

**ACRIDINE ORANGE İÇEREN PHEMA
NANOPARTİKÜLLER İLE L929 FİBROBLAST HÜCRE
HATTININ ETKİLEŞİMİ**

**INTERACTION BETWEEN PHEMA NANOPARTICLES
INCLUDING ACRIDINE ORANGE AND L929 FIBROBLAST
CELL LINE**

ILGİM GÖKTÜRK

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2011

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI**
'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

.....
Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Üye (Danışman)

.....
Prof. Dr. M. Ali ONUR

Üye (Eş- Danışman)

.....
Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Üye

.....
Yard. Doç. Dr. Aylin GÜRPINAR

Üye

.....
Yard. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ

ONAY

Bu tez/...../.....tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil DENİZLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ACRIDINE ORANGE İÇEREN PHEMA NANOPARTİKÜLLER İLE L929 FİBROBLAST HÜCRE HATTININ ETKİLEŞİMİ

ILGIM GÖKTÜRK

ÖZ

Nanometre boyuttaki malzemelerin biyomedikal uygulamalarda kullanımı gittikçe artmaktadır. Bu malzemelerin hücrelerle etkileşimini anlamak onları *in vivo* ve *in vitro* uygulamalarda geliştirebilmek için önemlidir.

In vitro da nanopartiküllerle hücrelerin işaretlenmesi çeşitli biyomedikal uygulamalar için ilgi çekicidir. Üstün fiziksel özellikleri sayesinde birçok araştırmada tercih edilir hale gelmişlerdir. Farklı görüntüleme yöntemleri kullanarak bu nanopartikülleri canlı hücrelerde yüksek çözünürlükte tespit etmek mümkündür. İnvaziv olmayan yöntemler sayesinde *in vivo* da eş zamanlı takip sağlayarak, implante hücrelerin konakçı hücrelerden ayırt edilmesine olanak vermekte ve geleneksel histolojik yöntemlerden üstünlük sağlamaktadır. Nanopartiküllerin biyolojide kullanımı, özellikle hücresel görüntülemede geleneksel boyalardan birçok üstünlük sağlamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, hücreleri polimerik yapıdaki nanopartiküllerle etkili bir şekilde işaretleyebilmektir. Bunun için, akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküller miniemülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir.

Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu Zeta Sizer, Zeta Potansiyel, Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), Floresan Mikroskop, Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR) ve Elemental Analiz gibi yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin ortalama boyutu 63 nm, PI:0.058; zeta potansiyeli + 2.1 mV dur.

Nanopartiküllerin karakterizasyonu için çeşitli fiziksel yöntemler kullanılmasına rağmen, özellikle biyolojik sistemlerde görüntüleme ve izleme çok önemlidir. Floresan Mikroskop nanopartiküller ve hücreler arasındaki etkileşim ile ilgili önemli bilgiler sağlamaktadır.

Deneyssel kısımda nanopartiküllerle inkübe edilen L929 fibroblast hücrelerinin farklı zaman aralıklarında floresan mikroskop görüntüleri çekilmiştir. Hücrelerin nanopartiküllerle işaretlenebildiği gözlenmiştir. Daha sonra HeLa hücreleri nanopartiküllerle işaretlenmiş ve işaretlenmeyen L929 fibroblast hücreleriyle aynı ortamda biraraya getirilmiştir. Floresan mikroskopta işaretlenen HeLa hücreleri işaretli olmayan L929 fibroblast hücrelerinden kolaylıkla ayrılabilirdiği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Polimerik nanopartikül, akridin oranj, miniemülsiyon polimerizasyonu, hücre işaretleme

Danışman: Prof. Dr. M. Ali ONUR, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

Eş-Danışman: Prof. Dr. Adil DENİZLİ, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü

INTERACTION BETWEEN PHEMA NANOPARTICLES INCLUDING ACRIDINE ORANGE AND L929 FIBROBLAST CELL LINE

ILGİM GÖKTÜRK

ABSTRACT

Materials in the nanometer level are increasingly used for biomedical applications. Understanding the interactions of these materials with cells is important for improving their behaviour *in vivo* and *in vitro*.

Labeling of cells with nanoparticles for *in vitro* detection is interesting for various biomedical applications. Nanoparticles, with their superior physical properties, have become the materials of choice in many investigations. These nanoparticles can be detected by corresponding imaging modalities in living cells at a high resolution. These features allow implanted cells to be separated from host cells; and have advantages over traditional histological methods, as they permit non-invasive, real-time tracking *in vivo*. The use of nanoparticles in biology, especially in cellular imaging, is extremely promising and offers numerous advantages over existing organic dye systems.

The aim of this study was to label the cells with polymeric nanoparticles properly and efficiently. For this purpose, acridine orange loaded poly(HEMA) nanoparticles were synthesized by miniemulsion polymerization. Nanoparticles characterized by means of Zeta Sizer, Zeta Potential, Atomic Force Microscopy (AFM), Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmissin Electron Microscopy (TEM), Florescence Microscopy, Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR), and Elemental Analysis. These nanoparticles have an avarage diameter of 63 nm with a PI of 0.058, and a zeta potential + 2.1 mV.

Various physical methods can be used for characterization of nanoparticles, but evidently, their imaging and monitoring, especially in biological system, are of primary importance. Florescence Microscopy may provide valuable information regarding interactions between nanoparticles and cells.

In the experiment, after the incubation of nanoparticles with L929 fibroblast cells, florescence microscopy images were taken at different time periods. It was

observed that L929 fibroblast cells can be labeled efficiently. Then, HeLa cells were labeled with nanoparticles and these cells were assembled with unlabeled L929 fibroblast cells in the same medium. Florescence microscopy revealed that labeled HeLa cells using acridine orange loaded poly(HEMA) nanoparticles can be seperated from unlabeled L929 fibroblast cells efficiently.

Finally, the toxicity of nanoparticles on L929 fibroblast cells were investigated. The effects of different nanoparticle concentrations on L929 fibroblast cell were examined by MTT metod.

Key words: Polymeric nanoparticle, acridine orange, miniemulsion polymerization, cell labeling

Advisor: Prof. Dr. M. Ali ONUR, Hacettepe University, Biology Department

Co-Advisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ, Hacettepe University, Chemistry Department

TEŞEKKÜRLER

Bu tez çalışmasının planlanmasında, yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen pozitif enerjisiyle her zaman yanımda olan değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Ali Onur'a,

Tez aşamasında elindeki imkanları cömertçe sunan, Biyokimya Araştırma Grubu'nda yer almamı sağlayan değerli bilim insanı hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a ve tüm Nanoteknoloji ve Nanotıp ailesine,

Bilimsel katkıları ve destekleri için hocalarım Doç. Dr. Handan Yavuz, Yrd. Doç. Dr. Aylin Gürpınar, Yrd. Doç. Dr. Lokman Uzun ve Uzman Nilay Bereli'ye,

Bu çalışmanın tamamlanmasında büyük emeği geçen sevgili Veyis Karakoç ve Handan Sevim'e,

İhtiyaç duyduğum anda yardımlarını benden esirgemeyen Gamze Tan, Tayfun Vural, Cem Bayram, Gamze Ayaz ve Mehmet Doğan Aşık'a,

Tez çalışmam boyunca yorulduğum zamanlarda hayatı benim için kolaylaştıran, sevgili arkadaşlarım Canan Armutçu, Yeşeren Saylan, Duygu Çimen, Recep Üzek ve Emin Çorban'a,

Her sabah bölüme güleryüzle girmemi sağlayan, birlikte çalışmaktan zevk aldığım Biyokimya Araştırma Grubu'nun değerli üyeleri; Sevgi Aslıyüce, Gizem Ertürk, Erkut Yılmaz, Erdoğan Özgür, Gülsu Şener, Ayşe Müge Andaç, Gözde Baydemir, Bahar Ergün, İlker Koç, Ali Derazshamsir, Pınar Tekiner, Cemil Aydoğan, Işık Demirçelik, Ahmet Hamdi Demirçelik, Emel Tamahkar, Fatma Yılmaz, Alper Türkoğlu, Kivılcım Çaktü, Melike Türkmen ve Deniz Türkmen'e,

Ayrıca, beni büyütmek için emek veren başarılarımı borçlu olduğum sevgili anneme ve babama, biricik kardeşim Alihan'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

*Ilgım Göktürk
Ankara, 2011*

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜRLER	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolloidal Partiküllerin Tanımı ve Hücresel Alımı.....	3
2.1.1. İnorganik ve Metalik Kolloidal Partiküller.....	5
2.1.2. Polimerik Kolloidal Partiküller.....	6
2.2. Nanoteknoloji Temelli Tanı ve Görüntüleme	8
2.2.1. <i>In vivo</i> Görüntüleme.....	8
2.2.2. <i>In vitro</i> Görüntüleme.....	10
2.3. Görüntüleme Teknikleri	10
2.3.1. İnvaziv Olmayan Görüntüleme.....	11
2.3.1.1. Manyetik Rezonans Görüntüleme.....	11
2.3.1.2. Optik Görüntüleme.....	12
2.3.1.2.1. Floresan Mikroskobu	13
2.4. Görüntüleme Maddeleri.....	15
2.4.1. Endojen Görüntüleme Maddeleri.....	15
2.4.2. Ekzojen Görüntüleme Maddeleri.....	15
2.4.2.1. Nanopartikül Temelli Kontrast Maddeleri	16
2.4.2.1.1. Akridin Oranj Boyası.....	18
2.5. Kolloidal Partikül ile Hücre Etkileşimleri	20
2.5.1. Boyut İlişkisi.....	20
2.5.2. Yüzey Kimyası İlişkisi.....	21
2.6. Kolloidal Partiküller ve Sitotoksisite.....	22
2.6.1. Biyomalzemenin Biyouyumluluk Testleri.....	23

2.6.1.1.	MTT Testi.....	23
2.7.	Hücre Kültürü	24
2.7.1.	Hücre Kültürünün Kullanım Alanları.....	24
2.7.2.	Hücre Kültürü Koşulları.....	24
2.7.3.	Hücre Kültür Sistemleri.....	25
2.7.3.1.	Kaynaklarına Göre Hücre Kültür Sistemleri	25
2.7.3.2.	Büyüme Biçimlerine Göre Hücre Kültür Sistemleri.....	25
2.8.	Polimer Sentezi	26
2.8.1.	Süspansiyon Polimerizasyonu.....	26
2.8.2.	Emülsiyon Polimerizasyonu.....	27
2.8.2.1.	Makroemülsiyon Polimerizasyonu	27
2.8.2.2.	Mikroemülsiyon Polimerizasyonu.....	28
2.8.2.3.	Miniemülsiyon Polimerizasyonu	28
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	30
3.1.	Deneyde Kullanılan Kimyasallar.....	30
3.2.	Akridin Oranj Yüklü poli(HEMA) Nanopartiküllerin Sentezlenmesi.....	30
3.2.1.	Akridin Oranj Yüklü poli(HEMA) Nanopartiküllerin Çöktürülmesi.....	32
3.3.	Akridin Oranj Yüklü poli(HEMA) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	32
3.3.1.	Zeta Sizer ile Boyut Analizi.....	32
3.3.2.	Zeta potansiyel ile Yüzey Yükü Analizi.....	32
3.3.3.	Morfolojik Analiz.....	32
3.3.3.1.	AFM Çalışmaları	32
3.3.3.2.	SEM Çalışmaları	33
3.3.3.3.	TEM Çalışmaları	33
3.3.4.	Elemental Analiz.....	33
3.3.5.	FTIR Çalışmaları.....	33
3.4.	<i>In vitro</i> Akridin Oranj Yüklü poli(HEMA) Nanopartiküller ile Hücre Etkileşimleri.....	34
3.4.1.	Hücre Kültürü Çalışmaları.....	34
3.4.1.1.	İki Farklı Hücre Hattının Karıştırılması	35
3.4.1.2.	Sitotoksosite Testi (MTT)	36
4.	DENEYSEL SONUÇLAR	37
4.1.	Akridin oranj Yüklü poli(HEMA) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	37

4.1.1. Zeta Sizer ile Boyut Analizi.....	37
4.1.2. Zeta Potansiyel ile Yüzey Yükü Analizi.....	37
4.1.3. Morfolojik Karakterizasyon.....	38
4.1.3.1. AFM ile Görüntüleme Sonuçları.....	38
4.1.3.2. SEM ile Görüntüleme Sonuçları.....	40
4.1.3.3. TEM ile Görüntüleme Sonuçları.....	41
4.1.4. Elemental Analiz.....	42
4.1.5. FTIR Analizi.....	42
4.2. <i>In vitro</i> Akridin Oranj Yüklü poli(HEMA) Nanopartiküller ile Hücre Etkileşimleri.....	43
4.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	43
4.2.1.1. İki Farklı Hücre Hattının Karıştırılması	48
4.2.2. Sitotoksikite Testi (MTT).....	50
TARTIŞMA	51
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nanopartiküllerin hücresel alım yolları; partiküllerin, klatrin kaplı veziküller (reseptör aracılı) ve kaplı olmayan veziküller (sıvı faz) yolu ile endositozu onları lizozoma yönlendirir. Kaveolar endositoz ise partikülleri Endoplazmik Retikulum'a (ER), Golgi'ye ya da transitozla hücre dışına yönlendirmektedir.....	4
Şekil 2.2. a) İnorganik nanopartikülün temel yapısı b) Organik nanopartikülün temel yapısı.....	7
Şekil 2.3. Basitleştirilmiş Jablonski Diyagramı.....	12
Şekil 2.4. Tümör bölgesindeki (adım a) kontrast madde uygulamasının ve kontrast maddeden yansıyan floresanın algılanmasının (adım b) şematik gösterimi ..	13
Şekil 2.5. a) Floresansın temel fizik kuramı uygulaması ile ilgili şematik gösterimi b) epi-floresan mikroskop	14
Şekil 2.6. Geleneksel floresan nanoboyuttaki maddeler a) Organik boya molekülü (tetrametilrodamin) b) Yeşil floresan protein c) Polimer kaplı suda çözünür yarı iletken kuantum noktası d) Boya yüklü polimerik partikül	18
Şekil 2.7. Akridin oranjin moleküler yapısı.....	19
Şekil 2.8. Akridin oranjin DNA çift zinciri arasına girmesi ve DNA uzunluğundaki artış	19
Şekil 2.9. Heterofazlı polimerizasyon oluşumlarının şematik gösterimi: a) Emülsiyon polimerizasyonu, b) Miniemülsiyon polimerizasyonu, c) Mikroemülsiyon polimerizasyonu.....	29
Şekil 3.1. poli(HEMA) nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan miniemülsiyon polimerizasyonun şematik gösterimi	31
Şekil 4.1. Zeta Sizer'dan elde edilen boyut analizi	37
Şekil 4.2. pH 7.0'da alınan Zeta Potential bilgisayar görüntüsü.....	38
Şekil 4.3. Akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin AFM görüntüleri.....	39
Şekil 4.4. Akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin SEM görüntüleri	40
Şekil 4.5. Akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin TEM görüntüleri.....	41
Şekil 4.6. Akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin FTIR spektrumu.....	42
Şekil 4.7. L929 fibroblast hücrelerinin inkübasyondan 3 saat sonraki görüntüleri; a) Nanopartikül eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x20), b) a'daki alanın floresan mikroskop görüntüsü (x20), c) Sadece boya eklenen	

hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x20), d) c'deki alanın floresan mikroskop görüntüsü (x20).....	44
Şekil 4.8. L929 fibroblast hücrelerinin inkübasyondan 24 saat sonraki görüntüleri; a) Nanopartikül eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x40), b) a'daki alanın floresan mikroskop görüntüsü (x40), c) Sadece boya eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x20), d) Sadece boya eklenen hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü (x20)	45
Şekil 4.9. L929 fibroblast hücrelerinin inkübasyondan 48 saat sonraki görüntüleri; a) Nanopartikül eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x20), b) a'daki alanın floresan mikroskop görüntüsü (x20), c) Sadece boya eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (20), d) Sadece boya eklenen hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü (20)	46
Şekil 4.10. L929 fibroblast hücrelerinin inkübasyondan 120 saat sonraki görüntüleri; a) Nanopartikül eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x20), b) a'daki floresan mikroskop görüntüsü (x20), c) Sadece boya eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x20), d) Sadece boya eklenen hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü (x20)	47
Şekil 4.11. a) İşaretlenen HeLa hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (x40), b) İşaretlenmeyen HeLa hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü (x40).....	48
Şekil 4.12. a) İşaretlenmeyen L929 fibroblast hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (x40), b) İşaretlenmeyen L929 fibroblast hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü (x40).....	48
Şekil 4.13. Aynı ortamdaki işaretlenmiş HeLa hücreleri ile işaretlenmeyen L929 fibroblast hücrelerinin görüntüleri; a) İnverted mikroskop görüntüsü, işaretlenmeyen L929 fibroblast hücreleri ok ile gösterilmiştir (x20), b) Floresan mikroskop görüntüsü, işaretli olmayan L929 fibroblast hücreleri fark edilmemekteyken; işaretli olan HeLa hücreleri parlamaktadır (x20), c) a'daki ve b'deki görüntünün üst üste çakıştırılması, inverted mikroskopunda görününen ancak floresan mikroskopunda belli olmayan L929 fibroblast hücreleri ok ile gösterilmiştir (x20).....	49
Şekil 4.14. Farklı derişimlerdeki nanopartiküllerin hücre canlılığı üzerine etkisi ...	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 HeLa ve L929 fibroblast hücrelerinin kültür koşulları.....	36
--	----

KISALTMALAR DİZİNİ

AFM : Atomik Kuvvet Mikroskobu

Akridin oranj : 6-bis(dimetil)akridinyum klorür hemi(çinko klorür tuzu)]

FDA : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FITC : Floresin İzotiyosiyanat

FTIR : Fourier Transform Infrared Spektroskopi

HeLa : serviks karsinom kökenli insan epitel hücreleri

Poli(HEMA) : poli(2-hidroksietilmetakrilat)

PS : Polistiren

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

TEM : Geçirimli Elektron Mikroskobu

nm : Nanometre

µm : Mikrometre

1. GİRİŞ

Wilhelm Roentgen 1896 yılında ilk kez eşinin elinin X-ışını görüntüsünü çektiğinde, tıbbi tanı tarihinde yeni bir dönem başlamış oldu. X-ışını teknolojisinden bu yana tıbbi görüntüleme alanında invaziv olmayan birçok yöntem keşfedildi. Bunlar, klinik tanıdan ilaç keşfine ve hücre biyolojisi araştırmalarına kadar geniş bir uygulama alanı buldu. Biyomedikal görüntüleme araştırmalarında, elektronikte, enformasyon teknolojisinde ve son zamanlarda nanoteknolojide de önemli yararlar sağlamıştır (Sharma ve ark., 2006).

Nanoteknolojinin hızla gelişmesiyle kolloidal partiküllerin biyolojik alanda kullanımı artmaktadır. Kolloidal partiküller; kontrollü ilaç salımı, kanser ve gen terapisi, hastalık tanısı ve biyolojik görüntülemede taşıyıcı olarak kullanılabilir. Biyolojik uygulamalarda, inorganik ve organik partiküller metalik partiküllere göre üstünlük sağlamaktadır. Bu bağlamda partiküllere ıslanabilirlik, spesifik hedefleme, görüntüleme ve istenilen maddenin kontrollü salımı gibi fonksiyonlar kazandırılabilir (Hu ve ark., 2009).

Partiküllerin uygulamaları arasında hücrelerin işaretlenmesi ve seleksiyonu ya da kök hücrelerin farklılaştırılması için kullanılması sayılabilir. Örneğin, hematopoetik kök hücre popülasyonlarının kötü huylu olan ve olmayan hastalıkların tedavisinde kullanılabilirliği otuz yıldır araştırılıyor olmasına rağmen uygulama alanındaki ileri araştırmalar birkaç yıldır yapılmaktadır. Hasar görmüş dokuyu onarmak için farklı kökenli hücrelerin kullanıldığı rejeneratif terapi gelişmekte olan bir alandır. Kök hücre terapisi için nanopartiküllerin kullanılabilirliğini anlamak ve kontrol altına almak için nanopartikül ile hücre etkileşiminin araştırılması gerekmektedir. Nanopartiküller *in vivo* çalışmalarda, kök hücrelerin takip edilebilmesi için kullanılabilir (Mailander ve Landfester, 2009).

Hücreleri ve hücresel oluşumları araştırmak için hücre içindeki yapıları, bölümleri ve biyokimyasal molekülleri görüntülemek önemlidir. Hücreler görünür ışığa karşı neredeyse geçirgen olduklarından ve özgül moleküller çok küçük olduklarından dolayı mikroskop ile direkt gözlem yapmak genellikle mümkün değildir. Hücre biyolojisinde en çok kullanılan yöntemlerden biri kuşkusuz floresan işaretlemidir. Floresan şiddeti, emisyon spektrumu, eksitasyon spektrumu ve floresan yarı ömrü gibi parametreler görüntülenen molekülün ve çevresinin aydınlatılmasında

kullanılmaktadır. Örneğin; çevre koşullarına duyarlı işaretleyiciler, moleküler haberciler olarak kullanılabilir. Floresan mikroskop ile floresan sinyaller sayesinde moleküler çevre hakkında bilgi sağlanabilir (Wang ve ark.; 2006).

Genellikle kullanılan floresan işaretleyici maddeler, floresin ve siyanin boya ları gibi geleneksel floro forlar veya kuantum noktaları gibi daha yeni inorganik nanopartiküller ya da yeni olan floresan lateks/silika nanopartiküllerdir. Yeni nesil floresan işaretleyicilerin daha iyi optik özelliklere sahip olmaları (arttırılmış fotokararlılık ve organik floro forlara göre daha büyük stokes kayması) onları ilgi çekici hale getirmektedir.

Floro forlar, doğrudan hedefe tutunarak ya da moleküler tanımayla antikora lar bağlanarak görüntülenebilir. Ancak geleneksel floro forların bazı dezavantajları vardır. Floro forların konformasyonu, çözücünün ısı l değişimi gibi çevresel koşullara çok hassastır. Bundan dolayı, floro forlar artık floresan özelliğini kaybettiği bir duruma geri dönüşümsüz olarak geçer ve tekli moleküllerin floresanı “blinking” olarak adlandırılan yanıp sönen bir duruma geçebilir (Parak ve ark., 2005).

Floresan prob lar gibi hedeflenebilir kontrast maddelerinin geliştirilmesi canlı ve cansız sistemlerdeki özel biyolojik olayların seçici olarak görüntülenmesini sağlar. Gelecekte bu kontrast maddeleri geniş kullanım alanlarıyla ve ticari ürüne dönüşme potansiyelleriyle modern tıp ve biyolojik araştırmalarda önemli bir yer oluşturacaktır.

2004 yılının ortalarına kadar, biyolojik ve kimyasal tanıma alanında nanoteknoloji temelli 20.000 patent başvurusu yapılmıştır. Bir kaç fonksiyonel özelliğe aynı anda sahip nanopartiküllerin yeni nesil terapötik, tanı ve görüntüleme teknolojilerinin gelişmesinde öncülük edeceği beklenmektedir (Sharma ve ark., 2006).

