktalar (GQD), kısmen mükemmel optik özelliklerine bağlı olarak biyoteknolojide son derece başarılı olma potansiyeline sahiptir. Aynı zamanda oldukça düşük sitotoksiteleri nedeniyle hücre aktivitesinde, 400 μ g GQD'nin 150 μ L kültür besiyerine (104 hücre) eklenmesi üzerine belirgin bir zayıflama olmadığını bildirilmiştir (Zhu *et al.* 2015).

Zhu ve arkadaşları (2015) bir MTT analizinde amino ve amido ile işlevselleştirilmiş m-GQD'leri ve azaltılmış r-GQD'leri karşılaştırırken azaltılmış hücre canlılığını göstermiştir. MTT kolorimetrik deneyler, tetrazolium boyası (MTT) azaldıkça renkteki değişikliği izleyerek hücrel aktiviteyi ölçmektedir. MTT analizlerinin sonuçları, r-GQD'ler için %80'den fazla canlılığa kıyasla 400 µg m-GQDs eklendiğinde hücre canlılığının %60'ın altında olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar, m-GQD'lerle gözlemlenen hücre canlılığında azalmanın, hem nitrojenin hem de alkil zincirlerinin hücre işlevselliğini etkileyebileceği metilamin işlevselleştirmesine bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Aynı zamanda 808 nm'de IR-yakın uyarımdan parlak yeşil ve mavi lüminesansın gözlemlendiği hücreler içinde yukarı-dönüşüm saptanılmıştır (Zhu *et al.* 2015).

2.4.1. Biyogörüntüleme çeşitleri

Görüntülemedeki tüm ilerlemelere rağmen, röntgen (X-ışını) halen dünyada kullanılan en yaygın görüntüleme yöntemidir. X-ışını pnömoni, akciğer kanseri veya kalp sorunları arama ortopedik cerrahi uygulamasında kullanılmaktadır (Shamir *et al.* 2009).

Ultrason da çok popüler bir görüntüleme yöntemidir. Fetal boyutu ölçmek için en sık kullanılan gebeliklerde, kan damarlarını, safra taşlarını, kalbi, kasları ve eklemleri ve pelvik organları incelemek için de kullanılmaktadır. Diğer birçok görüntüleme yönteminden farklı olarak, bir ultrason, sabit görüntüler yerine "gerçek zamanlı" hareketli resimleri göstermektedir. Ultrason, isminden de anlaşılacağı gibi, vücut tarafından ısı olarak emilen ses dalgalarını kullanır. Isınma etkisi yoktur ve ultrasonun bilinen hiçbir zararlı etkisi bulunmamaktadır (Wells 2011).

Diğer yaygın tıbbi görüntüleme bir bilgisayarlı tomografi (CT) taramasıdır ve vücudun kesitsel olarak incelenmesini sağlar. CT taraması, hem yumuşak doku hem de kemiğe bakmak için mikro dilimlerdeki alan boyunca ilerler (Erickson 2011).

Görüntüleme için önemli bir yöntemde manyetik rezonans görüntülemedir (MRI). Bir MRI, iç gövdenin fotoğraflarını çekmek için manyetik alan ve radyo dalgaları kullanılmaktadır. Bir MRI, vücut organlarının ve yumuşak dokuların yüksek çözünürlüklü resimlerini alır; kan damarları, beyin dokusu, diskler, bağlar ve kaslar olarak sıralanabilir. Birçok doktor, spor yaralanmaları veya beyin taramaları ve organ taramalarında eklemlere ve bağlara bakmak amacıyla MRI kullanılmaktadır (Rowayda 2012).

Bir elektron mikroskobu, aydınlatma kaynağı olarak bir hızlandırılmış elektron ışını kullanan bir mikroskoptur. Bir elektronun dalga boyu, görünür ışık fotonlarına göre 100.000 kat daha kısa olabildiğinden, elektron mikroskopları, ışık mikroskoplarından daha yüksek bir çözme gücüne sahiptir ve daha küçük nesnelerin yapısını açığa çıkarabilir (Rudenberg *et al.* 2010).

Elektron mikroskopları (EM), bir optik ışık mikroskobunun cam merceklerine benzer elektron optik mercek sistemlerine sahiptir. Elektron mikroskopları, mikroorganizmalar, hücreler, büyük moleküller, biyopsi örnekleri, metaller ve kristaller dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik ve inorganik örneklerin ultrastrüktürünü araştırmak için kullanılır. Endüstriyel olarak, elektron mikroskopları sıklıkla kalite kontrol ve arıza analizi için kullanılır. Modern elektron mikroskopları, görüntüleri yakalamak için özel dijital kameralar ve çerçeve kavrayıcıları kullanarak elektron mikrografları üretir. Elektron mikroskoplarının çeşitleri bulunmakla birlikte iki çeşidi (taramalı EM = SEM ve geçişli EM = TEM) yaygın olarak kullanılmakta ve bilinmektedir.

Genel olarak, bir SEM'nin görüntü çözünürlüğü bir TEM'ninkinden daha düşüktür. Bununla birlikte, SEM bir numunenin iç yüzeyinden ziyade bir yüzeyi yansıttığından, elektronların numune boyunca ilerlemesi gerekmez. Bu, numuneyi elektron saydamlığına inceltmek için kapsamlı numune hazırlama ihtiyacını azaltır. SEM ayrıca büyük bir alan derinliğine sahiptir ve bu nedenle örneğin üç boyutlu yüzey şeklinin iyi temsilleri olan görüntüler üretebilir. SEM'lerin bir diğer avantajı, hidratlı numunelerle veya yüksek, vakumlu veya odacık gazlarının altında, düşük kaliteli ve çözünürlükte görüntü üretebilen

çevresel taramalı elektron mikroskobu (ESEM) ile birlikte gelmektedir. Bu, geleneksel elektron mikroskoplarının yüksek vakumunda kararsız olan sabitlenmemiş biyolojik numuneleri kolaylaştırır (Danilatos 1986).

Biyogörüntülemelerde önemli araçlardan birisi de floresan mikroskoplardır. Hücre görüntülemelerde yaygın olarak kullanılan bu türden bir varyasyon, floresan konfokal mikroskobu olup, geniş spektrumlu floresan mikroskobu ile aynıdır, ancak uyarma ve emisyon ışığı konfokal konfigürasyon ile düzenlenmiştir (Pawley 2006).

Konfokal mikroskop, odak dışı ışığın toplanmasını önlemek için tasarlanmıştır. Oldukça küçük bir açıklıktan fotodedektörünün bulunduğu yere odaklanmış bir nokta lazer ışığı kaynağına sahiptir. Bir 3 D veri kümesi, mikroskopun bir dizi düzlemde odaklanması ve bu düzlemlerin her birinde tam bir taranmış görüntünün toplanmasıyla elde edilir (Pawley 2006; Yu *et al.* 2006). Fotodedektörden çıkan elektrik sinyalini, kaydedilebilen dijital bir forma dönüştüren konfokal mikroskoptaki elektronik cihaz olan analog-dijital (A / D) dönüştürücünün dinamik aralığını en iyi şekilde kullanabilmeyi sağlamaktadır (Fellers *et al.* 2007).

2.4.2. Biyogörüntülemelerde kullanılan işaretleyiciler ve/veya boyalar

Propidyum iyodür (PI), etidyum bromür (EB), diaminofenilindol (DAPI), akridin turuncu (AO) ve Hoechst boyları gibi aromatik amino veya guanidin gruplarına sahip floresan boyalar, floresan yaymak için nükleotidlerle etkileşime girmektedir. EB ve PI molekülleri DNA çift sarmalın içine girmekte, DAPI ve Hoechst boya molekülleri DNA çift sarmalının küçük oluşuna yapışmaktadır. Öte yandan, akridin turuncusu (AO), çift sarmallı DNA veya tek iplikli DNA ve RNA ile kompleksler oluşturabilir. Bir AO molekülü 526 nm'de maksimum dalga boyu ile yeşil flüoresan yaymak için üç baz çifti çift iplikli DNA ile interkalasyon yapabilir. Bir AO molekülü, aynı zamanda, 650 nm'de maksimum dalga boyu ile kırmızı flüoresan yayan bir yığılmış veya istiflenmiş yapı oluşturmak için tek iplikli DNA veya RNA'nın bir fosfat grubu ile etkileşime girebilir. Bu floresan boyalar, Hoechst boyları hariç, canlı hücrelerin hücre zarları boyunca

geçirimsizdir ve ölü hücrelerin floresan göstergeleri olarak kullanılabilir. Hoechst boyaları, fizyolojik koşullar altında pozitif yüklüdür ve canlı hücre zarlarından geçebildiği bildirilmiştir (Horobin *et al.* 2002).

Mavi flüoresan Hoechst boyaları, agaroz jellerinde RNA'nın varlığında hassas DNA belirlemesi (>3 ng), otomatik DNA tayini, hücre sayısının hassas belirlenmesi ve kromozom ayırma gibi çeşitli uygulamalara sahip hücre geçirgen nükleik asit lekeleridir. Bu boyaların flüoresanı, hücrelerde DNA konformasyonuna ve kromatin durumuna çok duyarlıdır. Sonuç olarak, nükleer hasarın derecelerini tespit edebilirler. Hoechst boyaları, boyaların emisyon spektral kaymalarını izleyerek, DNA hasarının ve diğer canlılık ölçümlerinin akış sitometrik olarak tanınması için faydalı yaşamsal boyalardır. Bu bisbenzimidazol türevleri, AT seçiciliği olan supravital minör groove bağlayıcı DNA lekeleridir. Boyalar, tüm nükleik asitlere işaret eder, ancak AT bakımından zengin dsDNA şeritleri, GC bakımından zengin şeritlerden ~ 2 kat daha fazla floresan geliştirir. Bu özellik, kromozomlardaki Q-bantlarını tanımlamak için kullanılmıştır (Q-bantları: boya kinakrine boyandığında parlak bir şekilde flüoresan AT-zengin kromozom bölgeleri) (Parrilla *et al.* 2004).

Propidyum iyodür (veya PI), hücreleri boyamak için kullanılabilen bir floresan ara tabakadır. Propidyum iyodür hücre döngüsü analizinde hücre canlılığını veya DNA içeriğini değerlendirmek için akış sitometrisinde DNA çekirdeği olarak veya çekirdeği ve diğer DNA içeren organelleri görselleştirmek için mikroskopi olarak kullanılır. Propidium İyodür, canlı hücrelerin zarını geçemez, bu da nekrotik, apoptotik ve sağlıklı hücreleri ayırt etmeyi kolaylaştırır. PI ayrıca RNA'ya bağlanır ve RNA ile DNA boyaması arasında ayırım yapmak için nükleazlarla tedavi gerektirir (Propidium Iodide Solution – Biolegend 2015).

2.5. Hücre Kültürleri

Yaşamın temel birimi olan hücreler, biyolojik araştırmalarda inanılmaz derecede faydalı bir araçtır. Fizyolojik süreçleri anlamak ve tıbbi tedavilerde kullanım için toksik veya

terapötik bileşiklerin taranması için bir zorunlu model sistemi olarak hizmet ederler. Ek olarak, hücreler, diğer birçok kullanımla birlikte fonksiyonel enzim, büyüme faktörü ve aşı üretiminde önemli bir rol oynar. Yukarıda belirtilen uygulamaların gerçekleştirilmesi için, hücrelerin öncelikle, kaynaklandıkları organizma dışındaki bir ortamda kültürlenmesi gerekir. Hücre kültürü, çok hücreli organizmaların hücrelerini orijinal halleri dışında kesin koşullar altında tutmayı içerir (Goetz *et al.* 2006).

Hücre kültürü, bir hayvan veya bitkiden hücrelerin çıkarılmasını ve bunların müteakip büyümesini uygun bir yapay ortamda ifade eder. Hücreler doğrudan dokudan çıkarılabilir ve ekimden önce enzimatik veya mekanik yollarla ayrılabilir veya önceden kurulmuş bir hücre dizisinden veya hücre soyundan türetilir (Barrila *et al.* 2015).

İlgili hücreler canlı dokudan izole edildikten sonra, daha sonra dikkatle kontrol edilen koşullar altında muhafaza edilebilirler. Bu koşullar her hücre tipi için değişir, ancak genellikle temel besinleri (amino asitler, karbonhidratlar, vitaminler, mineraller), büyüme faktörleri, hormonlar ve gazlar (CO₂, O₂) sağlayan bir substrat veya ortam içeren uygun bir kaptan oluşur ve fizyokimyasal ortamı düzenler (pH tamponu, ozmotik basınç, sıcaklık). Çoğu hücre, bir yüzey veya yapay bir substrat (yapışık veya tek tabakalı kültür) gerektirirken, diğerleri, kültür ortamında (süspansiyon kültürü) serbest yüzen olabilirler. Çoğu hücrenin ömrü genetik olarak belirlenir, ancak bazı hücre kültürü hücreleri, optimal koşullar sağlandığında sonsuza kadar çoğalan ölümsüz hücrelere dönüştürülmektedir (Edmondson *et al.* 2014).

2.5.1. Hücre kültürlerinin uygulamaları ve önemi

Hücre kültürü, hücresel ve moleküler biyolojide kullanılan başlıca araçlardan biridir ve hücrelerin normal fizyoloji ve biyokimyası, ilaçların ve toksik bileşiklerin hücreler üzerindeki etkilerini ve mutageniz ve karsinogenezini incelemek için mükemmel model sistemleri sağlar (örn. Metabolik çalışmalar, yaşlanma). Ayrıca, ilaç taraması ve geliştirilmesinde ve biyolojik bileşiklerin (örneğin, aşılarda, terapötik proteinler) büyük ölçekli imalatında kullanılır. Bu uygulamaların herhangi biri için hücre kültürünün

kullanılmasının en büyük avantajı, bir klonal hücre kümesinin kullanılmasıyla elde edilebilecek sonuçların tutarlılığı ve tekrarlanabilirliği olarak bildirilmiştir (Ausubel *et al.* 1994).

a) Aşı araştırmalarında:

Hücre kültürü, kültürlü hücreler diğerlerinin yanı sıra hücre biyologları, biyomateryaller bilim adamları, klinisyenler ve düzenleyici otoriteler tarafından kullanılan çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Hücre kültürünün en önemli kullanım alanlarından biri, aşılarda araştırılması ve üretilmesidir. Hücre kültüründe büyük miktarlarda virüs yetiştirme yeteneği, en sonunda, çocuk felci aşısının yaratılmasına yol açmıştır ve hücreler, günümüzde, diğer birçok hastalık için aşı üretmek üzere büyük çapta kullanılmaktadır. 1930'ların ve 40'ların başında, araştırmacılar poliovirüs yetiştirmek için canlı hayvanları kullanmak zorundaydılar, ancak hücre kültürünün ortaya çıkmasıyla birlikte, virüs üretimi ve çok daha büyük ölçekte çok daha fazla kontrol elde edebilmiştir. Bu, araştırmacıların onları daha yakından incelemelerine ve sonunda aşı ve çeşitli tedaviler geliştirmelerine izin vermiştir (Tibbitt *et al.* 2009).

b) Protein tedavisinde:

Hücre soylarının bir başka önemli kullanımı, memeli hücrelerinde farklı protein tiplerini ifade etmektir. Başlangıçta, *Escherichia coli*, protein üretmek için kullanılan birincil organizma olmuştur, ancak uygun post-translasyonel modifikasyonlar ile düzgün bir şekilde katlanmış proteinler yaratma ihtiyacıyla, odak ökaryotları kullanmaya kaymıştır. 1970 ve 80'lerden başlayarak, hücre kültürü ile interferon ve antikorlar gibi proteinler başarıyla oluşturulmuştur. Kültürlerden çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri elde edilebilir ve bu proteinlerin yapısına ve aktivitesine bakmak, organizmanın bedenindeki rollerini anlamamıza yardımcı olur. Farklı hücrelerde ve koşullarda yetiştirilen proteinin gözlemlenmesi bile proteinin çevresinin aktivitesini nasıl etkilediğini belirlememize yardımcı olabilmektedir (Caputo 1996).

c) Kanser araştırmalarında:

Kanser dünyadaki en önemli ölüm nedenlerinden biridir ve kanser araştırmaları ve tedavileri bulmak için milyonlarca dolar kullanılmaktadır. Burada hücre kültürü de önemlidir,      normal hücreler radyasyon, kimyasallar ve virüsler gibi yöntemlerle kanser hücrelerine dönüşebilir. Bu hücreler daha sonra kanseri daha yakından incelemek ve potansiyel yeni tedavileri test etmek için kullanılabilmektedir (Marcovic 1998).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

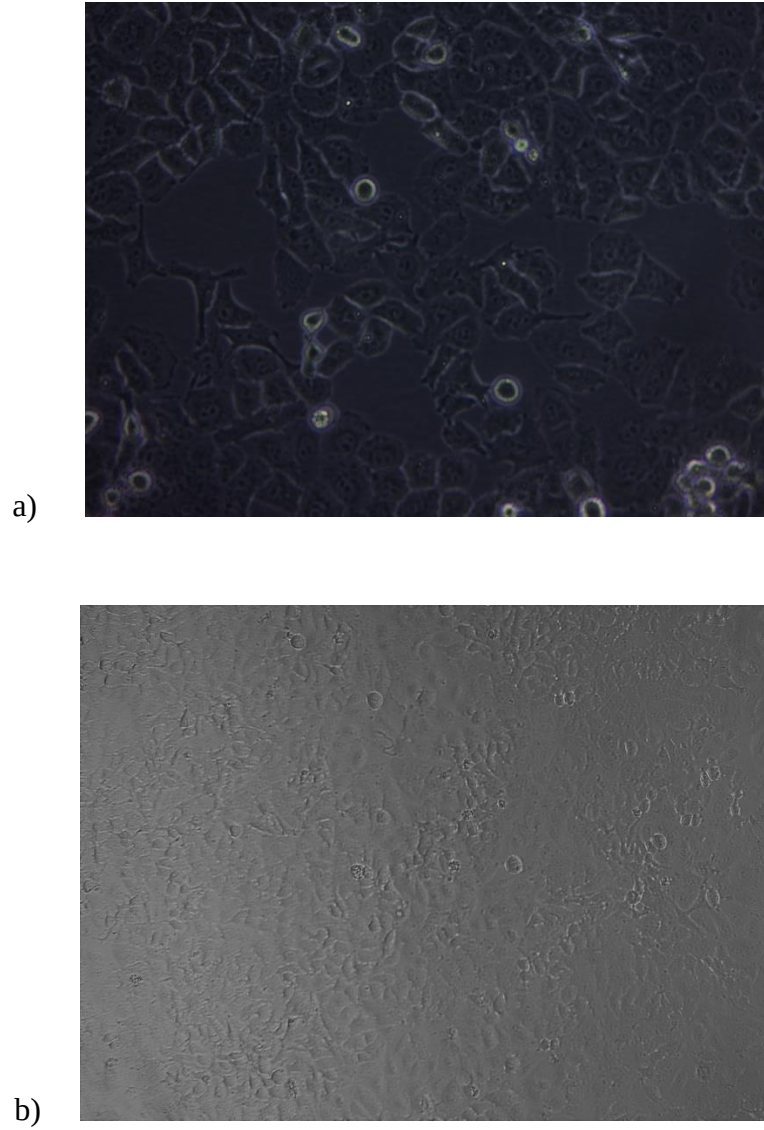
İnkübatör	Nuaire NU4750
Otoklav	Hirayama HMC
Laminar kabin	Nuaire 425-500E
Su banyosu	Memmert
Santrifüj	Hettich Rotofix 32A
Vorteks	Heidolph Reax Top
Sıvı azot tankı	Worthington - Taylor Wharton
Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)	Uğur
Ultra derin dondurucu (-80°C)	Nuaire
Hassas terazi	Shimadzu
Floresan mikroskopu	Zeiss Scope A1
Konfokal mikroskopu	Leica LSM710
İnvert mikroskopu	Zeiss Primovert

3.1.2. Kimyasal maddeler ve Sarf malzemeler

- DMEM – Medium (besiyeri)
- PBS – Phosphate Buffered Saline
- Tripsin / EDTA
- FBS – Fetal Bovine Serum
- HEPES – Sodyum Bikarbonat
- Hücreler
- DMSO
- Hücre büyüme kapları (flask, petri kapları, çok kuyulu plate)
- Pipet ve pipetör
- Falkon tüpler
- Mikropipet
- Ethanol %70
- Medium şişeleri

3.1.3. Hücre hatları

MCF7 meme kanseri hücre hattı (ATCC-HTB22) ve CaCO2 kolon kanseri hücre hattı (ATCC-HTB37) tüm çalışma süresince kullanılmıştır. MCF-7 hücre hattı ŞAP enstitüsünden elde edilmiş, pasaj numarası 6 olmaktadır. CaCO2 hücre hattı ise ATLAS Biyoteknoloji şirketinden ticari olarak elde edilmiş olup, pasaj numarası 10'dur. Öncelikle tüm hücre hatları %1 antibiyotik karışımı (10,000 U mL⁻¹ penisilin, 10,000 µg mL⁻¹ streptomisin), %1 L-glutamin ve %10 fetal sığır serumu içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besi yerinde, 37°C'de %5 CO₂ ve %90 nem sağlayan etüvde inkübe edilerek %80-90 hücre yoğunluğuna ulaşınca kadar büyütülmüştür. Sonrasında hücreler floresans ve konfokal mikroskopunda görüntü alabilmek için + yüklü lamellerin üzerine mililitrede 100.000 hücre olacak şekilde ekilmiş ve yüzeyi tamamen kaplayınca kadar büyütülmüştür (Fanelli 2016).



Şekil 3.1. İnvirt mikroskopta hücre hatlarının normal görüntüleri a) MCF-7 10x, b) CaCO₂ 10x

3.1.4. Hücre besiyeri ve elemanları

a. Hücre kültürü besiyeri ve solüsyonlar:

Hücre kültürü besiyerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikroçevreyi sağlayan besleyici solüsyonlardır. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin

ve iyonlarla hücrelerin gelişimini desteklerler. Laboratuvar ortamında hücrelerin çoğaltılabilmesi için, uygun pH sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki iyonlarla gerekli ozmolarite ve pH'ı da sağlarlar.

Besiyeri ihtiyacı hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterir. Hücreler farklı besiyerlerinde farklı davranabilirler. Bu yüzden çalışmanın amacına göre hücrenin besiyeri ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir. Hücrelerin canlılıklarının devamı ve çoğalmaları için aminoasitler, karbonhidratlar, lipidler, vitaminler, iyonlar ve proteinlerin ortamda bulunması şarttır (Yao *et al.* 2017).

b. DMEM - Hücre kültür besiyeri:

Orjinal formülasyonun literatürde yer almasından bu yana, Eagle Ortamı'nın birçok bileşim değişikliği geliştirilmiştir. Bu modifikasyonların en yaygın kullanılanları arasında Dulbecco'nun Modified Eagle'ın ortamı (DMEM) bulunmaktadır. DMEM, dört kat daha yüksek amino asit ve vitamin konsantrasyonu ve ek yardımcı bileşenler içeren Bazal besiyeri (BME) modifikasyonudur. Orijinal DMEM formülü bileşimi 1000 mg / L glukoz içermekte olup ilk önce embriyonik fare hücrelerini kültürlemek için rapor edilmiştir. 4500 mg / L glikoz ile yapılan bir başka değişiklik, belirli hücre tiplerinin ekimi için optimal olduğu kanıtlanmıştır. Dulbecco'nun değiştirilmiş ortamı, geniş bir memeli hücresi spektrumunun büyümesini desteklemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ortamda, vitaminler ve amino asitlerin konsantrasyonu MEM'den dört kat daha yüksek ve esansiyel olmayan amino asitler (NEA), eser elementler ve bikarbonat ile tamamlanmaktadır. DMEM, hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glukozu, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a, fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptir. Ancak tek başına hücre gelişimi için yeterli değildir (Wee *et al.* 2003).

c. FBS (Fetal Bovine Serum) - fetal sığır serumu

Fetal sığır serumu (FBS), hücre büyümesi için gerekli tüm büyüme faktörlerini, vitaminleri, hormonları, bağlanma faktörlerini, taşıma faktörlerini, besinleri ve eser elementleri içermektedir. Karmaşıklığı nedeniyle hücre kültürü için en etkili büyüme ürünüdür. Serum hücrelerin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan ve içeriği tam olarak tanımlanmamış zengin bir protein çözeltisidir. Hücre çeşidine ve uygulamalara göre besiyerindeki serum oranı değişebilir. Standart bir somatik hücre kültüründe serum oranı %10'dur (Valk *et al.* 2010).

d. Penisilin/streptomisin

Antibiyotikler penisilin ve streptomisin, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı etkili birleşik etkilerinden dolayı hücre kültürlerinin bakteriyel kontaminasyonunu önlemek için kullanılmaktadır (Kawana *et al.* 1992).

3.1.5. Kullanılan diğer kimyasal maddeler

a. Tripsin / EDTA:

Tripsin-EDTA, domuz pankreasından elde edilen proteazların ısıtılmış bir karışımı olan tripsin tozundan yapılmaktadır. Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan temel enzimdir. Tripsin, serin proteaz tipi bir enzimdir, lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptidleri yıkamaktadır. Genellikle %0,25 EDTA'lı tripsin solüsyonu kullanılmaktadır. Sindirim gücü nedeniyle, tripsin hücre ayrışması, rutin hücre kültürü geçişi ve birincil doku ayrışması için yaygın olarak kullanılmaktadır. -20°C'de saklanır, daha yüksek sıcaklıklarda bekleyen tripsinin aktivitesi düşebilmektedir. Serum tripsin inhibitörlerini içerir, bu nedenle hücrelere tripsin uygulanmadan önce mutlaka bir kere Ca ve Mg içermeyen PBS ile yıkanmalı ve yüzeylerindeki serum uzaklaştırılmalıdır. Hücreler yüzeyden ayrılır ayrılmaz tripsinin inhibe edilmesi önemlidir. Tripsin hücreleri yüzeyden

ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlayabilmektedir (Popescu *et al.* 1985).

b. PBS – phosphate buffered saline:

Fosfat tamponlu salin (kısaltılmış PBS), biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir tampon çözeltidir. Disodyum hidrojen fosfat, sodyum klorür ve bazı formülasyonlarda potasyum klorür ve potasyum dihidrojen fosfat içeren su bazlı bir tuz çözeltisidir. Tampon sabit bir pH tutmaya yardımcı olmaktadır. Solüsyonların ozmolaritesini ve iyon konsantrasyonlarını insan vücudunkilerle (izotonik) eşleştirmektedir (Simpson and Gilmour 2003).

c. Fenol red

Fenol kırmızısı, genellikle besiyerlerinde pH indikatörü olarak kullanılan, pH 6.6 ila 8.0 arasında sarıdan kırmızıya değişen ve daha sonra pH 8.1'in üzerinde parlak pembe bir renk veren suda çözünen bir boyadır. Bu şekilde, fenol kırmızısı çeşitli tıbbi ve hücre biyoloji testlerinde pH gösterge boyası olarak kullanılabilir. Besiyerlerinde görülen sarı renk asidite, mor renk ise alkaliliği göstermektedir. Sarı asidik besiyeri, fazla üremiş kültürü, bakteri kontaminasyonunu ya da fazla CO₂'i; Mor bazik besiyeri, ürememiş kültürü, küf kontaminasyonunu ya da az CO₂'i işaret etmektedir (Berthois *et al.* 1986).