Bu tez çalışması kapsamında FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmış bir polimer olan HEMA kullanarak nanopartiküllerin hazırlanması hedeflenmiştir. poli(HEMA), toksik olmaması, sterilizasyonunun kolay olması ve biyouyumlu bir polimer oluşu ile birçok biyotıp ve biyoteknolojik alanda tercih edilmektedir. Floresan olarak işaretlenen poli(HEMA) nanopartiküllerin *in vitro* hücre kültürü modelinde L929 fibroblast hücreleriyle etkileşimi değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

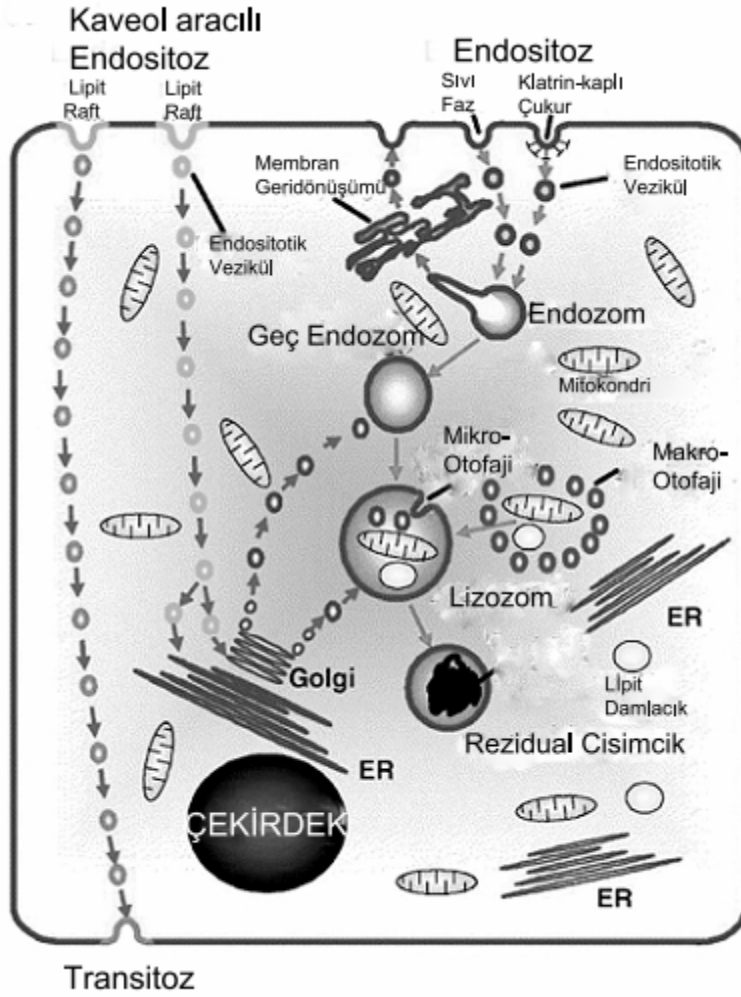
2.1. Kolloidal Partiküllerin Tanımı ve Hücresel Alımı

Kolloidal partiküller 1 nm'den mikron (genellikle 1µm) boyuta kadar olan bir ölçekte karakterize edilir. Bunlar; küçük partiküller (agregat, aglomerat), moleküler agregatlar (miseller) ya da tek bir makromolekül (dendrimerler) olabilir. Kolloidal partiküller değişken kimyasal yapılara sahiptir. Dolgu maddesi, gaz sensörleri ve katalizör olarak sanayide kullanılmaktadır.

Nanoteknolojinin hızla gelişmesi ile bu partiküllerin biyolojik alanda kullanımı önem kazanmıştır. Bunlar, kontrollü ilaç salımı, kanser ve gen terapisi, hastalık tanısı ve biyolojik görüntülemeye taşıyıcı olarak kullanılabilir. Biyolojik alanda inorganik ve organik partiküller, metalik partikül uygulamalarına göre büyük başarı göstermiştir. Bu bağlamda partiküllere ıslanabilirlik, spesifik hedefleme, görüntüleme ve istenilen maddenin kontrollü salımı gibi fonksiyonlar kazandırılabilir. Elde edilen sonuçlar, bu fonksiyonların ya da özelliklerin partikül ile organizma etkileşimini, salım etkinliğini, toksisitesini ve biyoyumluluğunu etkilediğini göstermiştir. Kolloidal partiküller ile organizma etkileştiğinde canlı hücreler tarafından partiküllerin alımı, pasif veya aktif olarak gerçekleşir. Partiküllerin hücreye alımı beklenmeyen yan etkilere neden olabilir. Örneğin, bozunmayan partiküllerin uzun süre dolaşımında kalması ve toksisiteye neden olmaları gibi. Diğer taraftan birçok partikülün biyolojik uygulaması hücresel alınımına bağlıdır. Örnek olarak biyogörüntüleme, hücre içi ilaç ve gen salımı gibi uygulamalarda partiküller hücre membranından sitozole doğru taşınmalıdır. Bu yüzden, kolloidal partiküllerle hücreler arasındaki etkileşimi, partiküllerin alım yolları, organellerdeki dağılımı ve hücresel alım mekanizmaları ile birlikte anlamamız çok önemlidir.

Küçük partiküller (<0.2 µm) pinositoz ile daha büyük olanlar (>0.5 µm) fagositoz ile hücre içine alınır. Partiküller ve proteinler için kesin olan hücre zarından taşıma işleminin endositoz ve ekzositoz (sitosiz olarak tanımlanan) ile birlikte gerçekleşmesidir. Endositoz mekanizması, reseptör aracılı adsorptif endositoz ile oluşur. Endositoz oluşumunda partiküller endozom adındaki vezikülü oluşturmak için hücre zarıyla çevrelenir. Bir dizi işlem ile endozomlar düşük pH değerine sahip (pH ~ 4.5) lizozoma transfer edilir. Sonuç olarak bir kısmı degrade olur ve diğerleri

lizozomdan kurtulur. Kurtulan koloidal partiküller hücre içi kompartmanlara hatta çekirdeğe gidebilir (Tang, 2003). (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Nanopartiküllerin hücresel alım yolları; partiküllerin, klatrin kaplı veziküller (reseptör aracılı) ve kaplı olmayan veziküller (sıvı faz) yolu ile endositozu onları lizozoma yönlendirir. Kaveolar endositoz ise partikülleri Endoplazmik Retikulum'a (ER), Golgi'ye ya da transitozla hücre dışına yönlendirmektedir (Tang, 2003)

Kimyasal yapılarına göre biyolojik alanda kullanılan koloidal partiküller iki ana gruba ayrılır. Bunlardan birincisi, inorganik ve metalik koloidal partiküller (kalsiyum fosfat, altın, kuantum noktaları, karbon materyaller, silikon oksit ve demir oksit); ikincisi ise, organik koloidal partiküllerdir (çoğunlukla sentetik ve doğal polimerlerden oluşan polimerik taşıyıcılar) (Yezhelyev ve ark., 2006).

2.1.1. İnorganik ve Metalik Kolloidal Partiküller

Klinikte başarıyla uygulanan partiküller süper paramanyetik özellikteki demir oksit nanokristallerdir. Manyetik rezonans alanı altında biyogörüntüleme için artrit, ateroskleroz ve kanser tanısında yüksek doğrulukta tanı sağlayan bir kontrast maddesi olarak kullanılır. 5-10 nm boyutlardaki demir oksitler göğüs, akciğer, prostat ve endometriyum gibi çeşitli kanser çeşitlerinde manyetik rezonans altında lokalize olabilirler. Demir oksitlerin hipertermi tedavisiyle kanser hücrelerini yok etmesi üzerinde çalışılmaktadır (Ito ve ark., 2005).

Altın nanopartiküller, boyutuna ve şekline bağlı olarak kızıl ötesinden görünür bölgeye kadar geniş bir spektrumda ışığı absorblayan tanı için optik olarak ayarlanabilir taşıyıcılardır (Loo ve ark., 2005).

İnorganik yapıda ve ışık yayan partiküller (yarı iletken kuantum noktaları) boyut ve içeriğine bağlı olarak 2000-4000 nm gibi geniş bir aralıkta floresan yayabilir. Kuantum noktaları güçlü parlaklık ve fotokararlılık özellikleri ile birlikte, biyogörüntülemeye yeni nesil floresan problemler olarak kullanılabilir (Hirsch ve ark., 2003).

Karbon temelli nanomalzemeler (fullerenler, nanotüpler, nanoelmaslar) biyolojik uygulamalarda farklı alanlarda kullanılmak üzere araştırılmaktadır. Normal şartlar altında yüksek fiziksel ve kimyasal kararlılığa sahiptir. Özel şartlar istendiğinde (suda çözünürlüğü sağlamak için ıslanabilirlik gibi) yüzeyleri kimyasal olarak modifiye edilebilir. Ayrıca ilaç, gen ve protein taşıyıcı, kontrast madde, biyosensör uygulamalarında kullanılması amacıyla girişimlerde bulunmaktadır (Schrand ve ark., 2007).

Bahsedilen partiküllerden başka mezopor silika ve kalsiyum fosfat ya da hidroksiapatit kolloidal nanopartiküller de hücre ile etkileşime girebilir ve hücre içi organellere ilaç ve DNA taşınmasında kullanılabilir (Hu ve ark., 2009).

Sadece partikül uygulamaları yerine, fonksiyonel moleküller ile (ilaç, protein, gen) birlikte uygulanmalar da mümkündür (Bottini ve ark., 2007). Bu moleküller, fiziksel olarak adsorbe edilir ya da kimyasal olarak porlu yapının içine ya da kolloidal partikülün yüzeyine immobilize edilir. Poli(etilen glikol) (PEG) gibi hidrofilik polimerlerle yüzeyin kaplanması partikül ile organizmanın daha uyumlu olmasını

sağlar (Xiong ve ark., 2008). Ayrıca, bu partiküllerin kan dolaşımında daha uzun süre kalmaları beklenir (Şekil 2.2).

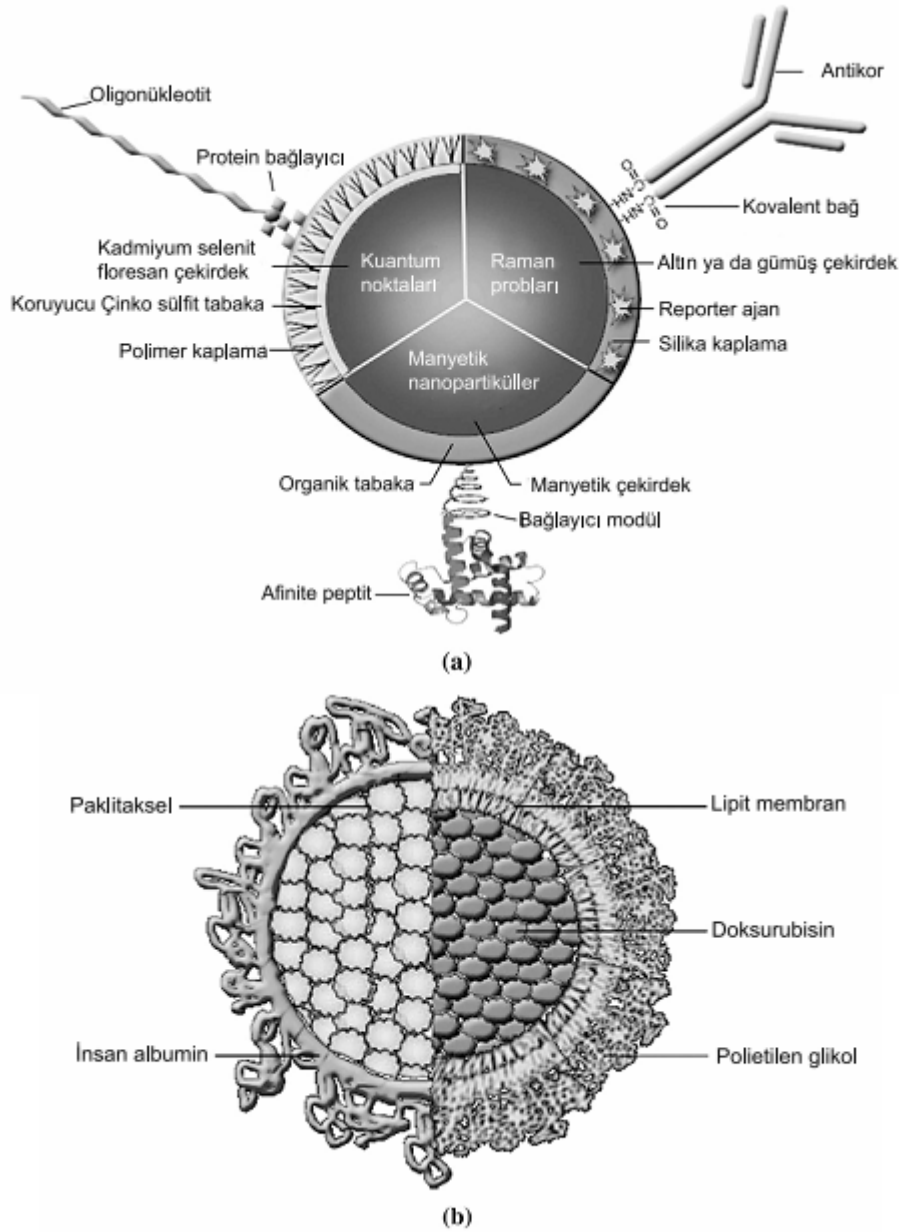
2.1.2. Polimerik Kolloidal Partiküller

Kimyasal yapı ve fiziksel benzerliklerinden dolayı biyolojik uygulamalarda kullanılan polimerler iyi işlenebilirlik, biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerine sahiptir. Emülsiyon polimerizasyonu, emülsiyon-çözücü buharlaşması, membran emülsifikasyonu yöntemleri ile üretilen polimerik kolloidal partiküllerde sıklıkla kullanılan matriks maddeleri; Polistiren (PS), poli(metil metakrilat) (PMMA), polilaktit (PLA) ve poli(laktik-ko-glikotit) (PLGA) gibi sentetik hidrofobik polimerlerdir (Sakum ve ark., 2001).

Diğer taraftan PEG, poli(vinil pirolidon) (PVP), poli(eterimit) (PEI), kitosan ve dekstran gibi hidrofilik polimerler saçaklı bir tabaka oluşturarak partiküllerin koagülasyonunu engeller. Bu durum, hem organik hem inorganik partiküller için fonksiyon sağlar (Hu ve ark., 2009).

Kolloidal partikül oluşumunda kullanılan diğer çeşit polimerler hidrofilik ve hidrofobik bölümler içeren graft veya blok kopolimerlerden oluşur. Çözücü değişimiyle kendiliğinden misel oluşturur (Gu ve ark., 2008). Miseller çok düşük kritik misel konsantrasyonu sayesinde kararlıdır. Partikül boyutu 10 nm'den 100 nm'ye kadar değişebilir. Yüksek miktarda ilaç yükleme kapasitesine sahiptir. 2004'te Japonya'da doksorubisin yüklü miseller klinik denemeye alınmıştır (Matsumura ve ark., 2004).

Dendrimerler ve yıldız şekilli polimerler yeni nesil kolloidal partikül biçimindeki amfifilik polimerlerdir. Dendrimerlerin çok dallı ve simetrik yapıları ve aktif yüzeyleri sayesinde ilacı, görüntüleme maddesini ve hedefleyici ligandı bir arada taşıyabilmektedir. Şimdiye kadar, dendrimerlerin biyolojik uygulamaları *in vitro* ve *in vivo* olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Hu ve ark., 2009).



Şekil 2.2. a) İnorganik nanopartikülün temel yapısı b) Organik nanopartikülün temel yapısı (Hu ve ark., 2009)

Fonksiyonel yapının yüzeye takılmasından ayrı olarak istenen madde üretim aşamasında polimerik yapının içine yüklenebilir ve özel etkileşimler ve difüzyon ile sonradan enkapsüle edilebilir. Yüklenen ilaç, DNA, enzim, hücre büyüme faktörleri gibi birçok biyoaktif madde korunur, tutulur ve salınır. İnorganik kolloidal partiküller ile karşılaştırıldığında sürekli salımı kontrol etmek daha kolaydır. Dahası, gerekli malzemelerin az kullanımını sağlayarak yüzeyin modifiye edilmesi ile istenilen bölgeye hedefleme yapılabilir.

Son zamanlarda, hücre içi ilaç ve gen taşınımında, normal hücre ve dokularda iyileştirici etkinliği düzenleyebilmek ve toksisiteyi azaltabilmek çok daha önem kazanmaktadır (Pan ve Feng., 2008).

2.2. Nanoteknoloji Temelli Tanı ve Görüntüleme

Tanıya yönelik mikro ve nanobiyoteknolojik uygulamalar üç alt bölüme ayrılır,

- *in vitro* tanılar
- *in vivo* tanılar
- Medikal cihazlar

Son 25 yıl içinde, medikal görüntüleme tanı bilminde önemli ve gerekli bir konuma gelmiştir. Yakın bir gelecekte, nanoteknoloji ve medikal görüntülemenin bir araya getirilmesi, moleküler görüntüleme (nano görüntüleme) ile karmaşık bir biyolojik ortamda tek bir molekül ya da hücreyi tespit ederek devrim yaratacaktır.

In vitro hücre ya da hücre kompartmanlarını karakterize etmek için oluşturulan gelişmiş metodlar (yeni optik ve luminesans mikroskop, taramalı prob mikroskobu, elektron mikroskobu, görüntülü kütle spektrometre) nanotıp için önemli olacaktır (European Technology Platform, 2006).

2.2.1. *In vivo* Görüntüleme

In vivo tanı genellikle görüntüleme teknikleri ile ilgili olmakla birlikte vücuda yerleştirilebilir cihazları da kapsamaktadır. Nano görüntüleme ya da moleküler görüntüleme *in vivo* moleküler çalışmalar ve molekül manipülasyon için gerekli teknikleri kapsar. *in vivo* tanının en önemli faydası hastalığın erken teşhisini sağlaması ve hastalığın hangi aşamada olduğunu (kanser metastası) görüntülemesidir.

Görüntüleme teknikleri, ileri düzeydeki optik ve luminesans görüntüleme ile spektroskopi tekniklerini kapsar. Kontrast maddeler radyoaktif işaretleyicilerle nükleer görüntüleme, manyetik rezonans görüntüleme ve spektroskopi, ultrases, ve X-ışını görüntüleme teknikleri sayesinde hastalıklı bölgeyi işaretler. Geliştirilmiş pozitron emisyon tomografi (kantitatif-PET) ile gerçekleştirilen *in vivo* moleküler

tanı ve manyetik rezonans spektroskopisi (MRS), manyetik rezonans spektroskopik görüntüleme (MRSG), difüzyon spektroskopisi (d-MRG) ve fonksiyonel manyetik rezonans (f-MRG) gibi ileri manyetik rezonans teknikleri ile gerçekleştirilen moleküler tanımlar *in vivo* olarak farklı organlardaki biyokimyasal oluşumları çalışma fırsatı sunmaktadır.

Toksisite ve hasta güvenliği ile ilgili muhtemel problemlerin önüne geçmek için optik nano görüntüleme metodu gibi işaret kullanmayan teknikler iyi bir alternatif sunar. Bu, özellikle fonksiyonel analizlerdeki (görüntüleme) nicel ölçüm kapasitelerinin kullanılabilmesinde ve rejeneratif tıpta kendiliğinden onarılan dokuların veya doku mühendisliği ile oluşturulmuş implantların kalite değerlendirmesinde önem taşımaktadır.

Hedeflenmiş moleküler görüntüleme birçok tanı amacı için kullanılır;

- İnflamasyon bölgesinin tanımlanması,
- Damar yapılarını ya da spesifik hastalık bölgelerinin görüntülenmesi,
- Anatomisinin incelenmesi amacıyla kullanılır.

Ayrıca kontrollü ilaç salınımında ilaç dağılımının değerlendirilmesi ve potansiyel tehlike oluşturan ilaç birikiminin erken teşhisi için önemlidir. Bir ilacın dağılımının takip edilmesi, ilacın sadece gerekli bölgede aktifleşerek toksisitesinin azaltılması için önemlidir.

Nano görüntüleme hekimlere direkt geri dönüş sağlayarak görüntüleme alanında büyük bir ilerleme yaratmaktadır. Çok sayıda partikül ve molekül, tıbbi görüntüleme için kullanılmaktadır. Floresan nanopartiküller (kuantum noktaları ve boya yüklü silika nanopartiküller) kaplamalarına fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak özgül bir doku ya da organa hedeflenebilmektedir. Floresan nanopartiküllerin floresan özellikleri özel görüntülemeler için kolaylıkla ayarlanabilir. Floresan nanopartiküller daha şiddetli floresan ışık emisyonu, daha uzun floresan yarı ömrü ve geleneksel floroforlardan daha geniş renk tayfı sunar. Bunlar, özellikle saçılmanın sinyalleri gizlediği canlı dokularda görüntüleme için uygundur.

Hücre ve moleküllerin *in vivo* görüntülenmesinde nanoyapıların kullanımı cerrahi tekniklerin gelişmesine yol açmıştır. Örnek olarak yakın kızıl ötesi görüntüleme kullanılan fototermal tedavi sayesinde kanser yayılımının daha iyi şekilde haritalanması ve karakterizasyonu; spesifik bir bölgedeki doku ve hücrelerin zarar görmeden çıkarılması; tedavide kullanılan özgül hücre tiplerinin izlenmesi ve terapötik maddelerin görüntülenmesi verilebilir (European Technology Platform, 2006).

2.2.2. *In vitro* Görüntüleme

Nanoteknolojiye dayalı gelişmeler sayesinde biyolojik örneklerin *ex vivo* olarak daha iyi görüntülenmesi sağlanabilmektedir.

Kullanılan teknikler;

- Optik, elektron ya da X-ışını mikroskopları,
- Tarayıcı prob/yakın alan yöntemleri,
- Hibrit mikroskoplar; tarayıcı prob/optik, tarayıcı prob/kuvvet, manyetik manipülasyon ve optik mikroskop, titreşimli floresan görüntüleme, tarayıcı prob nanografi ve elektrofizyoloji kombinasyonları gibi (European Technology Platform, 2006).

2.3. Görüntüleme Teknikleri

Cihazların biyolojik sistemlerdeki sinyalleri düşük hassasiyette algılayamamasından dolayı etiketleyici veya işaretleyici ajanlara gereksinim vardır. Biyolojik analizlerde dış kaynaklı işaretleyici olarak radyoimmünoassay (RIA) kullanma fikrini ilk kez Amerikan araştırmacıları Yalow ve Berson ileri sürmüştür. Radyoimmünoassay kullanımının birçok yararı olmasına rağmen (yüksek duyarlılık 10^{-9} - 10^{-12} ve geniş kullanım alanı) yapısı gereği kısa yarılanma ömrü ve radyoaktivite gibi dezavantajları vardır (Wang; 1999). Bu yüzden enzim katalizli reaksiyonlar, biyo/kemiluminesans ve floresan gibi radyoaktif olmayan çeşitli işaretleme teknikleri ortaya çıkmıştır ki bunlar arasında en yaygın kullanım alanı floresan işaretlemedir (Gao, 1991; Lippa ve ark., 2001).