3.1.6. Hücre kültürü

Çok çeşitli kaynaklardan ve dokulardan elde edilen hücre kültürleri iki bölümde incelenir:

1. Primer (birincil) hücre kültürleri
2. Sekonder veya diploid hücre kültürleri

a. Birincil hücre – Primer hücre kültürü

Dokulardan tripsin ile ayrıştırılarak elde edilen hücrelerin *in vitro* üretilmeleri ile elde edilen kültürler denir. *In vitro* koşullarda pasajları kısıtlı olup, bir kaç pasajdan sonra üreyebilme yeteneklerini kaybederler. İlk alt kültürün ardından primer kültür, hücre hattı veya subklon olarak adlandırılır. Primer kültürden gelişen hücre hatları sınırlı bir yaşam süresine sahiptir ve pasaj edildikçe, yüksek büyüme hızı gösteren hücreler üstün gelirler ve popülasyonda genotipik ve fenotipik tekdüzelik ortaya çıkmaya başlamaktadır. Hücre hattından bir hücre popülasyonu pozitif olarak seçilip klonlama veya diğer metotlarla kültüre edildiğinde, bu hücre hattı hücre soyu haline gelmeye başlar. Bu hücreler, sonlu hücreler olarak bilinir. Bununla beraber, transformasyon adı verilen spontan, kimyasal ya da viral olarak gerçekleşen bir işlem ile bazı hücre hatları ölümsüz (immortal) hale getirilebilir. Sonlu bir hücre hattı, transformasyon ile sınırsız bölünme yeteneği kazandığında sürekli hücre hattı haline gelmektedir (Park *et al.* 1971).

b. İkincil hücre – Sekonder hücre kültürü

Normal kromozom sayısına sahip diploid hücrelerden elde edilen ve en fazla 50 kez pasajları yapılabilen kültürler denir (Knorr and Heike 1995).

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre soylarının stoktan çıkartılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla kriyovialler -80°C'den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözülür. Hücre süspansiyonu; ilgili hücrenin büyütülmesinde kullanılan besiyeri içerisine alınarak falkon tüp, 21°C'de 800 rpm'de 5dk santrifüj edilir. Sonra süpernatant kısım aspire edilir ve hücre peleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlanmıştır. Hücre süspansiyonu, içerisinde 5ml besiyeri bulunan 25 cm²'lik flasklara alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren besiyerinde hücrelerin büyütülmesi amacıyla inkübe edilmiştir (Silva 2006).

3.2.2. Hücre soylarının pasajlanması

Hücre soyları, flask yüzeyini %80-85 kapladıklarında (konfluent olduklarında) flask içerisindeki besiyeri aspire edilmektedir. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25cm²'lik flask içerisine 2 ml 1X PBS ilave edilir ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlanmaktadır. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5 ml %0,25 Trypsin-EDTA solüsyonu kullanılır ve hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5 dk inkübe edilmektedir. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edilmektedir. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş olunur. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınmaktadır. 21°C'de 800 rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edilir ve elde edilen hücre peleti 1 ml besiyerinde çözündükten sonra hücre süspansiyonu 75cm²'lik flasklara alınarak hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlanmış olur (Silva 2006).

3.2.3. Hücre soylarının stoklanması

Hücreler konfluent olduklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırılır. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırılır ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,25 Trypsin EDTA solüsyonu eklenir. Hücreler inkübasyona bırakılır, yüzeyden ayrılan hücrelere, tripsini inhibe etmek için on katı kadar besiyeri ilave edilir. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisinde santrifüj edilir ve sonra süpernatant kısım aspire edilmektedir. Pelet üzerine her bir kriyovial için 1.5 ml dondurucu besiyeri (%5 DMSO + %10 FBS + DMEM) karanlık ortamda ilave edilerek hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılır ve hemen -80°C'ye kaldırılmaktadır (Silva 2006).

3.2.4. Hemositometre ile hücrelerin sayımı

Hücre sayımında; tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10µl alınır ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi konarak iyice karışmaları sağlanır. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına (Neubauer marka) koyulur ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapılmaktadır. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplanmaktadır (Silva 2006).

1 büyük karenin hacmi; $0,1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} = 0,01 \text{ cm}^2$

Bölmenin derinliği; $0,1 \text{ mm} = 0,01 \text{ cm}$

$$0,01 \text{ cm}^2 * 0,01 \text{ cm} = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ ml} = 0,1 \text{ µl}$$

Hücre sayısı x 10.000

Konsantrasyon (hücre/ml) = Sayılan alan x Dilüsyon

Sulandırma katsayısı (dilüsyon); 1:10 dilüsyon için; 0,1

1:100 dilüsyon için; 0,01

3.2.5. (+) Yüklü lamlara hücre ekimi

Önceliklerin lamların yüzeyi %70`lik Etil alkol (EtOH) ile temizlendikten sonra yüzeyler UV lambası altında 30 dakika steril edilmektedir. Hücreler sayılarak 100 µl besiyeri içerisinde 1×10^5 hücre olacak şekilde (hücre türüne bağlı olarak sayı değişebilir) hazırlanarak lamların yüklü yüzeylerine ekim yapılmaktadır. Hücreler yüzeye yapıştıktan sonra (hücre türüne bağlı olarak 2-3 saat/1 gün) boyama prosedürü uygulanabilmektedir (Silva 2006).

3.2.6. Hoechst 33342, propidiyum iyodür ile ikili boyama yöntemi

Floresans boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatinini, dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilmektedir. Hoechst 33342, hücre membranından nüfuz edebilen dolayısıyla DNA'ya bağlanabilen bir boyadır. Canlı ve ölü (apoptotik/ nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır.

Propidiyum iyodür (PI) ise sadece hasarlı hücre membranlarından geçebilen, geç apoptotik/sekonder nekrotik veya primer nekrotik olan, tüm ölü hücreleri boyayabilen nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları intact (erken apoptozda) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptoz/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler, non-vital boyalar ile (PI) boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran intact olmasından dolayı bu boyalarla boyanamaz. Yani PI negatif ve Hoechst boyası pozitif boyanmaktadır. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadır.

İkili boyama için + yüklü lameller üzerinde büyütülen hücreler bersiyerinin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla iki kez PBS ile yıkanmıştır. Yüzey laminar kabin içerisinde hava akımına maruz bırakılarak kurutulduktan sonra hücreleri yüzeye fikse edebilmek için %4'lük pararomaldehit solüsyonu hücrelerin üzerine uygulanmıştır. Fiksasyon işlemi için yarım saat beklenildi. Süre sonunda fazla fiksatif izotonik çözelti aracılığıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırma işlemi için PBS yerine izotonik çözelti kullanılmasının nedeni ortamdan kalacak tuz kristallerinin görüntü alırken sorun teşkil etmemesini sağlamaktır. 1µg/ml olacak şekilde hazırlanan PI boya solüsyonu hücrelerin üzerine direkt uygulanarak, 5 dakika beklenildi. Fazla boya yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hiç beklenmeden mikroskop görüntüleri alınmıştır. Mikroskop görüntülerinin alınmasını takiben, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen Hoechst 33342 boyası eklendi. 5 dakikalık inkübasyondan sonra fazla boyayı uzaklaştırmak maksadıyla lamel izotonik ile

yıkandı ve hücrelerin mikroskop görüntüleri tekrar elde edilmiştir. İnkübasyon sonunda, nükleusları Hoechst 33342 boyasıyla mavi renk boyanmış canlı ve ölü hücreler ile nükleusları propidyum iyodür boyasıyla kırmızı renk boyanmış ölü hücreler, floresan mikroskopunda değerlendirilmiştir. Boyanan hücrelerin görüntülenmesi 10X ve 20X objektif ile floresans mikroskobu altında yapılmıştır. Nükleik asitlere bağlandığında, PI için maksimum uyarma 535 nm ve maksimum emisyon 617 nm'dir. Hoechst boyasının su içinde çözünürlüğü oldukça zayıftır, bu yüzden çözünmesi için gerektiği kadar sonikasyona maruz bırakılmalıdır. 10 mg/ml (16.23 mM) bir boya çözeltisi hazırlamak üzere bir şişenin (100 mg) içeriği 10 mL deiyonize su içinde çözülerek Hoechst boya çözeltisi hazırlanmıştır. Hoechst stok çözeltisi PBS içerisinde 1:2.000 oranında seyreltilerek Hoechst boyama çözeltisi hemen boyama öncesinde taze olarak hazırlanmaktadır. Hücre içerisine girdiğinde, Hoechst için maksimum uyarma 350 nm ve maksimum emisyon 461 nm'dir (Pollack 1988).

3.2.7. Karbon kuantum nokta (CQD) sentezi

Grafen Oksit (GO) doğal grafitik tozdan modifiye Hummers metodu ile hazırlanmıştır. Belirli bir miktar GO alınarak quartz fırında 5°C/dk ısıtma hızıyla 50 dk'da 250°C'ye çıkarıldı. 2 saat 250°C'de bırakıldı. Bu işlem N₂ gazı atmosferinde gerçekleştirildi. Elde edilen Grafen tabakalarından 0,05 g alınarak 10 ml H₂SO₄ ve 30 ml HNO₃ bulunan balona alındı. Grafen tabakalarını okside etmek için bu karışım ultra homojenizatör kullanılarak 78 Watt'da 10 saat boyunca okside edildi. Karışım deiyonize suyla (250 ml) seyreltildi. İstenmeyen sentez atıklarını uzaklaştırmak için 0,20 µm porlu membranda filitrelendi. Elde edilen ~0,05 g okside edilmiş, grafen tabakaları 40 ml'lik deiyonize su içerisine alınarak pH, NaOH yardımıyla 8'e ayarlanmıştır. Süspansiyon 100 ml'lik teflon otoklav içerisine alındı ve 200°C'de 10 saat bırakılmıştır. Oda sıcaklığına kadar doğal olarak soğuyan süspansiyon 0,20 µm porlu filtre kağıdından süzölmüştür. Elde edilen süzöntü hala zayıf mavi ışık yayan bazı büyük grafen nano partikülleri (50-200nm) içermektedir. Bunları uzaklaştırmak için 12000 Da moleküler ağırlıklı diyaliz membran torbasında bir gece bekletilmiştir. Elde edilen GQD çözeltisinin yoğunluk tayini yöntemi ile 30 ml çözelti içerisinde 90 mg GQD olduğu ortaya çıkarılmıştır.

1. GO quartz fırında 5°C/dk ısıtma hızıyla 50 dk'da 250°C'ye çıkarılarak hazırlanmıştır. 12 saat 250°C'de bekletilmiştir. Deneyde saf su kullanılmıştır.
2. GO quartz fırında 5°C/dk ısıtma hızıyla 60 dk'da 300°C'ye çıkarılmıştır. 2 saat boyunca 300°C'de bekletilmiştir. Elde edilen GS'lerden 0,1 g alınarak 20 ml H₂SO₄ ve 60 ml HNO₃ bulunan balona alınmıştır. Ultra homojenizatör kullanılarak 78 Watt'da 10 saat boyunca okside edilmiştir. Bu işlem iki kere yapılarak okside edilmiş GS'lerden 0,2 g elde edilmiştir. Deneyde ultra saf su kullanılmıştır. 3500 Da diyaliz membran kullanılarak bir gece bekletilmiştir.
3. Hidrotermal reaktör değiştirilerek önceki reaktörün buhar kaçırıp kaçırmadığı kontrol edilmiş ve bir gece reaktörde bekletilmiştir.
4. Grafen tabakalardan 0,1 g alınarak 20 ml H₂SO₄ ve 60 ml HNO₃ bulunan balona alınmış ve ultrahomojenizatör kullanılarak 20 saat boyunca okside edilmiştir. Daha sonra 3500 Da diyaliz membanda bekletilmiştir (Chen *et al.* 2013).

3.2.8. Sentezlenen CQDlerin absorbens ve emisyon özelliklerinin belirlenmesi

Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Laboratuvarında sentezlenen CQD'ler kullanılmadan önce UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu UV-1800) kullanılarak absorbens değerleri ve PL spektrofotometre (Agilent Cary Eclipse) kullanılarak emisyon değerleri elde edilmiştir.

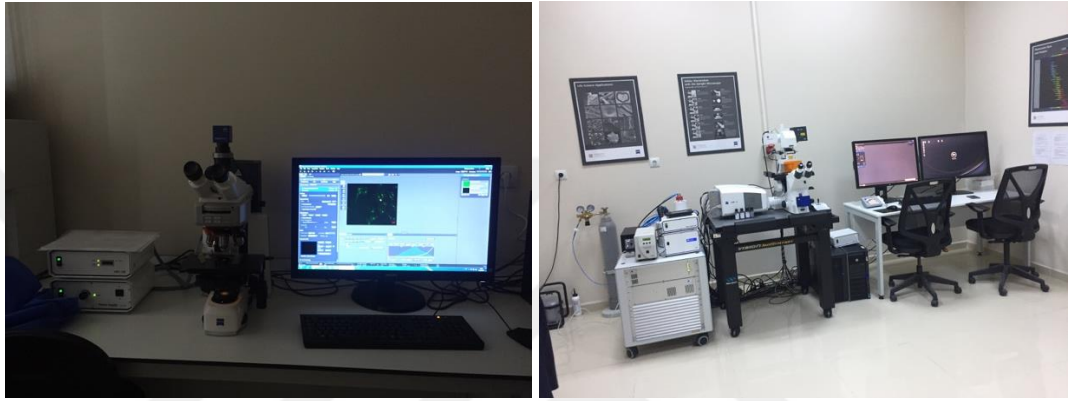
3.2.9. Sentezlenen CQDlerin TEM görüntülerinin alınması

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) yardımıyla görüntü alınarak tanecik boyutu araştırılmıştır.

3.2.10. CQD kullanılarak hücrelerin floresan ve konfokal mikroskopta görüntülenmesi

COQ'lar ışığa duyarlı oldukları için ışıktan korunmalarına özen gösterilerek çalışıldı. İnkili boyama prosedüründe olduğu gibi + yüklü lamaların yüzeyinde büyütülen hücreler %4'lük

paraformaldehit kullanılarak fikse edildikten sonra, izotonik çözelti ile yıkanan yüzeylere 100'er µl farklı zamanlarda sentezlenmiş COQ'lerden ilave edildi. Işımanın ne kadar sürdüğü ve hangi dalgaboyunda ışıma olduğu tam olarak bilinmediğinden 5, 15, 30 dakika bekletilerek mavi, yeşil ve kırmızı floresans filtreler kullanılarak hücreler farklı mikroskop büyötmelerinde görüntölendi.