2.3.1. İnvaziv Olmayan Görüntüleme

Bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans, pozitron emisyon tomografi, tek fotonlu emisyon bilgisayarlı tomografi, ultrases görüntüleme ve optik görüntüleme gibi birçok invaziv olmayan optik yöntem vardır. Her biri hassasiyet, çözünürlük, karmaşıklık, maliyet ve veri toplama zamanı açısından farklılık gösterir. Farklı görüntüleme teknikleri birbirini tamamlayıcı olarak birlikte de kullanılabilir. Kullanılacak teknik spesifik olarak amaca göre seçilir. Biyolojik örnekleri hem *in vitro* hem *in vivo* da görüntüleme ışık mikroskobu ile (floresan ve lüminesans görüntüleme) sağlanabilir. Son zamanlarda ışık mikroskobundaki teknolojik gelişmeler bu yönteme üstünlükler sağlamıştır.

Yumuşak dokular için tıbbi tanıdaki kayda değer başka bir teknoloji ise manyetik rezonans görüntülemedir. Multimodal nanopartiküller, hem manyetik rezonans görüntüleme hem de optik görüntüleme ile (floresan mikroskop) eş zamanlı karakterize edilebilmektedir. Çünkü bu partiküller lüminesans çekirdeğe ve MRG sinyali üreten paramanyetik iyonlara sahiptir. Bu sayede optik yöntemin sağladığı yüksek duyarlılıktan ve MRG yönteminin sağladığı üç boyutlu görüntülemeden aynı zamanda yararlanılabilir. Böylece optik görüntülemenin verdiği sınırlı anatomik bilgi ve manyetik rezonans görüntülemenin düşük hassasiyetliliği giderilmiş olur (Sharma ve ark., 2006).

2.3.1.1. Manyetik Rezonans Görüntüleme

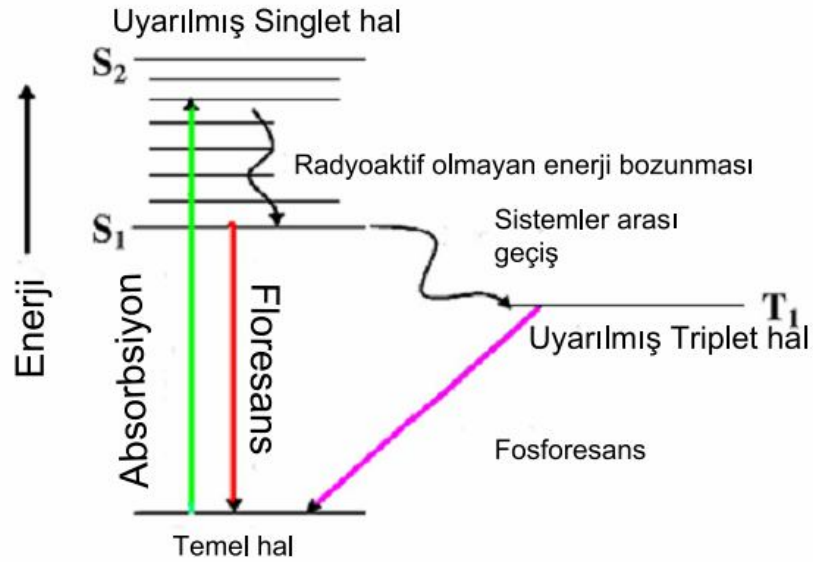
Manyetik rezonans görüntülemenin temeli nükleer manyetik rezonans prensibine dayanır. Cihaz, manyetik alan altında atomların manyetik alan yönüne yönelmesi ve belirli bir frekansta salınım yapmalarına dayanır. Üzerlerine radyo dalgaları uygulanan bu atomlar belirli bir frekansta bu radyo dalgalarını geri yansıtacaklardır. Bu yansıyan dalgaları alan MR cihazı görüntüleri oluşturur.

MR cihazında bulunan güçlü mıknatıslar, insan hücresindeki atom çekirdeklerinin titreşim yapmasını sağlayacak alanlar yaratır. Titreşen atomların üzerine gönderilen radyo dalgaları, onların salınım yapmalarını sağlar ve bu salınımların sonucunda atomlar bir radyo dalgası yayılımı yapmaya başlar. Bu dalgalar bir bilgisayar yardımı ile hareketsiz veya hareketli 3 boyutlu görüntüler oluşturur.

MR cihazının etkili olduğu kullanım alanı vücuttaki yumuşak dokulardır. MR yumuşak dokularda maksimum kontrastlama ve görüntüleme yeteneğine sahiptir. Hastaya verilecek tümör seçici gadolinyum şelatları ve süperparamanyetik demir oksit partiküller sayesinde, MR görüntülemede yumuşak dokulardaki lezyon ve patolojik dokular kolaylıkla incelenebilir (Sharma ve ark., 2006).

2.3.1.2. Optik Görüntüleme

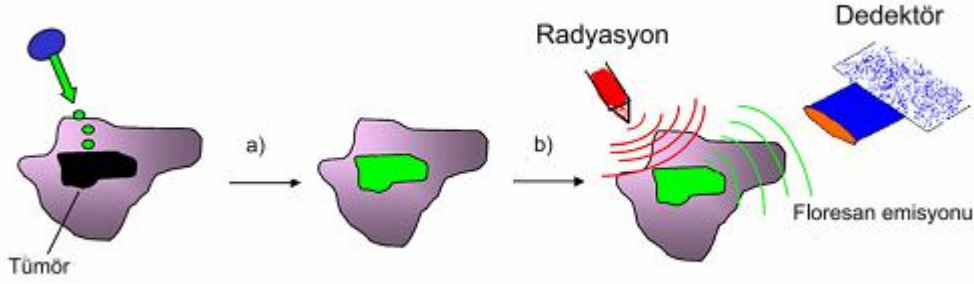
Işık invaziv olmayan, şiddet ve dalga boyuna sahip, polarizasyon ile (kutuplaşma) kontrast yaratabilen çok yönlü bir görüntüleme radyasyonudur. Optik görüntüleme tekniklerinde dokular ile etkileşimi anlamak için ışığın farklı fiziksel parametreleri kullanılır. Mevcut optik görüntüleme teknikleri içinde floresan mikroskop en gözde olanlardan biridir. Optik floresan, şekil 2.3'de (Jablonski diyagramı) gösterildiği üzere organik boyalar, lantanit bileşikler gibi floroforlara özgü özelliklere bağlıdır.



Şekil 2.3. Basitleştirilmiş Jablonski Diyagramı

Florofoz spesifik bir enerji tarafından uyarıldığında elektronlar temel seviyeden daha yüksek enerjili singlet seviyeye (S_1 ve S_2) yükselir. Farklı elektronlar farklı enerji seviyelerine sahip olduğundan (rotasyonel ve vibrasyonel), singlet seviyeye geçiş daha yüksek elektriksel seviyede eşit vibrasyonel ya da rotasyonel enerji dönüşümü gerektirir. Bu oluşum sırasında elektronlar enerjilerinin bir kısmını kaybeder. Bu genellikle termal bozunma (ışınımsal olmayan enerji bozunması) yoluyla daha düşük enerjili fotonların yayılmasına neden olur. Uyarı için gerekli dalgaboyu ile yayılan ışık dalgaboyu arasındaki fark "stokes kayması" olarak

adlandırılır. Bu olay bütün floresan yöntemlerin temelini oluşturur. Örneğin, floresan görüntülemeye ışık kaynağından gelen enerji tümör bölgesinin (Şekil 2.4, adım a) yakınına enjekte edilen kontrast madde tarafından adsorblanır ve hemen dedektör tarafından algılanan daha uzun ve düşük enerjili bir dalga boyu yayar (şekil 2.4. adım b).



Şekil 2.4. Tümör bölgesindeki (adım a) kontrast madde uygulamasının ve kontrast maddeden yansıyan floresanın algılanmasının (adım b) şematik gösterimi

2.3.1.2.1. Floresan Mikroskopu

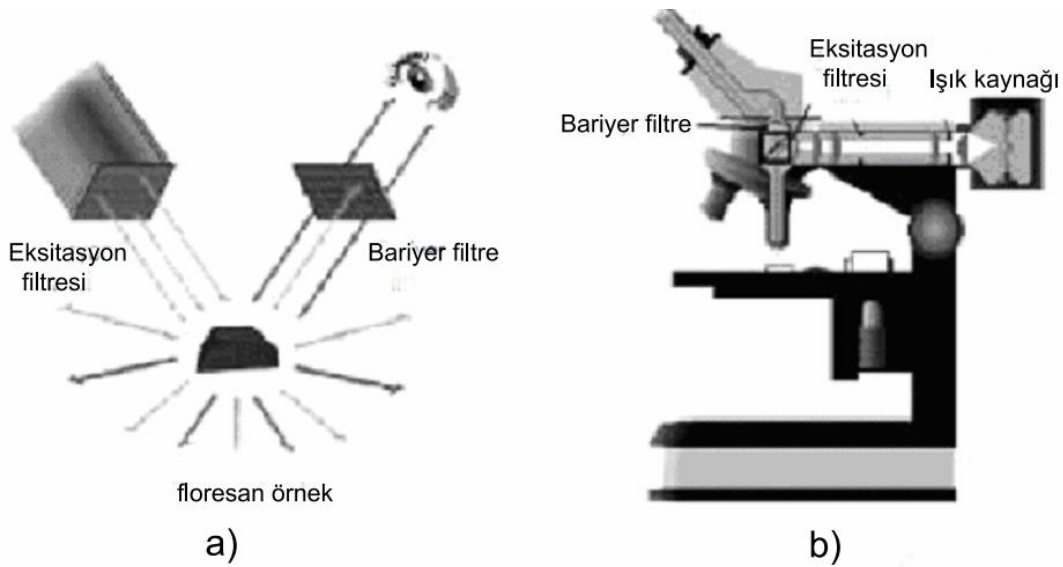
Yaşam bilimlerinde floresan problemlerin ve yüksek çözünürlüklü mikroskopların gelişmesiyle birlikte biyolojik görüntüleme yeni bir döneme girmiş, biyologlar görüntüleme ile daha çok ilgilenmeye başlamışlardır. Günümüzde *in vivo* hücre içi bileşenler yapısal ve fonksiyonel olarak görselleştirilebilmektedir. Hücresel dinamikleri araştırmak için farklı dalga boylarında (spektroskopi) iki ve üç boyutlu gözlemler yapmak mümkün hale gelmiştir.

Floresan mikroskop hemen hemen yüzyıl önce mikroskop ile ilgilenen uzmanların daha iyi çözünürlük elde etmek için ultraviyole ışık ile deneyler yaptığı sırada icat edildi. İlk zamanlarda yapılan gözlemler kendiliğinden floresan veren maddeler ile sınırlıydı. Bu özelliğe “otofloresan” ya da “birincil floresan” denmektedir. Sonra süratle doku ve hücreleri boyamak için araştırmalar yapılmıştır. Coons ve Kaplan 1940’larda immünohistokimya alanında büyük bir atılım yaratan antikorları floresan boya ile işaretleme tekniğini geliştirene kadar, floresan mikroskop popüler olamamıştır. 1994 yılında Chalfi ve ark.’nın yaptığı çalışma floresan mikroskopu ön sıralara taşımıştır. Bu buluş yeşil floresan protein (GFP) olarak bilinen canlı organizmada ifade olabilen yeni bir işaretleme metodudur.

Fizik, optik, mekanik ve elektrik mühendisliği alanlarındaki yeni buluşlar sayesinde ihtiyaç duyulan özellikler bir araya getirilmektedir. Klasik mikroskoplarda etkileyici bir ilerleme sağlanmıştır.

Mikroskobun evrimi 1990'larda dijital görüntülemeye yönelerek yüksek duyarlılıktaki cihazların ve güçlü bilgisayar yazılımlarının kullanılması ile gerçekleşmiştir. Bugünün sistemleri çok fazla sayıda veriyi depolama ve işleme kapasitesine sahiptir (Vonesch ve ark., 2006).

Floresan prensibin mikroskobideki uygulaması şekil 2.5 a) ve 2.5 b)'de gösterildiği gibidir. Burada ışık kaynağından optik filtreler yardımı ile uyarı ışığı süzülerek numuneye yönlendirilir, numunenin çıkarttığı emisyon bariyer filtreden geçirilerek uyarı ışığından arındırılır ve göze (veya fotoğraf makinesine) düşürülerek görüntülenir. Bu sayede numunenin kendi yaydığı spesifik floresan emisyon görüntülenmektedir. Eğer, numunenin belli bir kısmının floresan olarak işaretlendiğini düşünürsek sadece bu kısımlar spesifik olarak işaretlenecektir (Puralı, 2004).



Şekil 2.5. a) Floresansın temel fizik kuramı uygulaması ile ilgili şematik gösterimi b) epi-floresan mikroskop (Puralı, 2004)

Geliştirilmiş floresan görüntüleme teknikleri Floresan Moleküler Tomografi ve Floresan Yansımali Görüntüleme *in vivo* moleküler uygulamalar için yakın kızıl ötesi dalga boyu kullanan yöntemlerdir (Sharma ve ark., 2006).

2.4. Görüntüleme Maddeleri

Görüntüleme maddeleri iki ana gruba ayrılabilir.

2.4.1. Endojen Görüntüleme Maddeleri

Endojen maddeler enzimatik bir süreç kullanır. Yeşil floresan protein (GFP), lusiferin/lusiferaz biyoluminesans sistemler en çok bilinenlerdir. Bu floresan pigment, sentez sırasında proteine kovalent olarak bağlanır. Bundan dolayı yeşil floresan proteini kodlayan gen ifade olunca doğrudan yeşil floresan sinyal oluşur (Matz ve ark., 2002). Floresan proteinler küçük hayvanlarda moleküler ve hücresel seviyede bilgi sağlasa da klinik uygulamalarda sınırlı bir kullanıma sahiptir. Yeşil floresan proteinlerin düşük emisyon dalga boyu ($\lambda = 510$ nm) birçok dokunun kendi floresanı ile çakıştığı için problem yaratmaktadır.

Biyoluminesans görüntülemeye lusiferaz enzimini taşıyan hayvana genellikle lusiferin substratı verilir. Substrat ile enzim etkileştiğinde lusiferaz okside olur ve ışık yayar. Homojen olmayan saçılma, ışığı geçiren dokular ve lusiferaz enziminin gerekliliğinden dolayı ışık yayan hücrelerin pozisyonlarının belirsizliği problem yaratmaktadır (Sharma ve ark., 2006).

2.4.2. Ekzojen Görüntüleme Maddeleri

Ekzojen maddeler bugünün araştırmacıları ve bilim adamları için iyi bilinen kontrast maddeleridir. Bunlar, kolorimetrik kontrast için kullanılan basit boyalardan duyarlı floresan problemlara kadar değişiklik gösterir. Lantanit şelatları ve floresan görüntülemeye kullanılan organik floroforlar, gadolinyum şelatları ve süperparamanyetik demir oksitler ekzojen maddelere örnek olarak verilebilir. Ancak organik boyaların ve gadolinyum şelatların kullanımı ile ilgili birçok kısıtlama vardır.

Organik boyaların kullanımını kısıtlayan etkenler şu şekilde sıralanabilir;

- Çok hızlı bir şekilde "photobleaching" (ışıktan zarar görme) yatkınlıkları,

Organik floroforlar optik eksitasyona göre fotooksidasyon gibi ışık tarafından uyarılmış geri dönüşümsüz reaksiyonlara maruz kalabilir. Bu moleküller daha fazla floresan özellik göstermez. "Photobleaching" durumu bu işaretleyicilerin floresan

mikroskop altında görüntülenme zamanını sınırlar. Bu durum, uzun süre görüntü alınması gereken çalışmalarda bir engel oluşturur (Parak ve ark., 2005).

- Eş zamanlı renkli görüntüleme uygulamaları için uygun olmamaları,

Birçok organik florofofor diğer florofoforların emisyonu ile kolaylıkla çakışabilen geniş bir emisyon spektrumuna sahiptir. Dahası, her florofofor ışığın sadece belirli bir dalga boyunda optimum olarak uyarılabilir.

- Emisyonun/uyarılmanın farklı pH'da ve iyonların etkileştiği kimyasal çevrede değişmesi,
- Boyanın emisyonunun dokunun kendi floresanıyla çakışması,

Dokunun kendi floresanı nikotinamid (NAD[H]), flavin, kollajen ve elastin gibi düşük miktardaki florofoforlardan kaynaklanabilir. Bu moleküllerin arka planda verdiği floresan, aynı bölgede boyadan kaynaklanan sinyali zayıf düşürebilir. Bu durum görünür bölgede floresan ışımaya veren boyaların çoğunun bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla yakın kızılötesi floresan veren florokromların örnek olarak siyanin sınıfı boyaların görüntülemeye kullanımı artmaktadır. Birçok geleneksel boya (λ 850 nm ötesinde floresan yayan) düşük kuantum verimliliği (az parlaklık) ve zayıf fotokararlılık gösterir (Sharma ve ark., 2006).

- Optik mikroskobun çözünürlük sınırlaması,

Birkaç nanometre boyutundaki florofoforların her birinin floresanı gözlenebilse bile, bu durum ortamdaki işaretleyicilerin dağılımına bağlıdır. Yani her bir florofofor arasındaki mesafe çözünürlük limitinden daha büyük olmalıdır. Bu yüzden de klasik geniş alan mikroskobu ile birkaç yüz nanometreden küçük yapılar ayırt edilemez (Parak ve ark., 2005).

2.4.2.1. Nanopartikül Temelli Kontrast Maddeleri

Floresan temelli optik görüntüleme maddelerinin önemli özellikleri şunlardır:

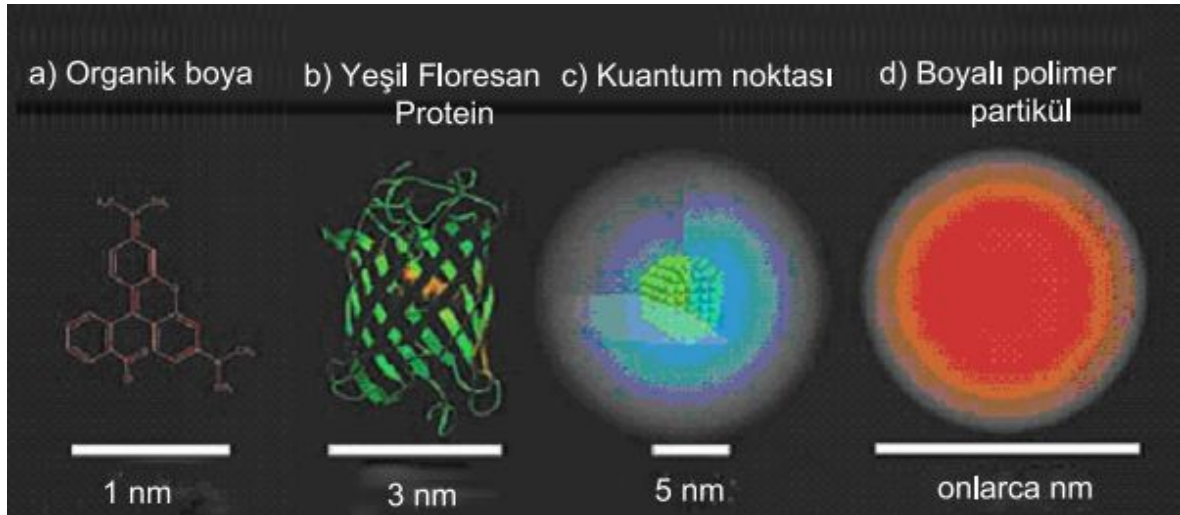
- *in vitro* ve *in vivo* kararlılık,
- "photobleaching" dirençleri,

- yüksek kuantum verimi ve yüksek emicilik,
- metabolik yıkıma karşı direnç ve toksik olmamaları,
- kızıl ötesi bölgede 700-900 nm'de emisyon,
- ve biyolojik ortamda dağılabilirlik.

Kuantum noktaları, altın nanopartiküller, organik olarak modifiye edilmiş boya yüklü silika nanopartiküller, lantanit temelli optik kontrast maddeleri yukarıdaki istenen özelliklerden birkaçını birleştiren ekzojen kontrast maddeleridir (Sharma ve ark., 2006).

Organik florofofor işaretli floresan lateks nanopartiküller ise organik boyaların eksikliğini ortadan kaldırmak için iyi bir alternatif sunar. FITC veya rodamin gibi tekli organik florofoforların aksine her nanopartikül polimerik kabuk içine enkapsüle edilmiş, dış çevreden korunan binlerce florofofor molekülü içermektedir. Buna bağlı olarak bu nanopartiküller tekli florofofor moleküllerinden daha parlak ışık yayar. Ayrıca florofofor molekülleri dış çevreden daha az etkilenir ve sönmeye karşı daha kararlıdır (Taylor ve ark.; 2000).

Biyokimyasal analizlerde kullanılan floresan lateks nanopartiküller ticari olarak mevcuttur. Ancak polistiren nanopartiküllerde olduğu gibi polimerin enkapsülasyonu bunlarda da büyük bir sorundur. Polimer kaplı nanopartiküllerdeki büyük partikül boyutu, şişme, partikül aglutinasyonu, aglomerasyonu ve küçük yüzey çatlaklarından florofofor sızıntısı problemlere neden olmaktadır (Wang ve ark., 2006).



Şekil 2.6. Geleneksel floresan nanoboyuttaki maddeler a) Organik boya molekülü (tetrametilrodamin) b) Yeşil floresan protein c) Polimer kaplı suda çözünür yarı iletken kuantum noktası d) Boya yüklü polimerik partikül

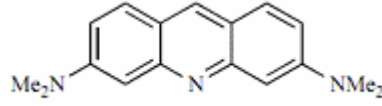
2.4.2.1.1. Akridin Oranj Boyası

Akridinler antitümoral, antiparaziter ve antibakteriyal maddeler olarak geniş bir biyolojik özellik gösteren heterosiklik yapılarıdır. 19. yüzyıldan beri bilinmelerine rağmen kansere karşı özelliğinin ilk kez keşfedilmesi I. Dünya Savaşı'ndan hemen sonraya denk gelmektedir. Akridin türevlerinin kanser, parazit ve bakterilere karşı terapötik özelliklerini konu alan birçok derleme yayınlanmıştır. 1970'lerden beri klinikte kullanılan akridinlerin antikanser aktiviteleri DNA'nın çift zincirleri arasına girmesi ile hücresel mekanizmayı durdurmasından kaynaklanır.

Son on yıl içinde akridinlerin nasıl etki gösterdiklerinin anlaşılması ile birlikte, bu heterosiklik aile hakkındaki araştırmalar halen devam etmektedir. Topoizomera I ve II, telomera/telomer ve protein kinaz gibi biyolojik hedefleri keşfedildikçe yeni akridin türevleri sentezlenip yapı-aktivite çalışmalarına yönelinmiştir. Önemli olan nokta, heterosiklik çekirdek üzerindeki substituentlerin yapısı ve konumunun biyolojik özelliği ve seçiciliği belirlemesidir (Belmont ve ark., 2007).