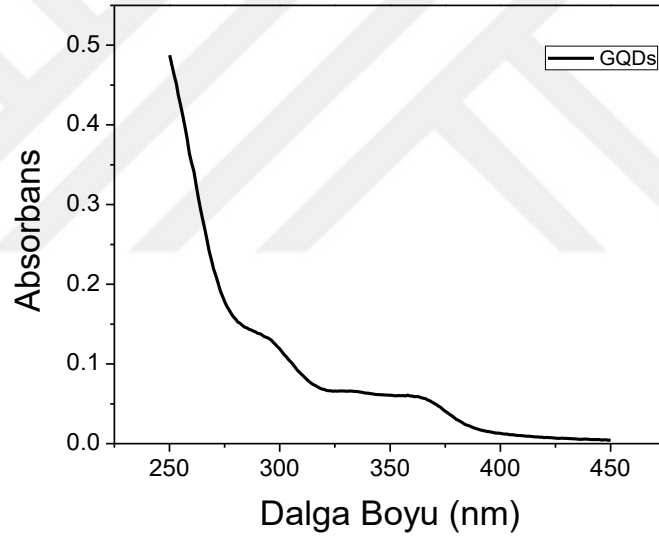


Şekil 3.2. Floresan Mikroskobu (a), Konfokal Mikroskobu (b)

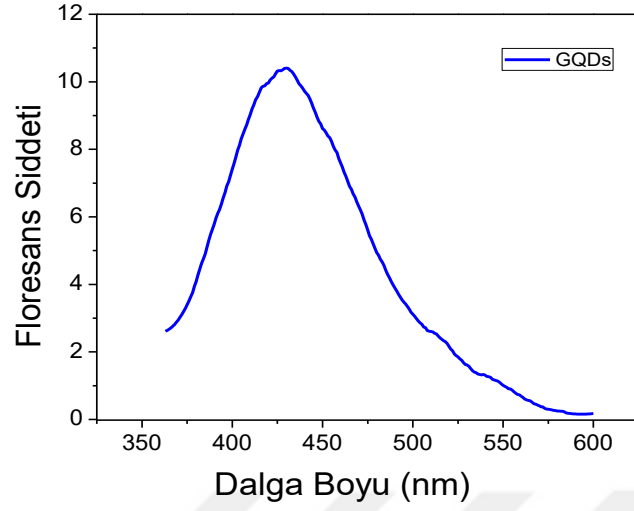
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Sentezlenen CQDlerin Absorbans ve Emisyon Özellikleri

Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Laboratuvarında sentezlenen CQD'ler hücreler ile muamele edilmeden önce basit karakterizasyon olarak UV-Vis spektrofotometre ile absorbans değerleri ve emisyon özellikleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak oluşturulan absorbans grafiği Şekil 4.1'de, 320nm uyarıma göre elde edilen emisyon özelliği ise Şekil 4.2'de sunulmuştur.



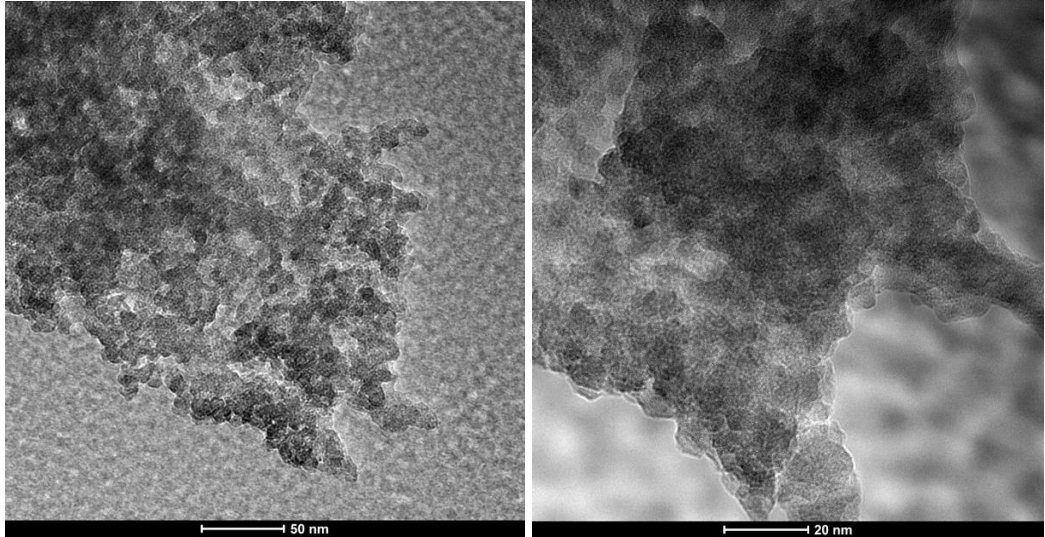
Şekil 4.1. Su içinde dispers edilmiş CQD'lerin UV-Vis spektrumu



Şekil 4.2. Su içinde dispers edilmiş CQD'lerin 320 nm'de PL spektrumu

4.2. Sentezlenen CQDlerin TEM görüntüleri

Sentezlenen CQD'lerin tanecik boyutunu belirlemek için TEM görüntüleri alınmıştır. Elde edilen görüntüler Şekil 4.3'te verilmiş ve görüntülere göre taneciklerin boyutlarının yaklaşık 2-16 nm arasında dağılıma sahip olduğu gözlemlenmiştir.

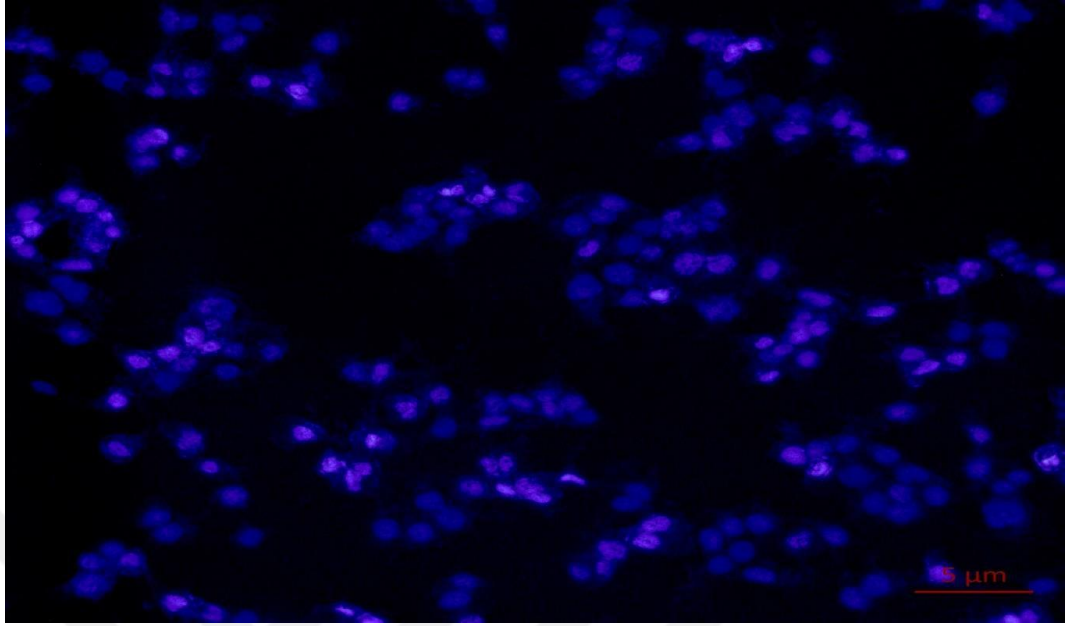


Şekil 4.3. Su içinde dispers edilmiş CQD'lerin TEM görüntüleri

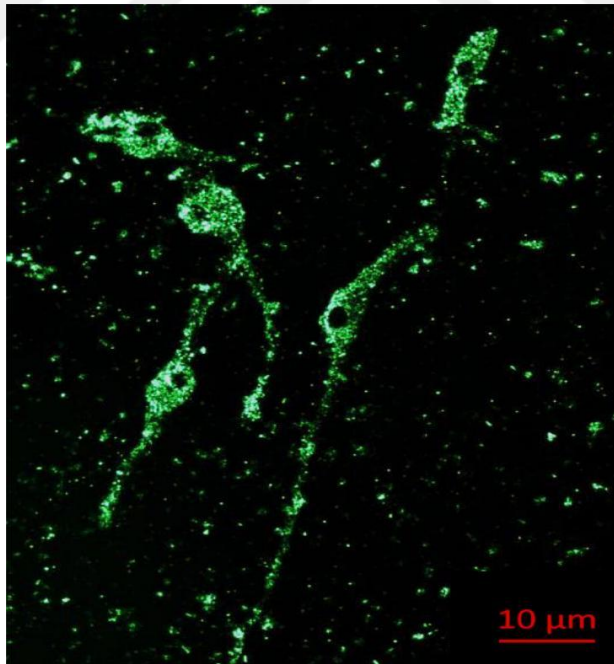
4.3. Floresan Mikroskop Görüntüleri

Farklı koşullarda sentezlenmiş olan CQD'ların hücrelerde ışıma verip vermediğini belirlemek amacıyla hücreler floresans mikroskopunda incelenmiştir. Hücrelerin Hoechst boyasıyla boyamaları yapılmış, karbon kuantum noktaların hangi bölgelerde ışıma yaptığı araştırılmıştır. Floresans mikroskopunda hücrelerden görüntü elde edebilmek için, hücreler (CaCO₂) %4'lük paraformaldehitte fiksasyon sonrası, Hoechst 33342 ve farklı tarihlerde farklı metodlarla sentezlenmiş olan CQD'larla boyanmıştır. Şekil 4.4'de 20X objektifte, Hoechst 33342 boyaması sonrasında elde edilen CaCO₂ hücresinin floresans mikroskop görüntüsü verilmektedir. Elde edilen görüntüde hücre çekirdeklerinin mavi renkte boyandığı gözlemlenmektedir.

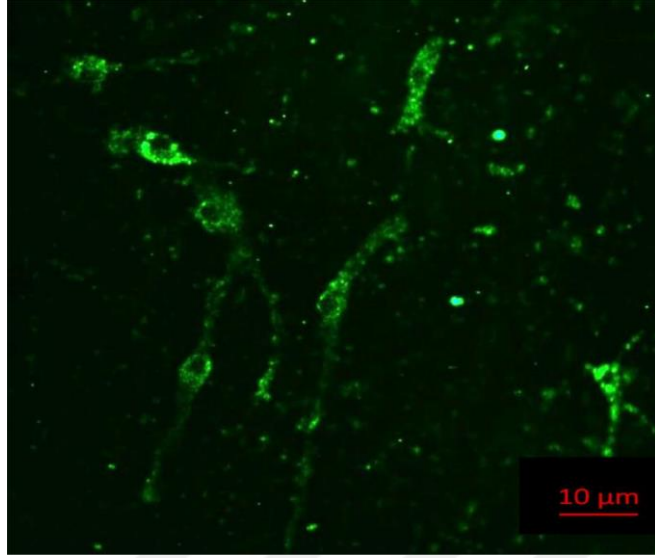
Şekil 4.5 ve 4.6'da 10X objektif ile elde edilen CaCO₂ hücrelerinin farklı zaman ve metodlarla sentezlenmiş CQD ile muamelesi sonucu Floresans mikroskop görüntüleri görülmektedir. FITC filtresinde alınan görüntülerden anlaşılabileceği üzere, Karbon Kuantum noktaların hücre sitoplazmasında yeşil renkte ışıma verdiği görülmektedir. Bununla birlikte farklı koşullarda sentezlenmiş CQD'lar kullanılarak CaCO₂ hücrelerinde elde edilen görüntülere göre (Şekil 4.7 ve 4.8), söz konusu noktaların hücre çekirdekçilerinde yeşil renkte ışıma verdikleri görülmektedir.



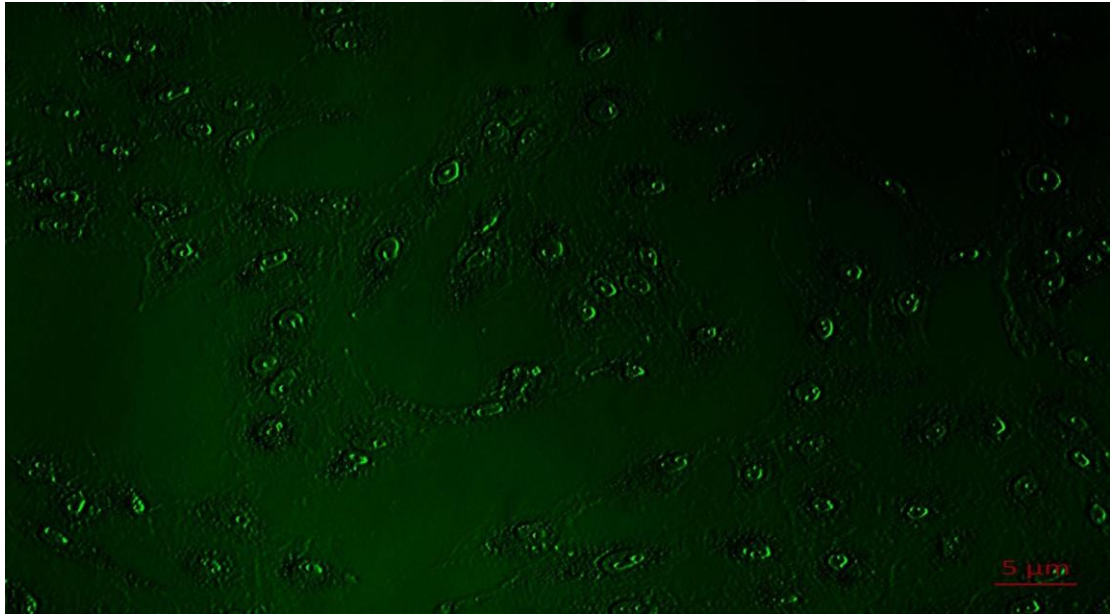
Şekil 4.4. CaCO₂ hücrelerinin Hoechst 33342 boyama sonrasındaki floresans mikroskop görüntüsü – Çekirdek (2. Sentez CQD ile, 20X büyütme ve ölçek 5 μm).



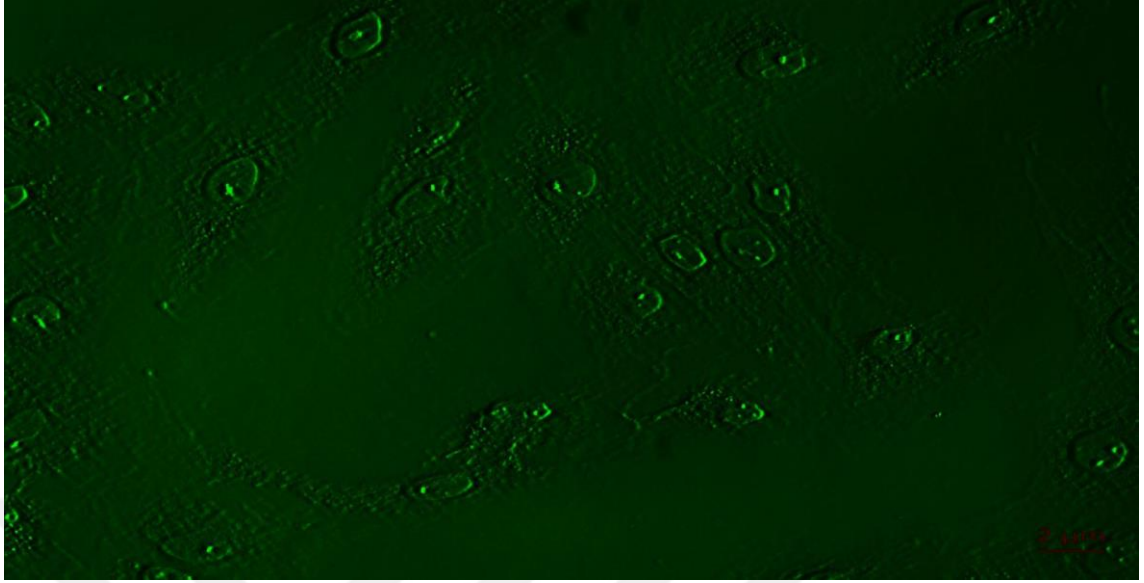
Şekil 4.5. CaCO₂ hücrelerinin CQD ile muamelesi sonrasındaki floresans mikroskop görüntüsü – Sitoplazma (2. Sentez CQD ile, 10X büyütme ve ölçek 10 μm).



Şekil 4.6. CaCO₂ hücrelerinin CQD ile muamelesi sonrasındaki floresan mikroskop görüntüsü – Sitoplazma (3. Sentez CQD ile, 10X büyütme ve ölçek 10 μm).



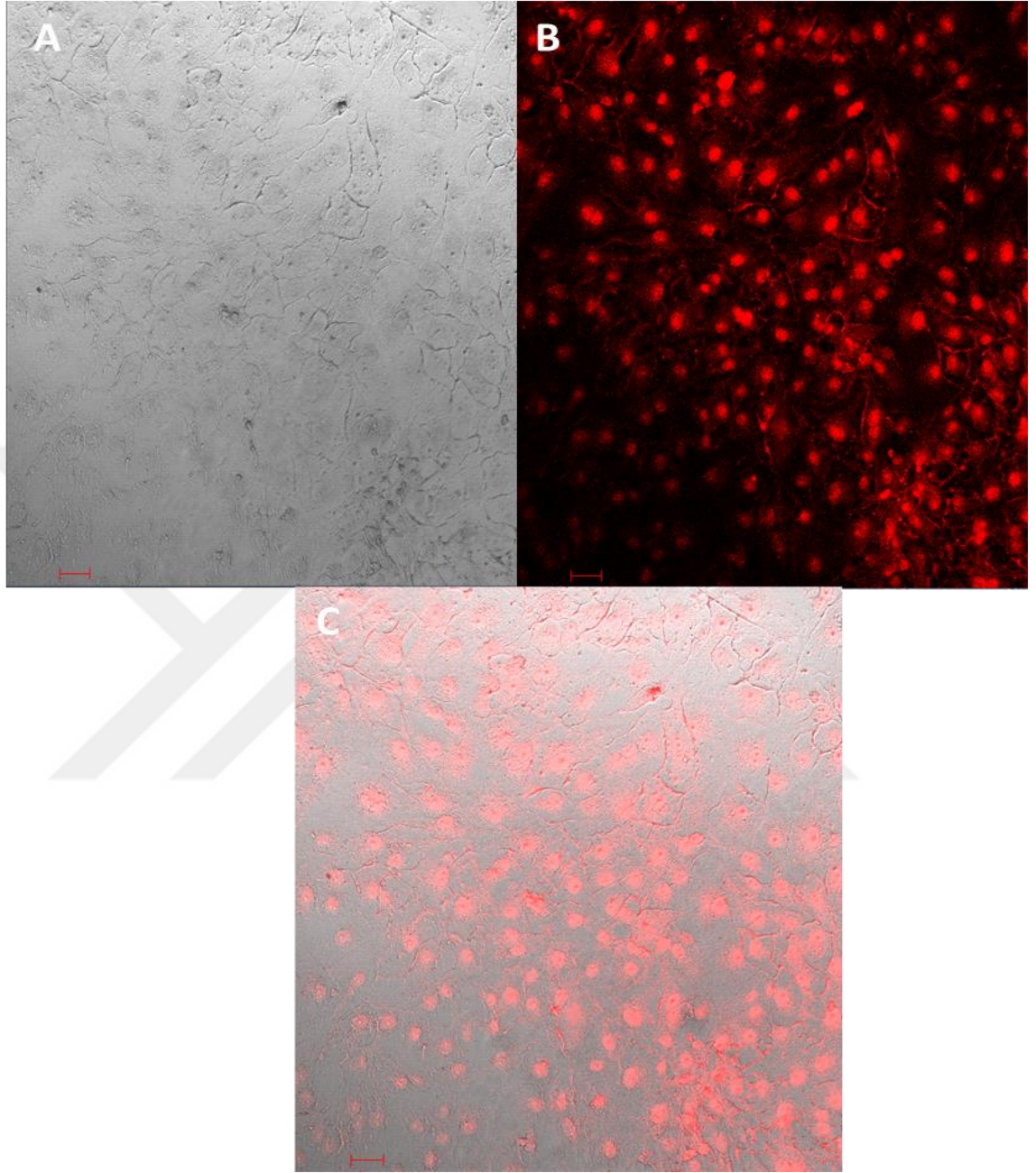
Şekil 4.7. CaCO₂ hücrelerinin CQD ile muamelesi sonrasındaki floresan mikroskop görüntüsü – Çekirdekçik (2. Sentez CQD ile, 20X büyütme ve ölçek 5 μm)



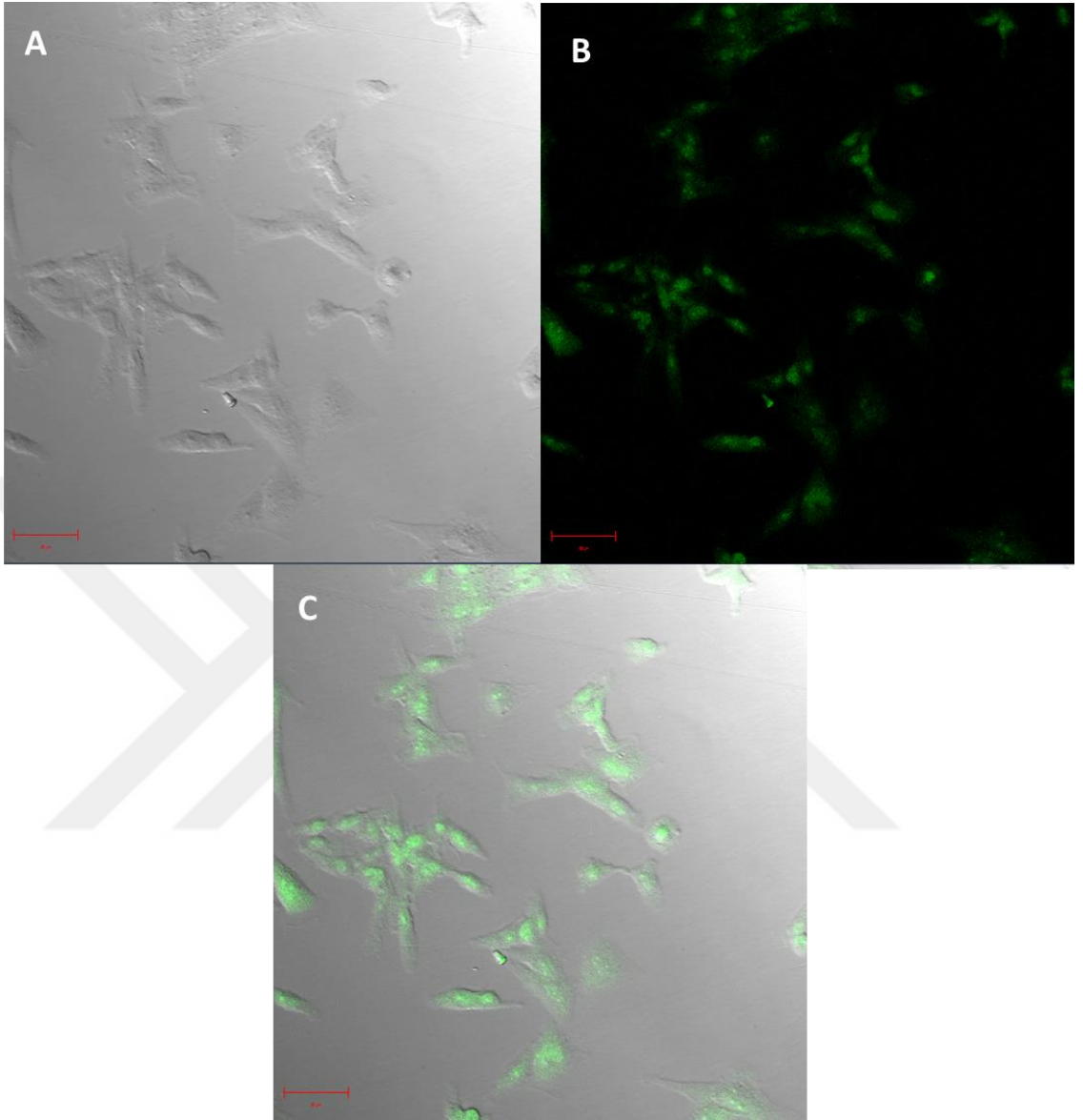
Şekil 4.8. CaCO₂ hücrelerinin CQD ile muamelesi sonrasındaki floresan mikroskop görüntüsü – Çekirdekçik (2. Sentez CQD ile, 20X büyütme ve ölçek 5 µm)

4.4. Konfokal Mikroskop Görüntüleri

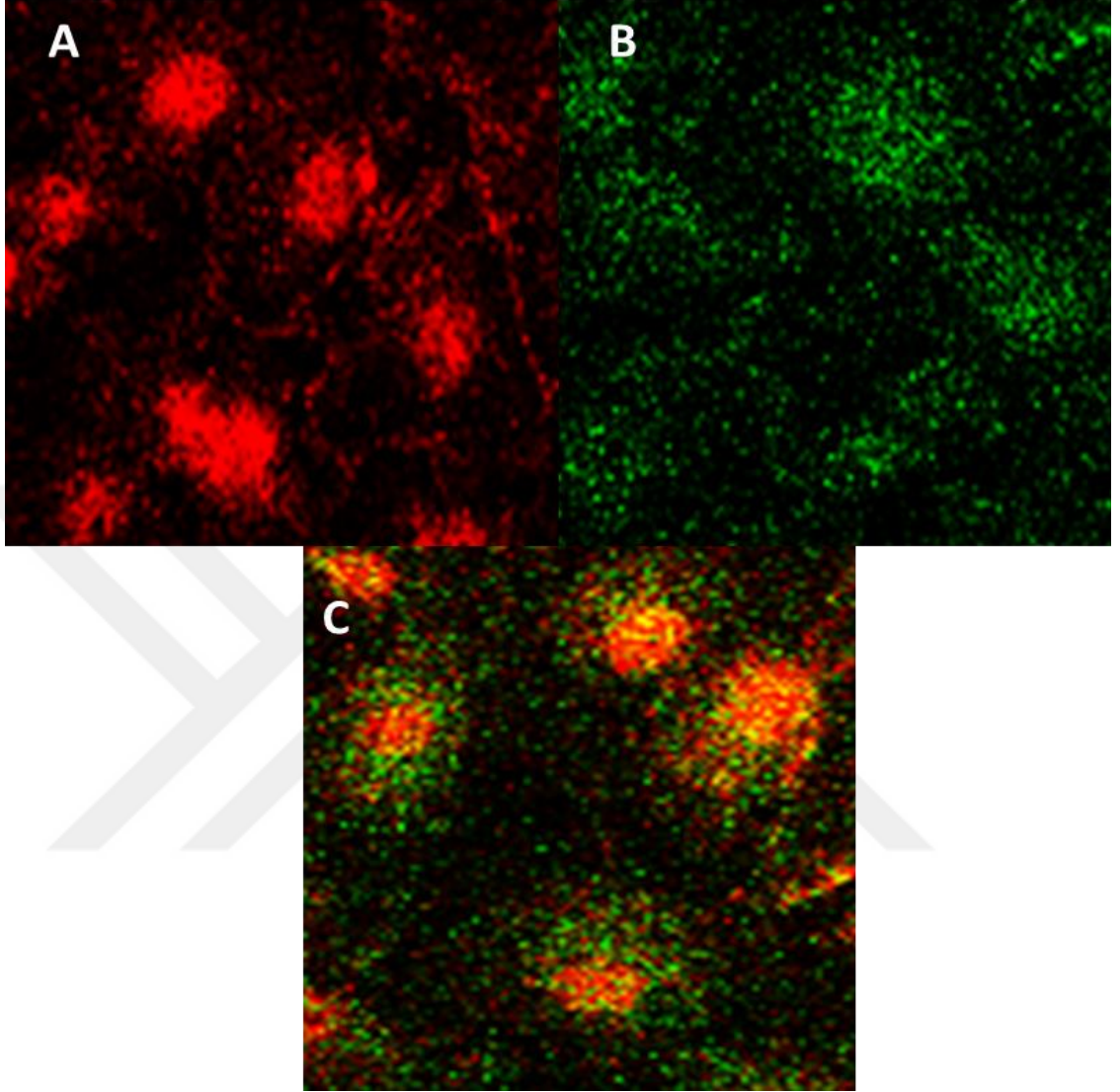
Elde edilen floresans mikroskop görüntülerine dayalı olarak, daha yüksek çözünürlükte görüntü elde etmek için konfokal mikroskobu kullanılmıştır. Şekil 4.9.'da konfokal mikroskobunda PI boyası ile boyanmış MCF-7 hücreleri görülmektedir. Öncelikli olarak aydınlık alan görüntüsü, daha sonra PI ile boyanmış görüntüsü alınarak her iki görüntü kombine edilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere, PI boyasının MCF-7 hücrelerinin çekirdeklerini belirgin bir şekilde kırmızı renkte boyadığı gözlemlenmiştir. Aynı işlemler sentezlenmiş olan CQD'lar için de yapılmış olup, elde edilen görüntüler Şekil 4.10.'da verilmektedir. Görüntülerde karbon noktaların hücre çekirdeklerinde yeşil renkte ışıma verdikleri gözlemlenmiştir. Elde edilen bu görüntülere dayanarak, PI ve farklı koşullarda sentezlenmiş CQD'ların ikili boyama işlemi MCF-7 hücrelerinde yapılmış ve konfokal görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.11'de de görüldüğü üzere, PI kırmızı renkte çekirdekleri, CQD'lar ise hem çekirdekte hem de kısmen sitoplazmada ışıma vermiştir. Diğer bir çekirdek boyası olan Hoechst 33342 ve farklı koşullarda sentezlenmiş CQD'larla yapılan görüntülemelerde ise çekirdeklerin belirgin olarak Hoechst ile mavi renkte boyandığı, sitoplazmaların ise CQD'larla yeşil renkte boyandığı Şekil 4.12 ve 4.13'de açıkça görülmektedir.