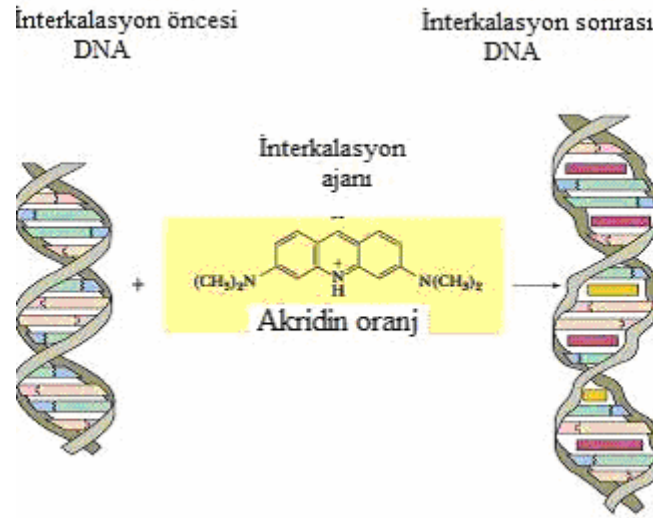
Akridin oranj gibi zayıf bazlar çeşitli organelleri boyamak için kullanılmaktadır. Akridin oranj absorbanı ve floresan spektrumu konsantrasyonuna bağlıdır. Agrege olmamış monomer formunda 490 nm'de absorbanı verir ve 530 nm'de yeşil floresan yayar. 655 nm'deki kırmızı emisyonu dimer ya da oligomer yapısından kaynaklanır. Bu agregatlar 465 nm'de maviye kayan absorbanı verir.

Yeşil/kırmızı (530/655 nm) floresan oranları canlı hücrenin asidik bölümündeki boya konsantrasyonuna bağlıdır (Han ve Burgess, 2010).



Şekil 2.7. Akridin oranjin moleküler yapısı

Akridin oranj ve DNA/RNA arasındaki etkileşim boya/baz çifti oranına bağlıdır. Akridin oranj düşük boya/baz çifti oranında, DNA'nın çift zinciri arasına eklenir. Burada hidrofobik etkileşimler söz konusudur. Yüksek boya/baz çifti oranında ise akridin oranj çift zincirli DNA'ya dıştan bağlanır. Burada iyonik bağlanma önceliklidir. Bu durum bazen DNA'nın denatürasyonu, yoğunlaşması ya da uzunluğunun değişmesi ile sonuçlanır (Şekil 2.8). Bu etkileşim aynı şekilde tek zincirli DNA ya da RNA'da da gözlenir (Lerman, 1984).



Şekil 2.8. Akridin oranjin DNA çift zinciri arasına girmesi ve DNA uzunluğundaki artış

Yüksek boya/baz çifti oranı ve yüksek akridin oranj konsantrasyonu (100 µM) komplekslerin kırmızı lüminesansını görünür hale getirir. Klasik modele göre DNA-akridin oranj kompleksinin kırmızı lüminesansı çift zincirli polimerin fosfat gruplarına elektrostatik olarak tutunan akridin oranjdan kaynaklanmaktadır (Darzynkiewicz ve ark., 1985). RNA'daki bazların hidrofobik çevre içine gömülü olmasından dolayı, boya DNA bazlarına kıyasla RNA bazları ile daha az etkileşime girer. (Ichimura, 1975).

2.5. Kolloidal Partikül ile Hücre Etkileşimleri

Kolloidal partiküllerin fizikokimyasal özellikleri ve hücre içi alımı ve gönderimi arasındaki ilişkiyi tamamen anlamak başlıca konulardan biridir. Şimdiye kadar ki deneyimler partiküllerin boyut, şekil, yük ve yüzey kimyasının hücre alım ve salımını etkileyen temel faktörler olduğunu göstermiştir. *in vivo* araştırmaların karmaşık olmasından dolayı sonuçların çoğu partiküllerin bulunduğu *in vitro* hücre kültürü ortamında elde edilmiştir. Dış faktörler kolaylıkla bertaraf edilerek partiküllerin yapısı ve özellikleri uzun süre değişmeden kaldığı için *in vitro* hücre kültürleri avantajlıdır.

2.5.1. Boyut İlişkisi

Kolloidal partiküller ile hücreler etkileştiğinde hücre alım adsorptif veya reseptör aracılı endositoz yolu ile gerçekleşir. Önceden tanımlandığı gibi mikropartiküllerin hücre içerisine alınması genellikle fagositoz yoluyla ve spesifik olmayan etkileşimlerle gerçekleşir. Biyoaktif maddelerin (özellikle genler) hücre içi salınım etkinliği, hücre içine alım hızı ve taşıyıcının miktarına bağlıdır (Mao ve ark.,2007).

Ancak şimdiye kadar hücre alım miktarı ve hızı ile partikül boyutu arasındaki ilişkiyi tanımlayan evrensel bir kural yoktur. Elde edilen bilgiler boyut etkisinin hem partikülün kimyasal yapısına hem de hücre tipine bağlı olduğunu göstermiştir.

Chithrani ve ark. 100 nm boyutlarındaki altın nanopartiküllerin 50 nm olanlara kıyasla HeLa (serviks karsinom kökenli insan epitel hücreleri) hücrelerine daha kolay endositoz yaptığını rapor etmiştir. Diğer taraftan 20 nm boyutlarındaki manyetik demir oksit nanopartiküllerin 100 nm olan nanopartiküllere oranla en yüksek alım dozuyla daha çabuk hücre içine girdiğini gözlemlemiştir.

Qaddoumi ve ark. farklı boyutlardaki 6-kumarin (floresan işaretleyici) içeren PLGA partiküllerinin (100 nm, 800 nm ve 10 µm) tavşan konjunktival epitel hücre katmanında alımını karşılaştırmış ve 100 nm olanların diğerlerine göre daha fazla alındıklarını gözlemlemiştir. İnkübasyon sıcaklığının düşürülmesi, metabolik inhibitörlerin ve sitokalazin D'nin varlığı hücre alımını inhibe eder. Buna dayanarak büyük ihtimalle alımın adsorptif endositoz ile gerçekleştiğine karar vermiştir.

Dawson ve Halbert tarafından benzer bir karşılaştırma yapılmıştır. 155 nm, 200 nm, 375 nm ve 600 nm çaplarındaki PLGA partiküllerle *in vitro* HEP2 2B (insan Kafkas larniks karsinom) hücre hattı ile etkileştirmişlerdir. Büyük partiküllerin (375nm ve 600 nm) küçük olanlara göre (155 nm ve 200 nm) hücrelere daha fazla giriş yaptıkları bulunmuştur. İnvazyonun yüksek yüzey yoğunlundan dolayı partiküller reseptör aracılı mekanizmayla yutulmuştur.

Partiküllerin alımı; boyuta, yüzey kimyasına ve hücre tipine bağlı olarak farklı mekanizmalar izleyebilir ve tartışmalı sonuçlar ortaya çıkabilir. Ayrıca kolloidal partiküllerin yüksek yüzey/hacim oranı ve küçük boyutlarda olmaları, özellikle serum içeren ortamlarda sedimentasyon ve aglomerasyon gibi önemli problemlere neden olabilir.

Buna ek olarak, hücre hatları farklı partikül şekillerine de farklı cevaplar verebilmektedir. Bu fark partikül boyutu, agregasyon kabiliyeti gibi bazı değişkenlerden kaynaklanabilir ve hücre alım mekanizmasını değiştirebilir. Farklı şekildeki (küre, çubuk, tüp ve şerit) kolloidal partiküllerin hücreler tarafından alındığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Trewyn ve ark., 2008; Chithrani ve ark., 2006; Jin ve ark., 2008).

2.5.2. Yüzey Kimyası İlişkisi

Hücre alım için, kolloidal partiküllerin yüzey özellikleri en önemli ve en kolay değiştirilebilir parametredir. Çoğu durumda hücreye giriş yolu için itici kuvveti (elektrostatik, hidrofobik ve hidrofilik (polar) kuvvet) yüzey özelliği sağlar.

Partikül yüzeyindeki spesifik ligandlar hücreye giriş mekanizmasını, alım hızını ve miktarını değiştirebilir. Yüzey yükü ve ıslanabilirlik gibi diğer etmenler de bunu değiştirebilir. PEG gibi hidrofilik bir polimer ile partikül yüzeyi modifiye edilirse, hücre alım başlangıç değerinin 1/3'üne düşer (Zahr ve ark., 2006). Tam tersi poli(N-vinil kaprolakton) ile kaplanan PS partiküllerin alımı fazlaşır (Vihola ve ark., 2007).

Hücre yüzeyi negatif yüklü olduğu için hücre alım, yüzey yükü tarafından elektrostatik etkileşimlerden büyük oranda etkilenir. Yüzey zeta potansiyelindeki -mV'dan +mV'a onlarca birimlik değişim ile partiküller hücreden içeri alınabilir. Genel olarak pozitif yüklü bir yüzey hücrelerle güçlü bir etkileşim içerisindedir.

Pozitif yüklü bir yüzey nötral veya negatif yüklü yüzeylere göre daha hızlı hücreye girer (Zahr ve ark., 2006).

Lorenz ve ark., yüksek pozitif yüklü partiküllerin hücre kültürü ortamında agregasyona yol açtığını ve hücreye girişi engellediğini gözlemlemiştir. Dahası HeLa hücreleri tarafından negatif yüklü partiküllerin alımının yük yoğunluğu ile azalmadığı ve bir iniş çıkışın meydana geldiği görülmüştür. (Holzapfel ve ark., 2005).

Buna ek olarak fazla pozitif yüklü bir yüzey partiküllerin hücreye özgül olmayan yapışmalarını tetiklemektedir. Nötral partiküller proteinlerin özgül olmayan adsorpsiyonlarını azaltabilir ve ligand aracılı endositoz gibi özgül etkileşimleri kolaylaştırır (Sunderland ve ark., 2006).

Yalnız endositoz miktarı ve alım hızı değil, hücresel endositoz mekanizmaları da yüzey yükü tarafından yönetilir. Harush-Frenkel ve ark. pozitif yüklü PEGlenmiş PLA nanopartiküllerin kltrin aracılı yolla çok çabuk, negatif yüklü PEGlenmiş PLA nanopartiküllerin ise çok yavaş bir hızla ve farklı bir yol kullanarak hücreye girdiğini göstermişlerdir.

2.6. Kolloidal Partiküller ve Sitotoksisite

Kolloidal partiküllerin internalizasyonu çeşitli etkilere sebep olur. En kaygı uyandıran etkilerinden biri sitotoksisitedir. Hücre morfolojisini, canlılığını, proliferasyonunu, fonksiyonunu ve diğer bazı hücre olaylarını değiştirebilir.

Partiküllerin küçük boyutu yan etki sebeplerinden biridir. Çünkü, büyük boyutlardaki aynı madde biyoinert hatta biyouyumlu iken nanoboyutta toksik olabilir. Örneğin, jelatin nanopartiküllerin internalizasyonu görünüşte hücre canlılığını ve morfolojisini değiştirmese bile insan fibroblast membran yapısını bozarak hücre iskeleti organizasyonunu engeller (Gupta ve ark., 2004).

Xia ve ark. 60 nm NH₂ işaretli PS nanopartiküllerin makrofaj ve epitel hücrelerinde fazla toksik etki yaptığını; ancak insan mikrovasküler endotel ve hepatum hücrelerinde bu partiküllere karşı direnç geliştirdiğini bulmuşlardır.

Partiküllerin toksisitesi yüzey modifikasyonu ile önlenabilir. Örneğin, hücreye yalnız altın partiküllerin alımı hücre iskeletinin yapısını bozarak ve sitotoksisiteye neden olurken; aynı dozdaki poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) kaplı altın partiküller hücreler üzerinde herhangi bir etki göstermez.

Laktoferrin, seruloplazmin (kıkırdakça zengin plazma proteini), dekstran ve albumin ile modifiye edilmiş manyetit koloidal partiküller daha fazla hücre canlılığı gösterir. Ayrıca PEGlasyon ve spesifik hedefleme istenmeyen adsorpsiyonları azaltır. Böylece hücre ve dokuların canlılığı artar (Hu ve ark., 2009).

2.6.1. Biyomalzemerin Biyouyumluluk Testleri

Toksik olduğu düşünülen maddenin, uygun hücre kültüründe, hücre büyüme oranı ve hücre tahribatı üzerindeki etkisi dikkate alınarak değerlendirme yapılan testlere “sitotoksosite testleri” denir.

Sitotoksosite belirlenmesinde ölçülebilir çeşitli katagoriler vardır;

- morfolojik yöntemler ile hücre hasarının değerlendirilmesi,
- hücre hasarının ölçümleri,
- hücre büyüme ölçümleri,
- hücre metabolizmasının spesifik ölçümleri.

2.6.1.1. MTT Testi

MTT testi biyomalzemelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini gözlemleyebilmek için tetrazolium tuzları kullanarak canlı hücre sayısının tespit edilmesini kolorimetrik yöntem ile sağlayan hücre kültürü çalışmalarından biridir. Canlı hücrelerde mitokondriyal enzimlerin dehidrogenaz aktivitesi sonucu formazan kristalleri meydana getirmesi, bu kristallerin çözünmesi ve spektrofotometrik yöntem ile absorbanlarının belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Ölü hücrelerde mitokondriyal aktive gözlenemeyeceği için tetrazolium tuzları ile sadece canlı hücreler sayılabilmektedir.

NAD(P)H formazan kristallerinin oluşumunda indirgeyici olarak çalışmakta ve tetrazolium tuzuna elektron ve hidrojen vermektedir. Bunun sonucunda da

formazan kristalleri oluşmaktadır. Çalışmalarda monotetrazolium tuzlarından MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium bromür), farklı biyomalzemeler ve bu malzemelerin farklı konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerin canlılıkları ve malzemelerin sebep olduğu sitotoksik etkiler incelenmektedir.

2.7. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilme sürecidir. Hayvan ve insan organizmasından hücre ve doku kültürü yapılabilir. Bunlar mekanik ve kimyasal müdahalelerle hücre birliklerinden alınarak besi agarına getirilir.

2.7.1. Hücre Kültürünün Kullanım Alanları

Hemen her alanda bu tür çalışmalara rastlamak mümkündür. Bunlar şu şekilde özetlenebilir;

- Viral aşılar ve viral teşhis amaçlı kullanım,
- Monoklonal antikorlar, interferon, enzim, aşı, büyüme faktörü, interlökin gibi immunoregülatörler, hormon üretimi,
- Somatik gen tedavisi,
- Tümör tedavisi,
- Canlı hücrelerin farklı amaçlarla kullanılması
 1. Eritrositlerin transfüzyon amaçlı kullanılması
 2. Kemik iliği nakli
 3. Parkinson hücrelerinde beyin hücrelerinin kullanılması
- Kompleks üç boyutlu dokular, yapay deri, kıkırdak, karaciğer ve yapay pankreas.

2.7.2. Hücre Kültürü Koşulları

Hücre kültür ortamı hücre ve kültür tipine göre değişmekle beraber, hücrelerin hayatta kalması ve çoğalması için gereksinim duyacağı şartları eksiksiz sağlamalıdır.

Kültür ortamı osmotik olarak dengelenmiş enerji kaynağı, vitaminler, kofaktörler, inorganik tuzlar, eser elementler, büyüme faktörü, mineraller ve aminoasitlerden oluşmaktadır. Kültür ortamını etkileyen diğer faktörler ise sıcaklık, pH, nemlilik, gaz fazı bileşenleri, ozmolarite ve ışıktır.

Hayvan hücre kültürü ortamında fizikokimyasal olarak optimum pH 7.2-7.5, CO₂ % 2-5, sıcaklık ise 35-37°C olmalıdır. Bikarbonat gibi tamponlayıcılar (özellikle toz vasat kullanıldığında), glutamin, kan serumu ve antibiyotik ortama sonradan ilave edilmektedir. Farklı hücre kültürleri için farklı özellikteki kültür ortamları gerekmektedir. Örneğin, memeli hayvan hücre kültüründe optimum pH 7.4'tür.

2.7.3. Hücre Kültür Sistemleri

Hücre kültürleri kaynaklarına ve büyüme biçimlerine göre sınıflandırılırlar.

2.7.3.1. Kaynaklarına Göre Hücre Kültür Sistemleri

Hayvan veya bitki hücreleri izole edildikten sonra kültüre edilirse primer kültür elde edilmektedir. Bu koşullarda hücre soyu sonludur, yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölür. Bu nedenle primer hücrelerde belirli sayılarda pasajlama yapılabildiğinden deneyleri bu dönemde yapmak gerekmektedir. Primer hücreler pasajlamalar sonunda ölümsüz olabilirler. Bu durumda bir hücre soyu elde edilmiş olur.

Hücre soyları, primer hücrelerde kendiliğinden mutasyonla, kimyasal maddeler veya virüsler eklenerek insan eliyle oluşturulmakta ya da tümör dokulardan alınan hücrelerden elde edilmektedir. Hücre soylarının primer kültürlerden farkları; kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri, büyüme faktörüne veya seruma daha az ihtiyaç duymaları, çoğalmak için zemine tutunma ihtiyacının azalması ve sonsuz çoğalma yeteneklerinin olmasıdır.

2.7.3.2. Büyüme Biçimlerine Göre Hücre Kültür Sistemleri

Süspanse kültürler ve yüzeye tutunarak büyüyen hücreler olarak sınıflandırılmaktadır. Kan, dalak, kemik iliği, kültürleri ve olgunlaşmamış hücreler bu şekilde üretilmektedir.

Tutunarak büyüyen hücreler ektoderm ve endoderm kökenli hücreler (fibroblast ve epitel hücreleri) olmak üzere, ekstraselüler matriks olarak adlandırılan ve kollojen,

laminin, proteoglikanlar gibi makromoleküllerin bir karışımı olan kompleks bir yapı üzerinde bu yapıdaki moleküler membran reseptörleri aracılığı ile etkileşerek büyümektedirler.

2.8. Polimer Sentezi

Polimer üretmek için yaygın olarak kullanılan başlıca polimerizasyon süreçleri dört grup altında incelenebilir:

- Yığın Polimerizasyonu
- Çözelti Polimerizasyonu
- Süspansiyon Polimerizasyonu
- Emülsiyon Polimerizasyonu

Bu dört yöntem uygun düzenekler ile radikal polimerizasyonunda çeşitli polimerlerin üretiminde kullanılmaktadır. Kondenzasyon polimerizasyonları ise, genellikle yığın ve çözelti işlemleri ile gerçekleştirilir.

2.8.1. Süspansiyon Polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonu "inci polimerizasyonu", günümüzde birçok önemli polimerin, yüksek kapasitede üretiminde kullanılmaktadır. Bu işlemde monomer uygun bir dağıtma ortamında süspansiyon haline getirilir. Dağıtma ortamı genellikle sudur. Başlatıcı, monomer damlacıkları içinde çözünmüştür. Ortam sürekli olarak karıştırılarak süspansiyonun devamlılığı sağlanır. Dağıtma ortamında çözülen süspansiyon stabilizörleri ile süspansiyon kararlılığı desteklenir. Sisteme uygun bir sıcaklık programı uygulanarak monomer damlacıklarının küresel polimer partikülleri haline dönüşmesi sağlanır. Süspansiyon polimerizasyonu ile 10 µm'den 10 mm'ye kadar değişik boy aralığında polimerler üretilir.

Süspansiyon süreçlerinin emülsiyon süreçlerine göre önemli avantajlarından biri, bu yöntemde ürün tanecik boyunun çok daha kolay ayarlanabilmesi ve istenilen boyda ve dar boy dağılımında ürün elde edilebilmesidir. Ayrıca, bu yöntemde katkı maddelerinin neden olduğu kirlenme emülsiyon polimerizasyonuna göre daha

azdır. Ürün, emülsiyon polimerizasyonuna göre daha ucuz ve daha basit ayırma ve saflaştırma işlemlerinden sonra piyasaya sunulabilmektedir.

2.8.2. Emülsiyon Polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonunun mekanizması süspansiyon polimerizasyonundan çok farklıdır. Burada polimerizasyon emülsiyeye edici maddelerin oluşturduğu miseller içinde yürür. Dağıtma ortamındaki monomer damlacıklarından miseller içine difüze olan monomer molekülleri, dağıtma ortamında çözülmüş ve sıcaklığın artırılması ile aktif duruma geçmiş ve misel içine girmiş başlatıcı moleküllerinin etkisi ile polimerleşir. Polimerizasyon monomer damlacıkları tamamen yok olana kadar devam eder. Ürün yüzey aktif maddeler olan emülsiyeye ediciler tarafından yüzdürülen bir polimer lateksidir. Emülsiyon polimerizasyonunda en önemli nokta emülsiyeye edici maddenin türü ve derişiminin seçilmesidir. İyi bir emülsiyeye edici madde öncelikle polimerizasyon için uygun miselleri oluşturabilmelidir. Kritik misel derişiminden daha düşük değerlerde emülsiyeye edici kullanıldığında polimerizasyonun süspansiyon bölgesine kayacağı bilinmelidir. Burada karıştırma işlemi, sıcaklık ve kütle transferlerinin kontrol etmesi bakımından önemlidir. Klasik emülsiyon polimerizasyonu ile üretilebilecek nanopartikül boyutu genellikle 0.1 µm'den daha küçüktür ve partikül boy dağılımı son derece dardır. Bu nedenle ürün çoğu zaman eş boyutlu lateks olarak adlandırılır.

Monomer/su mikroemülsiyonları sahip oldukları özelliklere göre makroemülsiyon, miniemülsiyon ve mikroemülsiyon olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Adlarından da anlaşıldığı gibi bu üç grup emülsiyon arasındaki temel fark sistem içerisinde yer alan damlacıkların (dağıtma ortamında monomer damlacıkları) büyüklüğüdür. İkinci önemli fark ise bu emülsiyonların kararlılığıdır. Burada kararlılık emülsiyonun fark edilir bir bozulmaya uğramasına kadar geçen süreyi tanımlamaktadır. Emülsiyonun bozulması ile orjinal emülsiyondaki damlacıkların büyüklüğü artmaktadır.

2.8.2.1. Makroemülsiyon Polimerizasyonu

Makroemülsiyon diğerlerine göre daha büyük monomer damlacıklarına (1-100 µm) sahiptir ve bu damlacıkların kararlılığı dakikalarla sınırlıdır. Eğer emülsiyon sistemi iyi karıştırılmıyorsa faz ayrımı çok hızlı olur. Damlacık boyutu sistem bileşenleri

(monomer, stabilizör, monomer/su faz oranı) ile karıştırma özelliklerine (karıştırma hızı, karıştırıcı türü) bağlıdır.

2.8.2.2. Mikroemülsiyon Polimerizasyonu

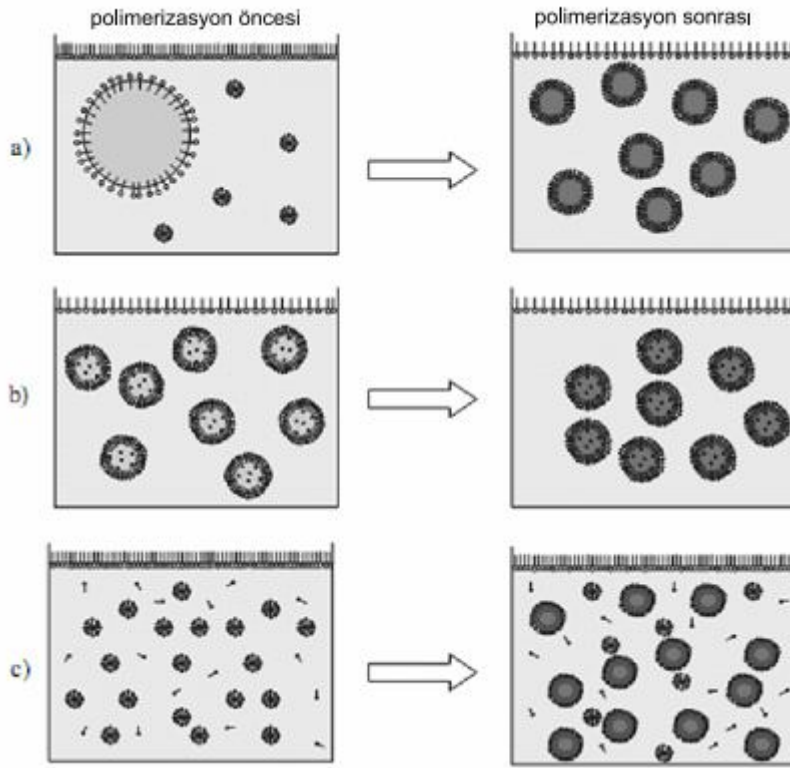
Mikroemülsiyon polimerizasyonunda, genellikle 50 nm'den daha küçük partiküller içeren lateksler elde edilir. Bu yöntemde hızlı polimerizasyon reaksiyonları ile yüksek molekül ağırlıklarına (birkaç milyon mertebesinde) ulaşılır. Partikül boyu nedeniyle mikroemülsiyon lateksleri, emülsiyon ve miniemülsiyonun tersine şeffaf ve uçuk mavimsi renktedir. Bu latekslerin kontrollü çapraz bağlama yöntemleri ile gözenekli katılara da dönüştürülmesi mümkündür (Candau, 1987; 1992).

Mikroemülsiyon lateksleri termodinamik olarak kararlı, optik olarak geçirgen dispersiyonlardır ve polimerik partiküller, dağıtma ortamı (örneğin su) ve yüzey aktif maddeler içerirler. Elde edilen kararlılık, çok düşük arayüzey geriliminden kaynaklanır. Çoğu kez, düşük arayüzey gerilimini sağlamak için bir yardımcı yüzey aktif madde (örneğin; sodyum dodesil sülfat, SDS) eklenmesi gerekir. Bu husus aslında mikroemülsiyonun dezavantajı olarak kabul edilir. Burada, emülsiyona göre çok daha fazla yüzey aktif madde kullanılır ki bu da arayüzeyin kirlenmesine yol açar. Mikroemülsiyon polimerizasyonunda genelde suda çözünmeyen veya az çözünen monomerler su ortamında dağıtılır. Suda çözünen monomerler için bunun tersi yani monomerin bir apolar organik fazda dağıtılması söz konusudur. Burada yüzey aktif maddenin türü ve miktarı önemlidir. Monomer türüne göre çeşitli yüzey aktif maddeler karıştırılarak, termodinamik olarak kararlı mikroemülsiyonları kolaylıkla oluşturmak ve bunlara uygun başlatıcılar (suda veya organik fazda, monomerde çözünen) kullanılarak nanopartikül lateksleri üretmek mümkündür.

2.8.2.3. Miniemülsiyon Polimerizasyonu

Miniemülsiyonlar damlacık boyutu ve emülsiyon kararlılığı bakımından makroemülsiyonlar ve mikroemülsiyonlar arasında yer alır. 50-500 nm arasında değişen damlacık boyutuna sahip düzgün şekilli polimerik nanopartiküller sentezlenebilmektedir. Geleneksel emülsiyon polimerizasyonundan farklı olarak yüksek parçalayıcı homojenizasyon basamağının olması ve yardımcı yüzey aktif maddeye gerek duyulması söz konusudur (Tan ve ark., 2007).

Miniemülsiyonların kararlılığı günler kadar kısa olabileceği gibi aylar kadar uzun da olabilir. Bu damlacıklar genellikle iyonik emülsiyon yapıcı madde (SDS) ile yardımcı emülsiyon yapıcı maddenin bileşimi ile elde edilir. Yardımcı emülsiyon yapıcı madde miniemülsiyon polimerizasyonunda iki görev üstlenir. Bunlardan ilki, emülsiyon yapıcı madde ile birleşip monomer-su ara yüzeyini düzenleyerek damlacık yüzeyinde damlacıkların birbirleriyle birleşmelerini engelleyen bir barikat oluşturmak; ikincisi, düşük su çözünürlüğüne sahip olması nedeniyle değişik boyut ve bileşimdeki damlacıklar arasında denge kurarak küçük damlacıklardan büyük damlacıklara monomer transferini önlemektedir.



Şekil 2.9. Heterofazlı polimerizasyon oluşumlarının şematik gösterimi: a) Emülsiyon polimerizasyonu, b) Miniemülsiyon polimerizasyonu, c) Mikroemülsiyon polimerizasyonu (Antonietti ve ark., 2002).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

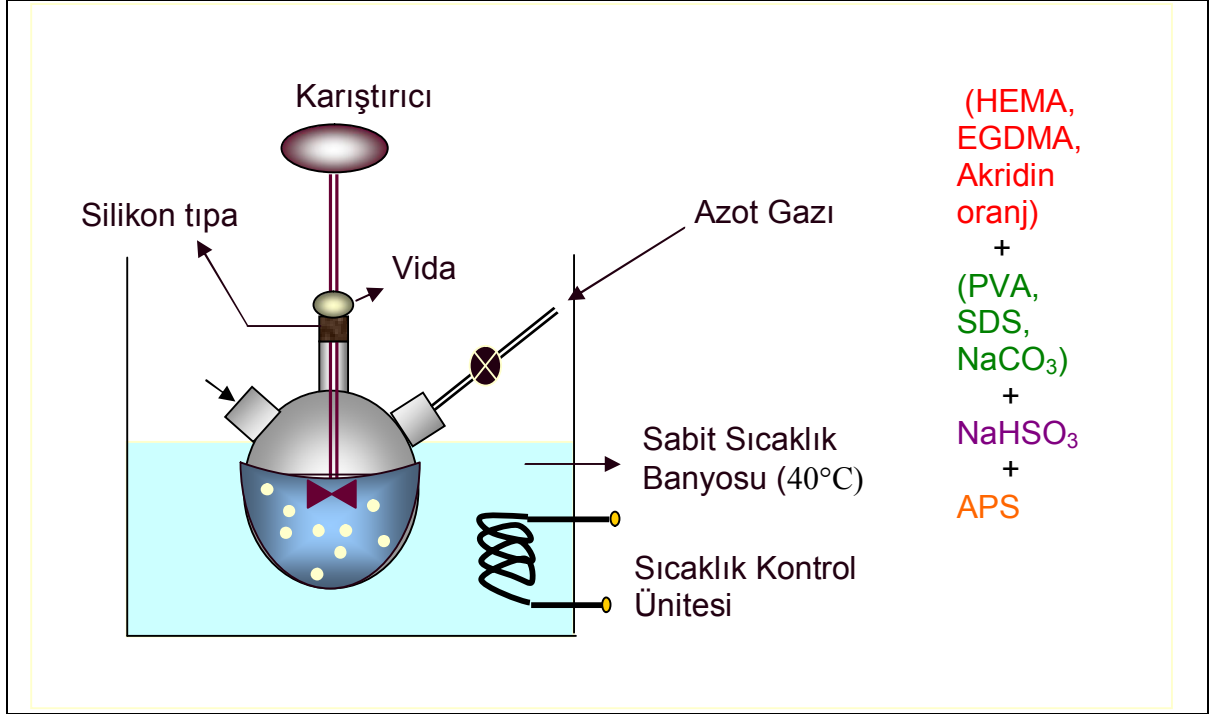
3.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan floresan boya Akridin oranj hemi(zinc chloride) salt Aldrich firmasından alınmıştır. Kullanılan 2-hidroksietilmetakrilat monomerleri (HEMA) ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA, % 98) Fluka AG (İsviçre) Sigma firmasından temin edilmiş ve kullanılmadan önce düşük basınç altında damıtılarak polimerizasyon inhibitörlerinden arındırılmıştır. Monomerler kullanılıncaya kadar 4°C'da buzdolabında muhafaza edilmiştir. Sodyum bikarbonat (NaHCO_3 , % 99.7-100.3), sodyum bisüfit (NaHSO_3 , minimum %99) ve amonyum persülfat (APS, % 98) ve Poli(vinil alkol) (PVAL; mol kütlesi: 100.000, % 98 hidroliz edilmiş) Aldrich (ABD) firmalarından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead Ropure LP® birimi ile ve ardından Barnstead D3804 NANOpure organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun direnci 18 MΩ/cm'dir.

3.2. Akridin Oranj Yüklü poli(HEMA) Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) nanopartiküllerinin polimerizasyonu için mikroemülsiyon polimerizasyonu yöntemi uygulanmıştır. Sıvı fazı oluşturmak için; 0.475 g stabilizör PVA, 37.7 mg yüzey aktif madde SDS ve 36.9 mg NaHCO_3 200 ml deiyonize (DI) suda çözülmüştür. İkinci bir sıvı faz 0.3 g stabilizatör PVA ve 0.3 g sürfaktan SDS'ın 400 ml (DI) suda çözülmesiyle hazırlanmış olan dağıtma ortamıdır. 200 rpm karıştırma hızında 30 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra 0.6 ml HEMA, 3.2 ml çapraz bağlayıcı EGDMA yağ fazı oluşturmak üzere ve içerisine 0.025 g akridin oranj eklenerek manyetik karıştırıcıda 200 rpm karıştırma hızında 15 dakika karıştırılmıştır. Devamında yağ fazı ikinci sıvı faza (dağıtma ortamına) eklenmiştir. Elde edilen son karışım 1 lt'lik üç boyunlu cam balona aktarılarak, 500 rpm karıştırma hızında yavaşça karıştırılarak ısıtılmıştır. Polimerleşme öncesi karışım 40°C'ye ulaştıktan sonra, reaksiyon ortamı 15 dakika boyunca oksijen ile yerdeğiştirmesi için azot gazına tabi tutulmuştur. Son olarak da 0.251 g NaHSO_3 ve 0.352 g APS başlatıcısı reaksiyon ortamına eklenerek, bu koşullarda 24 saat polimerizasyona devam edilmiştir.

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan EGDMA, polimerik yapıda zincirler arası bağlar oluşturarak zincir hareketliliğini sınırlar. Böylece polimerin kimyasal olarak degrade olmasını engellemektedir (Arshady ve ark., 1996).



Şekil 3.1. poli(HEMA) nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan miniemülsiyon polimerizasyonun şematik gösterimi

Reaktörün soğutma işleminden sonra, sentezlenen nanopartiküller santrifüjlenerek polimerizasyon ortamından ayrılmış ve tepkimeye girmeyen maddeler (monomer gibi) yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Sırasıyla etanol ve su ile yıkanarak çözünür bileşenler yapıdan tamamen uzaklaştırılmıştır.

Polimerizasyon tepkimesi tamamlandıktan sonra çözünür bileşenler, polimerin su ve etanol ile yıkanmasıyla yapıdan uzaklaştırılmıştır. Üretilen polimerler mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için % 0.02'lik NaN₃ çözeltisi içerisinde buzdolabında saklanmıştır.

3.2.1. Akridin Oranj Yüklü poli(HEMA) Nanopartiküllerin Çöktürülmesi

Gerek yıkama işlemlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla ultrasantrifüj (Beckman Coulter, Allegra 64R, USA) kullanıldı. Kolloid haldeki nanopartiküller ependorf tüplerine konularak, 30.000 rpm hızda 1 saat süreyle santrifüjlenerek çöktürülmüştür.

3.3. Akridin Oranj Yüklü poli(HEMA) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.3.1. Zeta Sizer ile Boyut Analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin boyut analizi Zeta Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) ile analiz edilmiştir. Zeta Sizer kolloidal çözeltilerde partiküllerin boyutunu ve zeta potansiyelini bulmak için kullanılan bir cihazdır. Bu cihazda kullanılan yöntem, dinamik ışık saçılımı ile partiküllerin süspansiyon içindeki Brownian hareketlerinin ölçülmesidir. Yıkanarak çöktürülen nanopartiküller Zeta boyut ölçüm cihazının hücresine konulduktan sonra ölçüm alınmış ve analiz sonrası sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.3.2. Zeta potansiyel ile Yüzey Yükü Analizi

Zeta potansiyeli, sulu ortamlarda partiküllerin yüzeyindeki iyonizasyon ya da yüzeylerine adsorbe olan iyonik maddelerin meydana getirdiği yüzey yükü olarak tanımlanmaktadır. Sentezlenen nanopartiküllerin zeta potansiyelleri, Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile analiz edilmiştir. Cihaz, bu potansiyeli ölçmek için süspansiyon boyunca bir elektriksel alan uygulamakta ve partiküllerin yüklerine bağlı olarak gelişen hareket hızlarını ölçerek bir hesaplama yapmaktadır. Zeta potansiyel ölçüm cihazının örnek haznesine 1 mL süspansiyon halindeki nanopartikül çözeltisi enjekte edilmiş ve yüzey yükü ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Morfolojik Analiz

3.3.3.1. AFM Çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında, nanopartiküllerin yüzeylerinin topografik görüntüleri atomik kuvvet mikroskobu (AFM) (Nanomagnetics Instruments, Oxford, UK) kullanılarak elde edilmiştir. Yıkanmış örnekler mika (cam) plakalar üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Mika plakalar 45°C açığa ayarlanıp partiküllerin yüzeye farklı şiddetlerde tutunmaları sağlanmıştır. Mika plakalar

üzerindeki örneklerin AFM görüntüleri, dinamik modda (tapping mode), Buggetsensor Tap300-G model silikon uç kullanılarak (yarıçap < 10 nm), rezonans frekansı 300 kHz ve kuvvet sabiti 40 N/m değerine ayarlanarak alınmıştır.

3.3.3.2. SEM Çalışmaları

Nanopartiküllerin yüzey morfolojisi için kullanılan yöntemlerden biri de SEM cihazıdır. Örnekler SEM analizi için örnek disklerinin üzerine yayılarak oda sıcaklığında sıvı fazın buharlaşması sağlanmıştır. Daha sonra vakum altında 100 Å kalınlığında altın ile kaplanarak SEM cihazında (SEM, Phillips, XL-30S FEG, Germany) 85000 X büyütme oranı ile fotoğraflanmıştır.

3.3.3.3. TEM Çalışmaları

Nanopartiküllerin yüzey morfolojisi için kullanılan başka bir yöntem de TEM cihazıdır. Örnekler karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılmış ve açık havada kurutulmuştur. 200 kV'ta TEM cihazında (FEI, Tecnai G2 F30, Oregon, USA) 98000 X büyütme oranı ile fotoğraflanmıştır.

3.3.4. Elemental Analiz

Nanopartiküllere bağlanan akrinin oran miktarının belirlenmesi için, elemental analiz cihazı (Leco, CHNS-932, ABD) kullanılmıştır. Nanopartiküller (1.0 mg) elemental analiz cihazının alüminyum örnek hücrelerine yerleştirilerek ± 0.0001 g duyarlılıkla tartılmıştır. Daha sonra nanopartiküller cihaza konularak yakma işlemi sonucunda % karbon (C), % hidrojen (H), % oksijen (O) ve % azot (N) analizi yapılmıştır.

3.3.5. FTIR Çalışmaları

Infrared spektroskopisi (IR), bir molekülün rotasyonel ve vibrasyonel enerji seviyelerindeki geçişlerden faydalanarak hızlı, kesin ve çok yönlü bir şekilde moleküllerin tanımlanmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemde, görünür bölge ile mikrodalga bölgesi arasında (700-100.000 nm) kalan enerjinin moleküller tarafından soğrulması ölçülür. Pratikte en çok yararlanılan kısmı $4000-670\text{ cm}^{-1}$ dalgabuyu aralığıdır. IR spektroskopisi polimerik materyallerin nitel ve nicel analizinde kullanılabilir. Yöntem çok az miktarda örnek kullanarak ve örnek üzerinde tahrip edici etkiye neden olmaksızın tayin yapar.

Nanopartiküllerin kimyasal yapısı ve kompozisyonları FTIR spektrofotometresi (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japan) kullanılarak belirlenmiştir. Sentezlenmiş olan partiküller vakum etüvünde kurutulduktan sonra KBr ile (ağırlıkça %10 olacak şekilde) karıştırılarak disk haline getirilmiş ve FTIR spektrumları oda sıcaklığında alınmıştır.

3.4. *İn vitro* Akridin Oranj Yüklü poli(HEMA) Nanopartiküller ile Hücre Etkileşimleri

3.4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Yapılan çalışmada HeLa hücreleri (İnsan Serviks Karsinoma hücreleri) ve fare fibroblast hücreleri (L929) kullanılmıştır. HeLa ve L929 hücreleri Şap Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

HeLa hücreleri 1951 yılında rahim ağzı yassı epitel hücreli karsinoma hastasından izole edilmiş olup halen günümüzde kadar kültür ortamlarında üretilebilen en iyi tanımlanmış hücre hatlarından biridir. Bu çalışmada HeLa hücrelerinin seçim sebebi kültür ortamında sınırsız sayıda bölünebilmeleri, insan kaynaklı olmaları ve kolay çoğaltılabilir olmalarıdır. HeLa hücreleri yüzeyde tek tabakalı veya süspansiyon formda üretilebilmektedir. Araştırma kapsamında uygulanan HeLa/L929 hücrelerinin kültür koşulları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. HeLa ve L929 fibroblast hücrelerinin kültür koşulları

Hücre türü	HeLa hücreleri (İnsan Serviks Karsinoma hücreleri) ve fare fibroblast hücreleri (L929)
Besi ortamı	DMEM-F12 ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium") besi ortamı
Serum	% 10 FCS (Fetal sığır serumu)
Antibiyotik	% 1 penisilin streptomisin
Kültür atmosferi	% 95 hava ve %5 CO ₂ karışımı
Sub-kültür	İki günde bir
Kültür kabı	25 cm ² 'lik polistren flask
Kültür özelliği	tek tabakalı yüzeye tutunmuş
Toplam hacim	5 mL
pH	7,2-7,5
Sıcaklık	37°C

Hücreler uygun kültür koşullarında inkübe edildikten sonra morfolojik değişiklikleri ve hücre sayıları ışık mikroskobu ile izlenmiştir. Belli aralıklarda besi ortamları

değiştirilerek taze besin sağlanmıştır. Hücreler kültür kabı yüzeyini kapladığında pasajlama yapılmıştır. Kültür koşullarında kontaminasyona karşı pH değişikliği besi ortamının renk değişikliği takip edilerek yapılmıştır. Kültür kabı yüzeyini tamamen kaplayan hücreler tripsin-EDTA (% 0.5 tripsin, %0.02 EDTA) çözeltisi ile 2 kez yıkandıktan sonra 0.5 ml tripsin-EDTA ile ortamdan kaldırılmıştır. Enzimin faaliyeti serum içeren besiyeri ilavesi ile durdurulmuştur.

Akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin hücre ile etkileşiminde altı bölmeli (her biri 35 mm çaplı) kültür kabı kullanılmıştır. İlk önce L929 fibroblast hücrelerin ekimi yapılmış ve %10 FCS, %1 antibiyotik içeren besiyeri eklenmiştir. Deiyonize su içinde hazırlanan stok polimer çözeltisi (1.5 mg/mL) vortekslenerek iyice dağıtılmıştır. Stok çözeltisinden 20 µl (30 µg polimer) alınarak kültüre edilmiş her bir bölmedeki L929 fibroblast hücrelerinin üzerine ilave edilmiştir. Nanopartiküller hücreler yüzeye tutunmadan önce ve tutunduktan 24 saat sonra iki ayrı grup olmak üzere kültür ortamına eklenmiştir. Daha sonra kültür kapları 37°C'de ve %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyonlar sonucunda her iki gruptaki serbest partiküller yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Nanopartiküllerin hücrelerle etkileşmesinden 3 saat, 24 saat, 48 saat ve 120 saat sonra floresan ataçmanlı inverted mikroskop (Fluorescence Inverted Microscope, Olympus IX70, Japonya) ile fotoğrafları çekilmiştir. Her iki gruptan elde edilen görüntülerin aynı olması nedeniyle çalışmanın bundan sonraki aşamalarında nanopartiküller ile hücreler inkübasyonun başından itibaren karşılaştırılmış ve veriler buna göre toplanmıştır (yüzeye tutunan hücrelere yapılan partikül eklemelerinden elde edilen sonuçlar tez kapsamında sunulmamıştır) (n=6).

3.4.1.1. İki Farklı Hücre Hattının Karıştırılması

Çalışmanın bu kısmında, iki farklı hücre hattının birbirleri ile karıştırılması ve bu karışımda daha önceden nanopartiküller ile işaretlenmiş HeLa hücrelerinin işaretlenmeyen L929 fibroblast hücreleri arasında gözlenebilmesi amaçlanmıştır. Öncelikle, HeLa hücreleri nanopartiküllerle 24 saat süreyle etkileştirilmiştir. Hücreler, ortamdaki besiyeri üç kere değiştirilerek yıkanmış ve tripsin ile toplanmıştır. Nanopartiküllerle etkileştirilmeyen aynı sayıdaki (30.000 hücre/mL) L929 fibroblast hücreleri de tripsinize edildikten sonra, 35'lik petrilere toplam hacim 3 ml olacak şekilde birlikte eklenmişlerdir. 24 saatlik inkübasyondan sonra, işaretli

olan HeLa hücrelerinin morfolojileri de göz önüne alınarak floresan mikroskop fotoğrafları çekilmiştir (n=3).

3.4.1.2. Sitotoksosite Testi (MTT)

Nanopartiküllerle hücreler etkileştiğinde, hücre fonksiyonları değişebilir. Kolloidal partiküllerin alımı; oksidatif stresi başlatabilir, hücre döngüsünü etkiler, hücre iskeletini tekrar yapılandırır, sitokin sentezini etkiler ve hatta DNA'ya oksidatif hasar verebilir (Rice ve ark., 2003).