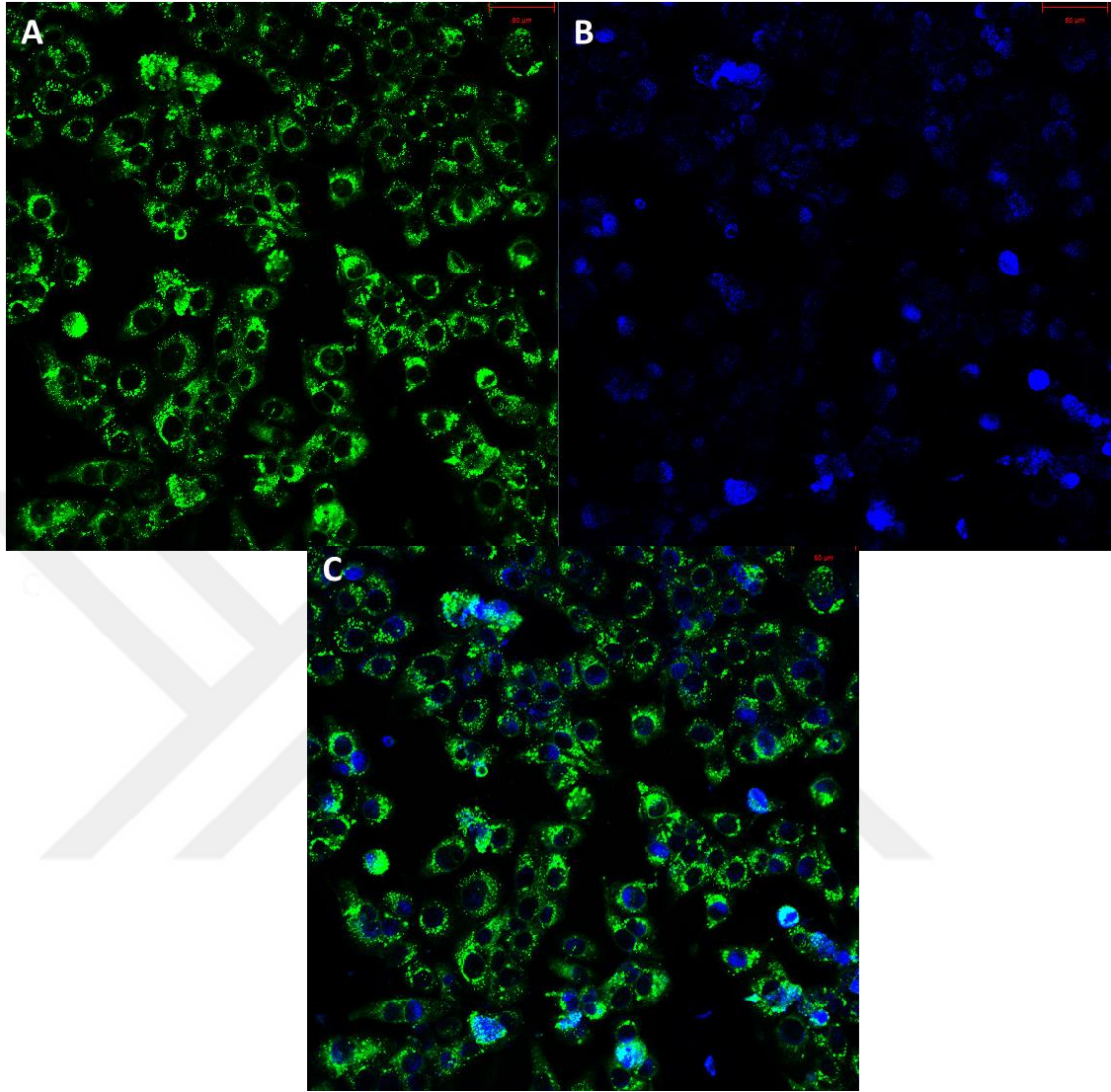
Şekil 4.9. MCF-7 hücrelerinin aydınlık alan (A), PI ile boyanması sonrasındaki tek ve aydınlık alan görüntüsü (B) ile kombine edilmiş (C) konfokal mikroskopu görüntüleri (2. Sentez CQD ile, 20X büyütme ve ölçek 5 μm)



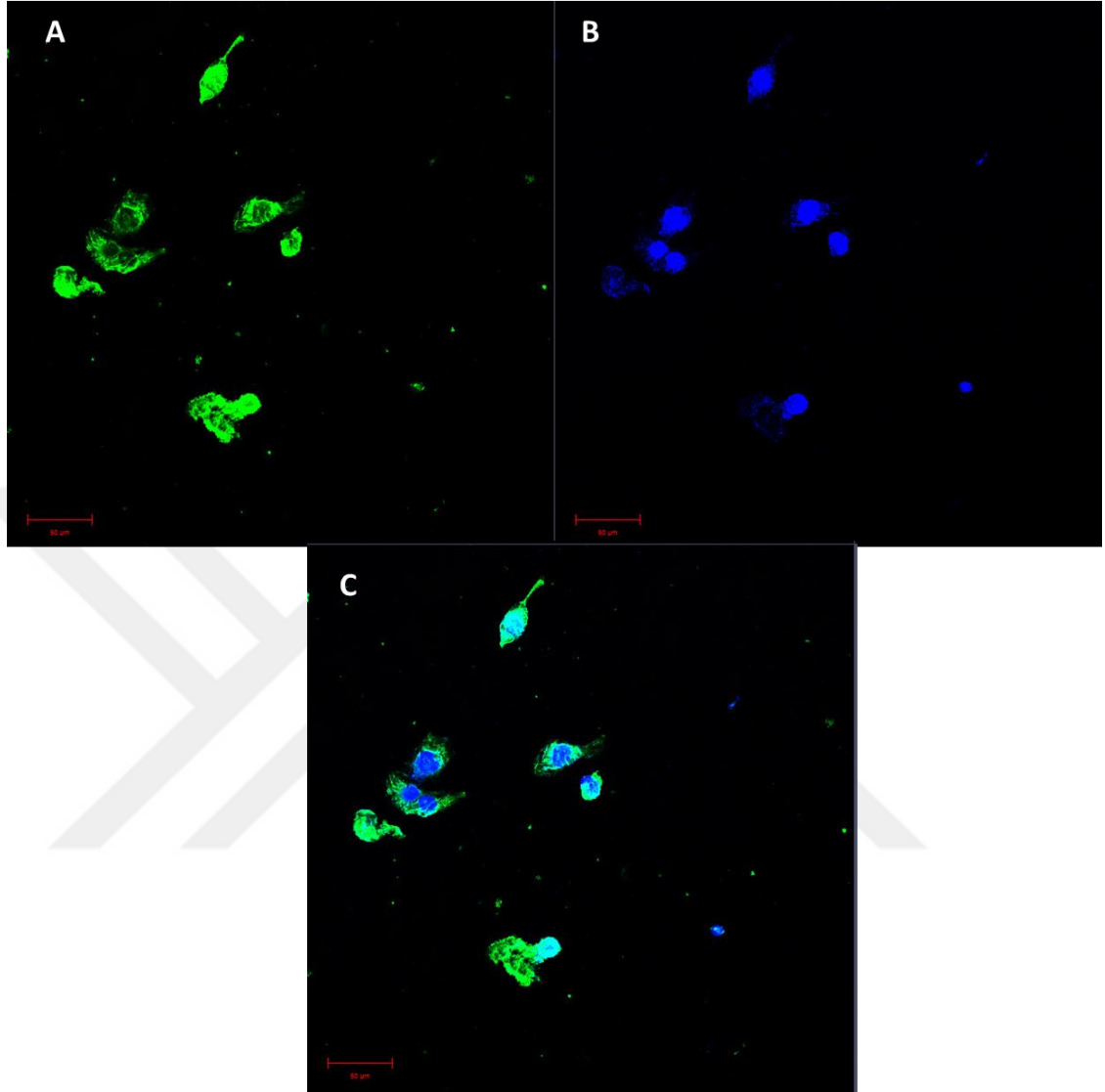
Şekil 4.10. MCF-7 hücrelerinin aydınlık alan (A), CQD ile muamelesi sonrasındaki tek (B) ve kombine edilmiş (C) konfokal mikroskopi görüntüleri (3. Sentez CQD ile, 20X büyütme ve ölçek 5 µm)



Şekil 4.11. MCF-7 hücrelerinin PI boyası (A), CQD ile muamelesi sonrasındaki tek (B) ve kombine edilmiş (C) konfokal mikroskopi görüntüleri (3. Sentez CQD ile, 20X büyütme ve ölçek 5 μm)



Şekil 4.12. MCF-7 hücrelerinin CQD (A), Hoechst 33342 (B) ile muamelesi sonrasındaki tek ve kombine edilmiş (C) konfokal mikroskopu görüntüleri (2. Sentez CQD ile, 20X büyütme ve ölçek 5 µm)



Şekil 4.13. MCF-7 hücrelerinin CQT (A), Hoechst 33342 (B) ile muamelesi sonrasındaki tek ve kombine edilmiş (C) konfokal mikroskopi görüntüleri (2. Sentez CQD ile, 20X büyütme ve ölçek 5 µm)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbon kuantum noktalar boyutları 10 nm'nin altında olan, karbon atomlarından oluşan nanopartiküllerdir. Karbon kuantum noktaları diğer kuantum noktalara nazaran çeşitli üstünlüklere sahip olmaktadır. Kurşun, kadmiyum gibi ağır metalleri içermediği için toksik etkileri oldukça düşük oranda olup, ister çevre isterse insan sağlığı için yan etkileri bulunmaktadır. Ayrıca suda çözünebilir olmaları dolayısıyla, çevre için toksik çözücüler kullanılmadan sentezlenebilmektedir. Ayrıca karbon kuantum noktalara fotostabil olmaları nedeniyle ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Karbon kuantum noktalar herhangi bir karbon kaynağından farklı yöntemler kullanılarak sentezlenebilmektedir. Bu amaçla tezimizde karbon kuantum noktaları elde etmek için modifiye Hummers metodu kullanılmıştır (Chen *et al.* 2013).

CQD'ların hücreye uygulamadan önce karakterizasyonunu yapmak için absorbands ve emisyon spektrumları ölçülmüştür. Özellikle absorbandsı görmek için spektrofotometrik ölçümler yapıldıktan sonra elde edilen spektrum, literatürlerde belirtilen değerler ile büyük benzerlik göstermektedir (Pan *et al.* 2010). Kullanılan CQD'nin karakterizasyonu veya elde etme yöntemiyle ilgili sorun olduğu düşünülmemiştir. Belirtilen çalışmada 320 nm'de UV bölgeden görünür bölgeye kadarki taramada pik verdiği noktalar benzerlik göstermektedir (Pan *et al.* 2010). Aynı çalışmanın PL spektrumu da literatür ile benzerlik göstermektedir. Çoğu floresan karbon nanoparçacıkları gibi, CQD'ler de bir uyarma bağımlı PL davranışı sergilemektedir. Literatürde eksitasyon dalga boyu 320 ila 420 nm arasında değiştiğinde, PL pik daha uzun dalga boylarına kayabilmektedir. Bu çalışmada mikroskop görüntülerinde alınan farklı emisyonların sebebi bu özellik olarak değerlendirilmiş ve bu yönüyle de literatürle benzer absorbands ve emisyon gösterdiği belirlenmiştir (Pan *et al.* 2010; Yang 2018).

Literatürde başka bir çalışmada sentezlenmiş olan CQD'nin 280 - 420 nm arasında ışıma verdiği görülmektedir (Yang 2018). Bu çalışma için sentezlenmiş olan CQD'nin, farklı absorbands ve emisyon vermesinin sebebi boyutu veya yüzey özelliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle TEM görüntüsü ile boyut analizi yapılması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada nanokarakterizasyon veya nanogörüntüleme üzerinde durulduğu için elde edilen TEM görüntüsünde daha çok aglomere olmuş CQD'lar dikkat çekmektedir. Ancak, aglomere olsa da, genel anlamda partikül boyutlarına dikkat edildiğinden partikül boyutunun yaklaşık 2 ila 16 nm arasında olduğu gözlenmektedir. Sentezlenmiş olan CQD'ın aglomere olması sık karşılaşılan problemlerden birisi olmaktadır. CQD'ler hücre uygulamalarında kullanılmadan önce sonikatörde birkaç saat (yaklaşık 4 saat) dispers edilmiştir. Bu sayede kümelenme durumunun engellenmesi veya kümelenmenin dağıtılması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada farklı koşullarda sentezlenmiş olan CQD ların hücrenin hangi bölgelerinde ışıma verip vermediğini belirlemek amaçlanmıştır. Bu bağlamda öncelikle ışıma verip vermediğini görmek amacıyla Floresan mikroskop görüntüleri alınmıştır. Floresan görüntüleri göstermektedir ki, sentezlenmiş olan CQD'lar hem çekirdekçik hem de hücre sitoplazmasını boyamaktadır. Daha yüksek çözünürlüklü görüntü elde etmek amacıyla konfokal mikroskop kullanarak CQD'ların ışıma verdikleri yerler belirlenmiştir. Sitoplazmayı spesifik olarak boyayıp boyamadağını belirlemek için öncelikle çekirdeği iyi boyayan Hoechst 33342 ve PI boyaları kullanılmıştır. Bu boyaların hücre çekirdeğini spesifik olarak boyadığı bilinmektedir. Hoechst ve PI boyalarıyla birlikte boyama için CQD'larda kullanılmıştır. Konfokal mikroskopunda PI-CQD ve Hoechst-CQD ikili boyamalardan elde edilen görüntüler, CQD'ların hem sitoplazmayı hem de çekirdeği boyadığını ortaya koymaktadır. Farklı bölgelerde ışıma elde edilmesinin sebebi farklı koşullarda senteze bağlı elde edilen nokta boyutlarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Zira literatürde söz konusu noktaların farklı hücre hatlarında hem sitoplazmayı hem de çekirdeği boyadığı gösterilmiştir (Kumawat *et al.* 2017). Çünkü hücre sitoplazması ile çekirdeğe nanopartiküllerin alınmasının partikül boyutu ve yüzey yüküne bağlı olduğu belirtilmiştir (Shen *et al.* 2010; Zheng *et al.* 2015). Özellikle 9 nm'den küçük nanopartiküllerin çekirdeğe daha kolay difüze olduğu gösterilmiştir (van Gaal *et al.* 2011). Bu çalışmada kullanılan CQD'lerin boyut aralığının geniş olmasının hücrelerin farklı kısımlarında gözlemlenmesine neden olduğu düşünülmektedir. Literatürlerde detaylı olarak görüldüğü üzere partikül boyutu küçüldükçe, hücrenin daha iç kısımlarında, çekirdekte hatta çekirdekçikte görüntü elde edilmektedir.

Nanopartiküllerin en yoğun etkelediği hücre gruplarının epitel hücreler olduğu bilinmektedir. Özellikle MCF-7 ile ilgili literatürde birden fazla uygulama bulunmaktadır. Farklı hücre hatlarında da çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Brun *et al.* 2018; Dyson *et al.* 2019)

Liu ve arkadaşları (2011), HepG-2 hücrelerine TTDDA ile pasifleştirilmiş karbon noktalarla uygulanmış ve lazer tarama konfokal mikroskobu (LSCM) ile farklı uyarma koşullarında noktaların çok renkli floresan emisyonlarını incelemiştir. HepG-2 hücreleri tarafından alınan karbon noktaları, sırasıyla 405 nm, 488 nm ve 543 nm eksitasyonlarında parlak mavi, yeşil ve kırmızı lazer filtrelerinde ışıma göstermiştir (Liu *et al.* 2011). Bu tez çalışmasında belirtilmiş hücreler pasifleştirilmiş karbon noktalarıyla muamele sonrasında lazer taramalı konfokal mikroskopunda incelenmiş, noktaların belli aralıklarda mavi, yeşil ve kırmızı filtrelerde ışıma verdiği gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler literatürle karşılaştırıldığında, farklı uyarma koşullarına göre değişiklik gösterdiği belirtilmektedir.

Buna ek olarak, Zhu ve arkadaşları (2016) tarafından MG-63 hücreleri ile grafen oksit öncüllerinden sentezlenmiş karbon noktalar kullanılarak yapılan görüntüleme çalışmaları söz konusu noktaların hem 405 hem de 488 nm eksitasyonlarında, hücre sitoplazmasında ışıma verdiği bulunmuştur (Zhu *et al.* 2016). Yang ve arkadaşları (2016) A549 hücrelerinde chitosanın hidrotermal karbonizasyonu yoluyla elde edilen karbon noktaların sadece hücre zarı ve sitoplazmik alanda sinyal verdiğini belirlemişlerdir (Yang *et al.* 2016).

Mevcut hücre görüntüleme sonuçları genel olarak, hücreler tarafından alınan karbon noktalarının çoğunlukla sitoplazmada lokalize olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, CQDların hücre çekirdeğinde sinyal verdiğini de gösteren birkaç çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Ray ve arkadaşları, herhangi bir partikül yüzey işlevselliği olmayan (5 M nitrik asidin oksidasyonu hariç) mum kurumundan elde edilmiş küçük karbon nanoparçacıklarının, EAC hücrelerinde hem sitoplazmada hem de çekirdek tarafından alındığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Chandra vd. organik moleküller (a-

naftilamin, flüoresin ve rodamin B) ile işaretlenmiş karbon noktaların insan kırmızı kan hücrelerinin korpüsküllerinde (RBC) tüm bölgelerde dağıldığını bildirmiştir.

Bu tez çalışmasıyla elde edilen sonuçlarda karbon kuantum noktalarının hem sitoplazmada hem de çekirdekde lokalize olduğu belirlenmiştir. Bu özellik ile yukarıdaki çalışmayla benzerlik göstermektedir (Ray *et al.* 2013; Chandra *et al.* 2013).

Bu çalışma ile CaCO₂ hücre hatlarında yapılan CQD uygulamaları sonucunda floresan mikroskop görüntülerinde dikkat çekici bir şekilde yoğunluklu olarak çekirdek bölgesinin işaretlendiği belirlenmiştir. Bu özellik Doñate-Buendia ve arkadaşları tarafından yapılan uygulama ile benzerlik göstermektedir. Özellikle kullanılan CQD'ların boyutu 3 nm aralığında olduğu bildirilen literatür verisi ile bu çalışmada kullanılan partikül ve boyutu hakkında da bilgi vermektedir. Hatta Şekil 4.7'de görüldüğü gibi çekirdekçikte yoğunlaşmanın partikül boyutunun daha küçük olması ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan hücre hatları genel olarak bu tez çalışmasından farklı olmakla beraber sonuçların yorumlanması için önemli bilgiler vermektedir (Doñate-Buendia *et al.* 2018). Geng ve arkadaşları çalışmalarında ise grafen kuantum noktaların boyutlarını değil emisyonlarını baz almış, absorbans ve emisyon değerlerini belirlemiştir. Görüntüleme kalitesi ve lokalizasyon azot ilavesi ile kontrol edilmiştir (Geng *et al.* 2018).

Farklı zamanlarda sentezlenmiş olan CQD'ların sentez şartları dolayısıyla kullanılan hücre hatlarında sadece boyuta göre değil aynı zamanda sentezlenme şartlarının da etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Sentez 1. ve Sentez 4.de kullanılan her iki hücre hatlarında ve görüntüleme sistemlerinde sonuç alınmamış, Sentez 2. ve Sentez 3. sonucu elde edilen karbon kuantum noktalarından alınan görüntüler çalışmamızda verilmiştir. Senteze bağlı olarak elde edilen karbon kuantum noktaların boyutlarından dolayı yeşil bölgede emisyon vermiş ve aynı sebepten dolayı hücrelerin farklı kısımlarında (çekirdek, sitoplazma hatta çekirdekçikte) lokalize olduğu gözlemlenmiştir.

Literatür dikkatle incelendiğinde farklı hücre hatları ve farklı boyutlarda CQD'lar ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır, ancak mevcut çalışmaların yeterli olduğu düşünülmemektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde bu çalışma ile elde edilen sonuçlar literatür ile benzerlik göstermektedir. Ancak bu çalışmaların netlik kazanması için farklı hücre hatlarında, sentezlenen CQD'ların denenmesi ya da sentez koşullarına göre yeni çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır. Literatür çalışmalarında da görülmektedir ki nanopartikülün sitoplazmaya ve ya çekirdeğe bağlanması, senteze bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışma sonunda gözlemlenmiştir ki, CQD'lar sentezlenme koşullarına, boyut farklılıklarına göre hem sitoplazmaya hem de çekirdeğe lokalize olmaktadır. Bunun tek hücrede spesifik lokalizasyonun olduğu yeri, sitoplazmayı ya da çekirdeği işaretlemesi için CQD sentezinin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu perspektifde hücre çalışmalarının da devam edilmesi gereksinimi vardır.

KAYNAKLAR

- Aceitunol, V.C., Ahnl S., Simu S.Y., Wang, C., Mathiyalagan, R., Yang, D.C., 2016. Silver nanoparticles from *Dendropanax morbifera* Léveillé inhibit cell migration, induce apoptosis, and increase generation of reactive oxygen species in A549 lung cancer cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 52, (10), 1012–1019.
- Amstad, E., Zurcher, S., Mashaghi, A., Wong, J.Y., Textor, M., Reimhult, E., 2009. Surface functionalization of single superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted magnetic resonance imaging. *Small*, 5 (11), 1334 - 1342.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1994. *Current protocols in molecular biology*. Wiley-Interscience, New York, U.S.A.
- Barrila, J., Radtke, A.L., Crabbé, A., Sarker, S.F., Herbst-Kralovetz, M.M., Ott, C.M., Nickerson, C.A., 2015. Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (11), 791-801.
- Batista, C. A., Silvera L., Ronald G., Kotov, N. A., 2015. Nonadditivity of nanoparticle interactions.
- Berlatsky, N., 2014. *Nanotechnology*. Greenhaven, 350 (6257), 1242477.
- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S., 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture; *PNAS*, 83 (8), 2496-2500.
- Bhunia, S.K., Saha, A., Maity, A.R., Ray, S.C., Jana, N.R., 2013. Carbon nanoparticle-based fluorescent bioimaging probes. *Scientific Report*, 3, 1473.
- Binns, C., 2010. *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*. John Wiley & Sons, Inc. 301 p, New Jersey USA.
- Biswas, A., D'Almeida, C.M., Bradley, J., 2016. Advances in Top-Down and Bottom-Up Surface Nanofabrication: Medical Applications of Nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 170 (1-2), 2–27.
- Brun, P., Monica, D., Luca, G.C., Fabrizio, D., Paolo, S., Clara, B., Tosid, A.L., Zamunerb, A., Sieni, E., 2018. Cell-seeded 3D scaffolds as in vitro models for electroporation. *Bioelectrochemistry*, 125, 15-24.
- Buzea, C., Pacheco, I.I., Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2 (4), MR17–MR71.
- Caputo, J.L., 1996. Safety procedures, in *Culture of Immortalised Cells* (Freshney, R. I. and Freshney, G., eds.), Wiley-Liss, 25–51 p, New York, USA.
- Chandra, S., Patra, P., Pathan, S. H., Roy, S., Mitra, S., Layek, A., Bhar, R., Pramanik, P., Goswami, A., 2013. Luminescent S-doped carbon dots: An emergent architecture for multimodal applications. *Journal of Materials Chemistry*, 1 (18), 2375–82.
- Chang, J-Y., Wang, G-Q., Cheng, C-Y., Lin, W-X., Hsu, J-C., 2014. Strategies for photoluminescence enhancement of AgInS₂ quantum dots and their application as bioimaging probes. *Journal of Materials Chemistry*, 22, 10609.
- Chen, J., Bowen, Y., Chun, L., Gaoquan, S., 2013. An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide. *Carbon*, 64, 225-229.

- Cherukula, K., Manickavasagam, L.K., Uthaman, S., Cho, K., Cho, C.S., Park, I.K., 2016. Multifunctional inorganic nanoparticles: Recent progress in thermal therapy and imaging. *Nanomaterials*, 4, 76.
- Ciancio, G., Pollack, M., Taupier, A., 1988. Measurement of cell-cycle phase-specific cell death using Hoechst 33342 and propidium iodide: preservation by ethanol fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 36 (9), 1147-52.
- Couvreux, P., Dubernet C., Puisieux, F., 1995. Controlled drug delivery with Nano particles: current possibilities and future trends. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41 (1), 1-2.
- Crisponi, G., Nurchi, V.M., Lachowicz, J., Peana, M., Medici, S., Zoroddu, M.A., 2017. Toxicity of Nanoparticles: Etiology and Mechanisms. Chapter in *Antimicrobial Nanoarchitectonics* (Ed: Grumezescu, A.) p551-546. Elsevier, USA.
- Danilatos, G.D., 1986. Colour micrographs for backscattered electron signals in the SEM. *Scanning*, 8, 9-18
- Deng, X., Wenbin, L., Guosheng, D., Tao, X., Chen, X., 2017. Synthesis and Applications of Functionalized Magnetic Nanomaterials in Enantioseparation. *Separation and Purification, Reviews*, 48 (1), 14-29.
- Doñate-Buendia, C., Torres-Mendieta, R., Pyatenko, A., Falomir, E., Fernandez-Alonso, M. and Mínguez-Vega, G., 2018. Fabrication by Laser Irradiation in a Continuous Flow Jet of Carbon Quantum Dots for Fluorescence Imaging. *ACS Omega*, 3, 2735–2742.
- Dornenburg, H. and Knorr, D., 1995. Strategies secondary for the improvement of metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 17 (8), 674-684.
- Drexler, K.E., 1986. *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*. Anchor Books Inc. p. 298. New York, USA.
- Dykman, L.A., Bogatyrev, V.A., Shchegolev, S.Yu., Khlebtsov, N.G., 2008. *Zolotye nanochastitsy: sintez, svoystva, biomeditsinskoe primeneniye* (Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Biomedical Applications). Moscow: Nauka, 3 (2), 34–55.
- Dyson, J., Le-Foll, F., Magal, P., Noussair, A., Pasquier, J., 2019. Direct and indirect P-glycoprotein transfers in MCF7 breast cancer cells. *Journal of Theoretical Biology*, 461, 239-253.
- Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., Yang, L., 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, 12 (4), 207-218.
- Erickson, B.J., Jack, Jr. C.R., 2011. Correlation of single photon emission CT with MR image data using fiducial markers. *American Journal of Neuroradiology*, 14 (3), 713 – 720.
- Fanelli, A., 2016. MCF-7 Cells: human breast adenocarcinoma cell line. <http://www.mcf7.com/>.
- Fellers, T.J., Davidson, M.W., 2007. *Introduction to Confocal Microscopy*. Olympus Fluoview Resource Center, <http://fluoview.magnet.fsu.edu/theory/confocalintro.html>.
- Fernando, K.A., Sahu, S., Liu, Y.L., William, K., Gulians, E.A., Jafariyan, A., Wang, P., Bunker, C.E., Sun, Y., 2015. Carbon Quantum Dots and Applications in