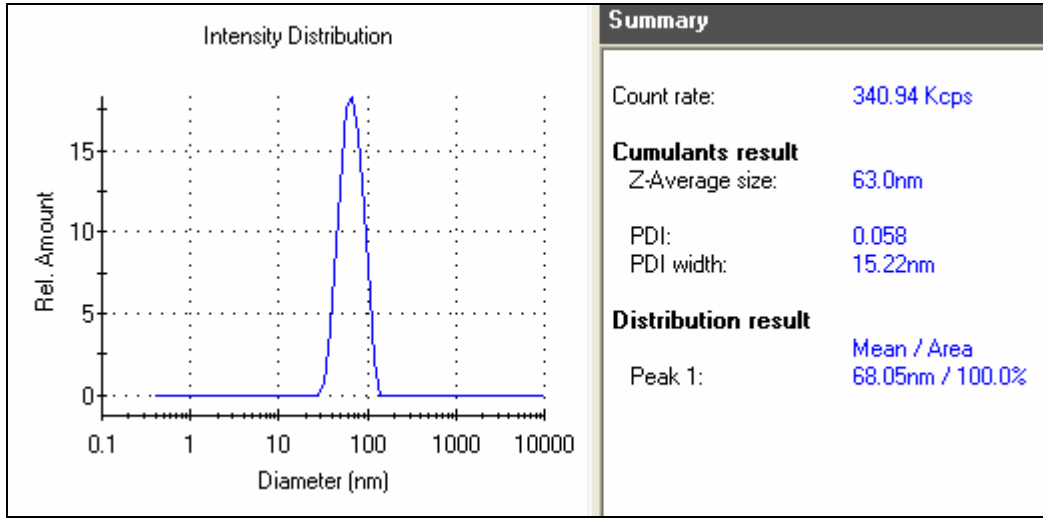
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide) testi hücre canlılığının ve böylelikle sitotoksitesinin kolorimetrik olarak ölçülebildiği bir testtir. Miniemülsiyon tekniği ile üretilen nanopartiküllerin aktiviteleri L929 fibroblast hücreleri üzerinde test edilmiştir. Hücreler 96 kuyucuklu plağa ekilmiş ve plak bir gece etüvde inkübe edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküller, otoklavda steril edildikten sonra farklı derişimlerde (10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL) olacak şekilde kuyucuklardaki hücrelerle etkileştirilmiştir. 24, 48 ve 72 saat sonunda serumlu besiyeri ve partikül ortamdan uzaklaştırılmış ve bunun yerine serum içermeyen besiyeriyle hazırlanmış % 10'luk MTT solüsyonu eklenmiştir. Etüvde 4 saat süreyle 37°C'de ,% 5 CO₂ koşulunda karanlıkta inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki MTT-Besi ortamı çözeltisi toplanmıştır. Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100µL izopropil alkol ilave edilmiştir. Plaklar 570 nm'de ELISA okuyucusunda (Molecular Devices, Versamax microplate reader, U.S.A.) okutulmuştur.

4. DENEYSEL SONUÇLAR

4.1. Akridin oranj Yüklü poli(HEMA) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1. Zeta Sizer ile Boyut Analizi

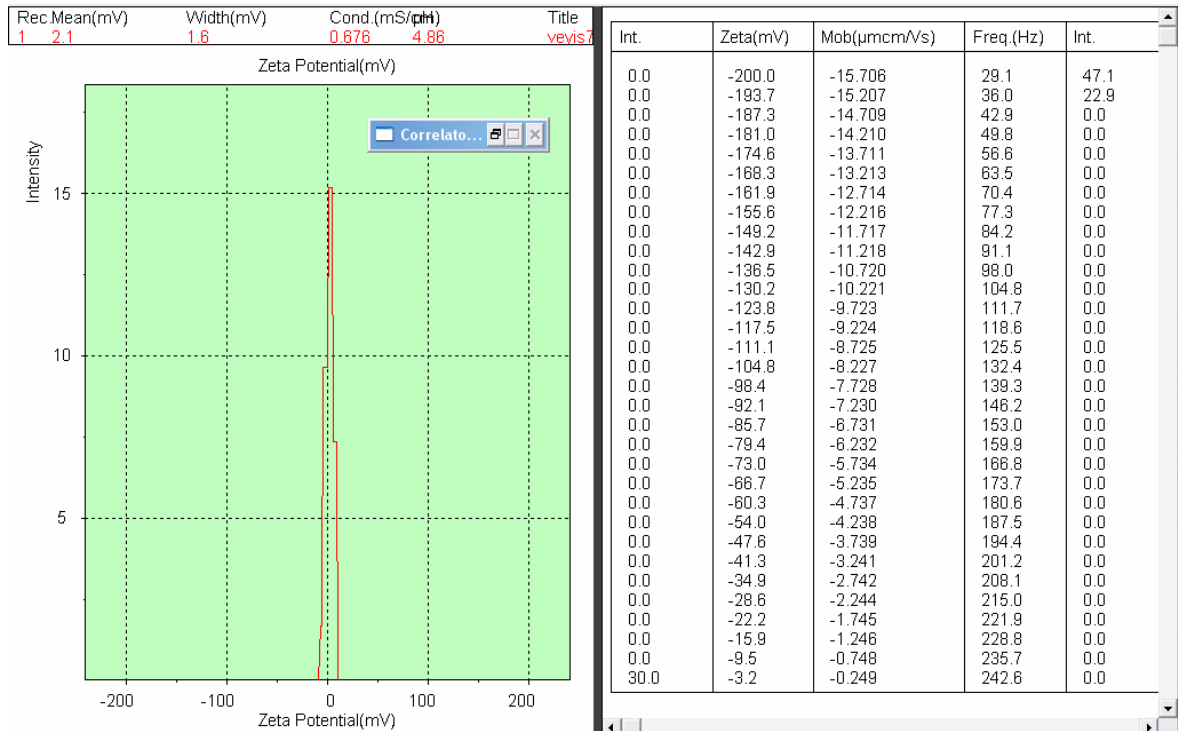
Nanopartiküllerin boyutsal analizi için Zeta Sizer cihazı kullanarak ortalama çap ve boy dağılımları belirlenmiştir. Boy dağılımını veren grafik ve bu grafiğe ait veriler şekil 4.1’de görülmektedir. Nanopartiküllerin ortalama boyutu 63 nm ve polidispersitesi 0.058 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. Zeta Sizer’den elde edilen boyut analizi

4.1.2. Zeta Potansiyel ile Yüzey Yükü Analizi

Teorik olarak pozitif ya da negatif değerdeki zeta potansiyel değerleri kararlı partikül süspansiyonunun oluşmasına eşlik eder (Kumar ve ark., 2004). Aynı elektrik yüküne sahip partiküller arasındaki elektriksel itme kuvvetleri süspansiyon halindeki kürelerin kümeleşmesini (agregatlaşmasını) önler. Miniemülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen nanopartiküllerin pH 7.0’deki zeta potansiyel değeri +2.1 mV olarak bulunmuştur. Pozitif değerde elde edilen bu zeta potansiyel değeri, sentezlenen nanopartikül süspansiyonunun kararlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.2. pH 7.0'da alınan Zeta Potensiyel bilgisayar çıktısı

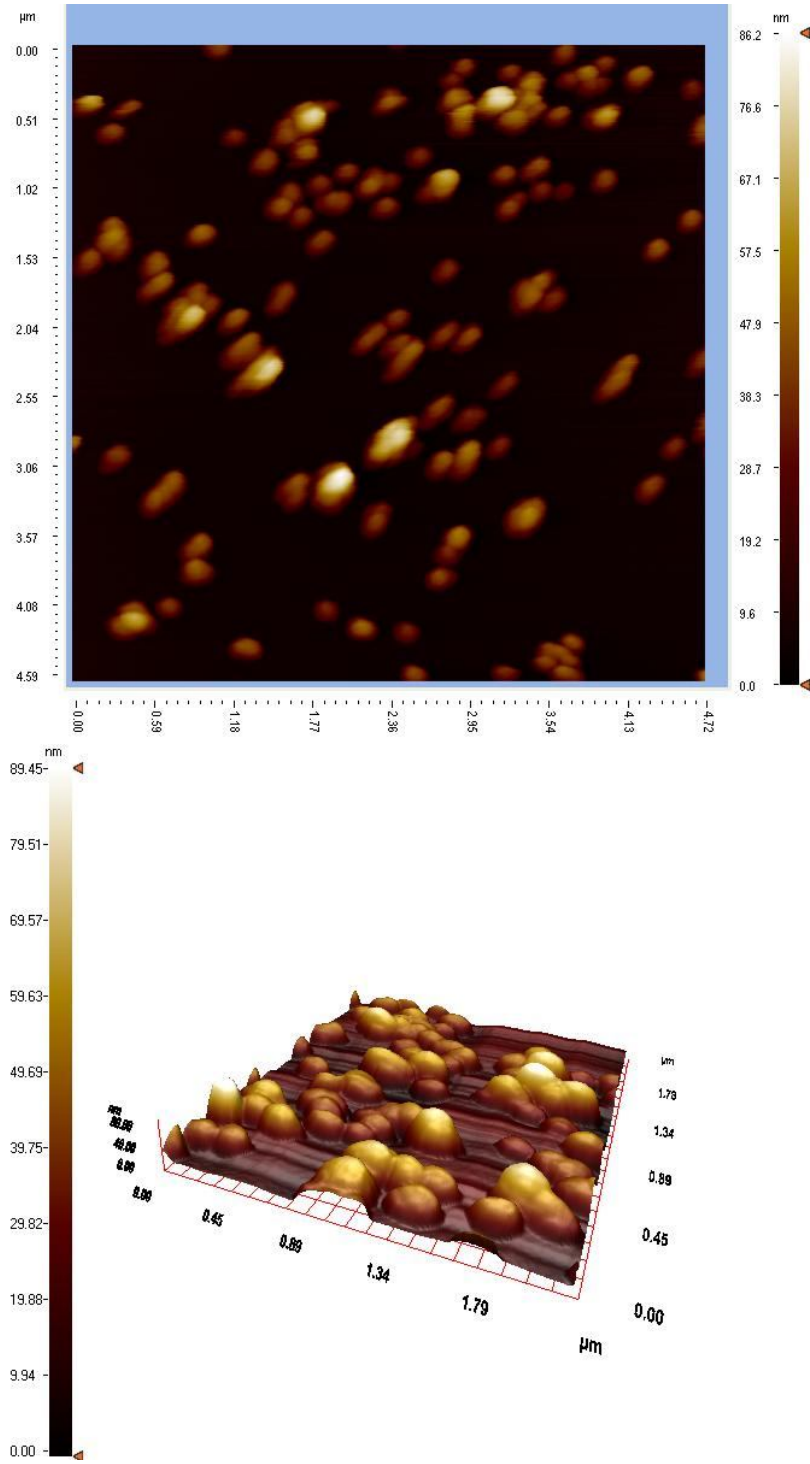
4.1.3. Morfolojik Karakterizasyon

Nanopartiküllerin morfolojik değerlendirmeleri Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılarak yapılmıştır.

4.1.3.1. AFM ile Görüntüleme Sonuçları

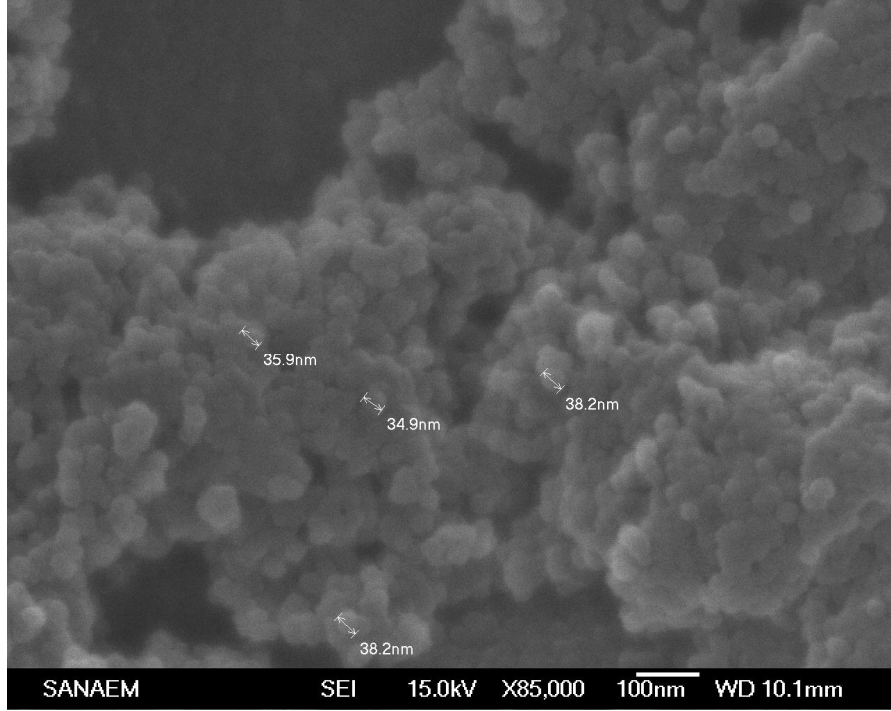
Atomik kuvvet mikroskobu ile alınan görüntüler ve bunlardan elde edilen sayısal veriler sonucunda sentezlenen nanopartiküllerin küresel formda yapılar oldukları belirlenmiştir. AFM ile partikül boyu ölçülürken cihazın yazılımı kullanılarak z eksenindeki yükseklik farkından (Δz) nanopartiküllerin boyutları hesaplanmıştır.

Şekil 4.3'te sentezlenen akrinin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin AFM görüntüsü sunulmuştur. Şekil 4.3'te de görüldüğü gibi nanopartiküllerin boyutları 50 nm civarındadır. Bu sonuçlar, zeta boyut analiz sonuçlarını desteklemektedir.



Şekil 4.3. Akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin AFM görüntüleri

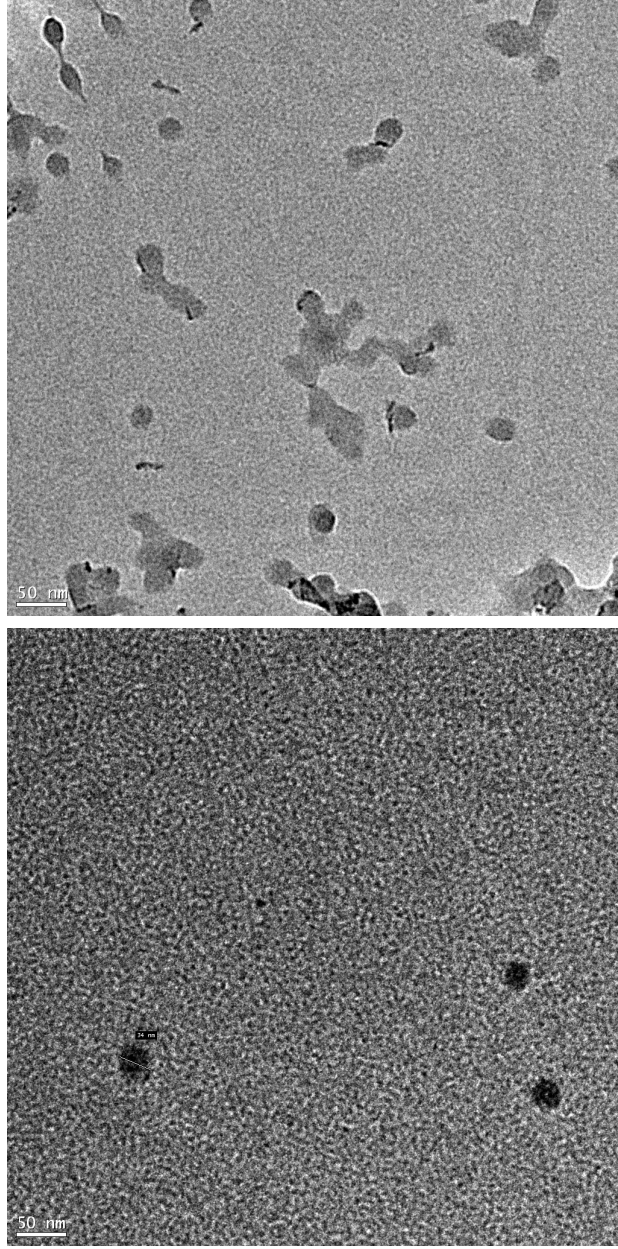
4.1.3.2. SEM ile Görüntüleme Sonuçları



Şekil 4.4. Akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin SEM görüntüleri

Akridin oranj varlığında miniemülsiyon yöntemi ile sentezlenen nanopartiküllerin SEM fotoğrafları şekil 4.4 de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi nanopartiküller çok eş boyutlu olmasalarda düzgün ve küresel formdadırlar. Nanopartiküllerin boyları 30 – 40 nm aralığında değişmektedir. Nanopartiküllerin en önemli sorunu partiküllerin agregasyonudur. SEM fotğrafında da nanopartiküllerin oluşturduğu bir agregat gözükmemektedir.

4.1.3.3. TEM ile Görüntüleme Sonuçları



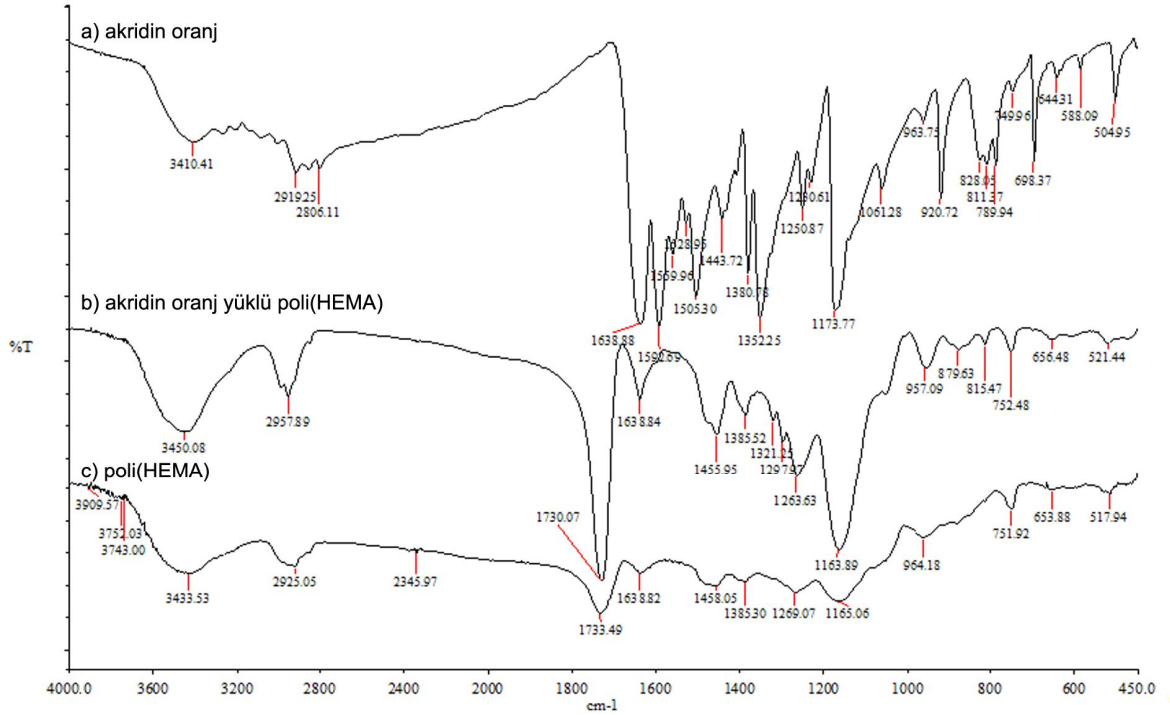
Şekil 4.5. Akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin TEM görüntüleri

Şekil 4.5'te akridin oranj yüklü nanopartiküllerin TEM fotoğrafları görülmektedir. TEM görüntüsü de nanopartiküllerin küresel ve boyutlarının 30-40 nm aralığında olduğunu göstermektedir. Bu görüntüler yüksek çözünürlüklü TEM cihazından alınmış olmasına rağmen inorganik madde içermemesi nedeniyle görüntülerde çok ciddi kontrast sağlanamaması nanopartiküllerin küresel şekilde olduğu açıkça görülmektedir.

4.1.4. Elemental Analiz

Elemental analiz sonuçlarına göre, yapıda % 57.74 karbon, % 7.01 hidrojen ve % 0.26 azot bulunmaktadır. Dolayısıyla, 100 gram polimerde 0.26 gram azot bulunmaktadır. Yapılan hesaplamalara göre polimerik yapıdaki boya miktarı 16.4µg/g polimer'dir. Sentezlenen akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerdeki azot yalnızca akridin oranjdan kaynaklanmaktadır.

4.1.5. FTIR Analizi



Şekil 4.6. Akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin FTIR spektrumu

Nanopartiküllerin kurutma sonrası 4000-450 cm^{-1} dalga boyu aralığındaki FTIR spektrumları çekilmiştir. Şekil 4.6'da a) akridin oranj boyasının b) akridin oranj yüklü poli(HEMA) ve c) poli(HEMA) nanopartiküllerin FTIR spektrumları görülmektedir. Akridin oranj yüklü poli(HEMA) ve poli(HEMA) yapısındaki 1730 $\pm$ 5 cm^{-1} bandı C=O gerilme, 3450 $\pm$ 5 cm^{-1} bandı O-H gerilme, 2957 $\pm$ 5 cm^{-1} bandı C-H alifatik gerilme titreşimlerini göstermektedir. Akridin oranj varlığına bağlı olarak akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin spektrumunda 3450 cm^{-1} civarında omuzlanmalar görülmektedir. Ayrıca akridin oranj'ın 789 cm^{-1} , 811 cm^{-1} ve 828 cm^{-1} 'deki bandları C-H aromatik düzlemdışı deformasyon ve eğilme titreşimleri, akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin spektrumunda da görülmektedir. Akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin yapısında

heterojen azot atomu içeren aromatik yapının varlığı 1100 cm^{-1} civarındaki bandla da kendini göstermektedir. Bu sonuçlar, nanopartiküllerin başarıyla sentezlendiğini ve akridin oranjin nanopartikül yapısına girdiğini göstermektedir.

Nanopartiküllerin sınırlı boyutlarının etkisiyle yüzey atomlarındaki çok sayıda bağ kırılmaktadır. Bu da parçacık yüzeyindeki elektronların tekrar düzenlenmesiyle sonuçlanır ve kristal yapısında bazı sınırlamalar oluşur. Sonuç olarak, nanoboyuta indiğinde IR spektrumunda absorpsiyon bantları daha yüksek dalga boylarına kayar ve bu nedenle karakteristik piklerde bir miktar kayma gözlenir.