- Photocatalytic Energy Conversion. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 7 (16), 8363–76.
- Feynman, R.P., 1992. There's plenty of room at the bottom. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 1, 60-6.
- Fischer, H.C., Hauck, T.S., Gómez, A.A., Chan, W., 2010. Exploring Primary Liver Macrophages for Studying Quantum Dot Interactions with Biological Systems. *Advanced Materials*, 22 (23), 2520-2524.
- Geng, H., Qiu, J., Zhu, J., Liu, X., 2018. Achieving stem cell imaging and osteogenic differentiation by using nitrogen doped graphene quantum dots. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29, 85.
- Gorbachev, I.A., Goryacheva, I.Y., Glukhovskoy, E.G., 2016. Investigation of Multilayers Structures Based on the Langmuir-Blodgett Films of CdSe/ZnS Quantum Dots. *BioNanoScience*, 2, 153–156
- Graf, E., Eva, C., Karin, Z., Franziska, Z., 2015. Affective Organizational Commitment in Swiss Nursing Homes: A Cross-Sectional Study. *The Gerontologist*, 56 (6), 1124–1137.
- Haitao, L., Xiaodie, H., Kang, Z., Hui, H., Yang, L., Liu, J., Suoyuan, L., Tsang, C., Him, A., Yang, X., Lee, S.T., 2010. Water-Soluble Fluorescent Carbon Quantum Dots and Photocatalyst Design. *Angewandte Chemie International Edition*. 26, 4430 - 4434
- Hasselov, M., Readman, J.W., Ranville, J.F., Tiede, K., 2008. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17 (5), 344-361.
- Heiligt, F.J., Markus, N., 2013. The Fascinating World of Nanoparticle Horikoshi, Satoshi, and Nick Serpone. *Introduction to Nanoparticles. Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, vol. 130, pp. 25-32.
- Hoffman, A., Goetz, M., Vieth, M., Galle, P.R., Neurath, M.F., Kiesslich, R., 2006. Confocal laser endomicroscopy: technical status and current indications. *Endoscopy*. 38 (12), 1275-1283.
- Horobin, R., Kiernan, J., 2002. *Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine*. xv, 555 p.
- Jain, P., Pradeep, T., 2005. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnology and Bioengineering*, 90 (1), 59-63.
- Jin, L., Kai, R., Qinwei, X., Hong, T., Wu, S., Zhang, Y., Wang, Z., 2018. Multifunctional Carbon Dots for Live Cell Staining and Tissue Engineering Applications. *Polymer Composite*, 39, 73–80.
- Karanikolos, N.G., Paschalis, A., Grigorios, I., Athos, P.T., Mountziaris, J.L., 2004. Synthesis and Size Control of Luminescent ZnSe Nanocrystals by a Microemulsion–Gas Contacting Technique. *Langmuir*, 20 (3), 550–553.
- Katie, E., Fowler, M. F., Eric, F., James, G. R., Gilbert, E. G., Gorodkin, J., Darren, K., Griffin, J. L., Harrow, A. H., Kerstin, H., Hu, Z.L., 2012. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* 491, 393–398.
- Kawana, M., Kawana, C., Giebink, G.S., 1992. Penicillin treatment accelerates middle ear inflammation in experimental pneumococcal otitis media. *Infection and Immunity*, 60 (5), 1908–1912.
- Khan, F.A., 2012. *Biotechnology Fundamentals*. CRC Press. p. 647, Florida, USA.

- Khan, I., Saeed, K., Khan, I., 2017. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 16 (7–8) 23 - 37.
- Khazaei, A., Kazem-Rostami, M., Moosavi-Zare, A.R., Bayat, M., Saednia, S., 2012. Novel One-Pot Synthesis of Thiophenols from Related Triazenes under Mild Conditions. *Synlett*, 23 (13), 1893–1896.
- Kiss, L.B., Soderlund, J., Niklasson, G.A., Granqvist, C.G., 1999. New approach to the origin of lognormal size distributions of nanoparticles. *Nanotechnology*, 10, 25-28.
- Kumawat, M.K., Thakur, M., Gurung, R.B., Srivastava, R., 2017. Graphene quantum dots for cell proliferation, nucleus imaging, and photoluminescent sensing applications. *Scientific Reports*, 7, 15858.
- Le, W., Cui, S., Chen, X., Zhu, H., Chen, B., Cui, Z., 2016. Facile synthesis of gd-functionalized gold nanoclusters as potential mri/ct contrast agents. *Nanomaterials*, 6 (4) 65 - 73.
- Lee, S., Mao, C., Flynn, C., Belcher, A., 2002. Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses. *Science*, 296, 892-895.
- Li, Y., Sun, L., Jin, M., Du, Z., Liu, X., Guo, C., Li, Y., Huang, P., Sun, Z., 2011. Size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Toxicology In Vitro*, 25 (7), 1343-1352.
- Li, Z., Zhang, Y., La, H., Zhu, R., El-Banna, G., Wei, Y., Han, G., 2015. Upconverting NIR photons for bioimaging. *Nanomaterials*. 4-5 (4), 2148 – 2168.
- Lim, S.Y., Shen, W., Gao, Z., 2015. Carbon quantum dots and their applications. *Department of Chemistry, National University of Singapore, Singapore* 44, 362-381.
- Luo, P.G., Sahu, S., Yang, S.T., Sonkar, S.K., Wang, J., Wang, H., LeCroy, G.E., Cao, L., Sun, Y.P., 2013. Carbon quantum dots for optical bioimaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 2116-2127.
- Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., Sen, T., 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63 (1-2), 24-46.
- Mangeolle, T., Yakavets, I., Marchal, S., Debayle, M., Pons, T., Bezdetnaya, L., Marchal, F., 2018. Fluorescent Nanoparticles for the Guided Surgery of Ovarian Peritoneal Carcinomatosis. *Nanomaterials*, 8 (18), 30775-30777.
- Marcovic, O., Marcovic, N., 1998. Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 34 (1), 1–8.
- Martinez, B., Obradors, X., Balcells, L., Rouanet, A., Monty, C., 1998. Low Temperature Surface Spin-Glass Transition in g-Fe₂O₃ Nanoparticles. *Physical Review Letters*, 80, 181.
- Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S., Weiss, S., 2005. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science*, 307 (5709), 538–544.
- Min, C.K., Yu, K.S., Han, S.Y., Kim, J.J., Lee, J.W., Lee, N.S., Yeong, G.J., Kim, D.K., 2018. Highly photoluminescent N-isopropylacrylamide (NIPAAm) passivated carbon dots for multicolor bioimaging applications. *European Polymer Journal*, 60, (1), 191-198.

- Pan, D., Zhang, J., Li, Z., Wu, M., 2010. Hydrothermal Route for Cutting Graphene Sheets into Blue-Luminescent Graphene Quantum Dots. *Advanced Materials*, 22, 734–738.
- Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K., Dobson, J. 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Applied Physics*, 36, 167-181.
- Park, C.H., Bergsagel, D.E., McCulloch, E.A., 1971. Mouse Myeloma Tumor Stem Cells: A Primary Cell Culture Assay. *Journal of the National Cancer Institute*, 46 (2), 411–422.
- Parrilla, I., Vázquez, J.M., Cuello, C., Gil, M., Roca, J., Di-Berardino, D., Martínez, E., 2004. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction*, 128 (5), 615-621.
- Pawley, J., 2006. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Berlin: Springer. Biol. 18, 1476–1482.
- Popescu, N.C., Amsbaugh, S.C., Swan, D.C., DiPaolo, J.A., 1985. Induction of chromosome banding by trypsin/EDTA for gene mapping by in situ hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*, 39 (1), 73–74.
- Ramirez, H. Y., Florez, J., Camacho, A. S., 2015. Efficient control of coulomb enhanced second harmonic generation from excitonic transitions in quantum dot ensembles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 37, 23938-23946.
- Ramsden, J., 2016. *Nanotechnology*. Elsevier, ISBN: 9780323393140
- Ratner, M. A., Ratner, D., 2013. *Nanotechnology: A Gentle Introduction to the Next Big Idea*. Upper Saddle River: Prentice, 334-8.
- Rogers, B., Adams, J., Sumita, P., 2013. *Nanotechnology: The Whole Story*. Boca Raton, CRC Press, p. 377, New Jersey, USA.
- Rowayda, S.A., 2012. An improved MRI segmentation for atrophy assessment. *International Journal of Computer Science Issues*, 9 (3), 569-574.
- Rudenberg, H. G., Rudenberg, P.G., 2010. Chapter 6 – Origin and Background of the Invention of the Electron Microscope: Commentary and Expanded Notes on Memoir of Reinhold Rüdenberg. *Advances in Imaging and Electron Physics*, 160, 207-286.
- Shamir, L., Ling, S., Rahimi, S., Ferrucci, L., Goldberg, I. G., 2009. Biometric identification using knee X-rays. *International Journal of Biometrics*. 1 (3), 365–370.
- Shen, R., Shen, X., Zhang, Z., Li, Y., Liu, S., Liu, H., 2010. Multifunctional conjugates to prepare nucleolar-targeting CdS quantum dots. *Journal of the American Chemical Society*, (34), 22442-22450.
- Shi, W., Wang, Q., Long, Y., Cheng, Z., Chen, S., Zheng, H., Huang, Y., 2011. Carbon nanodots as peroxidase mimetics and their applications to glucose detection. *Chemical Communications*, 47 (23), 6695–6697.
- Silva, G.A., 2006. Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 65–74.
- Simpson, R.K., Gilmour, A., 1997. The effect of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and model food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 181–188.
- Tam, Y.Y.C., Chen, S., Cullis, P.R., 2013. Advances in lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Pharmaceutics*, 5, 498–507.

- Tan, X., Li, Y., Li, X., Zhou, S., Fan, L., Yang, S., 2015. Electrochemical synthesis of small-sized red fluorescent graphene quantum dots as a bioimaging platform *Chemical Communications*, 13, 2544-2546.
- Tibbitt, M.W., Anseth, K.S., 2009. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 4, 655-663.
- Tsoi, K. M., Dai, Q., Alman, B.A., Chan, W., 2013. Are Quantum Dots Toxic? Exploring the Discrepancy Between Cell Culture and Animal Studies. *Accounts of Chemical Research*, 46, (3), 662-671.
- Valk, V. J., Der, V., Brunner, D., Smet, K., Svenningsen, F., Honegger, P., Knudsen, L.E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M.L., Gstraunthaler, G., 2010. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24, (4), 1053-1063.
- Van Gaal, E.V., Oosting, R.S., van Eijk, R., Bakowska, M., Feyen, D., Kok, R.J., Hennink, W.E., Crommelin, D.J., Mastrobattista, E., 2011. DNA nuclear targeting sequences for non-viral gene delivery. *Pharmaceutical Research*, 28 (7), 1707-1722.
- Walling, M.A., Novak, J.A., Shepard, J.R.E., 2009. Quantum Dots for Live Cell and In Vivo Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 441–491.
- Wang, Y., Hu, A., 2014. Carbon quantum dots: Synthesis, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry C*, 2, 6921–6939.
- Wee, L.M., Long, L.H., Whiteman, M., Halliwell, B., 2003. Factors Affecting the Ascorbate- and Phenolic-dependent Generation of Hydrogen Peroxide in Dulbecco's Modified Eagles Medium., *Free Radical Research*, 37 (10), 1123-1130.
- Wells, T., Liang H.D., 2011. Medical ultrasound: imaging of soft tissue strain and elasticity. *Journal of the Royal Society*, (8), 1521–1549
- Xu, Y., Wu, M., Liu, Y., Feng, X.Z., Yin, X.B., He, X.W., Zhang, Y.K., 2013. Nitrogen-Doped Carbon Dots: A Facile and General Preparation Method, Photoluminescence Investigation, and Imaging Applications. *Chemistry - A European Journal*, 19, 2276–2283.
- Yang, F., 2018. Preparation and Studies of Carbon Dots. *Scientific Reports*, 10 (49), 42915-42924.
- Yao, T., Asayama, Y., 2017. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*. 16, 99–117.
- Youselfinejad, S., Rasti, H., Hajebi, M., Kowsari, M., Sadravi, S., Honarasa, F., 2017. Design of C-dots/Fe₃O₄ magnetic nanocomposite as an efficient new nanozyme and its application for determination of H₂O₂ in nanomolar level. *Sensors and Actuators B, Chemical*, 247, 691–696.
- Yu, H., Cheng, P.C., Lin, P.C., Kao, F.J., 2006. *Multi-Modality Microscopy*. World Scientific, p. 303. New Jersey, USA.
- Zhang, X., Zhi-Guo, L., Shen, W., Gurunathan, S., 2016. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1534.
- Zheng, X.T., Ananthanarayanan, A., Luo, K.Q., Chen, P., 2015. Glowing graphene quantum dots and carbon dots: properties, syntheses, and biological applications. *Graphene Quantum Dots*, 11, 1620-1636.

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Bakü/Azerbaycan'da doğmuştur. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Bakü'de tamamlamıştır. Üniversite eğitimi için 2012 yılında Türkiye'ye gelmiştir. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümüne kayıt olmuş, 2016 yılında mezun olmuştur. 2016 yılı Temmuz ayında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanobilim ve Nanomühendislik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek lisansa başlamıştır.