4.2. *In vitro* Akridin Oranj Yüklü poli(HEMA) Nanopartiküller ile Hücre Etkileşimleri

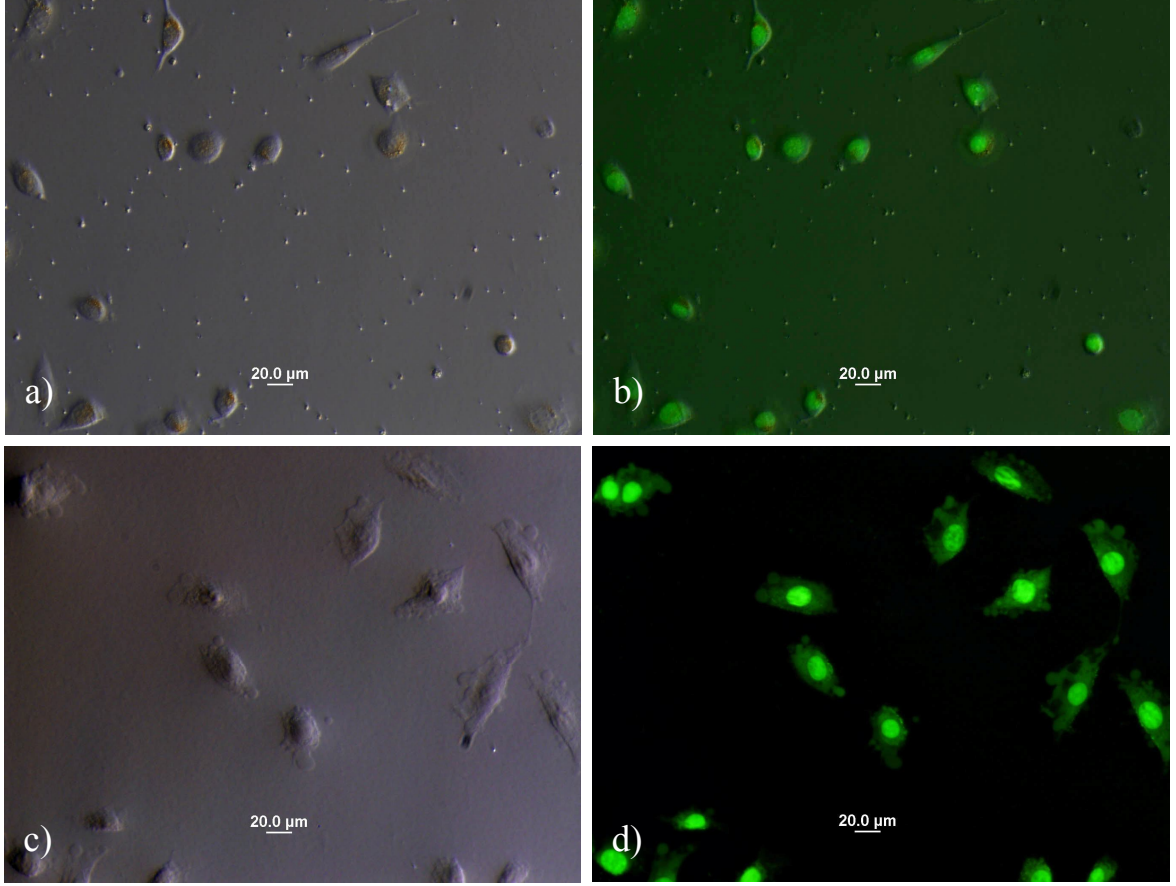
4.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Floresan mikroskop akridin oranj boyasının özelliklerini ortaya çıkarır. Akridin oranj iki tip nükleik asit için spesifiktir. Çekirdekdeki deoksiribonükleik asit (DNA) ile yeşil floresan verirken, sitoplazmadaki ribonükleik asit (RNA) ile, mevcut RNA miktarına göre kahverengi, kırmızı-kahve ve turuncu/parlak kırmızı floresan verebilmektedir. Bu spesifik histokimyasal reaksiyon hücrede protein senteziyle ilgili olan ribonükleik asitten kaynaklanır. Bölünmeyen veya nadiren bölünen hücreler (az miktarda RNA içeren) yeşilden kahverengine floresan verir. Hücre yenilenmesi gibi bir durumda bölünen hücreler orta seviyede RNA içerir ve kırmızı-kahverengi floresan verir. Malign hücreler gibi çok sık bölünen ve fazla miktarda RNA içeren hücreler ise turuncudan parlak kırmızıya floresan verir (Bertalanffy F. D.,1960).

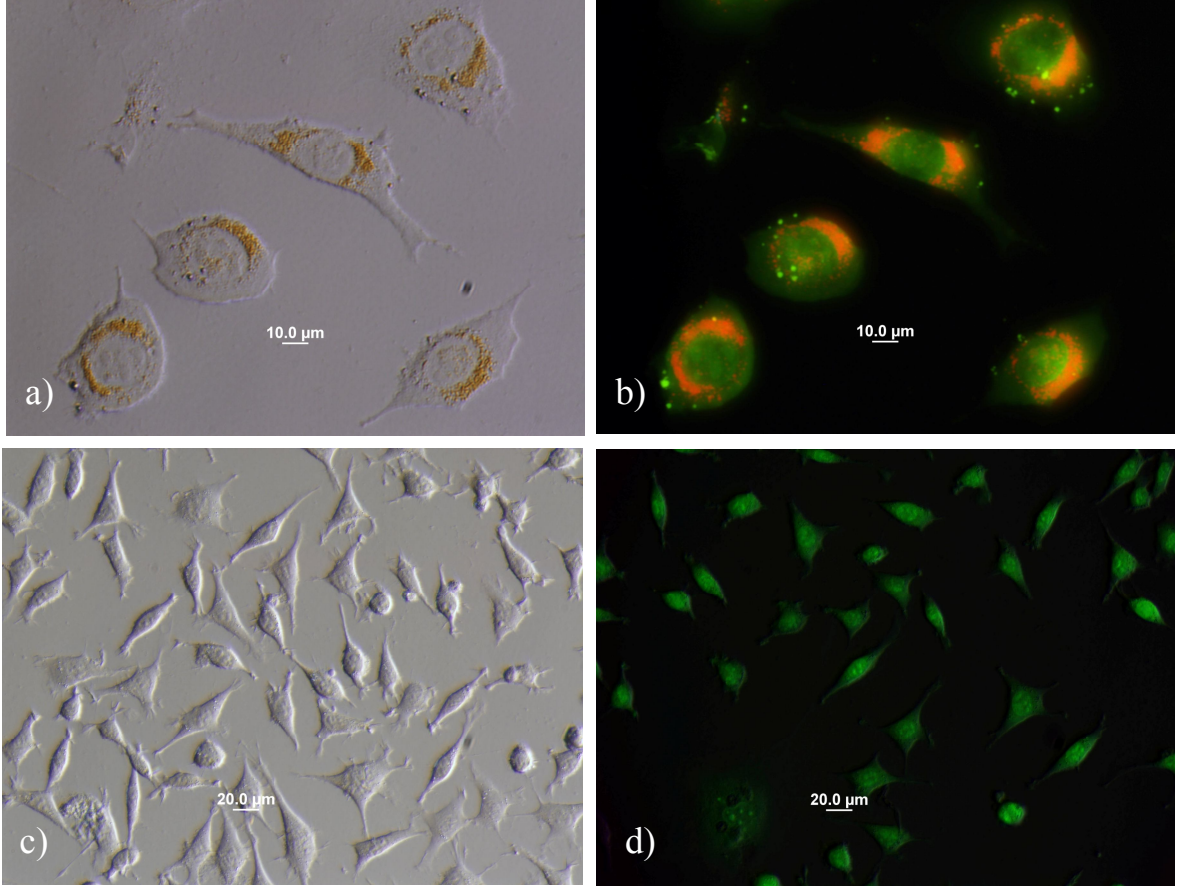
L929 fibroblast hücreleri ortama ekilmiş ve daha yüzeye tutunmadan nanopartiküller ile etkileştirilmiştir. İnkübasyondan 3 saat sonra hücreler yüzeyden kaldırılmadan nazikçe üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve ortam üç defa taze besiyeri ile yıkandıktan sonra floresan mikroskopun 510-550 nm filtresinde fotoğraflar çekilmiştir (Şekil 4.7). Aynı işlem 24, 48 ve 120 saatlik örneklerde uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrası alınan görüntüler şekil 4.8'de görülmektedir. Hücrelerin yüzeye tutundukları gözlenmiştir. Partiküllerle birlikte hücrenin çekirdeği ve stoplazması belli olmaktadır.

48 saatlik inkübasyon sonrası alınan görüntüler şekil 4.9'da görülmektedir. Sadece boya eklenmiş hücrelerde boyanın toksik etkisi gözlenirken nanopartiküller ile

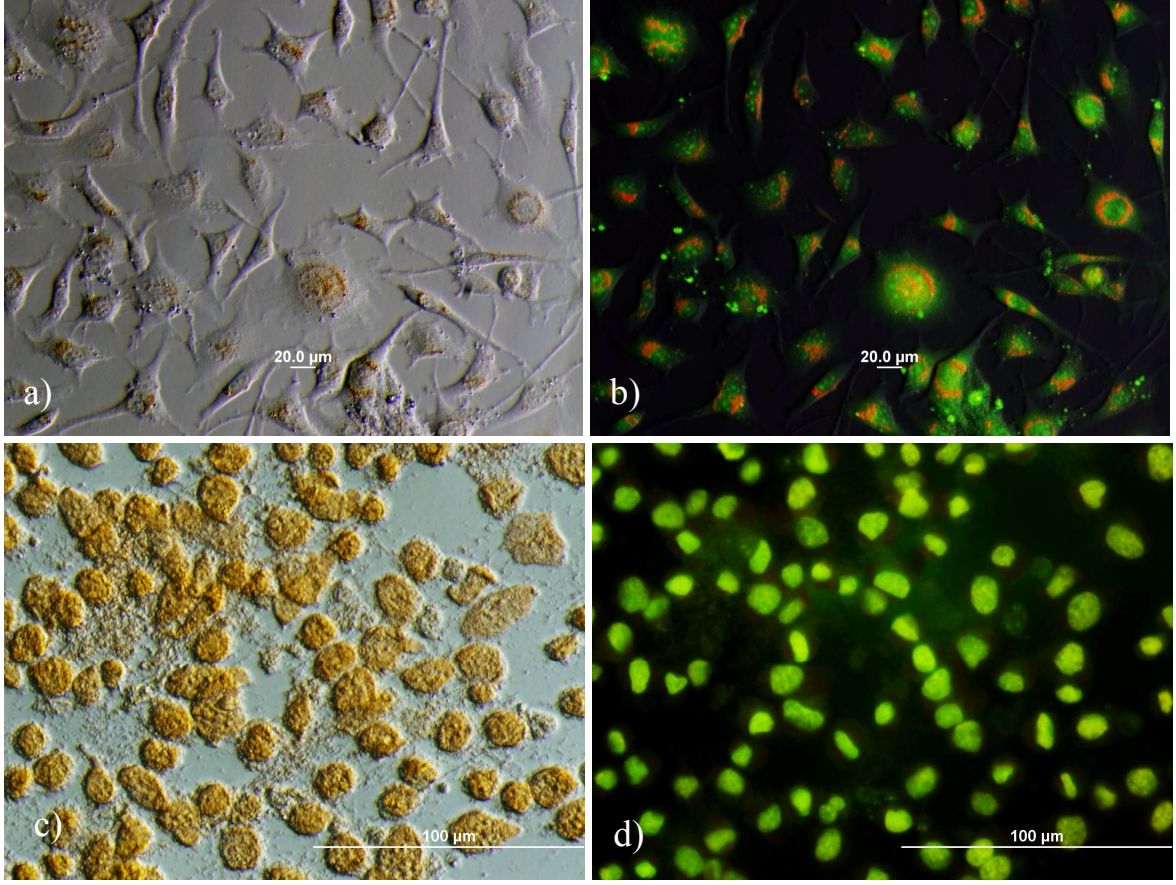
işaretlenen hücreler sağlıklı görünmektedir. 120 saatlik inkübasyon sonrası alınan görüntüler ise şekil 4.10'da görölmektedir. Sadece boya eklenmiş grupta boyanın hücreler üzerindeki toksik etkisi ve hücre sayısındaki azalma dikkat çekmektedir. Nanopartiküller ile işaretlenen hücrelerin hala canlılığını koruduğu görölmektedir.



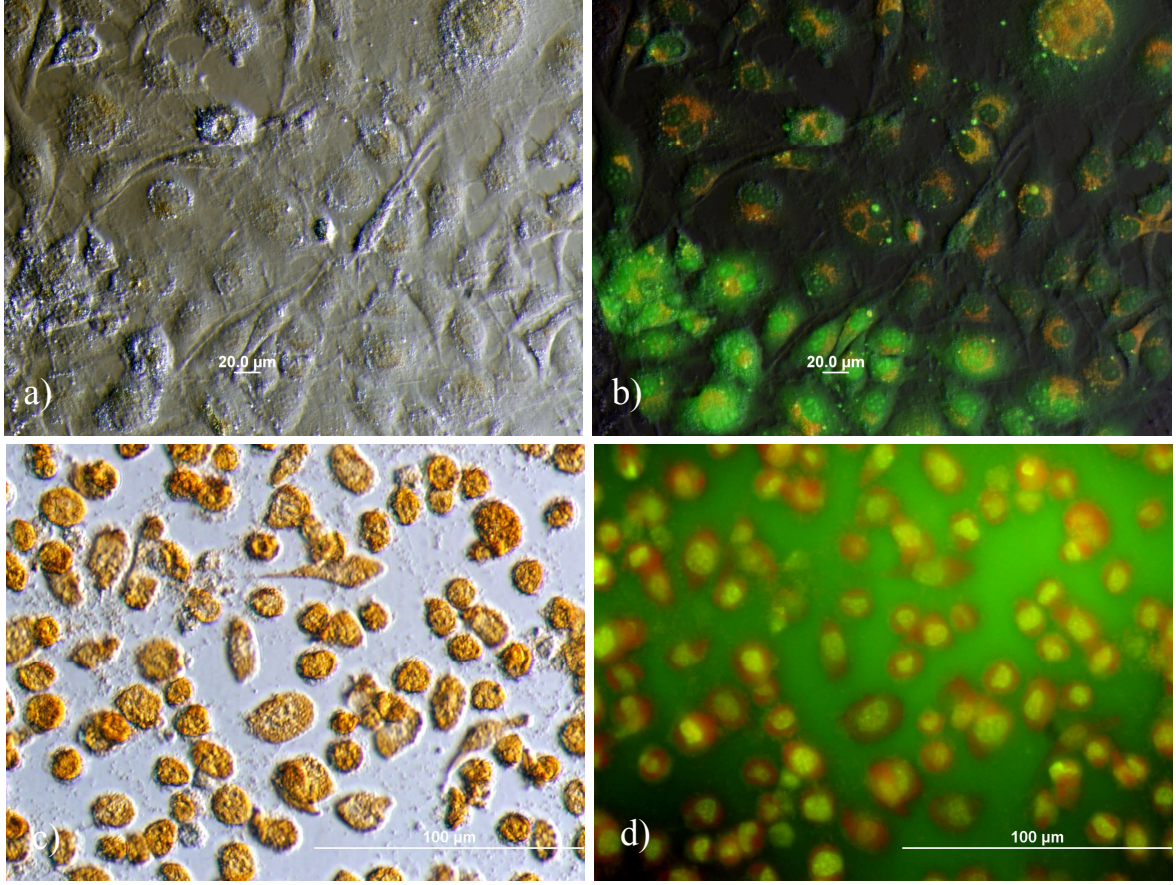
şekil 4.7. L929 fibroblast hücrelerinin inkübasyondan 3 saat sonraki görüntüleri; a) Nanopartikül eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x20), b) a'daki alanın floresan mikroskop görüntüsü (x20), c) Sadece boya eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x20), d) c'deki alanın floresan mikroskop görüntüsü (x20)



Şekil 4.8. L929 fibroblast hücrelerinin inkübasyondan 24 saat sonraki görüntüleri; a) Nanopartikül eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x40), b) a'daki alanın floresan mikroskop görüntüsü (x40), c) Sadece boya eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x20), d) Sadece boya eklenen hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü (x20)



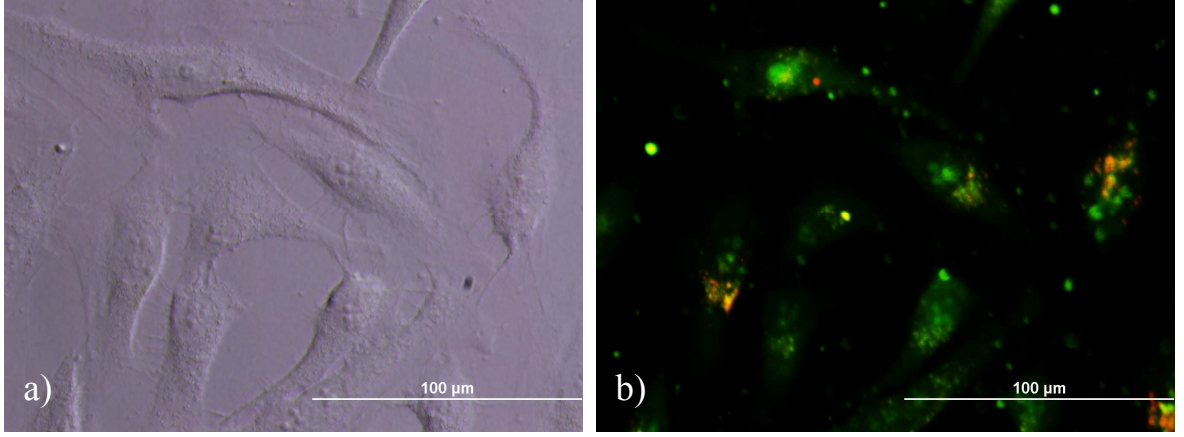
Şekil 4.9. L929 fibroblast hücrelerinin inkübasyondan 48 saat sonraki görüntüleri; a) Nanopartikül eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x20), b) a'daki alanın floresan mikroskop görüntüsü (x20), c) Sadece boya eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (20), d) Sadece boya eklenen hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü (20)



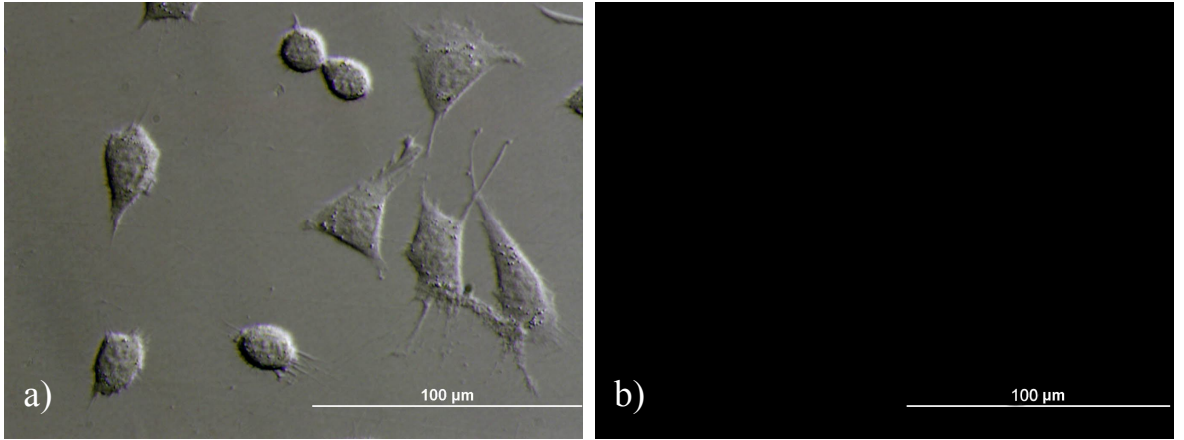
Şekil 4.10. L929 fibroblast hücrelerinin inkübasyondan 120 saat sonraki görüntüleri; a) Nanopartikül eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x20), b) a'daki floresan mikroskop görüntüsü (x20), c) Sadece boya eklenen hücrelerin inverted mikroskop görüntüsü (x20), d) Sadece boya eklenen hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü (x20)

4.2.1.1. İki Farklı Hücre Hattının Karıştırılması

Hücre kültürü çalışmalarının ikinci kısmında HeLa hücreleri üzerine nanopartiküller eklenerek hücreler işaretlenmiştir. Şekil 4.11’de nanopartiküllerle işaretlenen HeLa hücrelerinin görüntüleri gösterilmektedir. Şekil 4.12’de ise nanopartikül eklenmeyen L929 fibroblast hücrelerinin görüntüsü gösterilmiştir (n=3).



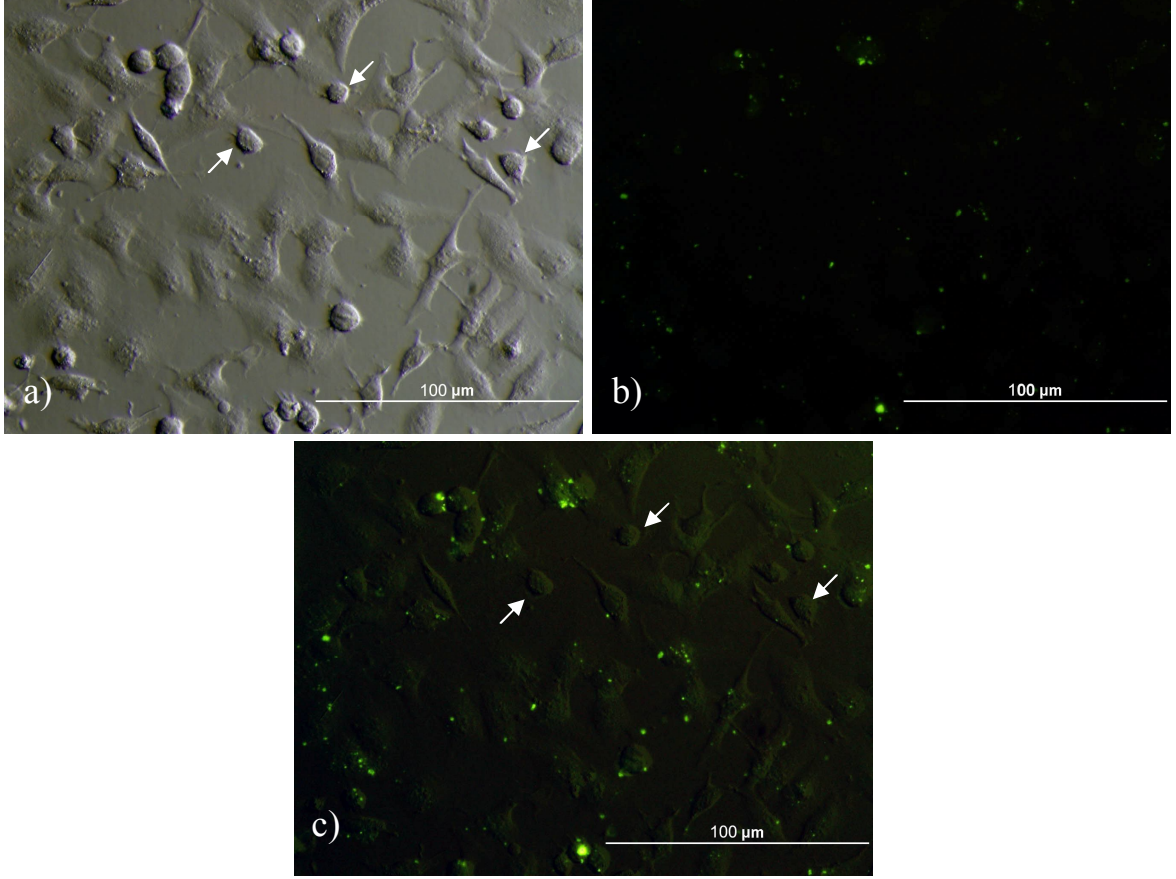
Şekil 4.11. a) İşaretlenen HeLa hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (x40), b) İşaretlenen HeLa hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü (x40)



Şekil 4.12. a) İşaretlenmeyen L929 fibroblast hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (x40), b) İşaretlenmeyen L929 fibroblast hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü (x40)

Her iki hücre hattının da yüzeye tutundukları ve sağlıklı oldukları ifade edilebilir. HeLa hücrelerinin inverted mikroskop görüntülerinde L929 fibroblast hücrelerinden farklı olduğu ve floresan mikroskop görüntülerinde ışıma yapan partikülleri içerdiği gösterilmiştir (Şekil 4.11).

Nanopartiküllerle işaretlenen HeLa hücreleri ile işaretlenmeyen L929 fibroblast hücreleri aynı ortamdayken çekilmiş floresan mikroskop görüntüleri şekil 4.13'de görülmektedir (n=3).

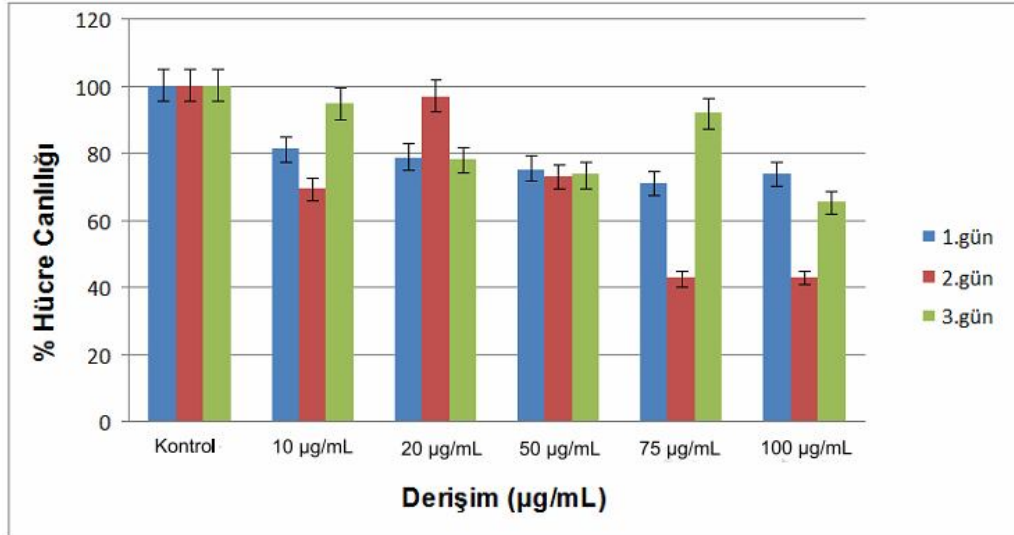


Şekil 4.13. Aynı ortamdaki işaretlenmiş HeLa hücreleri ile işaretlenmeyen L929 fibroblast hücrelerinin görüntüleri; a) İnverted mikroskop görüntüsü, işaretlenmeyen L929 fibroblast hücreleri ok ile gösterilmiştir (x20), b) Floresan mikroskop görüntüsü, işaretli olmayan L929 fibroblast hücreleri fark edilmemekteyken; işaretli olan HeLa hücreleri parlamaktadır (x20), c) a'daki ve b'deki görüntünün üst üste çakıştırılması, inverted mikroskopunda görününen ancak floresan mikroskopunda belli olmayan L929 fibroblast hücreleri ok ile gösterilmiştir (x20)

4.2.2. Sitotoksosite Testi (MTT)

MTT testi ile polimerik yapıların sitotoksik olup olmadıkları veya sitotoksosite oranları belirlenebilir. MTT analiz sonuçlarına göre, kontrol plağından alınan absorbanların ortalaması %100 kabul edilerek, test kuyucuklarından alınan absorbanların ortalamaları ile karşılaştırma yapılmış ve standart sapmaları hesaplanarak nanopartiküllerin farklı derişimlerdeki toksisiteleri şekil 4.14'teki grafikte gösterilmiştir (n=6).

Üç gün boyunca alınan farklı derişimlerdeki nanopartikül içeren gruplar ile kontrol grubu arasında düşük derişimlerde (10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL) anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir. Yüksek derişimlerdeki (75 µg/mL, 100 µg/mL) nanopartiküller ise hücre canlılığını azaltmıştır.



Şekil 4.14. Farklı derişimlerdeki nanopartiküllerin hücre canlılığı üzerine etkisi

% Hücre canlılığının günlere göre değişimini çizersek 2. günde 75 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarının hücrelerin yarısını öldüren IC₅₀ değeri olarak kabul edilebileceğini söyleyebiliriz.

TARTIŞMA

Embriyonik kök hücre çalışmalarında, tek bir hücreden organizmanın tamamının nasıl oluştuğu yoğun olarak çalışılan bir konudur. Embriyonik dönemde hangi hücrelerin gelişerek vücudun hangi kısmını oluşturduğu ya da hücreler arasındaki hangi sinyallerin hücre/hücre gruplarını farklılaştırarak özelleşmiş dokuları oluşturduğu merak konusudur. Bu embriyonik kök hücrelerin yetişkin bir organizmaya verilmesi durumunda, diğer önemli sorunlar; hücrelerin nereye göç edecekleri, nasıl farklılaşacakları ve yavru hücrelere ne olacağıdır.

Nakledilmiş hücrelerin göçünü ve hedefe ulaşabilirliğini belirlemek için kullanılan bazı yöntemler; biyoluminesans, radyoaktif izotoplar, yakın kızılötesi floresan ve kontrast maddelerin kullanıldığı manyetik rezonans görüntülemelerdir.

Süper paramanyetik demir oksit çekirdekler, TEM ya da MRG gibi yöntemlerle tespit edilebilir. Ancak bu tür kompleks nanopartiküllerin sentezi ve hücrelerle inkübasyonu sonrası değerlendirilmesi daha zordur (Taylor ve ark., 2000; Bhargava ve ark., 1998). Canlı hücreler tarafından yutulan demir oksit nanopartiküller inert değildir. Biyobozunur olmalarından dolayı serbest kalan demir hemoglobinin ile birleşir. Birkaç ay sonra vücutta hiçbir partikül kalıntısı kalmaz (Papak ve ark., 2005).

Uzun süreli araştırmalarda, kuantum noktalarının kontrast madde olarak kullanımı mümkün olmakla birlikte, canlı dokuda aylarca hatta yıllarca kalabilirler. Birçok katman ile enkapsüle edilmiş olsa bile, yıllar içerisinde kuantum noktalarından toksik iyonların salınması söz konusudur.

Piyasada mevcut olan polistiren partiküller ise hidrofobik özellikte olduğu için biyolojik sistemlerde partiküllerin yüzeyine özgül olmayan bağlanmalar gerçekleşecektir. Özgül olmayan bu bağlanmaları en aza indirmek için yüzeyi kaplamak gerekmektedir.

Radyoaktif izotopların çabuk bozunması ve uzun süre saklanamaması gibi dezavantajları vardır. Oysa ki floresan işaretli reaktifler, büyük ölçekte hazırlanabilir ve altı aydan daha uzun süre saklanabilir. Floresan işaretleme, radyoaktif işaretlemeden daha düşük maliyetlidir.

Organik boyalar, hala sıklıkla kullanılan floresan işaretleyicilerdir. Küçük moleküller olmaları, yüksek tuz konsantrasyonunda bile suda iyi çözünmeleri, uygulama protokollerinin kolay olması gibi birçok avantajının yanında; çabuk sönüm göstermeleri ve fotokimyasal kararlılıklarının zayıf olması gibi dezavantajları mevcuttur.

Organik florofor işaretli floresan lateks nanopartiküller organik boyaların eksikliğini ortadan kaldırmak için iyi bir alternatif sunar. FITC veya rodamin gibi tekli organik floroforların aksine her nanopartikül polimerik kabuk içine enkapsüle edilmiş, dış çevreden korunan binlerce florofor molekülü içermektedir. Buna bağlı olarak bu nanopartiküller tekli florofor moleküllerinden daha parlak ışık yayar. Ayrıca florofor molekülleri dış çevreden daha az etkilenir ve sönüme karşı daha dirençlidir (Taylor ve ark.; 2000).

Floresan boyanın polimerik bir partiküle bağlanması farklı yollarla gerçekleşebilir. Bu, partikül yüzeyine fiziksel adsorpsiyon (Charreyre ve ark., 1995) ya da floresan bir monomerin kopolimerizasyonu ile meydana gelebilir (Tronch ve ark., 2003). Fiziksel adsorpsiyon değişen çevresel koşullarda kararsızlığa neden olabilir ve adsoblanan floresan boya desorbsiyona uğrayabilir. Diğer bir yaklaşım, hidrofobisitesi yüksek olan floresan boyanın polimerik matriks içine gömülmesidir. (Mailander ve ark., 2009).

Miniemülsiyon polimerizasyonu mevcut olan birçok habercinin (floresan boya, manyetit (Fe_3O_4), gadolinyum kompleksleri gibi) bir arada enkapsüle edilmesine olanak sağlayarak nanopartikül-hücre çalışmalarını kolaylaştırır.

Bu çalışma kapsamında, L929 fibroblast hücreleri ile etkileştirmek üzere akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküller miniemülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. poli(HEMA) toksik ve antijenik özellikler taşıması, kolaylıkla sterilize edilebilmesi ve biyoyumluluğunun çok yüksek bir polimer olması sebebiyle birçok biyotıp ve biyoteknolojik uygulamada kullanılmaktadır.

Nanopartiküllerin karakterizasyonu Zeta Sizer, Zeta Potansiyel, AFM, SEM, TEM, FTIR, Elemental Analiz ve Floresan Mikroskop kullanılarak yapılmıştır.

Partiküllerin boyutu ve boyut dağılımı nanopartiküler sistemlerin en önemli özelliklerinden birisidir. Bu, nanopartiküllerin biyolojik ortamdaki kaderlerini, toksisitelerini, hedeflenme kabiliyetlerini ve kararlılıklarını belirler. Morfolojik incelemeler sonucu nanopartiküllerin küresel formda oldukları gösterilmiştir. Zeta Sizer, AFM, SEM ve TEM sonuçları birbirlerini desteklemektedir. Nanopartiküllerin ortalama boyutu 63 nm'dir. Partikül dağılımının monodispers sistemlere yakın olduğu bulunmuştur. FTIR ve Elemental Analiz sonuçlarına göre akridin oranjin nanopartiküllerin yapısına katıldığı görülmüştür.

Hücre kültürü çalışmalarında, akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküller L929 fibroblast hücre hattı ile etkileştirilmiştir. İşaretlenen hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri çekilmiş ve sadece akridin oranj ile boyanan hücrelerle karşılaştırılmıştır. Sadece akridin oranj uygulanan gruplarda boyanın toksik etkisinden dolayı, hücre sayısının gün geçtikçe azaldığı ve hücrelerin yüzeyden koparak öldüğü gözlenmiştir. Halbuki aynı süre zarfında nanopartiküller ile işaretlenmiş hücrelerin morfolojik olarak daha sağlıklı olduğu görülmüştür.

Bundan ayrı olarak nanopartiküller HeLa hücreleri ile etkileştirilmiş ve hücrelerin işaretlenmesi sağlanmıştır. İşaretlenen HeLa hücreleri işaretlenmeyen L929 fibroblast hücreleriyle aynı ortama konulmuştur. İşaretlenen HeLa hücreleri floresan mikroskopta ışımaya gösterirken işaretlenmeyen L929 fibroblast hücreleri doğal olarak ışımaya göstermemiştir. Böylece, farklı iki hücre hattı aynı ortamda birbirinden ayrılmış olmaktadır. Akridin oranj saf olarak hücrelere verildiğinde, boyanın toksik etkisinden dolayı hücre ölümü gerçekleşeceği için bu uygulamanın yapılabilmesi mümkün değildir.

Farklı derişimlerdeki nanopartiküllerin L929 fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi MTT analizi yapılarak ölçülmüştür. Analiz sonuçlarına göre, düşük nanopartikül derişimlerinin (10 µg/mL, 20 µg/mL ve 50 µg/mL) kontrol grubuna göre hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı, ortalama % 75 canlılık veriminin korunduğu gözlenmiştir. Yüksek derişimdeki nanopartiküllerin (75 µg/mL ve 100 µg/mL) kontrol grubuna göre hücre canlılığı üzerinde toksik etkisi olduğu söylenebilir. Akridin oranjin antikanser ajanı olarak kullanıldığı göz önüne alınırsa, yüksek derişimdeki nanopartiküllerin hücreler üzerinde olumsuz bir etki göstermesi normaldir.

Sonuç olarak sentezlenen akridin oranj yüklü poli(HEMA) nanopartiküllerin, L929 fibroblast ve HeLa hücreleri tarafından alındığı tespit edilmiştir. Bu nanopartiküllerin, iki farklı hücre tipinin birbirinden ayrılmasında ve *in vitro* takibinde kullanılabilir olduğu ileri sürülebilir.

Ancak, nanopartiküllerin hücre içindeki lokalizasyonu belirlenememiştir. Bu yüzden ileriye yönelik çalışmalarda hücre içindeki partiküllerin TEM ile gösterilmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca *in vivo* alışmalar ile işaretlenmiş hücrelerin belirli bir süre sonra hayvandan alınan histolojik kesitlerde gösterilmesi önemli bir bulgu olacaktır.

KAYNAKLAR

- Alemdaroglu F. E., N. C. Alemdaroglu, P. Langguth and A. Herrmann, 2008, Macromol. Rapid Commun., 29, 326.
- Antonietti M., K. Landfester, 2002, Polyreactions in miniemulsions, Prog. Polym. Sci. 27,689– 757.
- Arshady R., 1996, Desk reference of functional polymers. In editors, Synthesis and applications. Washington, DC: Americal Chemical Society, p. 699-717.
- Bertalanffy F. D., 1960, Cytodiagnosis of Cancer Using Acridine Orange with Fluoresence Microscopy, CA Cancer J Clin; 10; 118-123.
- Bhalgat, M. K.; Haugland, R. P.; Pollack, J. S.; Swan, S.; Haugland, R. P. J. Immunol. Methods 1998, 219, 57–68.
- Bottini M., F. Cerignoli, D. M. Mills, F. D’Annibale, M. Leone, N. Rosato, A. Magrini, M. Pellecchia, A. Bergamaschi and T. Mustelin, 2007, J. Am. Chem. Soc., 129, 7814.
- Candau, F., 1987, Encyclopedia of Polymer Sci. and Engineering, John Wiley: New York, Vol. 9, pp. 718-724.
- Candau, F., 1992, Polymerization in Organized Media, Gordon and Breach: Paris, Chapter 4.
- Cédric Vonesch, François Aguet, Jean-Luc Vonesch, and Michael Unser, 2006, The Colored Revolution of Bioimaging, IEEE Signal Processing Magazine, 20,31.
- Charreyre, M. T., Zhang, P.; Winnik, M. A.; Pichot, C., Graillat, C. Adsorption of rhodamine-60 onto polystyrene latex-particles with sulfate groups at the surface, J. Colloid Interface Sci. 1995, 170, 374–382.
- Chithrani B. D., Arezou A. Ghazani, and Warren C. W. Chan, 2006, Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells Nano Lett., 6 (4), pp 662–668.
- Dawson, GF., Halbert, GW., 2000, The *in vitro* cell association of invasin coated polylactide-co-glycolide nanoparticles, Pharmaceutical Research, 17, 1420-5.
- Darzynkiewicz Z., Frank Traganos, Jan Kapuscinski, and Myron R. Melamed, 1985, Denaturation and condensation of DNA in situ induced by acridine orange in relation to chromatin changes during growth and differentiation of Friend erythroleukemia cells. Cytometry, 6: 195 p.
- European Technology Platform, 2006, Nanomedicine, Nanotechnology for Health, 10 p.
- Gao H., 1991, The Front of Analytical Chemistry (Beijing: SciencePress).

- Geng Y., P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko and D. E. Discher, 2007, Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, *Nat. Nanotech.*, 2, 249.
- Gu J. X. ,W. P. Cheng, J. G. Liu, S. Y. Lo, D. Smith, X. Qu and Z. Yang, 2008, *Biomacromolecules*, 9, 255.
- Gupta A. K., M. Gupta, S. J. Yarwood and A. S. G. Curtis, 2004, Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organisation of human fibroblasts *J. Control. Release*, 95, 197.
- Han J. and Burgess K., 2010, Fluorescent indicators for intracellular pH, *Chem. Rev.*, 110, 2709-2728.
- Harush-Frenkel O., N. Debotton, S. Benita and Y. Altschuler, 2007, Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353, 26.
- Hirsch L. R., R. J. Stafford, J. A. Bankson, S. R. Sershen, B. Rivera, R. E. Price, J. D. Hazle, N. J. Halas and J. L. West, 2003, Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 13549.
- Holzapfel V., A. Musyanovych, K. Landfester, M. R. Lorenz and V. Mailander, 2005, Preparation of fluorescent carboxyl and amino functionalized polystyrene particles by miniemulsion polymerization as markers for cells *Macromol. Chem. Phys.*, 206, 2440.
- Junyan Han and Kevin Burgess, 2010, Fluorescent Indicators for Intracellular pH *Chem. Rev.* 110, 2709–2728
- Jin H., D. A. Heller and M. S. Strano, 2008, Single-Particle Tracking of Endocytosis and Exocytosis of Single-Walled Carbon Nanotubes in NIH-3T3 Cells, *Nano Letters*, 8, 1577.
- Ichimura, S., 1975, Differences in Red Fluorescence of Acridine-Orange Bound to Single-Stranded Rna and DNA. *Biopolymers*, 14(5): p.1033-1047.
- Ito A., H. Honda and T. Kobayashi, 2005, cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of “heat-controlled necrosis” with heat shock protein expression *Cancer Immun. Immun.*, 55, 320-328.
- Lerman, L.S., 1984, Citation Classic - Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines. *Current Contents/Life Sciences*, (51): p. 19-19.
- Lorenz M. R., V. Holzapfel, A. Musyanovych, K. Nothelfer, P. Walther, H. Frank, K. Landfester, H. Schrezenmeier and V. Mailander, 2006, *Biomaterials*, 27, 2820.

- Loo, C.; Lowery, A.; Halas, N.; West, J.; Drezek, R.; Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy. 2005. Nano Letters Vol. 5, No. 4, 709-711.
- Luppa P B, Sokoll L J and Chan D. W., 2001, Immunosensors -principles and applications to clinical chemistry, Clinica Chimica Acta, 314, 1–26.
- Mailander V., Landfester K., 2009, Interaction of Nanoparticles with Cells, Biomacromolecules 10, 2379-2400.
- Matsumura Y. , T. Hamaguchi, T. Ura, K. Muro, Y. Yamada, Y. Shimada, K. Shirao, T. Okusaka, H. Ueno, M. Ikeda and N. Watanabe, Br., Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin, J. Cancer, 2004, 91, 1775.
- Matz MV, Lukyanov KA, Lukyanov SA, 2002, Bioessays, Family of green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow, 24:953.
- Mao Z., B. Wang, L. Ma, C. Gao and J. Shen, 2007, The influence of polycaprolactone coating on the internalization and cytotoxicity of gold nanoparticles, Nanomed., Nanotech. Biol. Med., 3, 215.
- Natarajan A., C. Gruettner, R. Ivkov, G. L. DeNardo, G. Mirick, A. Yuan, Foreman A. and S. J. DeNardo, 2008, NanoFerrite particle based radioimmunonanoparticles: Binding affinity and *in vivo* pharmacokinetics Bioconjugate Chem., 19, 1211.
- Nuhan Puralı, 2004, Fonksiyonel hücre görüntüleme teknikleri, Hacettepe Tıp Dergisi 35:107-113.
- Qaddoumi M. G., H. Ueda, J. Yang, J. Davda, V. Labhasetwar and V. H. L. Lee, 2004, The characteristics and mechanisms of uptake of PLGA nanoparticles in rabbit conjunctival epithelial cell layers. Pharm. Res., 21, 641.
- Pan J, Feng SS., 2008, Folate-decorated poly (lactide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel, Biomaterials, 29:2663-2672.
- Parvesh Sharma , Scott Brown, Glenn Walter, Swadeshmukul Santra, Brij Moudgil , 2006, Nanoparticles for bioimaging, Advances in Colloid and Interface Science 123–126; 471–485.
- Parak J. W., T. Pellegrino, C. Plank, 2005, Labelling of cells with quantum dots, Nanotechnology 16 R9-R25.
- Philippe Belmont, Johann Bosson, Thomas Godet and Martin Tiano, 2007, Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now?, AntiCancer Agents in Medicinal Chemistry, 7, 139-169.

- Rice J. M., J. A. Hunt, J. A. Gallagher, P. Hanarp, D. S. Sutherland and J. Gold, 2003, Quantitative assessment of the response of primary derived human osteoblasts and macrophages to a range of nanotopography surfaces in a single culture model *in vitro* Biomaterials, 24, 4799.
- Sakum S., M. Hayashi and M. Akashi, 2001, Design of nanoparticles composed of graft copolymers for oral peptide delivery, Adv. Drug Delivery Rev., 47, 21.
- Schrand A. M., H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, E. Osawa, S. M. Hussain and L. Dai, 2007, Are Diamond Nanoparticles Cytotoxic?, J. Phys. Chem. B, 111,2.
- Sunderland C. J., M. Steiert, J. E. Talmadge, A. M. Derfus and S. E. Barry, 2006, Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer, Drug Develop. Res., 67, 70.
- Tang (ed.) X. M., 2003, Medical Cell Biology, Science Press of China, first edition, Beijing, 285.
- Taylor J. R, Fang M. M. and Nie S. M., 2000, Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles Anal. Chem. 72 1979-86.
- Tronc, F., Li, M., Lu, J. P., Winnik, M. A., Kaul, B. L., Graciet, J. C., 2003, Fluorescent Polymer Particles by Emulsion and Miniemulsion Polymerization, J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 41, 766–778.
- Trewyn B. G., J. A. Nieweg, Y. Zhao and V. S. Y. Lin, 2008, Biocompatible mesoporous silica nanoparticles with different morphologies for animal cell membrane, penetration Chem. Eng. J., 137, 23.
- Wang F., Wee Beng Tan, Yong Zhang, Xianping Fan and Minquan Wang, 2006, Luminescent nanomaterials for biological labelling, Nanotechnology, 17 R1-R13.
- Wolfgang J. Parak, Teresa Pellegrino and Christian Plank, 2005, Labelling of cells with quantum dots, Nanotechnology 16, R9-R25.
- Xia T., M. Kovichich, M. Liong, J. I. Zink and A. E. Nel, 2008, Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways, ACS Nano, 2, 85-96.
- Xiong H. M., Y. Xu, Q. G. Ren and Y. Y. Xia, 2008, Stable Aqueous ZnO Polymer Core-Shell Nanoparticles with Tunable Photoluminescence and their Application in Cell Imaging, J. Am. Chem. Soc., 130, 7522.
- Vihola H., A. K. Marttila, J. S. Pakkanen, M. Andersson, A. Laukkanen, A. M. Kaukonen, H. Tenhu and J. Hirvonen, 2007, Int. J. Pharm., 343, 238.
- Yalow R.S. and Berson S. A., 1959, Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods Nature 184, 1648–9.

- Yezhelyev MV, Gao X, Xing Y, Al-Hajj A, Nie S, O'Regan, 2006, RM: Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncol.*7,657-667.
- Zahr A. S., Cheryl A. Davis, and Michael V. Pishko, 2006, Macrophage Uptake of Core-Shell Nanoparticles Surface Modified with Poly(ethylene glycol) *Langmuir*, 2006, 22 (19), pp 8178–8185

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :İlgım GÖKTÜRK

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum tarihi : 11.03.1986

Medeni Hali : Bekar

Yazışma adresi : Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD
06800 Beytepe Çankaya/Ankara/TÜRKİYE

Elektronik posta adresi : ilgim@hacettepe.edu.tr

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans 2004-2008 : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD

İş Tecrübesi:

2009-devam ediyor: Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı.