

**ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ FLORESAN GÖRÜNTÜLEME İÇİN
FLORESAN BOYALAR İLE ETİKETLENMİŞ İNORGANİK
NANOPARTİKÜLLER**

**INORGANIC NANOPARTICLES LABELLED WITH
FLUORESCENCE DYES FOR ENHANCED
FLUORESCENCE IMAGING**

EHSAN SANATTALAB

Prof. Dr. Tülin KUTSAL

Tez Danışmanı

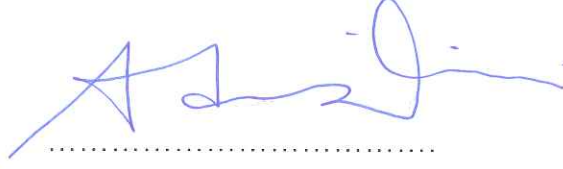
Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak
hazırlanmıştır.

2017

EHSAN SANATTALAB'ın hazırladığı "Zenginleştirilmiş Floresan Görüntüleme İçin Floresan Boyalar İle Etiketlenmiş İnorganik Nanopartiküller" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan



Prof. Dr. Tülin KUTSAL

Danışman



Yrd. Doç. Dr. Fatma YILMAZ

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 07.06.2017 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

07/06/2017


(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı
Ehsan Sanattalab

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

Tarih: 05.06.2017

EHSAN SANATTALAB

ÖZET

ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ FLORESAN GÖRÜNTÜLEME İÇİN FLORESAN BOYALAR İLE ETİKETLENMİŞ İNORGANİK NANOPARTİKÜLLER

Ehsan SANATTALAB

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tülin KUTSAL

Haziran 2017, 73 sayfa

Floresan görüntüleme, enstrümantasyon ve ölçme elementi gelişmeleri sayesinde performansda sürekli iyileştirmelerle biyolojik ve prelinik çalışmalar için çok yönlü bir araç haline gelmiştir. İn vivo derin hedeflerin hassas algılanması ve görüntülenmesi, ışığın dokular tarafından difüzyonu ve absorpsiyonu ve gerçek kromoforlardan otofloresans emisyonu nedeniyle özellikle zordur. Floresan inorganik nanopartiküller, organik boyalardan önemli ölçüde farklı olabilecek ilginç optik özellikler sunar. Bu tez çalışmasında, çekirdek olarak kullanılan silika nanopartiküller stöber yöntemi ile sentezlenmiştir. İnorganik kaplama yapılmadan önce floresan etiketleme için rodamin kullanılmıştır. Silika nanopartiküller su veya etanolde dağıtılmış ve üzerine belli miktarda floresan boya konularak 24 saat karıştırılmıştır [3-4]. SiO₂/NPler sol-jel yöntemiyle inorganik tabakalar ile kaplanmıştır. Titanyum dioksit ile kaplama, sol-jel tekniği ile silika nanopartiküller üzerine uygulanmıştır. Etanolde hazırlanan Titanyum tetra isopropoksit çözeltisi (öncül) kullanılmıştır. Üretilen TiO₂-SiO₂/NPler karanlıkta saklanmıştır. İnorganik çok katmanlı nanopartiküller sentezledikten sonra karakterizasyon ve çeşitli görüntüler alınmıştır. ZetaSizer cihazını kullanarak nanopartiküllerin boyut dağılımı incelenmiştir. Nanopartiküllerin TEM fotoğrafları

kaplama işlemi yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra alınmıştır. Floresan mikroskop vasıtası ile nanopartiküllere boyaların etiketlenmesi incelenmiştir. Bu nanopartiküllerin hem bakteriler hem de insan hücre hatları ile etkileşimleri hücre kültür ortamlarında araştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: İnorganik nanopartiküller, Floresan görüntüleme, Biyo görüntüleme, Hücre canlılığı

ABSTRACT

INORGANIC NANOPARTICLES LABELLED WITH FLUORESCENCE DYES FOR ENHANCED FLUORESCENCE IMAGING

Ehsan SANATTALAB

Master of Science, Bioengineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Tülin KUTSAL

June 2017, 73 pages

Fluorescence imaging, instrumentation and probe development are a versatile tool for biological and preclinical studies, with continuous improvement in performance. Sensitive perception and visualization of deep targets in vivo is particularly difficult due to diffusion and absorption of light by tissues and autofluorescence emission from real chromophores. Fluorescent inorganic nanoparticles offer interesting optical properties that can be significantly different from organic dyes. The silica nanoparticles used as core were synthesised by the stöber method. Fluorescent labeling was done before inorganic coating was applied, for which Rhodamine was used. Silica nanoparticles were dispersed in water or ethanol and a certain amount of fluorescent dye was added and mixed for 24 hours. SiO₂ / NPler is coated with inorganic layers by sol-gel method. Coating with titanium dioxide was applied on silica nanoparticles by sol-gel technique. Titanium tetra isopropoxide solution

(precursor) prepared in ethanol was used. The $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ NPs produced is stored in the dark. Characterization and various images were obtained after synthesis of inorganic multilayer nanoparticles. The size distribution of the nanoparticles was investigated using the ZetaSizer instrument. TEM photographs of nanoparticles were taken before and after coating. Labeling of the dyes with nanoparticles was examined by means of a fluorescent microscope. Interactions of these nanoparticles with both bacterial and human cell lines have been investigated in cell culture media.

Key words: Inorganic nanoparticles, Fluorescence imaging, Bioimaging, Cell viability

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde ve gerçekleştirilmesinde bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, yol gösteren ve emeği bulunan değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Tülin KUTSAL' a;

Tez aşamasında tüm imkanlarını sunan, her zaman arkamızda olan onur duyduğumuz bilim insanı, Prof. Dr. Erhan BİŞKİN' e;

Biyokimya araştırma gurubunda bana çalışma fırsatı sunan, büyük emeği olan değerli hocam, Prof. Dr. Adil Denizli' ye;

Tıp fakültesinde bilgi ve tecrübeleri ile hep yardımcı olan değerli hocam, Prof. Dr. Ayşe Kevser Özden' e;

Özellikle çok büyük emeği olan Dr.Esra Buber' e;

Biyoloji gurubunda imkanlardan yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Mehmet Ali Onur' a;

Sevgili arkadaşlarım Ahmad Salmanogli, Araz Noroozi, Aykut Bilir, Berkay Demirci, Ozan Azgüler' e;

Zor günlerimde her zaman yanımda olan Fadime Deniz' e;

Her zaman beni destekleyen ve motive eden Anne ve Babam' a;

Espirilerini hiç bir zaman esirgemeyen abim Elyas' a;

Çalışmalarımda maddi destek sağlayan Tübitak' a (Tübitak 1003 projesi (113O864))

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
Kısaltmalar.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. NP'lerin İşlevselleştirilmesi.....	3
2.2. Biyo Görüntüleme Uygulaması İçin Nanopartikül Tasarımı.....	4
2.2.1. Optik Çekirdeğin Sentezi	4
2.2.2. Kabuğun Sentezi.....	4
2.2.3. Yüzey Değişikliği	5
2.2.4 Biyo-Konjugasyon ve Hedefleme.....	5
2.3. Biyoanaliz İçin Boya Katkılı Nanopartiküller	5
2.3.1. Organik Boyalar	6
2.3.1.1. Floresein ve Rodamin	6
2.4. Biyogörüntülemeye Kullanılan Malzemeler	7
2.4.1. Silika ve Sol-jeller.....	7
2.4.1.1. Sol-jel Yöntemi	10
2.4.2. Silika Nanopartiküllerinin Toksikliği	11
2.4.3. Boya Katkılı Silika NP'ler	11
2.4.4. Floresan Silika NP'lerin Sentezi	13

2.4.4.1. Stöber Yöntemi	13
2.4.4.2. Ters Mikroemülsiyon Yöntemi.....	14
2.4.5. Titanyum Dioksit Nanopartikülleri	15
2.5. Floresan Görüntüleme	17
2.5.1. İn-vivo Görüntüleme.....	17
2.5.2. NIR II Yayan Nanoprobalar	18
2.5.3 Yüksek Çözünürlüklü in Vivo Floresan Görüntüleme.....	19
2.5.4. Çok Modlu Görüntüleme	19
2.5.5. FLIM Görüntüleme	20
2.6. İn Vivo Görüntülemede İnorganik Nanoprobalar	20
2.7. İn Vitro Nanotoksikolojik Çalışmalar.....	21
2.7.1. Hücre Etiketleme ve Hücresel Etkileşim İçin Biyomoleküler İşlevselleştirme..	24
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	31
3.1. Deneyde Kullanılan Malzemeler	31
3.2. Silika Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	31
3.3. Floresan Etiketleme	31
3.4. Titanyum Dioksit Nanoparçacıkların Silika Nanopartiküllerine KaplanmasıKaplanmas.....	32
3.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	33
3.5.1. Nanopartiküllerin Boyut Analizi	33
3.5.2. Nanopartiküllerin Yüzey Yükü Analizi	33
3.5.3. SiO ₂ @ TiO ₂ 'nin Kabuk Yapısı ve Morfolojisi	33
3.5.4. TEM Çalışmaları	34
3.5.5 FTIR Çalışmaları.....	34
3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	35
3.6.1. MTT Testi ile Hücre Canlılığının İncelenmesi.....	35

3.6.2. Floresan Mikroskop Çalışmaları.....	37
3.6.3. Antibakteriyel Aktivitenin İncelenmesi	37
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1. Silika Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Floresan Etiketlenmesi.....	39
4.2. Titanyum Dioksit Nanoparçacıkların Silika Nanopartiküllerine Kaplanması.....	39
4.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	40
4.3.1. Nanopartiküllerin Boyut Analizi.....	40
4.3.2. Nanopartiküllerin Yüzey Yükü Analizi.....	43
4.4. FTIR Sonuçları	44
4.5. SiO ₂ @ TiO ₂ 'nin Kabuk Yapısı ve Morfolojisi.....	46
4.5.1. TEM Görüntüleme Sonuçları	46
4.6. Floresan Mikroskop Görüntüleri.....	48
4.6.1. Hücreler ile Nanopartiküllerin Etkileşmesi.....	51
4.7. MTT Testi ile Hücre Canlılığının İncelenmesi.....	52
4.8. Antibakteriyel Aktivitenin İncelenmesi.....	54
5. SONUÇLAR.....	55
KAYNAKLAR'	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. SiO ₂ @ TiO ₂ CSNs sentezi için kullanılan formülasyon parametrelerinin özeti ve analizinden elde edilen parçacık boyutu dağılımı.....	41
--	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. boya katkılı silika NP'lerin transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) görüntüsü. Ölçek çubuğu = 500 nm	12
Şekil 2.2. Boya katkılı NP'leri kullanarak floresan sinyal amplifikasyonu: (a) saf su (kontrol); (B) tetrametilrhodamin (TMR) boya, 1.5×10^{-9} M; (C) TMR katkılı NP, 1×10^{-13} M	13
Şekil 2.3. Çeşitli FITC, R6G ve ROX boyanacak oranlara sahip NP'lerin floresan emisyonu: (a) NP numunelerinin emisyon spektrumları ve (b) 1: 0: 0, 0: 1: 0, 1: 0: 1, 4: 1.5: 3, 0.5'lik FITC: R6G: ROX boya katkılama oranları için 300 nm ultraviyole uyarım altında NP numunelerinin rengi : 0.5: 0.5, 2: 2: 2, 0: 1: 1 ve 0.5: 0.5: 4 (soldan sağa)	15
Şekil 2.4. NIR I (sol) ve NIR II (sağ) aralığında, kuyruk damarına enjekte edilen SWNT kullanılarak beyin vaskülatürünün in vivo kafes içi floresan görüntülenmesi..	19
Şekil 2.5. Sol-jel kaplama işleminin adapte edilmiş şematik çizimi (MxOy: SiO ₂ , Al ₂ O ₃ , TiO ₂ veya ZrO ₂)	22
Şekil 2.6. Etiketlenmemiş ve R6G etiketli nanopartiküllerin floresan yoğunluklarının yükselmesi doğrudan sentezden sonra. Üst ve alt satırlar süspansiyonda 525 nm uyarımda emisyon spektrumları, floresan mikroskopi görüntüsü	23
Şekil 2.7. SiO ₂ // R6G // TiO ₂ nanopartiküllerine 72 saat maruz bırakıldıktan sonra insosteoblast hücrelerinin floresan mikroskopi görüntüsü. Kırmızı floresan nanopartiküller gözlenebilir	24
Şekil 3.1. 105 ° C'de HTT'den sonra elde edilen, kaplanmamış silika, desteksiz TiO ₂ (T1 numunesi) ve hidrotermal kristalleşmiş CSNs örneklerinin XRD modelleri.....	34
Şekil 3.2. 2 saat boyunca havada 600 ° C'de kalsine edilen saf titanyum ve titanyum silika kompozit nanopartiküllerin FT-IR iletim spektrum: (a) SGH serisi ve (b) SG serisi (* Ti-O-Si titreşimi)	35
Şekil 3.3. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri.	36
Şekil 3.4. (A) MTT ve formazanın kimyasal yapısı. (B) MTT ve formazanın absorpsiyon spektrumu	37
Şekil 3.5. MTT uygulandıktan 4 saat sonra formazan bileşiğinin görüntüsü.	37

Şekil 4.1. Silika nanopartiküllerin boyut analizi.	40
Şekil 4.2. Zeta Sizer'dan elde edilen titanyum dioksit kaplı boyalı silika nanopartiküllerin boyut analizi.	41
Şekil 4.3. Zeta Sizer'dan elde edilen titanyum dioksit kaplı boyalı silika nanopartiküllerin boyut analizi.....	42
Şekil 4.4. Zeta Sizer'dan elde edilen titanyum dioksit kaplı boyalı silika nanopartiküllerin zeta potansiyel analizi.....	43
Şekil 4.5. Titanyum-silika kompozit nanopartiküllerdeki Ti-O-Si bağlarının oluşumu.....	44
Şekil 4.6. Silika nanopartiküllerin TEM görüntüsü.....	46
Şekil 4.7. Titanyum dioksit kaplı silika nanopartiküllerin TEM görüntüleri.....	46
Şekil 4.8. Silika@Titanya nanokristallerinin TEM görüntüsü.....	47
Şekil 4.9. A,C,E) Rodamin 6G ile boyanmış Silika nanopartiküllerin inverted görüntüleri ve B,D,F) aynı alanların floresan mikroskop görüntüleri.....	48
Şekil 4.10. Titanyum dioksit kaplı rodamin 6G boyalı silika nanopartiküllerinin inverted mikroskop görüntüsü.....	49
Şekil 4.11. Silika çekirdekli titanyum dioksit nano kristallerin inverted mikroskop görüntüsü.....	49
Şekil 4.12. A,C,E) Titanyum dioksit kaplı rodamin 6G ile boyanmış silika nanopartiküllerin, MDA-MB-231 hücrelerine uygulanma sonucu inverted mikroskop görüntüleri ve B,D,F) aynı alanın floresan mikroskop görüntüleri.....	50
Şekil 4.13. Titanyum dioksit kaplı rodamin 6G ile boyanmış silika nanopartiküllerin, MDA-MB-231 hücrelerine uygulanma sonucu inverted mikroskop görüntüleri ve B,D,F) aynı alanın floresan mikroskop görüntüleri.....	51
Şekil 4.14. NP'lerin uygulandıktan 24 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığına etkileri.....	52
Şekil 4.15. NP'lerin 48 saat inkübasyon sonunda MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığına etkisi.....	52
Şekil 4.16. NP'lerin E. coli hücrelerindeki antimikrobiyal etkisi. Amp: Ampisilin, (1) Silika, (2) Silika@Rodamin 6G (3) Silika@Titanya (4) Silika@Titanya(5) Silika@Rodamin 6G@Titanya(6) Silika@Rodamin 6G@Titanya (7) Titanya.....	53

KISALTMALAR

CSN	Çekirdek Kabuk Nanopartikül
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FLIM	Floresan Ömür Boyu Görüntüleme
ND	Nano Elmaslar
NIR	Yakın Kızılötesi Radyasyon
NP	Nano Partikül
PAA	Poli Akrilik Asit
PAMAM	Poli Amido Amin
PE	Foton Uyarımı
PEG	Poli Etilen Glikol
PH	Hidrojenin gücü
QD	Kuantum Noktacıkları
QY	Kuantum Verim
RE-NP	Nadir Toprak Katkılı NanoPartikül
SG	Sol Jel
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TiP	Titanyum İzo Propoksit

1. GİRİŞ

Nanoyapılı malzemelerin sentezi ve karakterizasyonundaki ilerleme, sürekli gelişmekte olan nanoteknoloji ile beraber biyomedikal alanda uygulanabilirliğinde önemli ölçüde değişiklikler getirmiştir. Son zamanlarda pekçok nanoyapılı ileri elektronik materyaller dikkat çekici elektriksel, optik ve mekanik özellikleri geliştirilip, çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır. Modern malzeme biliminde yüzey kaplamaları ve modifikasyonları, materyalin güçlü oksidant, asit ve bazlar tarafından dış erozyona maruz kalmalarını engellemekte ve yüzeyi korumaktadır. Ayrıca, yüzey modifikasyonları yüzey özelliklerini kontrol etmeyi sağlarken, yüzeylere yeni fonksiyonlar kazandırmaktadır. Örneğin, kendiliğinden oluşan materyaller büyük oranla yüzey enerjisine ve yüzeydeki fonksiyonel grupların doğasına dayanmaktadır. Genelde günümüzde materyal yüzeylerinin modifikasyonu için kullanılan kimyasal birleşme, hidroliz, kendiliğinden oluşma ve plazmaya maruz kalma gibi modifikasyonlar, özellikle zaman alıcı ve karışık işlemlerdir ve her türlü yüzeye uygulanamazlar. Bundan dolayı bu alandaki araştırma ilgisi, verimli, kararlı ve herhangi bir yüzeye uygulanabilir basit kaplama yaklaşımlarının oluşturulması üzerine odaklanmıştır.

Polimerik ve seramik nanopartiküllerin boyutları ve özellikle nanoboyutta olmalarından kaynaklanan olağan dışı optik, manyetik, vb. özellikleri nedeniyle medikal alanda taşıyıcı (ilaç ve benzeri aktif ajanlar) ve görüntüleme ajanı olarak kullanılabilirlikleri kapsamlı bir şekilde çalışılmaktadır [1-3].

SiO_2 , Al_2O_3 , TiO_2 veya ZrO_2 gibi seramik nanopartiküller, dolgu maddeleri, kaplama maddeleri, boyalar, biyolojik sensörler, kromatografik analiz sistemleri, filtrasyon ortamları, kozmetikler, ilaç taşıyıcılar, katalizörler, fotonik kristaller ve diş macunu gibi çok farklı ve çok sayıda ürünlerde yer almaktadır. Özellikle görüntülemede görüntü kalitesini/çözünürlüğünü artırmak (zenginleştirmek) için yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Bu tez kapsamında silika çekirdekli, floresan boyalar ile etiketlenmiş, floresan zenginleştirmesi ile yüksek çözünürlükte görüntüleme sağlayacak titanyum dioksit kaplı çok katmanlı boyalı nanopartiküllerin üretimi yapılarak, inorganik çok katmanlı nanopartiküller sentezlenmiş ve sonra karakterizasyon ve çeşitli

görüntüler alınmıştır. Floresan inorganik nanoparçacıklar, organik boyalardan farklı olarak önemli ölçüde ilginç optik özellikleri sunmaktadır. Nanopartiküllerin boy ve boy dağılımları ve yükleri Zetasizer ile bulunmuş, TEM ile kaplama yapılmadan önce ve kaplama yapıldıktan sonra partikül görüntüleri elde edilmiştir. Floresan mikroskop ile görüntüleme yapılarak floresan etiketlemenin başarısı araştırılmıştır. Bu nanopartiküllerin hem bakteriler hem de insan hücre hatları ile etkileşimleri hücre kültür ortamlarında gösterilerek, NPlerin etkisi ile *E.coli* parçalanması sonunda oluşan ("lysis") şeffaf daire çapları ile antibakteriyel etki saptanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Modern biyomedikal görüntüleme teknolojileri, tanı ve tedavide önemli ilerlemelere neden olmuştur. Çoğu hastalık süreci moleküler ve hücresel düzeylerde gerçekleştiğinden, araştırmacılar bu süreçleri tam ve gerçek zamanlı olarak görüntüleme ve anlama konusunda zorluklarla karşılaşmaktadırlar. İdeal görüntüleme çözünürlüğü nanometre cinsindedir, çünkü çoğu biyolojik süreç bu uzunluk ölçeğinde gerçekleşir. Bu nedenle, nanopartiküllerin (NP) işlevselleştirilmesi ve bunların terapötik ve diagnostik uygulamalardaki kullanımları çok önemlidir. İnorganik NP'lerden yapılmış moleküler ve hücresel görüntüleme ajanları, biyolojik olayları girişimsel (invaziv) olmayan şekilde araştırmak için geliştirilmektedir. Küçük NP'lerin spesifik biyomoleküllerle birleşmesi, araştırmacıların arzulanan yerleri hedef almalarını, genel toksisiteyi azaltmalarını ve görüntüleme problemlerinin verimliliğini artırmalarını sağlar. Biyolojik görüntüleme uygulamaları için NP'lerin hazırlanması, çeşitli adımları içerebilir: sentez, kaplama, yüzey işlevselleştirme ve biyokonjugasyon. Mühendislikte NP yüzeylerinin en yaygın kullanılan stratejileri, fiziksel adsorpsiyon veya istenen ligandların yüzey üzerine kimyasal adsorpsiyonunu içerir. Kovalent bağlar tercih edilir ve kaplanmış NP'ler daha fazla biyo-konjugasyon için yüksek koloidal kararlılık, biyoyumluluk, suda çözünürlük ve işlevsel gruplara sahip olmalıdır. Literatürde verilen pek çok işlevselleştirme tekniği, kompleks sentez aşamaları, kötü biyoyumluluk, düşük kararlılık ve hidrofobik ürünler gibi sınırlamalar nedeniyle yeterince kullanılamamaktadır. Kimyasal adsorpsiyona dayanan kaplama stratejileri ve ligand değişimi genellikle NP'lerin yüzey özelliklerini ayarlamak için daha iyi bir yol sağlar. Uygun hedefleme ligandları, antikorları veya proteinleri ile konjugasyon yapıldıktan sonra, NP'ler onları floresan görüntüleme, manyetik rezonans görüntüleme (MR), pozitron emisyon tomografisi (PET) ve multimodal görüntüleme için kullanışlı hale getiren oldukça seçici bağlanma gösterebilir [3].

2.1. NP'lerin İşlevselleştirilmesi

NP'lerin sentezi, sırasıyla (i) hidrofobik koşullar ve (ii) sulu fazdaki doğrudan sentezin, yani önce hidrofobik ve daha sonra hidrofilik NP'lerin oluşmasını içeren iki ana kategoriye ayrılabilir. Kullanılan yüzey aktif maddelerin özelliklerinden ötürü, çeşitli NP'ler için mevcut sentetik yöntemlerin çoğunun doğada hidrofobik

olması suda çözünmezliğe neden olmakta ve daha fazla işlevselliği önlemektedir. Bu nedenle, suda çözünürlük ve işlevselleştirme, NP'lerin uygulanmasından önce önemli adımlardır ve kaplama kimyası, esnek yüzey kimyasına sahip, koloidal olarak kararlı, suda çözünür, sağlam NP'ler elde etmek için kritiktir. Ortak işlevselleştirme stratejileri arasında, (i) hidrofobik NP'lerin hidrofilik polimerler tarafından doğrudan kapsüllenmesi [4-7] (ii) ligand değişimi ile tiyoller gibi hidrofilik ligandlarla doğrudan kapsüllendirilme[8] ve (iii) amfifilik moleküller arasında birbirine eklenmiş iki tabakanın oluşturulması veya polimerler ve NP yüzeyindeki pasifleştirici sürfaktan katmanı sayılabilir [9].

Bu yaklaşımlar, asil metal NP'lerine başarıyla uygulanmıştır. Literatürde suda çözünür kuantum noktaları tasarımı için çeşitli yöntemler mevcuttur. Polimerler, miseller, tiyoller [10] ve silika [11] ideal olarak, iyi bir kaplama malzemesidir. NP'lere çoklu ve optimum bağlanma alanları, suda çözünürlük, daha fazla işlevselleştirme için kimyasal işlevsellik ve biyouyumluluk sağlamaktadırlar. NP'lerin yüzeysel işlevselleştirilmesi için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri, organik kaplamaya kıyasla birtakım avantajlara sahip silika kaplamadır [12]. Silika kaplı NP'ler, sağlam, suda çözünür, koloidal olarak kararlı, fotostabil ve biyosistemlerle düşük spesifik olmayan etkileşime sahiptirler [13].

2.2. Biyo Görüntüleme Uygulaması İçin Nanopartikül Tasarımı

Biyo görüntüleme uygulamalarında kullanılmak üzere nanopartikül sentezi için dikkate alınması gereken temel parametreler aşağıda verilmiştir.

2.2.1. Optik Çekirdeğin Sentezi

İlk adım, florokromu, örneğin boyaları veya QD(quantum dot)'leri kapsayan çekirdeğin sentezidir. Nanopartikülün hazırlanması için en çok kullanılan mikroemülsiyon sistemi "yağ içinde su" (w / o) mikroemülsiyon sistemidir ve ayrıca bu sistem yaygın olarak ters misel olarak adlandırılır. w / o mikroemülsiyonları, reaksiyon koşullarının uygulanabilmesi için (yani yüzey aktif cisim-yüzey aktif, yüzey aktif cisimlerinin ve yardımcı yüzey aktif cisimlerinin kombinasyonu, kutup ortamı bileşimi ve miktarı, yağ, sıcaklık vb.) nanopartikül tasarımına uyacak şekilde muazzam bir kapsam taşır.

2.2.2. Kabuğun Sentezi

Kabuk, optik göbeğin dış ortamdan korunmasını, böylece fotostabilitesinin artırılmasını (örneğin, organik boyalar için), optik özelliklerinin artırılmasını (örneğin, QD'ler için bir kafes uyumsuzluğu sağlayarak) ve yüzey kararlılığı ve biyokonjugasyon için moleküllere bağlanmalarını sağlar.

2.2.3. Yüzey Değişikliği

Parçacıkların pıhtılaşması ve toplanması doğal bir eğilimdir. Bununla birlikte, nanopartiküllerin tercihen herhangi bir uygulama için sulu bir ortamda uygun bir şekilde dağılmış kalması önemlidir. Bu, metal nanopartiküllerin yüzeyinin, çeşitli yüzey aktif cisimler, polimerler, kenetleme grupları gibi çeşitli dağıtıcı maddeler kullanılarak modifiye edilmesiyle sağlanır.

2.2.4. Biyo-Konjugasyon ve Hedefleme

Nanopartiküllerin istenen etki ve bağlanma bölgesine hedeflenmesi için yüzeyine, antikolar, peptidler, enzimler gibi uygun biyomoleküllerin eklenmesi gereklidir. Bu moleküllerin ayrıca, dağılmalarını sürdürmek için pasif (fizikokimyasal veya farmakolojik faktörlere bağlı olarak ilaç veya ilaç taşıyıcı sistemin belirli bir bölgede birikimi) ve aktif hedefleme (nanosistem taşıyıcısının, "tanımlayıcı ve etkileşim için seçici afiniteye sahip olan" ajanlar "ile spesifik modifikasyonu ile nanopartiküllerin ve ilaçların konjugasyonu, spesifik hücre, doku, vb.) ile gösterdikleri etki çeşitli araştırmacılar tarafından ayrıntılı olarak tanımlanmıştır [14].

2.3. Biyoanaliz İçin Boya Katkılı Nanopartiküller

Hücre içi olayların tanımlanması, karakterizasyonu ve protein-reseptör etkileşimleri, temel tıbbi çalışmalar ve terapötik uygulamalar için büyük önem taşımaktadır. Floresan etiketlemeye dayanan optik analiz yaygın olarak incelenmiştir. Canlı hücreler ve dokular gibi çeşitli biyolojik örneklerin saptanması ve in vivo görüntülemesi bu şekilde gerçekleştirilebilir. Birçok floresan etiketleme reaktifleri kullanılmaktadır, bu işlem için çoğunlukla organik fluoroforlar kullanılır. Floroforlar genellikle yüksek kuantum verimine sahiptirler ve kolayca pek çok farklı uygulamada kullanılabilirler. Bununla birlikte, genellikle sınırlı duyarlılık ve fotostabileden dolayı sorunlu olabilirler. Çoğu florofor, in vivo hücresel çalışmalar ve görüntüleme uygulamalarını engelleyen belirli bir toksik seviyeye sahiptir. Son

on yılda önemli ilerlemeler, kontrol edilen boyut ve şekle sahip nanomalzemelere dayalı çeşitli reaktiflerin etiketlenmesine yol açmıştır. Bu nanomalzemeler biyoanaliz için organik fluoroforların etkili bir alternatifi olarak heyecan verici ve çoğunlukla daha fazla boya katkılı nanopartikülleri temsil eder. Bu tür nanomalzemelerin üstün özellikleri, tek molekül seviyesinden insan vücudu uygulamalarına, in vitro tanıdan in vivo gerçek zamanlı görüntülemeye kadar farklı koşullar altında çeşitli hedeflerin hassas olarak saptanması için çoklu olanaklar sağlar. Farklı NP'ler kendi eşsiz özelliklerine sahiptir ve biyoanaliz alanında farklı uygulamalara uyarlanmıştır.

2.3.1. Organik Boyalar

Organik boyalar, biyolojide kullanılan klasik floresan etiketler arasında en erken kullanılanlardır. Düşük Stokes kayması, zayıf fotokimyasal kararlılık, tekrarlanan uyarma altında foto-ağartmaya ve bozulmaya duyarlı olma gibi doğasında olan sakıncalarına rağmen, düşük maliyetli ve kullanım kolaylığı nedeniyle hala tercih edilmektedir. Tekli organik boyalar aralıklı açma / kapama emisyonundan (yanıp sönüyor) çekilmesine rağmen, yanıp sönme tek moleküllu saptama için kullanılabilir. Ayrıca, son araştırmalarda daha iyi kimyasal ve optik özelliklere sahip organik boyalar üretilmiştir. Yaygın olarak kullanılan organik boyalara örnek olarak floresein, rodamin, siyanin ve alexa boyları verilebilir [15-17].

2.3.1.1. Floresein ve Rodamin

Floreseinler proteinleri etiketlemek için yaygın olarak kullanılan amin reaktif organik floroforlardır. Çeşitli floresein boyları mevcuttur ve popüler bir seçenek flüseptin-5-izotiyosiyanat (FITC) (molekül formülü $C_{21}H_{11}NO_5S$) dir. Genellikle, FITC yüksek emiş gücü, yüksek floresan kuantum verimi ve su çözünürlüğüne sahiptir. Buna ek olarak, 494 nm'de uyarım maksimumunun argon iyon lazerin 488 nm spektral çizgisiyle yakından eşleşmesi nedeniyle, FITC, konfokal lazer tarama mikroskopisi ve akış sitometresi uygulamaları için baskın fluorofordur [18]. Bununla birlikte, FITC floroforların oldukça fazla dezavantajı vardır. En önemlilerden ikisi foto-ağartmanın ve pH hassasiyetinin olmasıdır. FITC ciddi fotoblokaja açıktır ve bu nedenle floresan sabit aydınlatmada nadiren birkaç dakika kalır. Fotobirikme, FITC kullanan çalışmalarda elde edilebilecek duyarlılığı da sınırlar. Ayrıca, floresan da çevre pH'ından etkilenir ve pH değerini 7'nin altına

düşürür. Aynı zamanda FITC'den hazırlanan antikor konjugelerinin zamanla bozulması da literatürde verilmiştir [19]. Sonuç olarak, bu problemler aşırı duyarlı biyolojik araştırmalarda FITC boyaalarının kullanımını büyük ölçüde engellemekte ve sınırlamaktadır. Florodin gibi, rodamin boyalarının da biyomoleküllerin etiketlenmesinde kullanılması uzun süredir düşünülmektedir. Bunun en önemli nedenlerinden birisi, 520 nm'de argon iyon lazerin 514 nm spektrum çizgisine yakın olduğu, uyarım tepesinin bulunduğu yere bağlı olarak konfokal lazer taramalı mikroskopi ve akış sitometrisi içeren çalışmalarda bir başka çok kullanılan ve önemli bir florofor olmasıdır. FITC'ye kıyasla, 5-karboksilodamin 6G [20] sukkinimidil esteri (molekül formülü $C_{31}H_{29}N_3O_7$) gibi kırmızı-floresan rodamin boyaaları daha iyi fotostabilite ve aynı zamanda daha uzun dalga boyu emisyon maksimumu sergilemektedirler. Bu, çok renkli etiketleme veya boyama için fırsatlar yaratır ve çok renkli deneylerde FITC gibi yeşil floresan boyaalarından daha iyi spektral ayırım sağlar.

2.4. Biyogörüntülemeye Kullanılan Malzemeler

Nanomalzemeler biyogörüntülemeye yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu malzemelere silika ve organik olarak modifiye edilmiş silika, hidrofobik ve hidrofilik organik polimerler, yarıiletken organik polimerler, kuantum noktacıkları, nanoelmaslar, metal partiküller ve metal oksitler örnek verilebilir [21].

2.4.1. Silika ve Sol-jeller

Potansiyel ilaçların otomatik olarak salınması, çözünme kolaylığı ve organizmada bulunabilirlik kolaylığı, farmasötik açıdan aktif mezogözenekli silis moleküllerinin en önemli özelliklerinden bazılarıdır. Bununla birlikte, silika nanopartiküllerinin biyoyumluluğu ve bu nanopartiküllerin canlı sistemlerde gösterebileceği olumsuzlukları azaltan etkileri birleştirmek için, farklı şekil, boyut ve daha sonraki fizikokimyasal özelliklere neden olabilen sentez koşullarındaki hafif değişiklikler nedeniyle, yöntemleri belirlemek zordur [22]. Üstelik kanser testlerinde belirteç olarak etkili olan ve insan testi için onaylanmış multimodal silika nanopartikülleri vardır. Geleneksel olarak kullanılan işaretleyiciler tarafından tümör dokusunda zayıf seçicilik ve onkolojik hastalıklarda spesifikliğe olan ihtiyaç nedeniyle, 7 nm çaplı multimodal silika nanopartikülleri geliştirilmiştir. Bu gibi nanopartiküller arginin-glisin-aspartik asit peptid ligandları ve radyoyodin ile yüzey işlevselleştirilir

ve tümörler ve periferik kan akışkanlarında daha yüksek bir afinite ve bekleme göstermektedir. Bu tür nanopartiküller insan üzerinde klinik araştırmalarda onaylanması ve böbrek temizliği için optimize edilmesine rağmen halen spesifik tümör hedeflemesi göstermemektedir. Silika nanopartiküller bir PEG katmanı ile kaplanmış ve amino asit ve peptid radyoaktif etiketleri ile işaretlenmiştir. Çalışmalar, çeşitli fare dokuları ve nanopartikül dozlarında nodal metastazın çeşitli modelleri üzerinde gerçekleştirilmiş ve sonuçların insan test modellerine başlanabilecek kadar etkili olduğu ortaya çıkmıştır [23].

Bu nanopartiküllerin, plasental zardan geçen ve yavruların sinir hasarına neden olan çapı 70 nm dir. Fare cenininin gelişimi sırasında olumsuz etkileri olduğu gözlenmiştir. Bununla ilgili çalışmalar, silisyum oksit nanopartiküllerinin yüksek konsantrasyonlarını (fare başına 0.8 mg'a kadar) içeren ceninleri göstermektedir [24].

Hayvan modellerinde yapılan son çalışmalar, silisyum dioksit nanopartiküllerinin inhalasyonunun akciğer inflamasyonu, miyokardiyal iskemi, atrial-ventriküler blok ve artmış fibrinojen ve kan viskozitesi gibi pulmoner ve kardiyovasküler bozukluklara neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, serbest hidroksil radikallerinin oluşmasıyla ilgili olan nanopartiküllerde boyutuna ve kompozisyonuna bağlı olarak DNA hasarı gözlenmiştir. Ayrıca, silisyum dioksit (SiO_2) nanopartiküllerinin kullanımı bir hücre hattı HaCaT'de (İnsan deri hücreleri) apoptozu indükleyerek önemli ölçüde hücre canlılığını azaltmaktadır. Bu nanopartiküllerin daha küçük boyutu, daha yüksek apoptoz oranı (nanopartiküller için 15 ve 30 nm, 10 μg / mL ve 24 saatlik bir konsantrasyonda) göstermektedir. Buna ek olarak, HaCaT hücreleri kozmetik endüstrisinde cilt için nanomalzemelerin araştırılmasına yönelik iyi bir model sağlamıştır [25].

Son yıllarda silika nanopartiküllerin uygulamalarının ve klinik ilgisinin artması bu alanın gelişmesini sağlamıştır. Bu sayede silikanın biyouyumluluğu, biyodağılımı ve toksikolojisi üzerine duyulan ilgi artmıştır. Diğer nanoyapılara kıyasla oldukça düşük toksisiteye sahiptir. Silika nanopartiküller görüntüleme ve terapötik ajanların taşınması ve ulaştırılması amacıyla araç olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Silika nanopartiküller görüntüleme kontrast ajanı ve ablatif tedavilerde hassaslaştırıcı ajan olarak hayvan deneylerinde de kullanılmaktadır. Bu da çeşitli

görüntüleme teknolojilerine uyarlanabilirliğini başarıyla göstermiştir. Görüntüleme ajanlarının geliştirilmesinde kabul edilebilir risk terapötik ajanlara göre daha düşüktür. Fakat silika partiküller için *in vivo* toleransı oldukça iyidir ve düşük miktarda partikül kontrast arttırma amacıyla kullanımında yeterli olmaktadır [26].

Silika nanopartiküllerin terapötik ajan olarak kullanılması ise ayrıca ilgi görmektedir. Silika nanopartiküllerin *in vivo* toleransının yüksek olması onları ilgi çekici ablatif hassaslaştırıcılar yapar, çünkü ablatif tekniğin zamanını ya da gücünü azaltmaktadır. Fakat ablatif enerji uygulanana kadar görece zararsızdır. Ek olarak ilaç ulaştırma alanında yeni akıllı ilaç ulaştırma araçları kullanılmaya başlanmıştır. Bunlar basit emdirme-salma mekanizmasına sahip ilaç taşıma sistemlerine kıyasla duyarlı karşılık verme (stimuli-risponsif) özelliği bulunmaktadır [27]. Her iki yaklaşım da terapötik indeksini arttırabilir ve yan etkilerini azaltabilir. Buna rağmen her iki yaklaşım da tümörün konumunun belirlenmesine veya hastalıklı dokunun yerinin bilinmesine ve harici enerji kaynağına erişiminin bulunmasına ihtiyaç duyar. Bu anlamda ilaç salımı amacıyla kimyasal ya da enzimatik tetikleyici ile tasarlanmış silika partiküller daha avantajlı olabilir. Örnek olarak metastatik hastalık ya da tüm vücutta bulunan hastalık verilebilir, bu durumda ilacın birden çok yere ulaştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır, spesifik bir dokuda ilaç salımı gerçekleştirecek bir araç arzu edilmektedir. Bu yaklaşımın riski ise, hedef olmayan dokularda halihazırda kimyasallar ya da enzimler bulunabilir ve ilacın partiküllerden salınmasına neden olabilir. Tüm bu yaklaşımlar akıllıca tasarlanmıştır ve silikanın bir platform olarak kullanılmasından avantaj elde edebilmektedir.

Silika nanopartiküller biyogörüntüleme amacıyla ilk kullanılan malzemeler arasındadır. Bu nanopartiküllerin kullanımı ile ilgili kapsamlı bir literatür incelemesi bulunmaktadır [28]. Mezogözenekli silika yüksek miktarda floresan boyalar ile yüklenebildiği için fotohassaslaştırıcı veya tanı ayırıcı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Floresan mezogözenekli silika reaktif siloksanlar ile hidrotermal reaksiyon kullanılarak elde edilebilir ve fonksiyonelleştirilebilir [29]. Bu partiküller düşük sitotoksikite ve mükemmel hücre görüntüleme özelliklerine sahiptir.

Uzun dalga (600 nanometreden daha büyük) emisyonlarına sahip olan silika nanopartiküller, çeşitli organik, metal-organik ve metalik floroforlar ile kolayca katkılanabilmektedir, çünkü nanopartiküllerin floresansı 500 nm'den daha büyük

olan dalga boylarında hücrenin kendi floresansı tarafından girişime uğramaktadır [30, 31]. Renk, zayıflama zamanı ve boyut ayarlanabilir ve katkılanacak malzeme hidrofobik, hidrofilik veya iyonik olabilir. Silika nanopartiküller ayrıca florofor ile kaplanabilir fakat kendi-sönümlenme gibi muhtemel agregasyon etkilerine dikkat etmek gerekir. 300 nm'den daha büyük boyuta sahip silika nanopartiküller ve agregatları yüksek ışık saçılımına neden olmaktadır. Hücre geçirgenliği zeta potansiyeline bağlıdır. Eğer negatif yüklüyse hücre membranından zor geçmektedirler. 50 nm boyutunun altında olması kaydıyla toksik değildirler, kolayca vücuttan atılabilir ve hücreler arası proteinler ile kaplanarak bağışıklık sistemi tarafından saldırıya uğrayabilirler. Bu partiküller yüzeylerinde gerekli modifikasyonlar yapılmadığı takdirde şişmeye değil topaklaşmaya eğilimlidirler. Mezogözenekli silika yapılar yüksek yüzey alanına sahiptir ve hücre görüntüleme ve hedefleme amacıyla yüksek miktarda yüklemeye elverişlidir [32].

Lüminisans lantanitler silika nanopartiküllere katkılanmak amacıyla yaygın olarak tercih edilmektedir [33]. Lantanit tabanlı floroforlar a) görece yüksek bozulma zamanları, b) oldukça dar emisyonları, c) tek-foton ve çift-foton uyarımı ve d) üst-çevirme ve alt-çevirme lüminisans gibi birçok ilgi çekici özelliğe sahiptir. Lantanit yüklü silika nanopartiküller lantanit iyonlarını veya silika nanopartiküllerin Eu(III), Tb(III) veya Gd(III) ile komplekslerini içermektedir [34]. Organik ve inorganik florofor yüklü titanya ve zirkonya nanopartiküller ise daha az kullanılmaktadır.

2.4.1.1. Sol-jel Yöntemi

Sol-jel yöntemi nanopartikül üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde gözeneklilik, uygun malzeme seçimi ve asit-baz katalizörünün değiştirilmesi ile kontrol edilebilir. Sol-jeller tetraalkoksisilanların polikondenzasyonu, tetraalkoksisilanların alkil-alkoksisilanlar ile karışımının kopolimerizasyonu ile ya da yalnızca alkil-alkoksisilanlar kullanılarak elde edilebilir. $(R_1)_x(R_2O)_{3-x}Si-R_1$ (R_1 alkil veya aril, R_2 ise alkil) genel formülüne sahip mono-, di- veya trialkilsilanlar gibi birçok malzeme kullanılmaktadır [21].

Floresan görüntüleme nanopartiküller aşağıda verilen kriterlere göre seçilir:

- a) Normal görüntüleme, parlak ve toksik olmayan ve tercihen hücre zarından geçebilen partiküller. Bunlara nanokristaller, kuantum noktacıkları, boya bağlı silika veya polistiren örnek verilebilir.

- b) Hedefli görüntülemelerde ise parlak ve toksik olmayan ve tercihen hücre zarından geçebilen partiküller. Uygun ligand bağlanarak hedeflendirilecek hücre çeşidine yönlendirilmelidir.
- c) Kimyasal sensörlerde kullanılacak olan partiküller seçici ve sıcaklıktan etkilenmemelidir. Biyouyumlu olmalı ve (600-900 nm) dalga boyunda çalışmalıdır.
- d) Sıcaklık görüntülemesinde kullanılacak olan partiküllerin tamamen inert olması beklenir.
- e) Multimodal görüntüleme sofistike malzemelere ihtiyaç duyar. Parlak ışık vermesi ve ikincil görüntülemeler (MRI vb.) ile uyumlu olması beklenir. Sonuç olarak fonksiyonel malzemeler çekirdek ya da kabuk yapısına eklenmelidir.
- f) Kanser görüntülemesinde kullanılacak malzemelerin tercihen ilaç, gen veya fotodinamik ya da fototermal ajan yüklü gözenekli bir kabuğa sahip olması. İlaç ya da genler harekete geçeceği yere geldiğinde salınabilir olmalı. Kontrollü salım ışık ya da pH'daki değişimler ile uyarılabilir olmalıdır [1].

Nanopartiküller medikal alanın yanında, biyoanaliz, biyoloji, savunma sanayi, güvenlik ve birçok teknik nanosistemlerde kullanım alanı bulmaktadır.

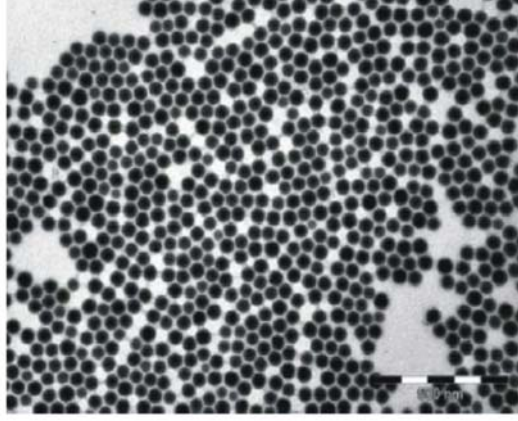
2.4.2. Silika Nanopartiküllerinin Toksikliği

Artan kanıtlar, birçok nanomalzemenin eşsiz fiziksel-kimyasal özelliklerinden dolayı potansiyel toksisiteye sahip olduğunu göstermektedir [35]. HaCaT, normal insan keratinosidine benzeyen biyolojik özellikleri sergileyen ve dermal toksikliği araştırmak için ideal bir hücre modeli olan yetişkin bir insan cildinden ölümsüzleştirilmiş bir epitel hücre dizisidir [36]. HaCaT hücrelerinde hücre canlılığı, hücre döngüsü ve apoptoz üzerine SiO₂ nanopartiküllerin etkileri test edilmiştir. Veriler, nano-SiO₂ ve mikro boyutlu SiO₂ ile etkileşimin, hücre canlılığını, hücre döngüsü değişimini önemli ölçüde azaltabileceğini ve hücre canlılığının partikül boyutu ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, SiO₂ parçacıklarına maruz kalma aynı zamanda büyüklük ve doza bağımlı bir şekilde apoptozu da tetiklemektedir. Apoptotik oran, küçük SiO₂ parçacığı (15-nm) ile işlemden geçirilmiş hücrelerde, büyük SiO₂ parçacığı (30 nm ve mikro boyutlu) ile muamele edilen hücrelere göre daha yüksektir. Bu sonuçlar, SiO₂ parçacık etkileşiminin belirgin toksikolojik etkiler ürettiğini ortaya koymuştur. Çalışmalar SiO₂

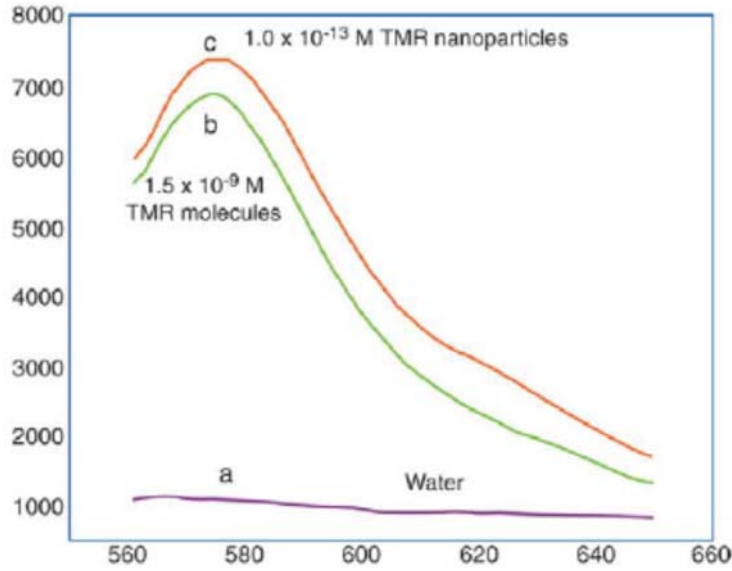
nanopartiküllerinin yüzeyindeki aktif noktanın oksijen molekülleri ile reaksiyona girebileceğini ve orantısız tepki ile süperoksit ve diğer reaktif oksijen türlerini (ROS) üretebileceğini göstermiştir [22, 37]. Protein ve DNA oksidatif hasarla sonuçlanan ROS, bu nedenle gözlemlendiği gibi SiO₂ parçacıklarının toksik etkilerinin indüksiyonunda yer alabilmektedir.

2.4.3. Boya Katkılı Silika NP'ler

Silika tabanlı nanomalzemeler, biyomedikal olarak önemli hedeflerin geniş bir yelpazesinin seçici olarak etiketlenmesi için optik şifreleme özellikleriyle geliştirilmiştir; Bakteriler, kanser hücreleri ve bireysel biyomoleküller [38] örnek olarak verilebilir. Biyoanaliz ve etiketlemede yaygın olarak kullanılan polimer esaslı NP'lerle karşılaştırıldığında, silika NP'leri daha az agregasyon ve az miktarda boya sızıntısı gösterir [39]. Uygun sentetik koşulları kullanarak, tek bir silika parçacık içine çok sayıda boya molekülü (organik veya inorganik) yüklenebilir (on binlerce boya molekülü olabilir). Boya katkı NP'ler tek bir boya molekülüne kıyasla oldukça yükseltilmiş bir optik sinyal üretir. Biyoanalizde uygun bir şekilde uygulanırsa, silika NP'leri analitik duyarlılıkta büyük bir gelişme sağlayabilir (Şekil 2.2). Ayrıca, boya, silika matrisin içinde sıkıştıkça, etkili bir boya çevreleyen ortamdan koruyan bariyer, hem geleneksel boya etkileyen hem de fotoblokasyon ve fotodegradasyon fenomenleri en aza indirilebilir [40]. Mükemmel fotostabilite, bu NP'leri, yüksek yoğunluklu veya uzun süreli uyarımların gerekli olduğu uygulamalar için uygundur. Örneğin, hücre içi optik görüntüleme fotobloklamadan ciddi şekilde zarar görür, silika NP'leri ile bu problem en aza indirilebilir. Esnek silika kimyası ayrıca yüzey modifikasyonu için çok yönlü yollar da sağlar. Biyomoleküllerle konjugasyon için NP'lere farklı türde fonksiyonel gruplar kolayca verilebilir. Ek olarak, silika yüzeyi bu NP'leri kimyasal olarak inert ve fiziksel olarak kararlı hale getirmektedir [41]. Bütün bu özellikler biyolojik analiz ve biyolojik görüntüleme için silika NP'lerini mükemmel etiketleme reaktifleri yapmaktadır [42-45].



Şekil 2.1. boya katkılı silika NP'lerin transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) görüntüsü. Ölçek çubuğu = 500 nm [42].



Şekil 2.2. Boya katkılı NP'leri kullanarak floresan sinyal amplifikasyonu: (a) saf su (kontrol); (B) tetrametilrhodamin (TMR) boya, 1.5×10^{-9} M; (C) TMR katkılı NP, 1×10^{-13} M [45].

2.4.4. Floresan Silika NP'lerin Sentezi

Boya katkılı silika sentezi için iki ana yöntem vardır; Stöber yöntemi ve ters mikro emülsiyon yöntemi.

2.4.4.1. Stöber Yöntemi

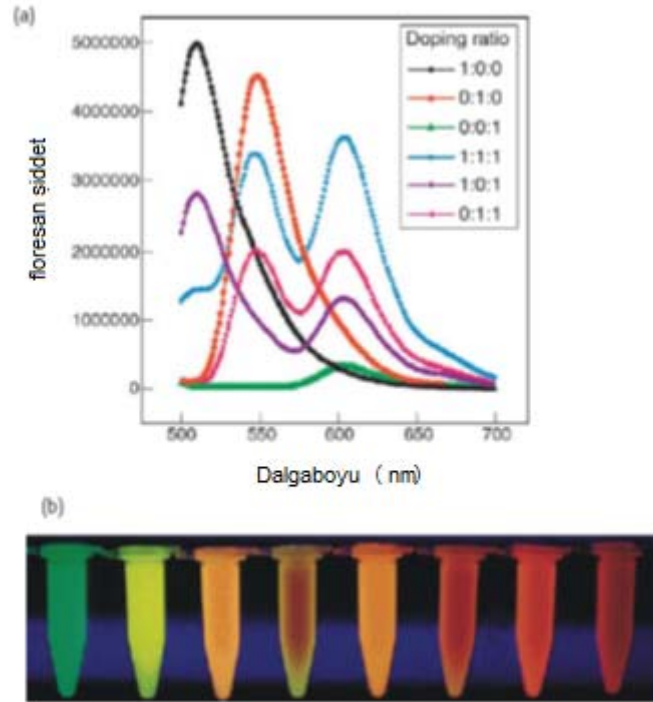
Bir silika alkoksit öncüsünün (Tetraetil Ortosilikat, TEOS) bir etanol ve sulu amonyumda hidroksit karışımı ile silisik asit hidroliz sırasında üretilir ve konsantrasyonu etanol içindeki çözünürlüğünün üzerindeyken, çekirdekler homojen olarak elde edililerek, nanometre boyutundaki silika parçacıklarını oluşturur. Yöntem nispeten basittir ve organik ve inorganik boyalar bu yöntem

kullanılarak yüklenebilirler [46]. Bununla birlikte, hidroliz işlemi nedeniyle, NP'lerin nispeten büyük bir boyut dağılımı vardır. İşlemin bazı modifikasyonları, silika NP'ler içine daha fazla hidrofobik boyalar eklemek için optimize edilmiştir. Birincisi, feniltrietoksisilan (PTES, hidrofobik) ve TEOS (hidrofilik) gibi, NP'lerin yapımında hidrofobik ve hidrofilik öncülerin kombinasyonuna dayanır. Rhodamine 6G (R6G), bu yöntemi kullanarak silis NP'lerine başarıyla yüklenmiştir [47]. Hidrofobik bileşen organik boyayı silika matriste tutarken, hidrofilik bileşen sonuçtaki NP'nin sulu solüsyonlara dağılmasını sağlar. Boya yüklemek için bir başka yöntem, organik boyanın silan reaktifine doğrudan bağlanmasıdır. Bu yaklaşımı kullanarak van Blaaderen ve ark. [48] Floresan izotiosiyanatı (FITC) 3 aminopropiltrietoksisilana kovalent olarak bağlamış ve boyayı silika matrisine başarıyla yüklemiştir.

2.4.4.2. Ters Mikroemülsiyon Yöntemi

Boya katkılı silika NP sentezi için ikinci temel teknik ters mikroemülsiyon yöntemidir. Bu, bir yağda su geri dönüşümlü mikroemülsiyon sisteminin oluşumuna dayanır. Ana tepkime karışımını üç temel bileşen oluşturur; su, yüzey aktif madde ve yağ (suya oranla yüksek oranda bulunan organik bir çözücü). Yağ çözeltisinde oluşan kararlı su nanodamları, silan hidrolizi ve içindeki tuzak boya ile NP oluşumu gerçekleştiği küçük mikroreaktörler gibi davranır [49]. NP'lerin boyutu, sürfaktan, hidroliz reaktifi ve reaksiyon süresi, yağ / su oranı gibi diğer bazı parametrelerin niteliğine göre belirlenir [45]. Bu yöntem ile üretilen NP'ler genelde yüksek derecede kararlılık gösterirler ve suda iyi dağılırlar. Bu yöntemin dezavantajlarından birisi, çoğu durumda organik floroforlara kıyasla daha düşük kuantum verimlerine sahip olan inorganik boyaların birleştirilmesi için kullanılabilmesidir. Organik boya katkılı silika NP'lerin, NP'lerin hidrofilik yüzeyi ile karşılaştırıldığında organik boyar maddenin hidrofobik özellikleri nedeniyle bu yöntemle hazırlanması zordur. Protokolde yapılan bir değişikliğin, parçacıkta bulunan organik boya miktarını arttırdığını bildirmiştir [45] Organik boyalar hidrofilik olan ve bağlı olan boya molekülünü silika içinde tutmaya yardımcı olabilen dekstran grubuna bağlanır. Tetrametilrohdamın (TMR), floresein ve Alexa Fluor 647 gibi flüoresan boyalar, sızıntı olmaksızın silika NP'lere başarıyla eklenmektedir. Tekli boya katkılamanın yanı sıra, silis matrisine çoklu boya katılması da rapor edilmiştir. Bu, algılama üzerine daha fazla bilgi sağlanmasına yardımcı olabilir. NP'lerin iki inorganik boyayla, tris (2'2 bipiridil) diklorürutenyum

(II) (Rubpy) ve tris (2'2-bipiridil) diklorosmium (II) (Os bpy) ile eşzamanlı olarak dopinglenmesi için bir yöntem geliştirilmiştir. Bu iki boya geniş, çakışan uyarma spektrumunu paylaşır, ancak farklı maksimum emisyon dalga boylarına sahiptir. Bu, onları yoğunluk oranının kullanılacağı iki dalga boylu bir sinyal yaklaşımı için ideal bir araç haline getirir [50]. NP içindeki boyaların konsantrasyonlarını hassas bir şekilde kontrol etmek ve değiştirmek suretiyle, tek bir dalga boyuyla uyarma, farklı emisyon imzalarına yol açarak, birden fazla hedefin aynı anda ve hassas şekilde algılanmasına izin verir. Diğer çalışmalarda, Wang ve ark. [51] emisyon şeması olarak flüoresans rezonans enerji transferi (FRET) kullanan boyalı silisyum NP'ler oluşturmuştur. Üç farklı organik boya olan FITC, R6G ve 6-karboksil-X-rodamin (ROX) aynı silika matrisine dahil edilmiştir. Bu boyalar, etkili floresan enerjisi transferinin gerçekleşmesi için, üst üste binen emisyon ve uyarılma spektrumlarına sahip olacak şekilde özenle seçilmiştir. Üç boya türünün farklı kombinasyonları ile doping yapılarak, tek dalgaboyu uyarılma altında çok katlı, hedeflenmiş FRET için barkod etiketleri üretilebilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Çeşitli FITC, R6G ve ROX boyanacak oranlara sahip NP'lerin floresan emisyonu: (a) NP numunelerinin emisyon spektrumları ve (b) 1: 0: 0, 0: 1: 0, 1: 0: 1, 4: 1.5: 3, 0.5'lik FITC: R6G: ROX boya katkılama oranları için 300 nm ultraviyole uyarım altında NP numunelerinin rengi : 0.5: 0.5, 2: 2: 2, 0: 1: 1 ve 0.5: 0.5: 4 (soldan sağa) [51].

2.4.5. Titanyum Dioksit Nanopartikülleri

Titanyum dioksitin farklı kristal yapıları onları geniş dielektrik ve optik özelliklere sahip bir fotokatalitik malzeme haline getirir. Titanyum dioksit nanopartiküllerinin çeşitli kullanım alanları vardır, nano ölçekte anataz fazının kararlı olmasının yanında aynı zamanda 3-10 nm aralığında rutil fazı ile kıyasla aynı skalada 100 kattan fazla sitotoksik etkiye sahiptir. Bu nanopartiküller farmakolojide ilaç salınımı aracılığı veya yardımcı madde formülasyonları olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Aslında, günümüzde fotodinamik terapide, bu partiküller etkin foto-oksidasyon özelliklerinden faydalanılarak kullanılmaktadırlar. Buna ek olarak, bu nanopartiküllerin sitotoksik yönleri, diğer malzemelerle (örneğin, hidroksiapatit) birleşmesi ile azaltılabilmektedir [52]. Mevcut kanser terapileri (ameliyat, radyo ve kemoterapi dahil), spesifik olmayan hedef hücre yüzünden insan sağlığına istenmeyen etkiler getirmektedir. Kanıtlar, nanopartiküllere dayalı tedavinin potansiyel bir kullanıma sahip olduğunu gösterir. Buna göre, TiO_2 (titanyum oksit) nanopartikülleri in vitro çalışmalarda başarıyla kullanılmıştır. Aslında, TiO_2 tozu, kanser, özellikle kolon kanseri için yeni bir terapötik madde olarak önerilmiştir. İnsan kolon karsinomasından gelen hücreler, fotonlar ile uyarılmış TiO_2 nanopartiküllerine maruz bırakıldıklarında yok edilmektedirler, ayrıca bu nanopartiküller altın ve platin ile zenginleştirildiğinde, kanser hücrelerinin hayatta kalma oranını önemli ölçüde düşürmektedirler. TiO_2 nanopartikülleri, bu hastalıkların tedavisinde fotokatalitik etkileri nedeniyle kullanılmaktadır, esas olarak bu da nanopartiküllerin konsantrasyonuyla bağlantılıdır. Fotokatalitik aktivasyon, TiO_2 ile tedavi edilen tümör bölgelerinde kontrollü ışığa maruz bırakmakla gerçekleştirilir. Çalışmalar, insan kolon karsinomasında hücrelerin Au-veya-Pt katkılı TiO_2 nanopartiküllerle maruz bırakıldığında basit TiO_2 ' ye maruz kalma ile karşılaştırıldığında hayatta kalma oranında belirgin bir azalma olduğunu göstermektedir. Bu veriler, TiO_2 'nin Au ve Pt ile dopinglenmesinin esasen, katkısız TiO_2 ' ye kıyasla kanser hücrelerinin öldürülmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir [53].

Sonodinamik tedavinin malign gliomlar için yeni bir tedavi stratejisi olması beklenmektedir. TiO_2 nanopartikülleri, bir fotosensitizer olarak, ultrason ile aktive edilebilir. Aslında, TiO_2 / PEG'in (polietilen glikol) potansiyel bir uygulaması olarak sonodinamik terapi ile malign gliomaların tedavisi gösterilmiştir [54].

Öte yandan, titanyum dioksit de dahil olmak üzere farklı nanopartikül konsantrasyonlarına maruz kalmanın çeşitli hayvan türleri için fitotoksik olduğunu gösteren klinik kanıtlar vardır. İnsanlara atfen, nanopartiküllerin geniş bir endüstriyel ürün yelpazesine girişi, doğal düşükleri de içeren gebelik komplikasyonlarını arttırmaktadır. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde, hamile kadınların % 1 ila % 3'ünün bu nanopartiküllerin konsantrasyonu ve dağılımından dolayı doğal düşük yaptıkları tahmin edilmektedir ve gebeliklerin % 7 ila 15'i, çocukları hayatları boyunca kardiyovasküler bozukluklara ve böbrek yetmezliğine yatkın hale getiren, zayıf cenin büyümesinden etkilenmiştir. Farelerin TiO₂ nanodotlarına maruz bırakılması, özellikle 2 ila 5 nm arasında olan titreşen nanopartiküllerde, püskürtmeden 24 saat sonra iltihaplı lezyonlar ürettiğini göstermektedir. Yüzey alanının toksisite ile ilişkili en önemli faktör olduğu saptanmıştır. Ayrıca, son çalışmalar, hem çapları 35 nm olan TiO₂ nanopartikülleri hem de intravenöz olarak enjekte olan nanopartikülleri, ceninin karaciğer ve beyinde birikim nedeniyle farelerde hamileliği etkiledikleri göstermektedir. Bu çalışmalarda floresan nanopartiküllerin intravenöz enjeksiyonundan sonra biyolojik görüntüleme teknikleri ile gözlenmiştir; TEM görüntüleri plasenta, karaciğer ve fare beyinde elementlerin varlığını göstermektedir [24].

2.5. Floresan Görüntüleme

2.5.1. İn-vivo Görüntüleme

Yakın kızılötesi pencere (700-1300 nm), hemoglobin emici kromoforların emdiği görünür alana kıyasla azaltılmış ışık emme ve saçılma özelliği sayesinde daha derin görüntüleme sağlar. Su ve lipidlerin kuvvetli emdiği yerde daha uzun NIR dalga boylarına sahiptir. İki yakın kızılötesi bant genellikle NIR I (700-950 nm) ve NIR II (1000- 1300 nm) arasında ayırım yapmaktadır. NIR I bandında çeşitli organik fluorofor sınıfları yayımlanır; Anjiyografi için örneğin indosiyanın yeşili kullanılır [2]. Parlak ve daha kararlı organik boyaların sentezinde sürekli gelişme kaydedilmesine rağmen, nanoparçacıklar NIR I yayan problemler olarak ilginç alternatifler sunmaktadır. Bunlar, yarıiletken kuantum noktalar (QD'ler), metal nanokütle, nadir toprak katkılı nanopartiküller (RE-NP'ler) ve nanoelmasları (ND'ler) içerir. CdTe ve PbS malzemelerine dayanan in vivo görüntülemenin ilk gösteriminden sonra, düşük toksisiteli yeni nesiller NIR yayan QD'ler ortaya

çıkıştır. Bu QD'ler, yüksek sönümlenme katsayısı ve kuantum verimleri (QY) ve organik kromoforlara kıyasla daha yüksek fotostabilite sayesinde yüksek parlaklık sunar. Emisyonları, boyutları ve bileşimleri ile ayarlanabilir. Metal nanokütük floresan nano materyallerin yeni bir sınıfıdır. Altta yatan fotofizik mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamasa da, NIR yayan altın nanokütükleri sentezlenmiştir [55-58]. Bu kümeler, QD'ler gibi söndürme katsayısı ve kuantum verim açısından parlak değildir, ancak küçük boyutları ve toksisitesi olmaması onları çekici bir alternatif haline getirmektedir. Karbon esaslı malzemeler de ilginç optik özellikler sunar. Özellikle, nanoelmasdaki azot boşluğu (N-V) merkezleri uzaktaki kırmızı-NIR aralığında floresan oluşturmaktadır [59, 60]. Bu ND'ler atıl olup, üstün bir fotostabiliteye ve düşük toksisiteye neden olur. Nadir bulunan toprak katkılı nanopartiküllerin floresan özellikleri, uygun bir ana madde matrisine yerleştirilen trivalent lantanit iyonlarının 4f geçişlerine dayanmaktadır. Malzemelerin seçimi, sentez sırasında boyut kontrolünün yanı sıra optik özellikler ve kolloidal ve kimyasal stabilite için belirleyicidir [61].

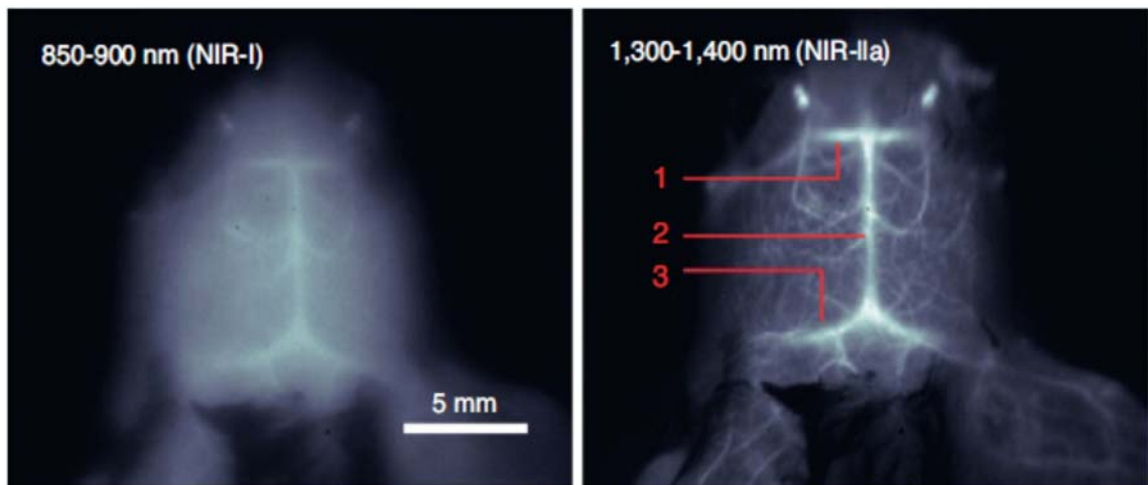
Bu farklı nanoprobaların yüzey kimyası tabii ki kolloidal kararlılıklarını garanti etmek, optik özelliklerini in vivo korumak, spesifik olmayan adsorpsiyonu azaltmak ve spesifik hedefleme ve işlevsellik sağlamak için çok önemlidir. Bunlar arasında vaskülatür ve lenf nodu görüntüleme, tümör saptama, hücre izi ve hücre soyları bulunur [62]. Bu nanoprobalar standart NIR I organik floroforlara kıyasla daha yüksek algılama hassasiyeti sağlamanın yanı sıra, birkaç benzersiz özellik paylaşmaktadır. Dokulara difüzyonu kısıtlarken ve böbrek atılımını 5 nm'nin üzerinde tutarken, büyük hidrodinamik büyüklüğü kan dolaşımındaki dolaşım süresini uzatır ve kan damarlarındaki çevre dokularına sızıntıyı engelleyerek daha spesifik hedeflemeye neden olur. Ayrıca nanoprobaları kullanan tümör saptamasında, gelişmiş permeasyon ve retansiyon (EPR) etkisinden yararlanır [63].

50-150 nm boyut aralığındaki nanopartiküller, gevşek epitel bariyerlerine nüfuz edebilir ve yıkanmış küçük organik boyalardan daha uzun süre tümörde kalabilirler [64]. Benzer şekilde, endositize NP'ler, daha küçük organik boyalara kıyasla hedeflenen hücrelerde daha uzun süre kalma eğilimi gösterir ve uzun vadeli hücre izlemeyi kolaylaştırır [65]. Tek işlevli organik boyaların aksine, NP'lerin geniş

yüzeyi tek bir nanoplatformda farklı bileşenleri bir araya getirmek için kullanılabilir. Bu, hedefleme parçalarının çokluğu sayesinde hedefleme verimliliğini potansiyel olarak artırır veya farklı hedefleme problemlerini, tamamlayıcı görüntüleme modelleri için kontrast maddeleri ve çevre muhabirlerini taşıyan çok fonksiyonlu NP'ler sağlar. Bu nanoprobler erişilebilir derinlik, çözünürlük ve hassasiyet açısından yeni gelişmiş görüntüleme yöntemleri geliştirmek için kullanılacak optik özellikler de sunmaktadır.

2.5.2. NIR II Yayan Nanoprobler

NIR II bandındaki in vivo görüntüleme, bu bölgedeki floroforların ve hassas dedektörlerin bulunmaması nedeniyle uzun süredir zor olmuştur. Bununla birlikte, prensipte, NIR II bandı, daha iyi algılama hassasiyeti ve azalmış ışık saçılımı sayesinde dokularda daha iyi mekansal kararlılık içerir ve NIR I'e kıyasla birçok avantaj sunar [66]. Şekil 2.4' de aradaki fark açıkça görülmektedir. Çoğu inorganik nanopartikül organik floroforlara kıyasla daha yüksek doğrusal olmayan soğurma kesitleri sunar. NIR'deki doğrusal olmayan uyarılma derin penetrasyonu mümkün kılar ve otofloresansı düşürür, böylece sinyal arka plan oranı artar. W. Webb ve arkadaşları 2-foton uyarımının (2PE) CdSe kuantum noktaları (QD) için özellikle uygun olduğunu ortaya koymuşlardır, çünkü organik floroforlardan iki ila üç derece daha yüksek 2 foton soğurma kesitlerine sahiptirler ve dinamik gözlem yapabilmektedirler [67]. Bununla birlikte, 2PE pahalı ekipman gerektirir ve hücresel ölçek için daha uygundur.



Şekil 2.4. NIR I (sol) ve NIR II (sağ) aralığında, kuyruk damarına enjekte edilen SWNT kullanılarak beyin vaskülatürünün in vivo kafes içi floresan görüntülenmesi [2, 68].

2.5.3. Yüksek Çözünürlüklü in Vivo Floresan Görüntüleme

Floresan mikroskopinin aksine, in vivo floresan görüntüleme binlerce hücreden daha düşük çözünürlükte toplu sinyaller algılar. Buna karşın, floresan mikroendoskopisi, dokuların derinliğinde yüksek çözünürlüklü görüntü elde etmek için katı dokulara minimal invaziv olarak yerleştirilen küçük boyutlu optik problemleri (genellikle 0.25-1 mm çapında) kullanır. Floresan problemlerle kombine edilen bu teknoloji, canlı dokulardaki tek hücreli ve tek moleküllü seviyedeki biyolojinin sorgulanmasına izin verebilir [69].

2.5.4. Çok Modlu Görüntüleme

MR ve X-ışını bilgisayarlı tomografisi (BT) gibi anatomik görüntüleme yöntemleri ile in vivo floresan görüntülemenin birlikte kaydı, fotonların sınırlı doku penetrasyonu ve düşük üç boyutlu uzaysal çözünürlük gibi floresan görüntülemenin eksikliklerini araştırmaya yardımcı olur ve tamamlayıcı bilgi sağlar. Çok işlevli problemlerin geliştirilmesi artan bir ilgi çekmektedir. Demir oksit ve dendrimer tabanlı çift MRI floresan görüntüleme kontrast ajanlarından kaynaşmış bir X-ışını BT floresan görüntüleme sistemine kadar birçok çalışma ortaya çıkmıştır [70, 71] .

2.5.5. FLIM Görüntüleme

İn vivo floresan görüntüleme çalışmalarının büyük çoğunluğu şu anda floresan yoğunluğundaki değişikliği ölçmektedir. Yoğunluk ölçümlerinden farklı olarak floresan ömür boyu görüntüleme (FLIM), probun yerel konsantrasyonuna daha az bağımlıdır ve emilim ve saçılma varlığında doğasında sağlamdır, ancak çevre değişikliklerine karşı oldukça hassas olabilir [72].

Çeşitli yeni çalışmalar, üç boyutlu floresan ömür boyu tomografinin geliştirilmesi yoluyla yaşayan küçük hayvanlarda tüm vücut FLIM'in kullanımını ve bir tümör ksenograftını bir NIR peptid probu ile görüntülemeye başlamıştır [73, 74].

2.6. İn Vivo Görüntülemeye İnorganik Nanoproblemler

İnorganik nanoproblemler in vivo görüntülemedeki floresan hassasiyetini, çözünürlüğünü ve görüntüleme derinliğini arttırmak için kullanılabilen benzersiz optik özellikleri sunar. Bu nedenle, yeni görüntüleme teknikleri ve uygulamalarının geliştirilmesinde giderek daha merkezi bir rol oynarlar. Bu NP'lerin sentezinde

ilerleme kaydedilmesi ve bunların optik özelliklerinin kontrolü ve anlaşılması, uyarlanmış enstrümantasyonun geliştirilmesi ile birlikte görüntüleme performansı daha da gelişmektedir. Bu gelişmeleri ilgili biyolojik uygulamalara çevirmek için, biyolojik dağılımlarını daha iyi kontrol etmek ve hedefleme verimliliğini artırmak için yüzey kimyasının geliştirilmesi de gereklidir. Bu da potansiyel toksisitesinin daha iyi anlaşılmasını ve kontrolünü sağlamalıdır. Sonuçta, bu görüntüleme yöntemlerini klinik alanda uygulanabilmesi için, NP'lerin vücuttan hızlı bir şekilde temizlenmesi gerekecektir [2].

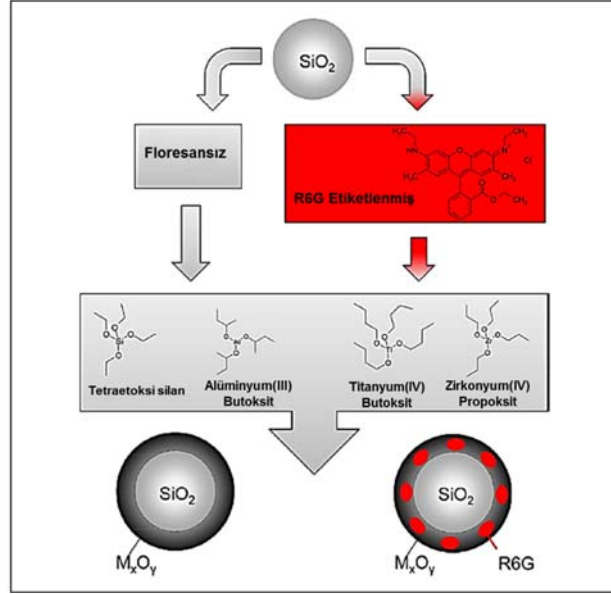
2.7. İn Vitro Nanotoksikolojik Çalışmalar

İn vitro nanotoksikolojik çalışmalar ışığında, floresan etiketlemesi, çevreye verilen parçacık lokalizasyonu için standart haline gelmiştir. Bununla birlikte, floresan etiketlemenin, parçacık yüzey kimyasını önemli derecede değiştirdiği ve bu nedenle hücre çalışmalarının sonucunu potansiyel olarak etkilediği bilinmektedir. Dolayısıyla, floresan işaretleme ile izoelektrik noktada bir değişim olmaması ve iyi tanımlanmış izoelektrik noktaları dar bir boyut dağılımı ile floresanla işaretlenmiş küresel metal oksit parçacıklarının elde edilmesi için basit ve açık bir yöntem sunmaktadır. Taban malzemesi olarak küresel amorf silis (SiO_2 , 161 nm çap) parçacıkları kullanılmış ve sol-jel kimyası kullanılarak silika, alüminyum oksit (Al_2O_3), titanya (TiO_2) veya zirkonya (ZrO_2) ile kaplanmıştır.

Metal oksit kaplamaları, izoelektrik noktasını etkilemeksizin, doğrudan doğruya rodamin 6G boya katman matrisine katılmasıyla başarılıdır. Kaplama kalitesi, yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskopisi, enerji filtrelenmiş transmisyon elektron mikroskopisi ve elektrokimyasal karakterizasyon ile doğrulanmış ve kaplamaların farklı pH koşullarında en az 240 saat sabit olduğu kanıtlanmıştır. Elde edilen bu flüoresan parçacıkları biyomedikal araştırmalar için doğrudan kullanılabilir, partikül-hücre etkileşimlerinin in vitro aydınlatılması buna örnek olarak verilebilir. Genellikle biyolojik sistemlerde toksisite ve genel davranışları gibi risklerle ilgili soruların gündeme getirilmesi ile yaygın bir ürün ve süreç portföyünde geliştirilmiş nanopartikül kullanımı artmaktadır [75, 76]. Dolgu malzemeleri, kaplama malzemeleri, boyalar, biyolojik sensörler, kromatografik sistemler, filtrasyon membranları, kozmetik, ilaç taşıyıcıları, katalizörler, fotonik kristaller ve diş macunu gibi ürünlerde SiO_2 , Al_2O_3 , TiO_2 veya ZrO_2 'nin seramik

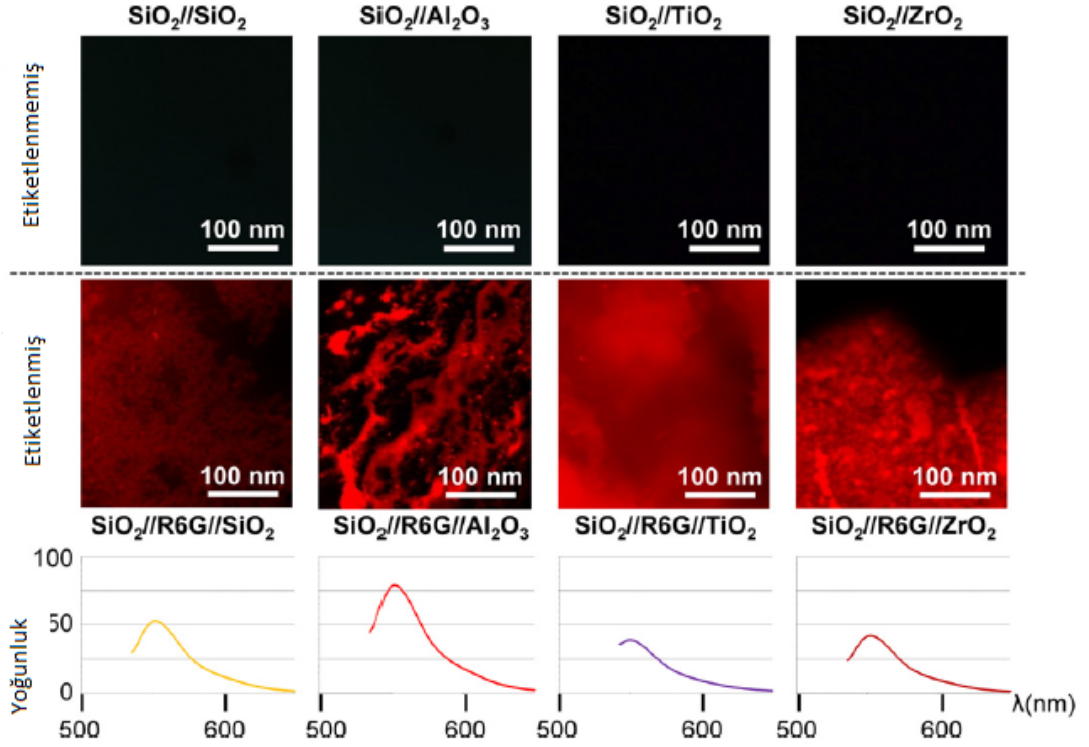
nanopartikülleri kullanılmaktadır [77, 78]. Bu uygulamalardan bazıları biyolojik ortama nanopartikül bırakma riski içermektedir. Özgül serbest bırakmaya ortopedik implantların zımpara aşınması (Al_2O_3 ve ZrO_2 'nin tipik olarak kullanıldığı yapay kalça eklemleri) [79-81]) verilebilir. Bu oksit nanopartiküllerinin biyolojik sistemler üzerindeki etkileri halen net değildir ve henüz ayrıntılı olarak aydınlatılmamıştır [82]. Partiküllerin biyolojik sistemlerde genel davranışının parçacık boyutuna ve malzemenin türüne göre etkilendiği öne sürülmüştür. Bu nedenle bu iki parametrenin bağımsız bir araştırmasının kullanılması düşünülmektedir. Boyut ve şekilleri korunurken, bu nanopartiküllerin farklı biyolojik etkileri, materyal ve yüzey özelliklerine açıkça atfedilebilir [83-86]. Biyolojik sistemler içindeki nanopartikül lokalizasyonu da çok önemlidir. Nanopartiküllerin floresan etiketlemesi, bunları veya en azından topaklarını bir hücre ortamında ve in vivo olarak görselleştirmek için kullanılmıştır [87-89].

Bir floresan boyanın nanopartikül yüzeyine yapışması veya kimyasal bağlanması onları görüntülemek için uygun bir yöntemdir, ancak nanopartiküllerin yüzey kimyasını değiştirebilir. Bu, silikada gösterildiği gibi, boya etkisi olmadan yüzey materyal özelliklerini koruyarak nanopartikül içine floresan boya dahil edilerek önlenir [90, 91]. Bununla birlikte, kontrollü yüzey kimyası ile diğer oksit yüzeylerin floresanla etiketlenmesi eksiktir ve literatürde henüz tartışılmamıştır. Bu tez kapsamındaki yaklaşımda alt katman malzemesi olarak amorf silika nanopartiküller kullanılmış ve Şekil 2.5'te gösterilen sol-jel işlemi ile yüzeye silis, alümina, titanyum ve zirkonya kullanılarak farklı oksit kaplamalar yapılmıştır. Kaplama işlemi sırasında bir oksit matrisine eklenerek stabilize olduğu bildirilen rodamin 6G (R6G) floresan boya olarak kullanılmıştır [92].



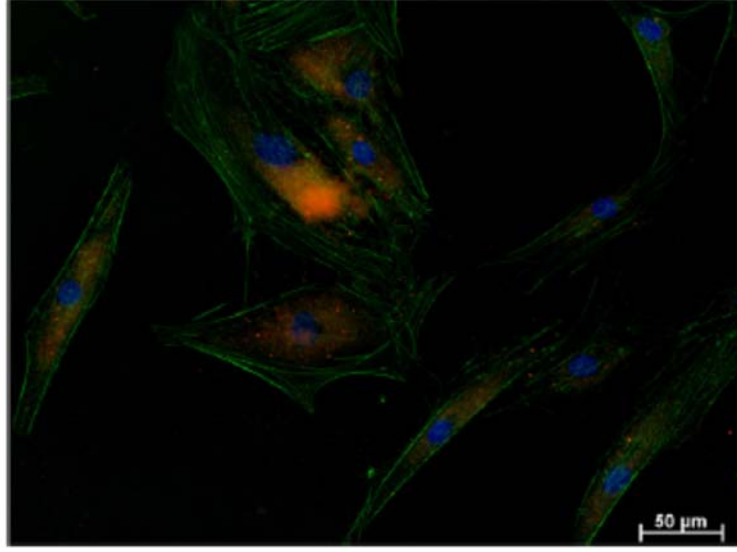
Şekil 2.5. Sol-jel kaplama işleminin adapte edilmiş şematik çizimi (M_xO_y : SiO_2 , Al_2O_3 , TiO_2 veya ZrO_2) [93].

$\lambda = 550$ nm'de R6G etiketli nanopartiküllerin floresansı, karşılık gelen etiketsiz nanopartiküllerle karşılaştırılmış ve Şekil 2.6'da gösterilmiştir. R6G ile etiketlenmiş olan tüm nanopartiküller, 240 saatten fazla bir süre için ayrı bir floresan emisyon sinyali göstermiştir; oysa etiketli olmayan nanopartiküller bunu göstermemektedir. R6G çözeltisi. $SiO_2 // R6G // SiO_2$ ve $SiO_2 // R6G // Al_2O_3$ süspansiyonlarının nispi yoğunluk pikleri, diğer iki süspansiyonun yaklaşık iki katına karşılık gelmiştir [93].



Şekil 2.6. Etiketlenmemiş ve R6G etiketli nanopartiküllerin floresan yoğunluklarının yükselmesi doğrudan sentezden sonra. Üst ve alt satırlar süspansiyonda 525 nm uyarımda emisyon spektrumları, floresan mikroskopi görüntüsü [93].

Şekil 2.6' da gösterildiği gibi tüm R6G etiketli nanopartiküller için 550 nm'de floresan emisyonu, yeterli miktarda R6G'nin 200°C ısıtılma direndiğini gösterir. SiO₂ // TiO₂ ve SiO₂ // ZrO₂ için floresan emisyonlarının azaltılmış kısmi yoğunlukları, aşağıdaki etkilerden bir veya daha fazlasıyla oluşabilir: (a) kaplamadaki R6G konsantrasyonundaki farklılıklar; (b) malzemelerin floresanla ilgili dalga boyundaki ışık üzerindeki farklı etkileri; (c) boya floresansını etkileyen kaplama malzemesi ve R6G arasındaki etkileşimler. Yukarıda tarif edildiği gibi 240 saat sonra floresan emisyon yoğunluğunda saptanabilir bir azalma yoktur. Şekil 2.7' de, insan kemik hücrelerinin hücre kültürlerinde 3 gün depolandıktan sonra, floresanla işaretlenmiş çekirdek-kabuk nanopartiküllerinin (SiO₂ // R6G // TiO₂) saptanabilir hale geldiği görülmektedir.



Şekil 2.7. SiO₂ // R6G // TiO₂ nanopartiküllerine 72 saat maruz bırakıldıktan sonra insosteoblast hücrelerinin floresan mikroskopi görüntüsü. Kırmızı floresan nanopartiküller gözlemlenebilir [93].

2.7.1. Hücre Etiketleme ve Hücresel Etkileşim İçin Biyomoleküler İşlevselleştirme

In vitro koşullar altında spesifik olmayan hücre boyamanın gerekli olduğu en basit durumda, biyomoleküler işlevselleştirme yapılmayan çıplak silika NP'leri kullanılabilir. Saf silika NP'lerin dış tabakası, izole edilmiş, yakın ve germinal silanol gruplarını içerir. Bunlar, fizyolojik pH'da negatif yüklü olup, kuvvetle negatif bir zeta potansiyeline sahip NP oluştururlar. Çıplak silika NP'leri birkaç saat boyunca % 10 serum içeren, serumsuz ve tamamen serum içeren ortamda koloidal olarak kararlıdır. İnsan akciğer epitel hücrelerini kullanarak yapılan bir hücre boyama deneyinde, çok sayıda silika NP'ler hücre yüzeyine bağlanır ve endositotik yollar yoluyla az miktarda alınır [94]. Çıplak silika hücre boyasında kullanılabilir, ancak hücre yüzeyleriyle etkileşime giren çıplak silis NP'leri olmadığını anlamak önemlidir. Çıplak silika NP'leri yüksek oranda reaktiftir ve serum içeren veya içermeyen hücrelere eklendiğinde proteinlerle kolaylıkla işlevlendirilirler [95].

Korona oluşturan iki makromolekül vardır: NP yüzeyine hızlı adsorpsiyon ve desorpsiyon oranlarıyla gevşek bağlanan biyomolekülleri içeren "yumuşak" bir bileşen ve biyomoleküllerden oluşan, sert bir bileşen. NP yüzeye yüksek afinite gösterir ve çok daha yavaş emisyon oranlarına sahiptir [95].

Silika NP'lerin bu koşullar altında proteinlerle işlevselleştirilmesi, kontrol edilemeyen bir pasif adsorpsiyon türü olarak düşünülebilir; burada ana etkileşim kuvvetleri silis yüzeyindeki biyomolekül ve silanol grupları arasında elektrostatik ve hidrojen bağı olacaktır [96]. Çoğu durumda, belirli hücre lekelenmesi, bir takım negatif kontrol hücrelerine tercih edilir. Bu normal olarak, NP'lerin, hücre zarı üzerindeki alıcıları hedef alan glikoproteinler veya aptamerler gibi sensör biyomoleküllerle işlevselleştirilmesi yoluyla elde edilir. Silika NP'lerin antikorlarla işlevselleştirilmesi için iki ana yöntem vardır ve bunların her biri kendine özgü avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Birinci yöntem pasif adsorpsiyon olup, daha önce belirtildiği gibi, çıplak silika NP'leri etrafında protein koronalarının oluşumunda temel rota oluşturmaktadır [96, 97]. Bu yöntemin avantajı, protokollerin çoklu saflaştırma adımlarına gerek kalmaksızın çok basit ve ucuz olmasıdır. Ana dezavantaj, proteinin NP'ye kovalent olarak bağlanmaması ve NP yüzeyiyle daha yüksek bir bağlanma afinitesi olan ancak hücre özgüllüğü olmayan başka bir biyomolekül tarafından çıkartılarak yerine konması olanağıdır [95]. Ayrıca, antikor konformasyonundaki veya yerel pH'daki değişiklikler, antikoron izoelektrik noktasını etkileyebilir ve NP yüzeyinden daha hızlı desorpsiyon oranlarına neden olabilir. İkinci yöntem kovalent bağlanma olup, yaygın olarak 'biyokonjugasyon kimyası' olarak anılır. Silika NP'lerin önemli bir avantajı, çeşitli teknikler kullanılarak antikorlarla konjuge edilebilmelerinin kolaylığıdır [98]. Antikorların silika NP'lere konjugasyonu için en basit yöntem, antikoru yüzey modifikasyonu olmaksızın doğrudan NP yüzeyinde bulunan silanol gruplarıyla reaksiyona sokmaktır. Bu, nispeten yumuşak koşullar altında pozitif yüklü izoüre türevi oluşturmak için silanol gruplarıyla reaksiyona giren siyanojen bromürler kullanılarak yapılabilir [99].

Amin grupları, izoüre türevi ile kolayca reaksiyona girerek bir imidokarbonat kovalent bağlantı oluştururlar. Lizin kalıntıları, antikorlar üzerindeki en yaygın amin kaynağıdır. Standart bir IgG antikorida yaklaşık 90 lizin kalıntısı bulunmaktadır [100].

Bir antikor içerisinde çok fazla lizin kalıntısıyla bağlantı oluşturmamak önemlidir, çünkü protein denatürasyonuna ve epitop bağlanma verimliliğinde bir azalmaya yol açabilir [101]. Doğrudan bir antikor ile veya bir bağlayıcı molekül aracılığıyla reaksiyona girebilen bir yüzey işlevsel grubu başlatmak için silika NP'lerin

etiketlenmesinde çok daha yaygındır. En yaygın yüzey değişikliklerinden bazıları şunlardır: karboksilik asit, birincil amin, klorometil, (vinilbenzil) klorür, hidrazin, azid, aldehid, tiyol ve epoksit. Yüzey modifikasyonu, en yaygın olarak, standart hidroliz ve yoğunlaştırma tepkimeleriyle [38] aminopropiltrimetoksisilan veya karboksiletilsilantriol gibi bir organosilan molekülünün bağlanmasıyla elde edilir. Fonksiyonel grupların eklenmesi fizyolojik koşullar altında silis NP'lerin kolloidal kararlılığını önemli ölçüde etkileyebilir [44]. Amin grupları, fizyolojik pH değerinde protonlanır ve yüksek bir yüzey alanı varsa, silis NP'leri pozitif yüklü hale gelir [102]. Hücre zarları negatif yüklü olduğundan ve bu nedenle amin kaplı NP'lerin yüksek miktarda spesifik olmayan bağlanma sergilediğinden bu durum bir dezavantaj olabilir [103].

Karboksilik fonksiyonel gruplar, silis NP'leri üzerinde negatif bir yük oluşturur, ancak karboksilik asitler zayıf bazlardır ve ayrıca hidrojen bağları oluşturduğundan, zeta potansiyelleri fizyolojik koşullar altında toplanmaya neden olur. İşlenmiş NP'leri stabilize etmek için, sığır serum albümin veya polietilen glikol (PEG) gibi katkı maddeleri, NP'lere ağırlıkça% olarak düşük oranda karıştırılır. Bu katkı maddeleri, NP yüzeyinde ilave yük veya sterik engel oluşturarak kolloidal dengeyi geliştirir. Hidrazin yüzeyi modifiye edilmiş silis NP'leri ilginçtir, çünkü bir hidrazin bağı oluşturmak için IgG'nin Fc bölgesindeki okside oligosakaritlerden aldehit grupları ile verimli bir şekilde çiftleşirler. Fc bölgesi, antijen bağlanmasına dahil değildir ve bu nedenle bu protokolü kullanarak bağlama için epitop her zaman mevcuttur [104].

Biyokonjugasyon için en yaygın yöntem, silis üzerindeki fonksiyonel grup ile antikordaki spesifik bir amino asit kalıntısı arasında bir bağlayıcı kullanmaktır. Tek değerlikli bağlayıcıların veya çok değerli bağlayıcıların kullanılmasını içeren, kullanılabilen iki standart yaklaşım vardır. Monovalent bağlayıcılar homofonksiyonel olabilir, örneğin glutaraldehit, NP yüzeyindeki amin gruplarını, imin kovalent bağlar oluşturmak için IgG üzerindeki lisin kalıntılarıyla çapraz bağlar. Homofonksiyonel bağlayıcılar kullanılırken, tüm amin gruplarının etkinleştirildiğinden ve NP etiketleri diğer NP'lerle çapraz bağlanıp birikmeye yol açtığından emin olmak için yüksek bir bağlayıcı konsantrasyonu gerekir [105]. Bunun üstesinden gelmek için, NP üzerinde sülfhidril gruplarına bağlanabilen sülfosüksinimidil 4- [N-maleimidometil] sikloheksan-1-karboksilat (sülfo-SMCC) ve

IgG üzerindeki lizin kalıntıları [106], bir bağlayıcı kullanılarak, silika yüzey ile antikor arasında bir boşluk yaratır; bu da yüzey ile etkileşim sayısını azaltabilir ve denatürasyonunu azaltır [107]. IgG ve FcFv antikorlarını silika NP'lere önemli ölçüde geliştirilmiş avidite ve reaksiyon kinetiği ile bağlamak için çok değerlikli poli (amidoamin) dendrimerleri (PAMAM) kullanılmıştır. Dendrimer üzerindeki karboksilik fonksiyonel gruplar, genel negatif zeta potansiyeline katkıda bulunarak NP'leri fizyolojik koşullar altında koloidal olarak kararlı hale getirmektedir. Poli (amidoamin) dendrimerleri (PAMAM) gibi çok değerli bağlayıcılar kullanılarak anti-CD41 antikoru ile işlevselleştirilen uzak-kırmızı boya katkılı silika NP'ler, trombositleri yüksek özgünlüğün gözlemlendiği in vitro olarak etiketlemek için kullanılmıştır [108].

PEG bağlayıcıları genellikle hücre algılama deneylerinde kullanılır [109, 110]. PEG, kısa zincirli, polimerik veya çok değerli formlarda, antikorlara bağlanma için çok çeşitli fonksiyonlarla satın alınabilir. PEG'lerin hücre algılamada yararlı olmasını sağlayan birçok özellik vardır, örneğin hidrofilik, yüklenmemiş, biyolojik olarak uyumlu ve toksik değildir [111].

Ayrıca, PEG kaplamaları, spesifik olmayan protein ve hücre bağına önemli ölçüde azaltan bir sterik bariyer sağlar. Bu, PEG kaplı NP'lerin önemli ölçüde daha uzun sirkülasyon sürelerine sahip olduğu ve bu nedenle seçilen hedef hücreyi bulabildiği ve bunlarla etkileşebildiği in vivo çalışmalar için özellikle yararlıdır. PEG kaplamaları ayrıca, yüksek tuz koşullarında silis NP'lerini koloidal olarak kararlı tutarken, çıplak silika NP'ler hemen ve geri döndürülemez biçimde toplanır.

Antikorların silika NP'ler ile tutturulması için yeni bir yöntem, NP'leri bir polielektrolit tabakası ile kaplamaktır. Zhang ve arkadaşları (2011) PAA'daki karboksil gruplarını aktive etmek için 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) kullanarak amin fonksiyonlu silika NP'lere bir poli (akrilik asit) katmanı (PAA) kovalent olarak bağlamışlardır. Bu NP'ler negatif yüklü, koloidal olarak kararlı ve HeLa hücreleriyle inkübe edildiğinde spesifik olmayan bir bağlanma göstermemiştir. IgG antikorları EDC aktivasyonu kullanılarak PAA'nın dış yüzeyine de bağlanmıştır. Antikor kaplı mikro küreler kullanılarak yapılan test deneylerinde yüksek özgünlük gözlemlenmiştir. NP'lerin işlevselleştirilmesi için başka bir seçenek, örneğin streptavidin ve biyotin arasındaki bağlanmaya benzer afinite bağlaması kullanmaktır [112]. Bu tür kovalent olmayan bağlanma çok güçlü olabilir.

Streptavidin, pH, sıcaklık, proteolitik enzimler ve denatüre karşı direnci nedeniyle biyomoleküler işlevselleştirmede sıklıkla kullanılır. Standart bir deneyde, streptavidin bir silika NP'ye kovalent olarak bağlanır ve daha sonra bir biyotinlenmiş antikoru eklenir. Streptavidin biyotinlenmiş antikoru silis yüzeyinden uzakta tutar ve hem daha esnek bir destek sağlar hem de denatürasyon şansı azalır. Streptavidin'e bir alternatif, NeutrAvidin™ 'dir; bu, daha yüksek bir izoelektrik nokta (6.3) ve nötr yükün yakınında bulunan bir deglikosile edilmiş versiyondur. NeutrAvidin™, yüksek bağlanma afinitesini korur ancak daha düşük özgün olmayan bağlanma gösterir [109].

Hücre içi görüntüleme ve algılama ile ilgili olarak NP biyofonksiyonelleştirme hedefleri, sitoplazmanın spesifik bölgelerine kontrollü olarak uygulanan yüksek hücresel alımdır. Hücresel alım, parçacık yükü, boyutu ve şekli gibi materyal kompozisyonu ve yüzey kimyası gibi birçok farklı faktöre bağlıdır. Literatürdeki örnekler, pozitif yüklü nanomalzemelerin hücreler tarafından daha hızlı ve daha verimli bir şekilde alındığını göstermektedir. Bunun nedeni, NP'nin hücre zarı üzerine elektrostatik olarak yüklenmesidir [113]. Çıplak silika NP'leri negatif yüklüdür, bu da zayıf hücresel alımına neden olur [114].

Ek olarak, modifiye edilmemiş silika NP'leri, sitoplazmik ve nükleer görüntüleme / algılama maddeleri olarak kullanımlarını hariç tutan phagosomlara veya endozomlara yönlendirilir. Bu nedenle, uygun NP yüzey biyokonjügasyonu, başarılı bir NP hücre içi iletimi için çok önemlidir. Yukarıda anlatıldığı gibi, silis NP'lerin yüzeyi, çeşitli işlevsel gruplar ve biyomoleküllerle (diğer bir deyişle, antikolar, peptidler ve polielektrolitler) nispeten basit bir şekilde değiştirilebilir. Nanomateryal hücre içi alımı ve endozomal kaçışını kolaylaştırmak için katyonik grupların NP yüzeyine verilmesi gerekir. Literatürde verilen bazı yaklaşımlar, NP silika yüzeyinin amin grupları ile aşılması ya da polietilenimin [115], poliamidoamin [116] ve polilisin [117] gibi katyonik polimerler ile kaplanmasına dayanmaktadır.

Başka bir strateji, bir karboksilatla işlevselleştirilmiş silika NP yüzeyini biyoaktif moleküller veya monoklonal antikolarla [118] eşleştirmektir. Bununla birlikte, NP alımı başlangıçta in vitro ve sonunda in vivo uygulamalar için kontrol etmek amacıyla bir çok araştırma yapılmalıdır.

İlaç dağıtım ve hedefleme için inorganik nanopartikül sistemlerin avantajları:

İnorganik nanopartiküller (NP) şu anda birim hacim başına yüksek yüzey alanı, optik ve manyetik benzersizlikleri ve çok sayıda ligand ile işlevselleştirilme yeteneği gibi benzersiz fizikokimyasal özelliklerinden dolayı ilaç salım vektörleri olarak önemli potansiyele sahiptirler. Bu özellikler, bazı ilaçların terapötik etkinliği ile birlikte bu iki maddenin (NP-ilacı) kombinasyonunu ilaç salma alanında cazip bir alternatif haline getirmektedir. Bu konjugatların en önemli avantajlarından biri, ilacın lokal olarak verilmesi, böylece sistemik yan etkilerin azaltılması ve terapötik molekülün daha yüksek verimliliğe ulaşması olanağıdır. Bu gözden geçirme, ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesinde nano ölçekli parçacıkların doğrudan etkilerini vurgulamaktadır. Daha ayrıntılı olarak, hedeflenmiş kanser terapileri için inorganik NP'lerin yaygın kullanımı da belirtilmektedir. Nanopartiküllerin çeşitleri ve uygulamaları artmaya devam ederken, insan güvenliği kaygıları önem kazanmakta ve bu da bu materyallerin potansiyel toksisite tehlikelerinin daha iyi anlaşılmasını gerekli kılmaktadır. Manyetik veya antikör hedefli nanoparçacıklar ile belirli doku / hastalık yerlerine lokalize ve hedefli taşınım yapılabilmektedir. Doku ve bazı nanomalzemelere penetrasyon artışı olmaktadır.

Lenfatik sistemin olmaması nedeniyle belirli boyutlu nanopartiküller doğal olarak tümör dokusunda biriken gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisiyle partiküllerin filtrelenmesine olanak sağlar.

Nano grafen gibi karbon esaslı materyallerin modifiye edilebilir yüzey kimyasalları vardır, ilaç yüklemesi için ultra yüksek yüzey alanlarıyla üretilebilirler ve ayrıca benzersiz elektriksel ve optik özelliklere sahiptirler. Pozitron emisyon tomografisinde yaygın olarak kullanılırlar.

Yakın IR emici altın nanopartikülleri (altın nanosheller ve nanorodlar da dahil olmak üzere) 700-800 nm dalga boylarındaki ışıktan etkilenerek ısı üretirler. Bu, nanopartiküllerin hedeflenen tümörleri ortadan kaldırmasını sağlar. Işık altın nanopartikülleri içeren bir tümöre uygulandığında, partiküller hızla ısınır ve tümör hücrelerini öldürürler. Altın nanopartiküller de ışığı saçar ve karanlık alan mikroskopisi altında ilginç renk dizisi üretebilir. Altın nanopartiküllerin dağınık renkleri şu anda biyolojik görüntüleme uygulamaları için kullanılmaktadır. Ayrıca,

altın nanopartiküller nispeten yoğun olup, bunları transmisyon elektron mikroskobu için prob olarak kullanışlı kılmaktadır.

Gözenekli silika esaslı malzemeler, kanser tedavisi için daha fazla olanak sağlayabilen bileşikler arasındadır. Silika, çok yönlülük, toksik-olmayan, biyolojik uyumluluk, biyolojik bozunabilirlik, yüksek yüzey alanı, gözenek hacmi, gözenekli bölgede konuk moleküllerin homojen dağılımı, yüzey şarj kontrolü için yetenek ve serbest dispersiyon gibi çeşitli çok yönlü ve geniş avantajlara sahiptir. Gözenekli silika nanopartiküllerin en büyük dezavantajı, kırmızı kan hücre membranlarının fosfolipidlerinin yüzeyi ile etkileşen silanol gruplarının yüzey yoğunluğuna bağlı olarak oluşan hemolizdir. Bir başka dezavantaj, gözenekli silis nanopartiküllerinin melanom promosyonuna yol açtığı metabolik değişikliklerle ilgilidir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Deneyde Kullanılan Malzemeler

Bu tez çalışmasında Floresan boya olarak Rodamin 6G (Sigma Aldrich), silika kaynağı için % 98 lik Tetraetil ortosilikat, TEOS (Acros organics), titanium dioksit kaynağı olarak % 98 lik Titanyum tetraisopropoksid, TiP, 2- propanol, %97 (Sigma Aldrich), % 28 Amonyum hidroksit, NH₄OH (Sigma Aldrich), MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Besiyeri olarak % 10 FBS (fötal sıgır serumu), 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 2.0 mM L-glutamin ve 4500 mg/L glukoz içeren DMEM kullanılmıştır. Çalışmanın bütün aşamalarında hücreler %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de tutulmuştur. Hücre sayımları tripan mavisi ve hemositometre kullanılarak yapılmıştır.

3.2. Silika Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

(202 ± 20) nm çapında Stöber silika parçacıkları [119, 120] oda sıcaklığında (25 ± 2 ° C) bazik ortamda (pH ~ 11), bir teflon reaktöründe 15 mL H₂O ve 4 mL NH₄OH (% 28), 100 mL etanole ilave edilmiş ve 20 dakika manyetik karıştırıcıda sabit hızda karıştırılmıştır. Daha sonra yukarıdaki karışıma 3.0 mL TEOS hızla ilave edilmiş ve 1 saat daha sabit manyetik karıştırma altında bırakılmıştır. Bu hidroliz-polikondansasyon adımından sonra, karışım 5 mol L⁻¹ HCL ile nötrleştirilmiş ve 10 dakika boyunca 3500 rpm' de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak, çökelti, süspansiyone edici-santrifüjleme yöntemi ile üç kez su ile yıkanmış, son kalan çökelti, 70 ° C'de en az 15 saat süreyle kurutulmuştur.

3.3. Floresan Etiketleme

Nanopartiküllerin floresan etiketleme işlemi kaplamadan önce uygulanmıştır. Substrat silika nanopartikülleri, kaplamaya bağlı olarak su veya etanol içinde süspansiyone edilmiş, 15 mg rodamin 6G süspansiyona ilave edilerek 24 saat karıştırılmıştır. Sol-jel işlemi, bu R6G içeren süspansiyona uygun öncül molekülün eklenmesiyle başlatılmıştır. R6G ile etiketlenmiş tüm süspansiyonlar ve tozlar, floresan boyanın foto-ağartma işlemini en aza indirmek için alüminyum folyo kullanılarak ışığa karşı korunmuştur.

3.4. Titanyum Dioksit Nanopartiküllerin Silika Nanopartiküllerine Kaplanması

Toz silika 110 ° C'de en az 1 saat kurutulmuş, 0.2 g, 1 saat boyunca sonikasyon ile 30 mL izopropanol içerisinde dağıtılmıştır. Bu silika süspansiyon daha sonra bir Teflon reaktöre aktarılmış ve 50 mL daha izopropanol eklenerek, 5 dakika manyetik karıştırma altında bırakılmıştır. Daha sonra farklı miktarda titanyum izopropoksit (TiP) (Çizelge 4.1.) [121] hızla ilave edilmiş ve reaktör kapağı sıkı bir şekilde kapatılmıştır. Numuneler içerdikleri % TiO₂ (ağırlıkça %) baz alınarak etiketlenmiştir. Karışım 19 saat manyetik karıştırma altında tutulmuş, daha sonra 9 mL su-alkol karışımı (3 mL H₂O: 6 mL izopropanol) yavaşça ilave edilmiş (2 mL dk⁻¹) ve manyetik karıştırma altında 1 saat karışmaya bırakılmıştır. Oluşan SiO₂@TiO₂ koloidal süspansiyonu daha sonra 10 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant alınarak, çökelti bir kez izopropanol ve iki kez deiyonize su ile yıkanmıştır. Amorf kabuk, hidrotermal işlemeyle kristalleştirilmiştir. Elde edilen amorf CSN'ler 50 mL H₂O içinde süspansiyon edilmiş ve ev tipi havaya dayanıklı bir Teflon reaktöründe (kapasite 120 mL) 105 ° C'de 24 saat hidrotermal işleme tabi tutulmuştur. Hidrotermal muamele sonrası numuneler tekrar 3500 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüje edilmiş ve çökelen CSN'ler havada 100 ° C'de kurutulmuştur.

3.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin karakterizasyonu amacıyla kullanılan yöntemler aşağıda verilmiştir.

3.5.1. Nanopartiküllerin Boyut Analizi

Nanopartiküllerin boyut analizi için Zeta Sizer cihazı 3000 HSA kullanılmıştır. Zeta Sizer cihazından, partiküllerin boyut ölçme dışında zeta potansiyel bulmak için de yararlanabilir, sentezlenen partiküllerin yıkama işlemi yapıldıktan sonra süspansiyon halinde küvete aktarılıp, cihazın hücreğine yerleştirilip işlem başlatılmış ve partiküllerin boyut sonuçları elde edilmiştir.

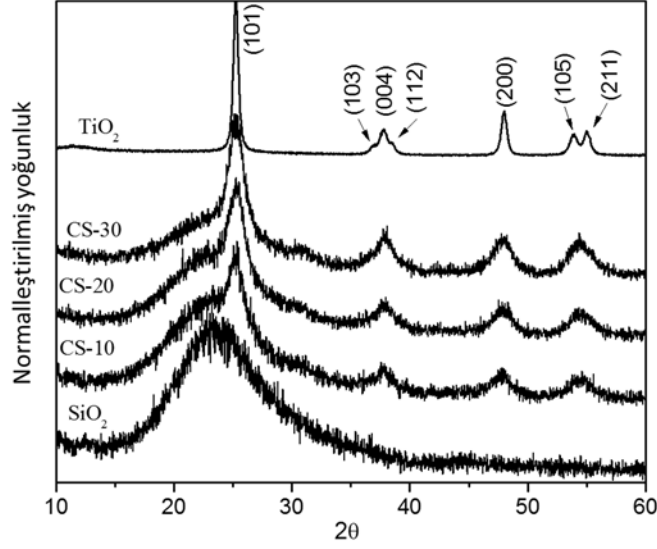
3.5.2. Nanopartiküllerin Yüzey Yükü Analizi

Nanopartiküllerin yüzey yükü analizi için Zeta Sizer cihazından yararlanılmıştır, cihaz elektriksel bir ortam ile partiküllerin yüzeyindeki yüklerin etkileşmesinden

dolayı ortaya çıkan partiküllerin hareket hızındaki değişiklikleri ölçerek çalışmaktadır.

3.5.3. SiO₂ @ TiO₂'nin Kabuk Yapısı ve Morfolojisi

Sol-jel yöntemi ile elde edilen nanokristalin TiO₂'nin özellikleri, proses parametrelerinin optimizasyonu ile kontrol edilebilir [122]. SiO₂ yüzeyinde hidroliz-polikondensasyon adımı tarafından üretilen tüm TiO₂'nin başarılı bir şekilde kaplanması doğal olarak TiO₂ NP'lerin üretilmesi ve çökmesi oranları arasındaki dengeye bağlıdır. Çekirdeksiz TiO₂ NPs oluşumunu önlemek için, öncül (TiP) hidroliz yoğunlaştırma aşamasından önce 19 saat boyunca SiO₂ yüzeyinde önceden adsorbe edilmiştir. TiP'nin hidrolizi muhtemelen adsorpsiyon aşamasında oluşur ve kısmen hidrolize edilmiş ön madde ile silika yüzeyleri arasındaki ara yüzey Si-O-Ti bağının oluşumuna neden olur. Si-O- Ti bağ oluşumu, daha sonra açıklanacak olan XPS analizi ile teyit edilir. XRD analizi (Şekil 3.1), CSN'lerdeki amorf titanyanın, yumuşak hidrotermal muamele (T = 105 ° C) kullanılarak iyi kristallik (~% 95) ve küçük partikül boyutu (<10 nm) ile saf anatazda seçici olarak kristalleştirildiğini göstermiştir (Zaman = 24 saat). Kolay ve tekrarlanabilir bir yöntem kullanarak bu tür küçük anataz nanokristalinin faz-selektif oluşumu, geliştirilen prosedürün en iyi özelliklerinden biridir. TiP konsantrasyonunun fonksiyonu olarak CSN'lerin morfolojisi ve kabuk yapısı FEG-SEM ve TEM ile incelenmiştir. Saf SiO₂ yaklaşık 200 nm'lik düz küresel parçacıklara sahipken, CSN'lerin yüzeyi daha pürüzlü ve küçük TiO₂ NP'leri ile süslüdür.



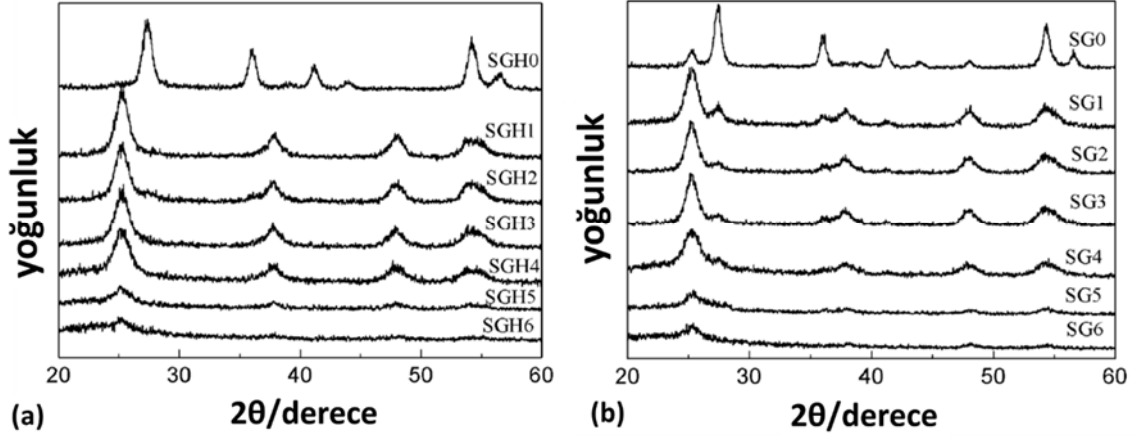
Şekil 3.1. 105 ° C'de HTT'den sonra elde edilen, kaplanmamış silika, desteksiz TiO₂ (T1 numunesi) ve hidrotermal kristalleşmiş CSNs örneklerinin XRD modelleri.

3.5.4. TEM Çalışmaları

Nanopartiküllerin yüzey morfolojisi için TEM cihazı (FEI-Tecnaı G2 Spirit Biotwin, ABD.) kullanılmıştır, örnekler çok seyrek hale getirildikten sonra karbon kaplı bakır gridler üzerine damlatılmış, açık havada kurutulmuş ve fotoğraflanmıştır.

3.5.5. FTIR Çalışmaları

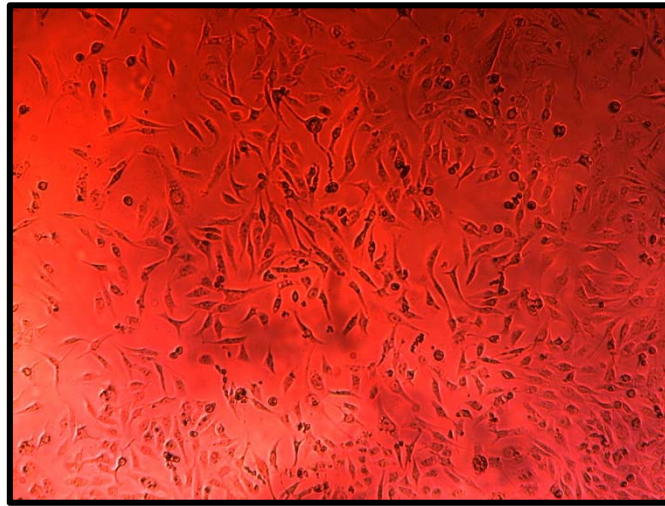
Titanyum-silika kompozit nanopartiküllerdeki Ti-O-Si bağlarının oluşumunu incelemek için FTIR cihazından yararlanılmıştır. Şekil 3.2'de, titanyum-silika karışımı için spesifik bantların sadece en ilginç bölgesi olan (1600-400 cm⁻¹), (Thermo scientific nicolet 6700 FTİR'da) ATM metodu ile çalışarak titanyum-silika kompozit nanopartiküllerin FT-IR iletim spektrumları verilmiştir. Tüm spektrumlarda 1620 cm⁻¹ civarında absorpsiyon pikleri, bükülme hidroksil modeli ile ilişkilendirilmiştir. Genel olarak titanyumun koordineli olarak doymamış Ti⁺⁴ yüzey alanlarının güçlü Lewis asitliği nedeniyle adsorbe edilmiş çözünmemiş suyunu kuvvetli bir şekilde koruduğu kabul edilmektedir. hazırlanan kompozit nanoparçacıkların kimyasal olarak bağlanmış malzemeler olabileceğini doğrulamıştır [123].



Şekil 3.2. 2 saat boyunca havada 600 ° C'de kalsine edilen saf titanyum ve titanyum silika kompozit nanopartiküllerin FT-IR iletim spektrum: (a) SGH serisi ve (b) SG serisi (* Ti-O-Si titreşimi) [123].

3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

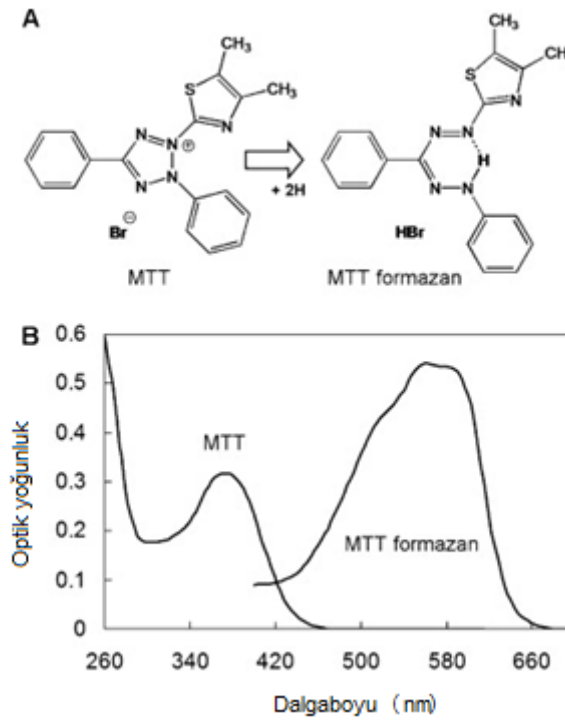
Bu çalışmada, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri kullanılmıştır (Şekil 3.3). Besiyeri olarak % 10 FBS (fötal sığır serumu), 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 2 mM L-glutamin ve 4500 mg/L glukoz içeren DMEM kullanılmıştır. Çalışmanın bütün aşamalarında hücreler %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de tutulmuştur. Hücre sayımları tripan mavisi ve hemositometre kullanılarak yapılmıştır.



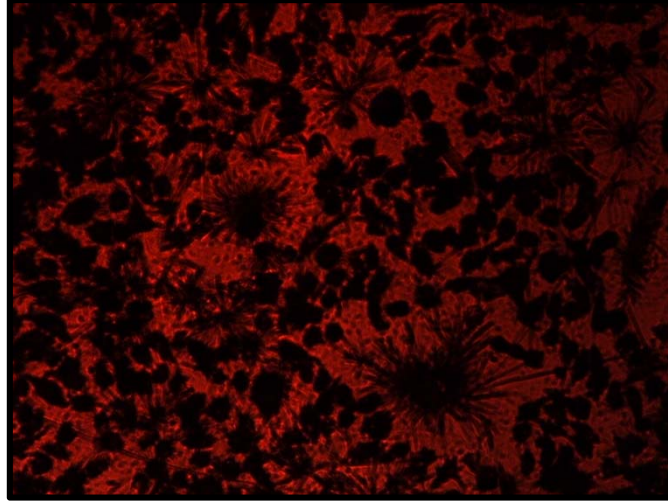
Şekil 3.3. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri.

3.6.1. MTT Testi ile Hücre Canlılığının İncelenmesi

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi [124], hücre biyolojisi alanında sitotoksitenin, hücre canlılığının ve proliferasyonun değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. MTT sarı renkli bir bileşiktir; canlı hücrelerdeki mitokondrilerde bulunan bir dehidrogenaz enziminin aktivitesi ile tetrazolyum halkasının kırılması sonucu, suda çözülmeyen mor renkli formazan bileşiğine dönüşür (Şekil 3.4). Oluşan bileşiğin miktarı kolorimetrik olarak tayin edilebilir. Bu dönüşümden yararlanılarak canlı hücre sayısı bulunur. Hücre sayısındaki artış, formazan kristallerinin, dolayısıyla spektrofotometrik ölçümlerdeki absorbansın artışına neden olacaktır. MTT uygulandıktan 4 saat sonra formazan bileşiğinin görüntüsü Şekil 3.5’de verilmiştir.



Şekil 3.4. (A) MTT ve formazanın kimyasal yapısı. (B) MTT ve formazanın absorpsiyon spektrumu [125].



Şekil 3.5. MTT uygulandıktan 4 saat sonra formazan bileşiğinin görüntüsü.

Bu çalışmada, 5×10^4 hücre/ml MDA-MB-231 hücre süspansiyonundan 96 kuyulu plaklara 100 μ l/kuyu olacak şekilde ekim yapılmış, plaklar, 37°C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. 24 saat inkübasyon sonrası test edilecek nanopartiküller 0,1; 1 ve 10 mg/ml konsantrasyonlarda plaklardaki hücrelerin olduğu kuyulara uygulanmıştır. PBS içerisinde hazırlanan NP süspansiyonu, uygulamalardan önce % 20 amplitütte 5-10 dakika sonike edilmiştir (Sonics Vibra Cell VCX 750, USA). Tüm deney süresince hücrelerin normal çoğalma sayısının ve inhibitör etkisi bilinen bir maddenin varlığında hücre sayılarının nasıl etkilendiğini test etmek üzere, en az 3 kuyuya sadece besiyeri uygulanmış ve yine en az 3 kuyuya da hidrojen peroksit içeren besiyeri eklenmiştir. Tüm uygulamalar en az 3 kez tekrarlanmıştır. 24. ve 48. saatlerde, her kuyuya 5 mg/ml MTT çözeltisinden 25 μ l eklenmiş, 4 saatlik inkübasyonun sonunda da kuyulara 0.01 N HCl içeren % 10 SDS çözeltisi eklenerek 16 saat daha bekletilmiştir. Örneklerin absorbanları 570 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu (SpectraMax M2, Molecular Devices) yardımıyla belirlenmiştir [126].

3.6.2. Floresan Mikroskop Çalışmaları

MDA-MB-231 hücreleri 24 kuyulu plaklara 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş, 24 saat sonunda kuyulara 1 mg/ml konsantrasyonda NP örnekleri eklenerek, 24 saat inkübasyonun ardından örnekler floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir.

3.6.3. Antibakteriyel Aktivitenin İncelenmesi

Antibakteriyel aktivitenin incelenmesi "Disk Difüzyon Yöntemi" ile yapılmıştır. Bu yöntem [127] *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bakterilerin çoğaltılması ve antibakteriyel aktivitenin incelenmesi aşamalarında LB katı ve/veya sıvı besiyeri kullanılmıştır. Yöntem aşağıdaki aşamalarda gerçekleştirilmiştir.

1. LB sıvı besiyeri: % 1 tripton, % 0.5 maya ekstraktı, % 1 NaCl içerecek şekilde hazırlanmış, NaOH ile pH 7'ye ayarlanmış ve otoklav kullanılarak steril edilmiştir.
2. LB agar: % 1 tripton, % 0.5 maya ekstraktı, % 1 NaCl içerecek şekilde hazırlanan besiyerinin pH'sı NaOH ile 7'ye ayarlanmış, katı besiyeri yapmak üzere 15 g agar eklenmiş ve sterilizasyon amacıyla otoklavlanmıştır. Petri kaplarına dökülen besiyerleri +4°C'de saklanmıştır.

LB sıvı besiyerinde çoğaltılan *E.coli* hücreleri, LB agar içeren petri kaplarına ekilerek 24 saat üretilmiştir. Bu petrilere elde edilen tek koloniler LB sıvı besiyerine alınarak çalkalamalı inkübatörde bulanıklığı 0.5 McFarland olacak şekilde üretildikten sonra LB agar içeren petri kaplarına ekilmiştir. Kurutulmuş ve steril edilmiş disklere NP örnekleri 5 mg/ml konsantrasyonda uygulanmıştır. Diskler, *E.coli* ekilmiş plaklara yerleştirilmiş, pozitif kontrol olarak ampisilin kullanılmıştır. Petri kapları 37°C'de 24 saat bekletilmiş, her bir diskin etrafında oluşan ve üreme inhibisyonunu gösteren zonların çapı ölçülerek antibakteriyel aktivite belirlenmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez kapsamında silika çekirdekli, floresan boyalar ile etiketlenmiş, floresan zenginleştirilmesi ile yüksek çözünürlükte görüntüleme sağlayacak titanyum dioksit kaplı boyalı nanopartiküllerin üretimi yapılarak, karakterizasyon ve çeşitli görüntüler alınmıştır. Floresan inorganik nanoparçacıklar, organik boyalardan farklı olarak önemli ölçüde ilginç optik özellikleri sunmaktadır. Nanopartiküllerin boy ve boy dağılımları ve yükleri Zetasizer ile bulunmuş, TEM ile kaplama yapılmadan önce ve kaplama yapıldıktan sonra partikül görüntüleri elde edilmiştir. Floresan mikroskop ile görüntüleme yapılarak floresan etiketlemenin başarısı araştırılmıştır. Bu nanopartiküllerin hem bakteriler hem de insan hücre hatları ile etkileşimleri hücre kültür ortamlarında gösterilerek, NPLerin etkisi ile *E.coli* parçalanması sonunda oluşan ("lysis") şeffaf daire çapları ile antibakteriyel etki saptanmıştır.

4.1. Silika Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Floresan Etiketlenmesi

(202 ± 20) nm çapında Stöber silika parçacıkları oda sıcaklığında, bazik ortamda (pH ~ 11), bir teflon reaktöründe, Bölüm 3.2 de detaylı anlatıldığı gibi üretilmiştir. Bu hidroliz-polikondansasyon adımından sonra, karışım 5 mol L⁻¹ HCL ile nötrleştirilmiş ve 10 dakika boyunca 3500 rpm'de santrifüj edilerek, süpernatant atılmış, çökelti, süspansiyon edici-santrifüjleme yöntemi ile üç kez su ile yıkanmış, son kalan çökelti, 70 ° C'de en az 15 saat süreyle kurutulmuştur. Elde edilen silika nanopartikülleri, kaplamaya bağlı olarak su veya etanol içinde süspansiyon edilmiş, 15 mg rodamin 6G süspansiyona ilave edilerek 24 saat karıştırılmıştır. Sol-jel işlemi, bu R6G içeren süspansiyona uygun öncül molekülün eklenmesiyle başlatılmıştır. R6G ile etiketlenmiş tüm süspansiyonlar ve tozlar, floresan boyanın foto-ağartma işlemini en aza indirmek için alüminyum folyo kullanılarak ışığa karşı korunmuştur.

4.2. Titanyum Dioksit Nanoparçacıkların Silika Nanopartiküllerine Kaplanması

Toz silika 110 ° C'de en az 1 saat kurutulularak, 0.2 g, 1 saat boyunca sonikasyon ile 30 mL izopropanol içerisinde dağıtılmıştır. Bu silika süspansiyon daha sonra bir Teflon reaktöre aktarılmış ve 50 mL daha izopropanol eklenerek, 5 dakika

manyetik karıştırma altında bırakılmıştır. Daha sonra farklı miktarda titanyum izopropoksit (TiP) (Çizelge 4.1.) [121] hızla ilave edilmiş ve reaktör kapağı sıkı bir şekilde kapatılmıştır. Numuneler içerdikleri % TiO₂ (ağırlıkça %) baz alınarak etiketlenmiştir. Karışım 19 saat manyetik karıştırma altında tutulmuş, daha sonra 9 mL su-alkol karışımı (3 mL H₂O: 6 mL izopropanol) yavaşça ilave edilmiş (2 mL dk⁻¹) ve manyetik karıştırma altında 1 saat karışmaya bırakılmıştır. Oluşan SiO₂@TiO₂ koloidal süspansiyonu daha sonra 10 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant alınarak, çökelti bir kez izopropanol ve iki kez deiyonize su ile yıkanmıştır. Amorf kabuk, hidrotermal işleme kristalleştirilmiştir. Elde edilen amorf CSN'ler 50 mL H₂O içinde süspansiyon edilmiş ve ev tipi havaya dayanıklı bir Teflon reaktöründe (kapasite 120 mL) 105 ° C'de 24 saat hidrotermal işleme tabi tutulmuştur. Hidrotermal muamele sonrası numuneler tekrar 3500 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüje edilmiş ve çökelen CSN'ler havada 100 ° C'de kurutulmuştur. Elde edilen partikül boyutu dağılımı Çizelge 4.1 de literatürle karşılaştırılarak verilmiştir. Tüm kaplanmış partiküllerin TEM fotoğrafları çekilmiş, zeta sizer ölçümleri yapılmış, örnek sonuçlar teze konulmuştur.

Çizelge 4.1. SiO₂ @ TiO₂ CSNs sentezi için kullanılan karışım ve analizden elde edilen partikül boyutu dağılımı.

Örnek	SiO ₂ (g)	TiP (mmol)	TiO ₂ (%) (wt.)	Partikül boyutu (nm)*
Silika	-	-	0	202 (20)
CS-10	0.2	0.46	10.4	225 (23)
CS-20	0.2	0.71	20.6	245 (25)
CS-30	0.2	1.4	31	250 (34)
CS-35	0.2	1.64	35	265 (33)
T1(Desteklenmemiş TiO ₂)	-	1.64	100	6.7 (1.2)

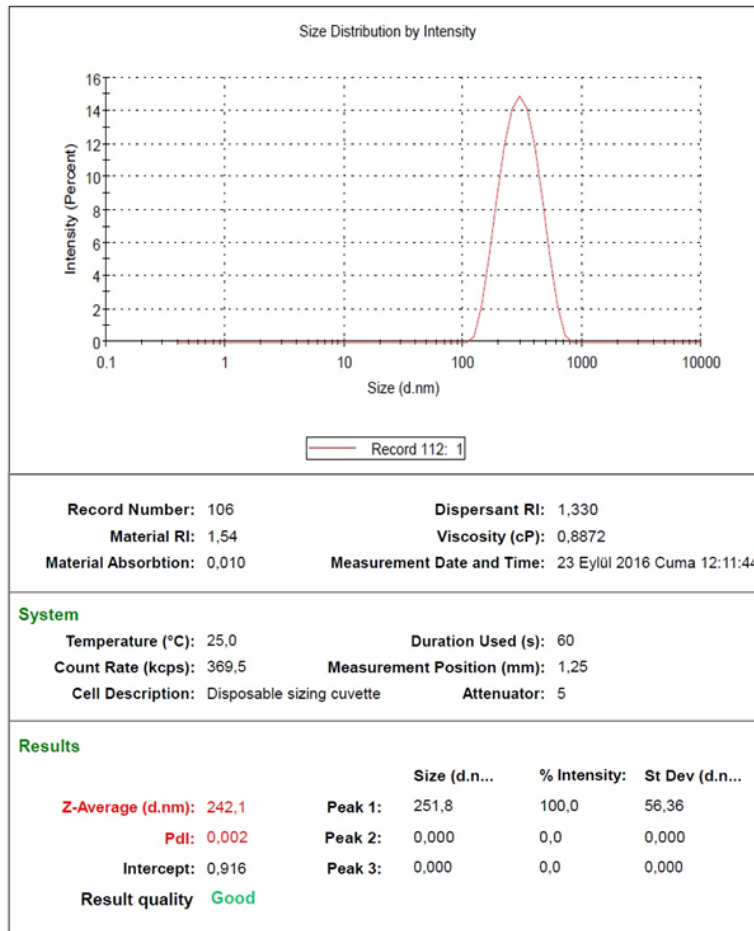
*T1 dışındaki bileşik SiO₂ @ TiO₂ parçacıklarının tanecik boyutu. Parantez içinde verilen değerler standart sapmayı gösterir [121].

4.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

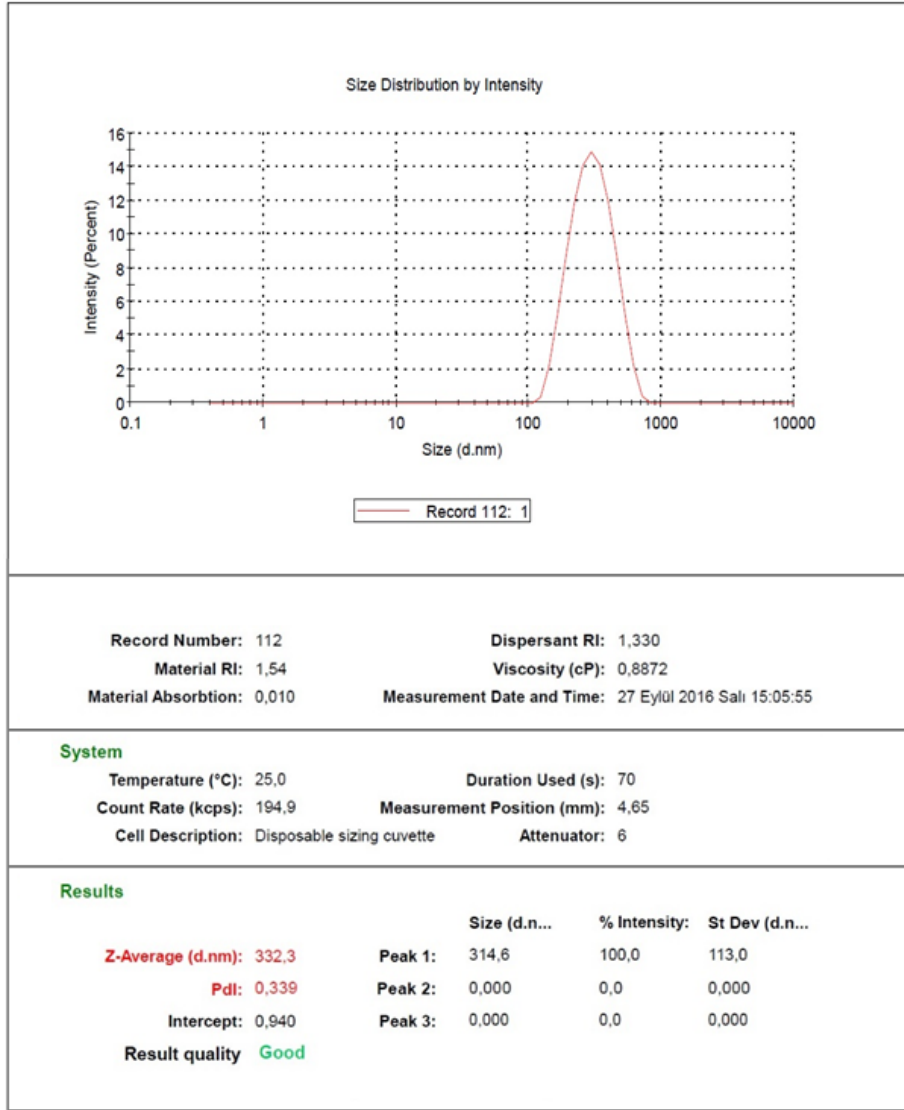
Nanopartiküllerin karakterizasyonu amacıyla yapılan çalışmalar aşağıda verilmiştir.

4.3.1. Nanopartiküllerin Boyut Analizi

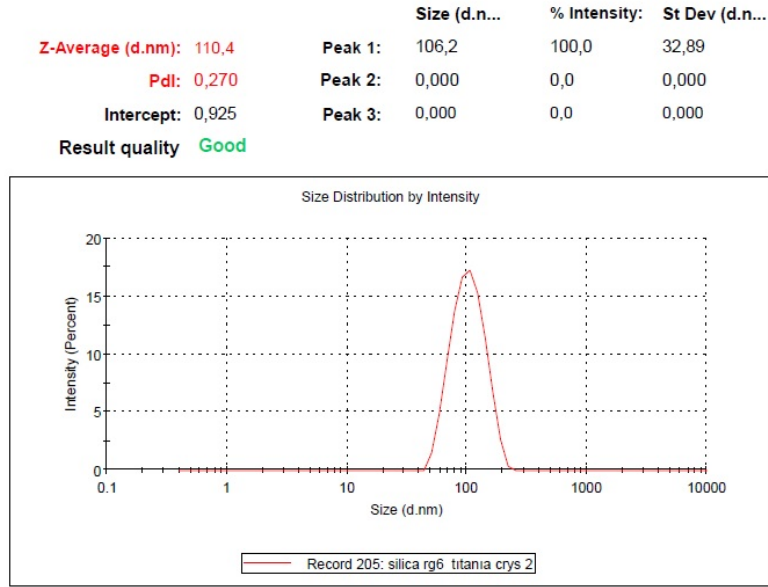
Nanopartiküllerin ortalama boyutlarını ölçmek için Zeta Sizer cihazı kullanılmıştır. Boy dağılımının grafiği ve verileri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de görülmektedir. Stöber yöntemi ile elde edilen silika nanopartiküllerin ortalama boyu 242 nm bulunmuştur. Titanyum dioksit kaplı rodamin 6G ile boyanmış silika nanopartiküllerin boyutunun da 332 nm ye yükseldiği gözlenmiştir. Daha küçük partiküller elde edebilmek için sonra santrifüjleme ile büyük nanopartiküller çöktürülmüş ve sadece 110 nm boyutunda olan nanopartiküller elde edilmiş ve Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Silika nanopartiküllerin boyut analizi.



Şekil 4.2. Zeta Sizer'dan elde edilen titanyum dioksit kaplı boyalı silika nanopartiküllerin boyut analizi.



Şekil 4.3. Zeta Sizer'dan elde edilen titanyum dioksit kaplı boyalı silika nanopartiküllerin boyut analizi.

4.3.2. Nanopartiküllerin Yüzey Yükü Analizi

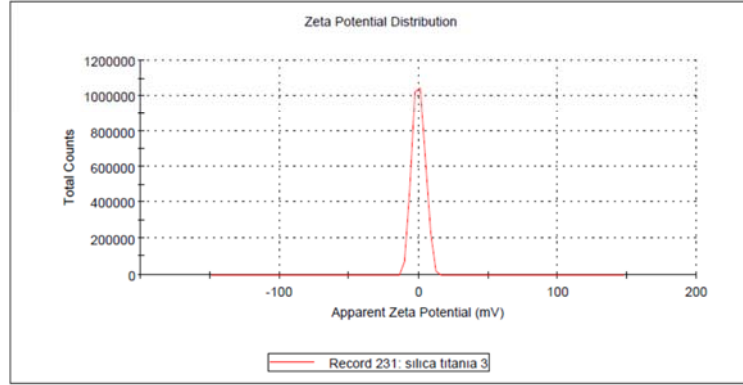
Zeta potansiyeli (ζ -potansiyeli) katılar ve sıvılar arasındaki faz sınırları arasındaki potansiyel farktır. Bu, sıvı içinde asılı olan parçacıkların elektrik yükünün bir ölçüsüdür. Zeta potansiyeli, genellikle koloidal dispersiyonun çift katlı özelliklerini tanımlamak için kullanılacak tek değerdir. Elektrokinetik potansiyel olarak da bilinen Zeta potansiyeli milivolt (mV) olarak ölçülür. Tipik olarak, zeta potansiyeli ne kadar yüksek olursa kolloid o kadar kararlı olur. -15 mV'den daha az negatif olan Zeta potansiyeli, tipik olarak parçacıkların aglomerasyonunun başlangıcını gösterir. Zeta potansiyeli sıfıra eşit olduğunda, kolloid katı bir madde olarak çökecektir.

Boyama ve kaplama işlemi yapıldıktan sonra elde edilen örneklerin zeta potansiyeli sonuçları Şekil 4.4' te verilmiştir. Örneklerin zeta potansiyeli 0.00452 mV olarak bulunmuştur.

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 0,00452	Peak 1: 0,00452	100,0	4,52
Zeta Deviation (mV): 4,52	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00887	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality See result quality report

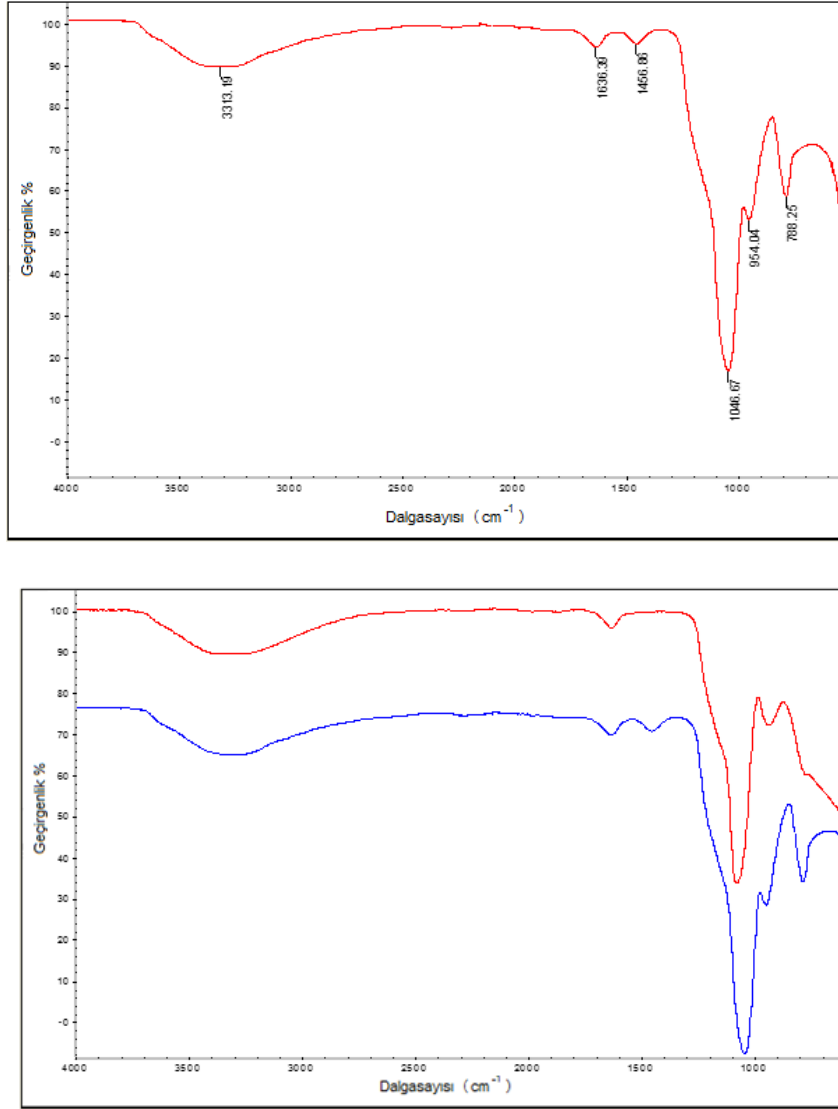


Şekil 4.4. Zeta Sizer'dan elde edilen titanyum dioksit kaplı boyalı silika nanopartiküllerin zeta potansiyel analizi

4.4. FTIR Sonuçları

Titanyum-silika kompozit nanopartiküllerdeki Ti-O-Si bağlarının oluşumu FTIR ile gösterilmiştir. Şekil 4.5' te titanyum-silika karışımı için spesifik bantların en ilginç bölgesi olan $1600-400\text{ cm}^{-1}$ aralığında, Thermo Scientific Nicolet 6700 FTIR'da ATM yöntemi ile çalışılarak elde edilen titanyum-silika kompozit nanopartiküllerin FT-IR iletim spektrumları verilmiştir. Tüm spektrumlarda 1620 cm^{-1} civarında absorpsiyon pikleri, bükülme hidroksil modeli ile ilişkilendirilmiştir. Genel olarak titanyumun koordineli olarak doymamış Ti^{+4} yüzey alanlarının güçlü Lewis asitliği nedeniyle adsorbe edilmiş çözünmemiş suyunu kuvvetli bir şekilde koruduğu kabul edilmektedir. Yoğunlaşma reaksiyonunun sonucu olarak Ti-O-Ti titreşimi $400-600\text{ cm}^{-1}$ aralığında ortaya çıkmıştır. Titanyum-silika kompozit nanopartiküller için, 800 cm^{-1} 'deki pik, Si-O-Si'nin simetrik gerilme titreşimine, 1087 veya 1110 cm^{-1} 'deki pikler ise Si-O-Si'nin asimetrik gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. Teorik olarak, TiO_2 ve SiO_2 arasındaki iki tür etkileşimi ayırt etmek mümkündür: fiziksel olarak karışık (zayıf Van der Waals kuvvetleri) ve kimyasal olarak bağlanmış (Ti-O-Si bağlarının oluşumu). Ti-O-Si bağlarının oluşumunu incelemek için en basit yol, IR spektroskopisi kullanmaktır. $910-960\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen IR bandı, Ti-O-Si bağlarının gerilme titreşim bandına bağlı olabilir. Dolayısıyla, her iki yoldan hazırlanan titanyum silika kompozit nanopartiküllerin spektrumundaki $930-960\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu, Ti-O-Si bağlarının oluşma olasılığını göstermektedir. Kompozit

nanopartiküllerdeki SiO₂ içeriği ne kadar yüksek olursa, bu pik o kadar yoğun olur. Özet olarak, FT-IR spektrumları, hazırlanan kompozit nanoparçacıkların kimyasal olarak bağlanmış malzemeler olabileceği doğrulanmıştır.

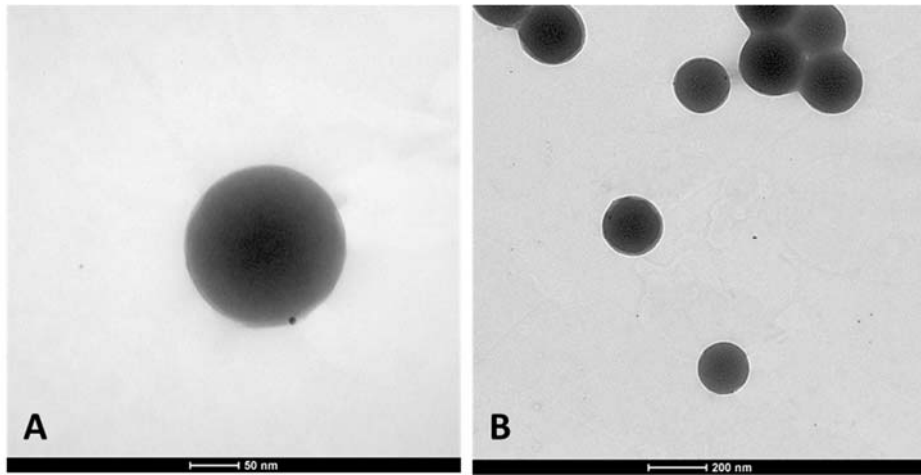


Şekil 4.5. Titanyum-silika kompozit nanopartiküllerdeki Ti-O-Si bağlarının oluşumu

4.5. SiO₂ @ TiO₂'nin Kabuk Yapısı ve Morfolojisi

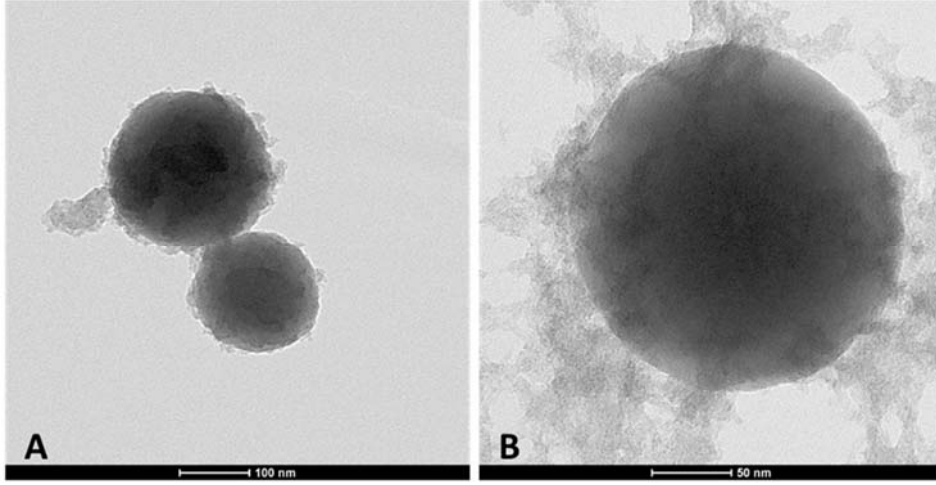
Sol-jel yöntemi ile elde edilen nanokristalin TiO₂'nin özellikleri, proses parametrelerinin optimizasyonu ile kontrol edilebilir [122]. SiO₂ yüzeyinde hidroliz-polikondensasyon adımı tarafından üretilen tüm TiO₂'nin başarılı bir şekilde kaplanması doğal olarak TiO₂ NP'lerin üretilmesi ve çökmesi oranları arasındaki dengeye bağlıdır. Çekirdeksiz TiO₂ NPs oluşumunu önlemek için, öncül (TiP) hidroliz yoğunlaştırma aşamasından önce 19 saat boyunca SiO₂ yüzeyinde önceden adsorbe edilmiştir. TiP'nin hidrolizi muhtemelen adsorpsiyon aşamasında oluşur ve kısmen hidrolize edilmiş ön madde ile silika yüzeyleri arasındaki ara yüzey Si-O-Ti bağının oluşumuna neden olur. TiP konsantrasyonunun fonksiyonu olarak CSN'lerin morfolojisi ve kabuk yapısı TEM ile incelenmiştir. Saf SiO₂ yaklaşık 200 nm'lik düz küresel parçacıklara sahipken, CSN'lerin yüzeyi daha pürüzlü ve küçük TiO₂ NP'leri ile süslüdür.

TEM, ışık mikroskopu ile aynı temel ilkeler üzerinde çalışır, ancak ışık yerine elektronlar kullanır. Elektronların dalga boyu ışığından çok daha küçük olduğu için, TEM görüntüleri için elde edilebilecek en uygun çözünürlük, ışık mikroskopuna göre çok daha büyük olacaktır. Böylece, TEM'ler iç yapının en ince detaylarını ortaya çıkarabilir.



Şekil 4.6. Silika nanopartiküllerin A) 50 nm de, B) 200 de TEM görüntüsü

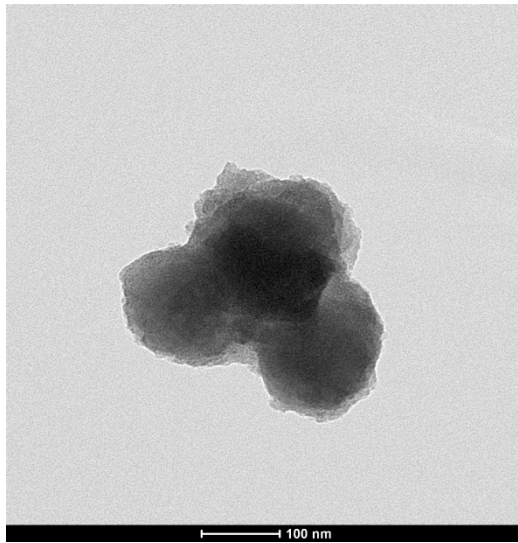
Şekil 4.6' dan silika nanopartiküllerin küresel ve ortalama boyutunun 50-100 nm civarında olduğu görülmektedir.



Şekil 4.7. Titanyum dioksit kaplı silika nanopartiküllerin A) 100 nm de, B) 50 nm de TEM görüntüleri.

Ayrıca (Şekil 4.7) incelendiğinde silika nanopartiküllerinin çevresinin titanyum dioksit nanopartikülleri ile kaplandığı görülmektedir. Bu durumda boyut 100 nm nin üzerine çıkmaktadır.

Şekil 4.8'de ise Silika@Titanya nanokristallerinin TEM görüntüsü verilmiştir. TiO_2 nanopartiküllerine ısıtma işlemi uygulandıktan sonra, kristallenmenin olduğu görülmektedir.

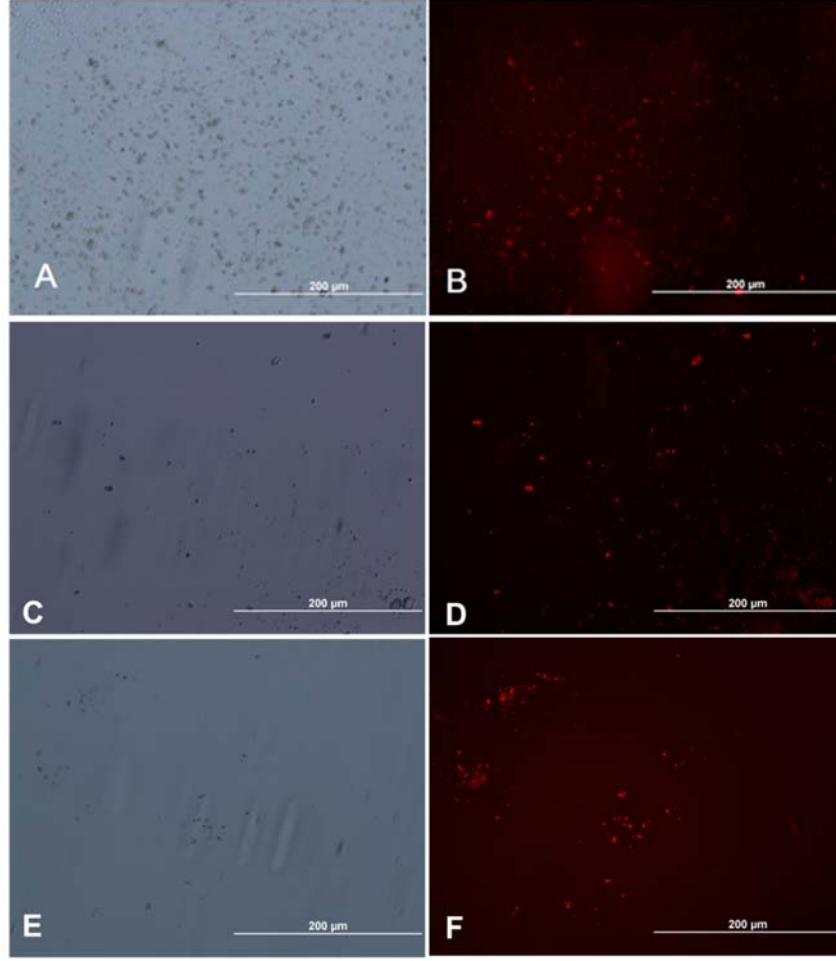


Şekil 4.8. Silika@Titanya nanokristallerinin TEM görüntüsü.

4.6. Floresan Mikroskop Görüntüleri

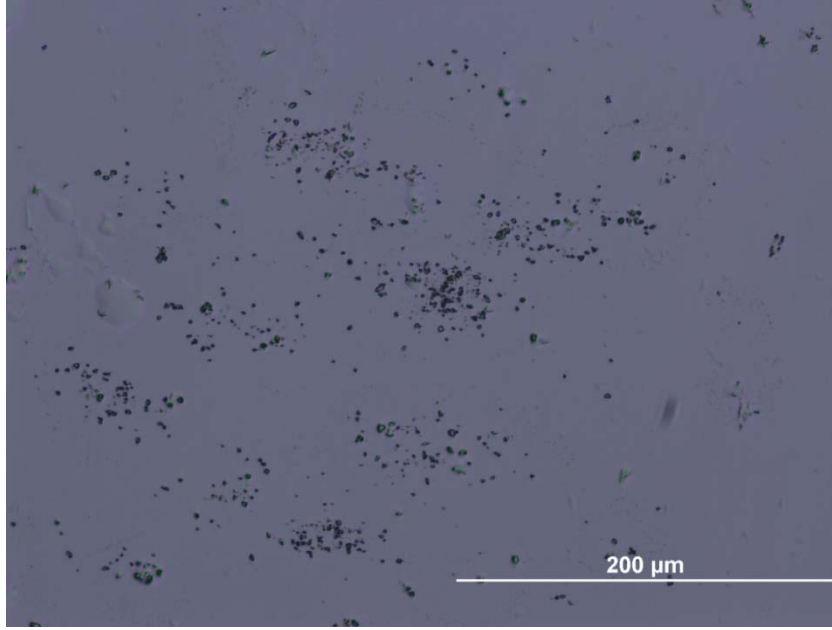
Floresan, biyolojik ve analitik mikroskopide, çoğunlukla yüksek duyarlılığı ve yüksek özgünlüğü nedeniyle en sık kullanılan fiziksel fenomenlerden biridir. Floresans bir lüminesans biçimidir. Floresan mikroskopisi, kullanıcıların tek bir molekül türünün dağılımını, miktarını ve hücredeki yerini belirlemesine olanak tanır. Boyama (etiketleme) işlemi polimer kaplama aşamasından sonra gerçekleştirilmiştir. Floresan mikroskop ile okunabilir etiketleme sağlayabilmek için uygun etiketleme protokolu belirlenmiştir. Görüntüleme için bir Floresan mikroskop (Fluorescence Inverted Microscope, Olympus IX70, Japonya) kullanılmıştır. Floresan boya çözeltileri hazırlanmış ve NPlar ile etkileştirilmiştir. Polimer tabaka boyandıktan sonra, bağlanmayan boya polimerik partiküllerin süpernatantta boya kalmayana kadar distile suyla yıkanmasıyla ayrılmıştır.

Şekil 4.9' da Rodamin 6G ile boyanmış silika nanopartiküllerin invert mikroskop görüntüleri ve aynı alanların floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.10'da Titanyum dioksit kaplı silika nanopartiküllerin invert mikroskop görüntüsü ve Şekil 4.11' de silika çekirdekli titanyum dioksit nanopartiküllerinin kristallenmiş hali görülmektedir.

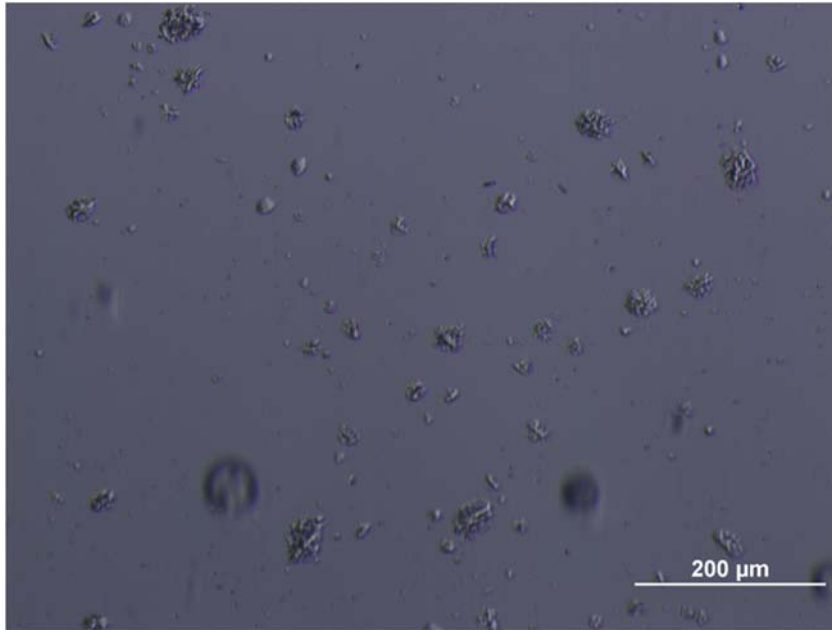


Şekil 4.9. A,C,E) Rodamin 6G ile boyanmış Silika nanopartiküllerin inverted görüntüleri ve B,D,F) aynı alanların floresan mikroskop görüntüleri.

Şekil 4.9' da floresan mikroskop görüntüleri ile karşılaştırıldığında, inverted görüntülerin olduğu aynı yerlerde boyamanın olduğu gözlenmektedir.



Şekil 4.10. Titanyum dioksit kaplı rodamin 6G boyalı silika nanopartiküllerinin inverted mikroskop görüntüsü.

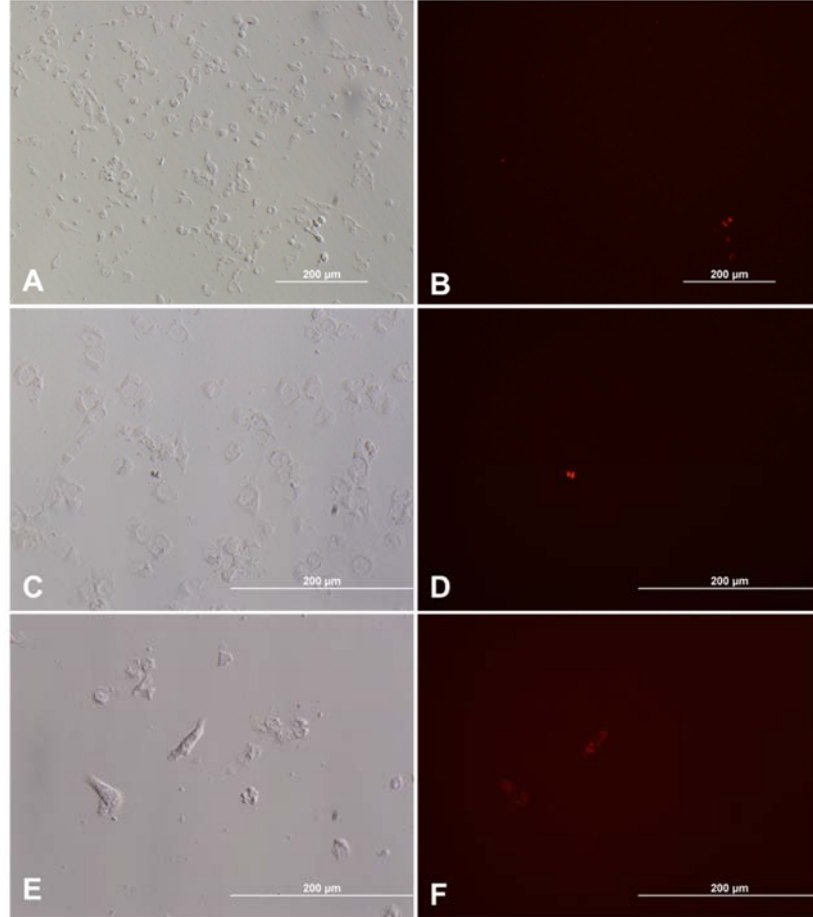


Şekil 4.11. Silika çekirdekli titanyum dioksit nano kristallerin inverted mikroskop görüntüsü.

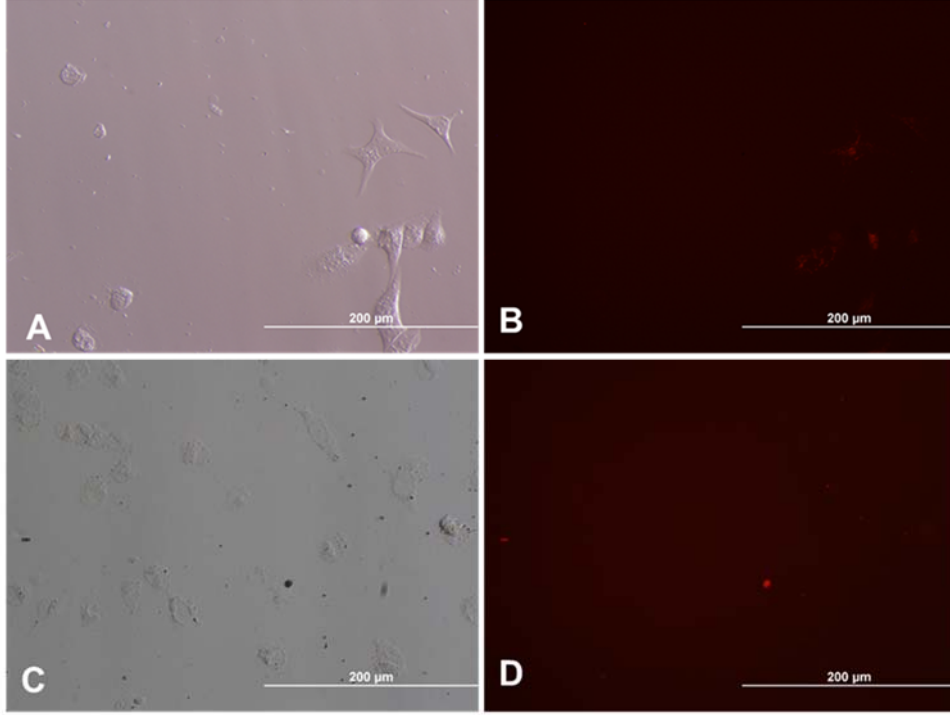
Şekiller 4.10 ve 4.11 karşılaştırıldığında, ısıl işlem sonucunda kristallenmenin başarılı bir şekilde olduğu görülmektedir.

4.5.1. Hücreler ile Nanopartiküllerin Etkileşmesi

Elde edilen nanopartiküllerin hücre canlılığının azalmasına neden olduğu Şekil 4.12 ve 4.13’ de görülmektedir, aynı zamanda nanopartiküllerin boyanması ile floresan mikroskop görüntüleri de elde edilmiştir.



Şekil 4.12. A,C,E) Titanyum dioksit kaplı rodamin 6G ile boyanmış silika nanopartiküllerin, MDA-MB-231 hücrelerine uygulanma sonucu inverted mikroskop görüntüleri ve B,D,F) aynı alanın floresan mikroskop görüntüleri.



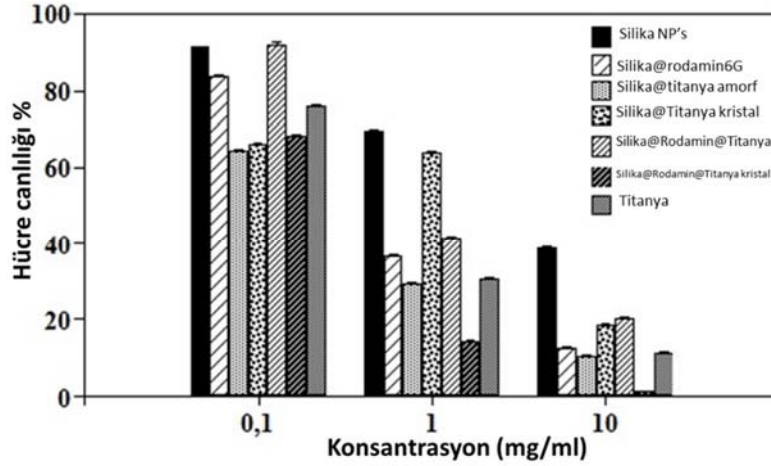
Şekil 4.13. Titanyum dioksit kaplı rodamin 6G ile boyanmış silika nanopartiküllerin, MDA-MB-231 hücrelerine uygulanma sonucu inverted mikroskop görüntüleri ve B,D,F) aynı alanın floresan mikroskop görüntüleri.

4.7. MTT Testi ile Hücre Canlılığının İncelenmesi

MTT testi ile hücre canlılığının incelendiği deney aşamalarında, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 96 kuyulu plaklara 5000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler, DMEM besiyerinde 24 saat üretildikten sonra besiyeri farklı konsantrasyonlarda NP'leri (0.1, 1, 10 mg/ml) ve kontrol olarak PBS'i içeren besiyerleri ile değiştirilmiştir. Besiyerine herhangi bir madde eklenmeden hücre canlılığının nasıl etkilendiğinin gözlenebilmesi için en az 3 kuyuya sadece besiyeri, olası en düşük hücre canlılığı koşullarının incelenmesi için de besiyeri ile birlikte başlangıçta en az 3 kuyuya H₂O₂ eklenmiştir. Her bir konsantrasyonun ve maddenin analizi için en az 3 uygulama yapılmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda her kuyuya MTT çözeltisinden eklenmiş, 4 saat sonra % 10 SDS çözeltisi eklenerek 16 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda mikropilaka okuyucu yardımı ile 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri bulunmuştur.

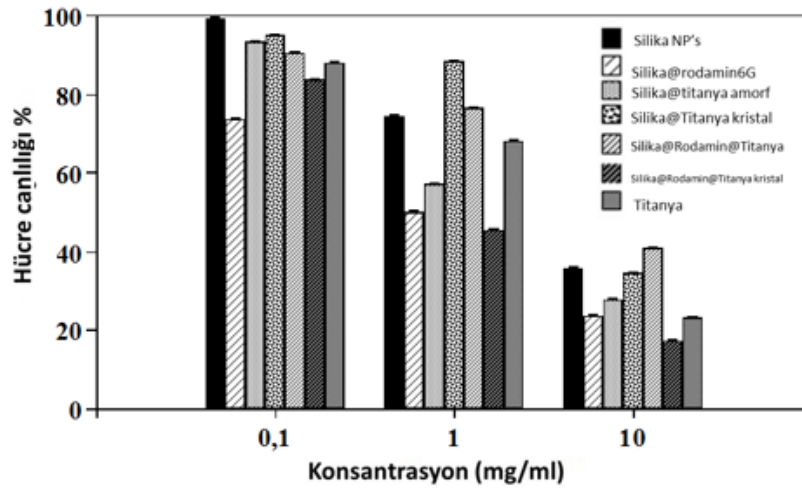
NP'lerin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Buna göre, konantrasyondaki artışa bağlı olarak her bir örneğin meme kanseri hücrelerinin canlılığını azalttığı gözlenmiştir. Elde edilen

bulgulardan hesaplanan IC₅₀ değerleri 1. örnekten başlayarak sırasıyla 4.28, 0.47, 1.08, 0.22, 0.94, 0.69 ve 0.27 mg/ml konsantrasyonlarda bulunmuştur.



Şekil 4.14. NP'lerin uygulandıktan 24 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığına etkileri.

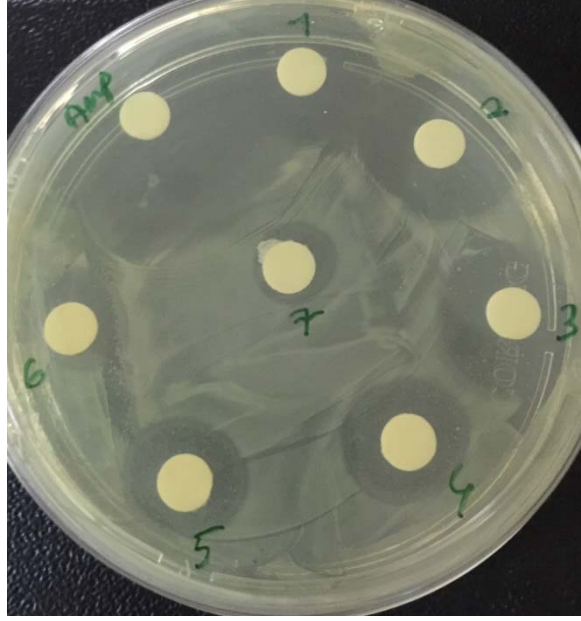
NP'lerin 48 saat inkübasyonu sonunda da MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığında belirgin bir azalma olduğu Şekil 4.15'de gösterilmiştir. Elde edilen bulgulardan IC₅₀ değerleri 1. örnekten başlayarak sırasıyla 4.22, 1.99, 5.93, 0.92, 5.60, 1.93 ve 0,91 mg/ml konsantrasyonlarında elde edilmiştir.



Şekil 4.15. NP'lerin 48 saat inkübasyon sonunda MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığına etkisi.

4.8. Antibakteriyel Aktivitenin İncelenmesi

Antibakteriyel aktivitenin incelenmesi disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. NP'lerin disklere uygulanması sonrasında 24 saatlik inkübasyonun ardından oluşan zon çapları ölçülmüştür. NP'lerin *E. coli* hücrelerindeki antimikrobiyal etkisi Şekil 4.16'da görülmektedir.



Şekil 4.16. NP'lerin *E. coli* hücrelerindeki antimikrobiyal etkisi. Amp: Ampisilin, (1) Silika, (2) Silika@Rodamin 6G (3) Silika@Titanya (4) Silika@Titanya(5) Silika@Rodamin 6G@Titanya(6) Silika@Rodamin 6G@Titanya (7) Titanya.

Şekil 4.16' dan örneklerin zon çapları sırasıyla 20, 25, 20, 15, 15, 12 ve 10 mm olarak ölçülmüş, kontrol olarak kullanılan ampisilin zon çapı da 45 mm olarak bulunmuştur.

5. GENEL SONUÇLAR

- Bu tez kapsamında, Silika nanopartiküllerin sentezlenmesi Stöber yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin ortalama boyutlarını ölçmek için Zeta Sizer cihazı kullanılmıştır. Stöber yöntemi ile elde edilen silika nanopartiküllerin ortalama boyu 240 nm bulunmuştur ve titanyum dioksit kaplı rodamin 6G ile boyanmış silika nanopartiküllerin boyutu da 330 nm civarına yükselmiştir. Yüksek hızda santrifüj cihazı kullanarak daha küçük boyutta olan nanopartiküllerin ayrımı yapılmıştır. Titanyum dioksit kaplı silika nanopartiküllerin boyutu 50-100 nm'ye kadar elde edilmiştir.
- Nanopartiküllerin floresan etiketleme işlemi kaplamadan önce uygulanmıştır. Sol-jel işlemi, R6G içeren süspansiyona uygun öncül bileşiğin eklenmesiyle başlatılmıştır. R6G ile etiketlenmiş tüm süspansiyonlar ve tozlar, floresan boyanın foto-ağartma işlemini en aza indirmek için alüminyum folyo kullanılarak ışığa karşı korunmuştur.
- Rodamin 6G ile boyanmış Silika nanopartiküllerin inverted görüntüleri ve aynı alanların floresan mikroskop görüntüleri alınmıştır.
- CSN'lerdeki amorf titanyanın, yumuşak hidrotermal muamele ($T = 105^{\circ} C$) kullanılarak iyi kristallik (~% 95) ve küçük partikül boyutu (<10 nm) ile saf anatazda seçici olarak kristalleştirildiği gösterilmiştir. Kolay ve tekrarlanabilir bir yöntem kullanarak bu tür küçük anataz nanokristalinin faz-selektif oluşumu, geliştirilen prosedürün en iyi özelliklerinden biridir. Saf SiO_2 yaklaşık 200 nm'lik düz küresel parçacıklara sahipken, CSN'lerin yüzeyi daha pürüzlü ve küçük TiO_2 NP'leri ile süslenmesi TEM görüntülerinde belirlenmiştir.
- Titanyum-silika kompozit nanopartiküllerdeki Ti-O-Si bağlarının oluşumunu incelemek için FTIR cihazından yararlanmıştır. Tüm spektrumlarda 1620 cm^{-1} civarında absorpsiyon pikleri, bükülme hidroksil modeli ile ilişkilendirilmiştir. Genel olarak titanyumun koordineli olarak doymamış Ti^{+4} yüzey alanlarının güçlü Lewis asitliği nedeniyle adsorbe edilmiş çözünmemiş suyunu kuvvetli bir şekilde koruduğu kabul edilmektedir. Yoğunlaşma reaksiyonunun sonucu olarak Ti-O-Ti titreşimi $400-600\text{ cm}^{-1}$

aralığında görülmüştür. Titanyum-silika kompozit nanopartiküller için, 800 cm^{-1} 'deki pik, Si-O-Si'nin simetrik gerilme titreşimine ve 1087 veya 1110 cm^{-1} 'deki pikler de Si-O-Si'nin asimetrik gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. Teorik olarak, TiO_2 ve SiO_2 arasındaki iki tür etkileşimi ayırt etmek mümkündür: fiziksel olarak karışık (zayıf van der Waals kuvvetleri) ve kimyasal olarak bağlanmış (Ti-O-Si bağlarının oluşumu). Ti-O-Si bağlarının oluşumunu incelemek için en basit yol, IR spektroskopisi kullanmaktır. 910-960 cm^{-1} 'de gözlemlenen IR bandı, Ti-O-Si bağlarının gerilme titreşim bandına bağlı olabilir Dolayısıyla, her iki yoldan hazırlanan titanyum silika kompozit nanopartiküllerin spektrumundaki 930-960 cm^{-1} dalga boyunda, Ti-O-Si bağlarının oluşma olasılığını göstermektedir. Kompozit nanopartiküllerdeki SiO_2 içeriği ne kadar yüksek olursa, bu pik o kadar yoğun olur.

- Bu çalışmada, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Deney süresince hücrelerin normal çoğalma sayısının ve inhibitör etkisi bilinen bir maddenin varlığında hücre sayılarının nasıl etkilendiğini test etmek üzere, en az 3 kuyuya sadece besiyeri uygulanmış ve yine en az 3 kuyuya da hidrojen peroksit içeren besiyeri eklenmiştir. Tüm uygulamalar en az 3 kez tekrarlanmıştır. 24. ve 48. saatlerde, her kuyuya 5 mg/ml MTT çözeltisinden 25 μl eklenmiş, 4 saatlik inkübasyonun sonunda da kuyulara 0.01 N HCl içeren % 10 SDS çözeltisi eklenerek 16 saat daha bekletilmiştir. Örneklerin absorbansları 570 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu (SpectraMax M2, Molecular Devices) yardımıyla belirlenmiştir.
- MDA-MB-231 hücreleri 24 kuyulu plaklara 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş, 24 saat sonunda kuyulara 1 mg/ml konsantrasyonda NP örnekleri eklenerek, 24 saat inkübasyonun ardından örnekler floresan mikroskop yardımıyla incelenmiştir.
- Disk difüzyon yöntemi *Escherichia coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Bakterilerin çoğaltılması ve antibakteriyel aktivitenin incelenmesi aşamalarında LB katı ve/veya sıvı besiyeri kullanılmıştır.
- NP'lerin 48 saat inkübasyonu sonunda da MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığında belirgin bir azalma olduğu gösterilmiştir.

- Titanyum dioksit kaplı rodamin 6G ile boyanmış silika nanopartiküllerin, MDA-MB-231 hücrelerine uygulanma sonucu inverted mikroskop görüntüleri ve aynı alanın floresan mikroskop görüntüleri alınarak hücre canlılığının azalması gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında altın ve gümüş esaslı nanopartiküllere alternatif olarak silika çekirdekli, floresan boyalar ile etiketlenmiş, floresan zenginleştirilmesi ile yüksek çözünürlükte görüntüleme sağlayacak titanyum kaplı çok katmanlı tek boyalı nanopartiküllerin üretimi yapılmıştır. Bu nanopartiküllerin hem bakteriler hem de insan hücre hatları ile etkileşimleri hücre kültür ortamlarında gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Moreno-Vega, A.-I., Gómez-Quintero, T., Nuñez-Anita, R.-E., Acosta-Torres, L.-S., Castaño, V., Polymeric and ceramic nanoparticles in biomedical applications, *Journal of Nanotechnology*, 2012, **2012**.
- [2] Bouccara, S., Sitbon, G., Fragola, A., Loriette, V., Lequeux, N., Pons, T., Enhancing fluorescence in vivo imaging using inorganic nanoprobes, *Current opinion in biotechnology*, 34, 65-72, **2015**.
- [3] Erathodiyil, N., Ying, J.Y., Functionalization of inorganic nanoparticles for bioimaging applications, *Accounts of chemical research*, 44, 925-935, **2011**.
- [4] Tiwari, D.K., Tanaka, S.-I., Inouye, Y., Yoshizawa, K., Watanabe, T.M., Jin, T., Synthesis and characterization of anti-HER2 antibody conjugated CdSe/CdZnS quantum dots for fluorescence imaging of breast cancer cells, *Sensors*, 9, 9332-9354, **2009**.
- [5] Duan, H.W., Nie, S.M., Cell-penetrating quantum dots based on multivalent and endosome-disrupting surface coatings, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 3333-3338, **2007**.
- [6] Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R., Mattoussi, H., Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing, *Nature Materials*, 4, 435-446, **2005**.
- [7] Selvan, S.T., Tan, T.T.Y., Yi, D.K., Jana, N.R., Functional and Multifunctional Nanoparticles for Bioimaging and Biosensing, *Langmuir*, 26, 11631-11641, **2010**.
- [8] Aldana, J., Lavelle, N., Wang, Y., Peng, X., Size-dependent dissociation pH of thiolate ligands from cadmium chalcogenide nanocrystals, *Journal of the American Chemical Society*, 127, 2496-2504, **2005**.
- [9] Duan, H., Nie, S., Cell-penetrating quantum dots based on multivalent and endosome-disrupting surface coatings, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 3333-3338, **2007**.
- [10] Susumu, K., Uyeda, H.T., Medintz, I.L., Pons, T., Delehanty, J.B., Mattoussi, H., Enhancing the stability and biological functionalities of quantum dots via compact multifunctional ligands, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 13987-13996, **2007**.
- [11] Selvan, S.T., Tan, T.T.Y., Yi, D.K., Jana, N.R., Functional and multifunctional nanoparticles for bioimaging and biosensing, *Langmuir*, 26, 11631-11641, **2009**.

- [12] Zhelev, Z., Ohba, H., Bakalova, R., Single quantum dot-micelles coated with silica shell as potentially non-cytotoxic fluorescent cell tracers, *Journal of the American Chemical Society*, 128, 6324-6325, **2006**.
- [13] Giaume, D., Poggi, M., Casanova, D., Mialon, G., Lahlil, K., Alexandrou, A., Gacoin, T., Boilot, J.-P., Organic functionalization of luminescent oxide nanoparticles toward their application as biological probes, *Langmuir*, 24, 11018-11026, **2008**.
- [14] Nishioka, Y., Yoshino, H., Lymphatic targeting with nanoparticulate system, *Advanced drug delivery reviews*, 47, 55-64, **2001**.
- [15] Ha, T., Enderle, T., Chemla, D., Selvin, P., Weiss, S., Quantum jumps of single molecules at room temperature, *Chemical physics letters*, 271, 1-5, **1997**.
- [16] Köhn, F., Hofkens, J., Gronheid, R., Van der Auweraer, M., De Schryver, F.C., Parameters influencing the on-and off-times in the fluorescence intensity traces of single cyanine dye molecules, *The Journal of Physical Chemistry A*, 106, 4808-4814, **2002**.
- [17] Zondervan, R., Kulzer, F., Orlinskii, S.B., Orrit, M., Photoblinking of rhodamine 6G in poly (vinyl alcohol): Radical dark state formed through the triplet, *The Journal of Physical Chemistry A*, 107, 6770-6776, **2003**.
- [18] Holmes, K.L., Lantz, L.M., Protein labeling with fluorescent probes, *Methods in cell biology*, 63, 185-204, **2001**.
- [19] Banks, P.R., Paquette, D.M., Comparison of three common amine reactive fluorescent probes used for conjugation to biomolecules by capillary zone electrophoresis, *Bioconjugate chemistry*, 6, 447-458, **1995**.
- [20] Hung, S.-C., Ju, J., Mathies, R.A., Glazer, A.N., Energy transfer primers with 5-or 6-carboxyrhodamine-6G as acceptor chromophores, *Analytical biochemistry*, 238, 165-170, **1996**.
- [21] Wolfbeis, O.S., An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging, *Chemical Society Reviews*, 44, 4743-4768, **2015**.
- [22] Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L.-O., Von Mikecz, A., Grether-Beck, S., Schins, R.P., Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms, *Nanotoxicology*, 1, 52-71, **2007**.

- [23] Benezra, M., Penate-Medina, O., Zanzonico, P.B., Schaer, D., Ow, H., Burns, A., DeStanchina, E., Longo, V., Herz, E., Iyer, S., Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma, *The Journal of clinical investigation*, 121, 2768-2780, **2011**.
- [24] Yamashita, K., Yoshioka, Y., Higashisaka, K., Mimura, K., Morishita, Y., Nozaki, M., Yoshida, T., Ogura, T., Nabeshi, H., Nagano, K., Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice, *Nature nanotechnology*, 6, 321-328, **2011**.
- [25] Yang, X., Liu, J., He, H., Zhou, L., Gong, C., Wang, X., Yang, L., Yuan, J., Huang, H., He, L., SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells, *Particle and fibre toxicology*, 7, 1, **2010**.
- [26] Liberman, A., Mendez, N., Trogler, W.C., Kummel, A.C., Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine, *Surface science reports*, 69, 132-158, **2014**.
- [27] Mura, S., Nicolas, J., Couvreur, P., Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nat Mater*, 12, 991-1003, **2013**.
- [28] Wang, K., He, X., Yang, X., Shi, H., Functionalized silica nanoparticles: a platform for fluorescence imaging at the cell and small animal levels, *Accounts of chemical research*, 46, 1367-1376, **2013**.
- [29] Zhou, H., Lv, X., Zhang, L., Gong, A., Wu, A., Liang, Z., Peng, G., Lin, H., A facile and in situ approach to fluorescent mesoporous silica and its applications in sensing and bioimaging, *Journal of Materials Chemistry C*, 2, 9625-9630, **2014**.
- [30] Mader, H., Li, X., Saleh, S., Link, M., Kele, P., Wolfbeis, O.S., Fluorescent silica nanoparticles, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1130, 218-223, **2008**.
- [31] Saleh, S.M., Ali, R., Wolfbeis, O.S., New silica and polystyrene nanoparticles labeled with longwave absorbing and fluorescent chameleon dyes, *Microchimica Acta*, 174, 429-434, **2011**.
- [32] Bae, S.W., Tan, W., Hong, J.-I., Fluorescent dye-doped silica nanoparticles: new tools for bioapplications, *Chemical communications*, 48, 2270-2282, **2012**.
- [33] Chen, X., Liu, Y., Tu, D., Bioimaging Based on Lanthanide-Doped Nanoprobes, in *Lanthanide-Doped Luminescent Nanomaterials*. 2014, Springer. p. 145-164.

- [34] Pinho, S.L., Faneca, H., Geraldés, C.F., Delville, M.-H., Carlos, L.D., Rocha, J., Lanthanide-DTPA grafted silica nanoparticles as bimodal-imaging contrast agents, *Biomaterials*, 33, 925-935, **2012**.
- [35] Seaton, A., Tran, L., Aitken, R., Donaldson, K., Nanoparticles, human health hazard and regulation, *Journal of the Royal Society Interface*, rsif20090252, **2009**.
- [36] Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breikreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E., Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *The Journal of cell biology*, 106, 761-771, **1988**.
- [37] O'Farrell, N., Houlton, A., Horrocks, B.R., Silicon nanoparticles: applications in cell biology and medicine, *International journal of Nanomedicine*, 1, 451, **2006**.
- [38] Yan, J., Estévez, M.C., Smith, J.E., Wang, K., He, X., Wang, L., Tan, W., Dye-doped nanoparticles for bioanalysis, *Nano Today*, 2, 44-50, **2007**.
- [39] Tan, W., Wang, K., He, X., Zhao, X.J., Drake, T., Wang, L., Bagwe, R.P., Bionanotechnology based on silica nanoparticles, *Medicinal research reviews*, 24, 621-638, **2004**.
- [40] Kim, H.K., Kang, S.-J., Choi, S.-K., Min, Y.-H., Yoon, C.-S., Highly efficient organic/inorganic hybrid nonlinear optic materials via sol-gel process: synthesis, optical properties, and photobleaching for channel waveguides, *Chemistry of materials*, 11, 779-788, **1999**.
- [41] Smith, J.E., Wang, L., Tan, W., Bioconjugated silica-coated nanoparticles for bioseparation and bioanalysis, *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 25, 848-855, **2006**.
- [42] Bagwe, R.P., Yang, C., Hilliard, L.R., Tan, W., Optimization of dye-doped silica nanoparticles prepared using a reverse microemulsion method, *Langmuir*, 20, 8336-8342, **2004**.
- [43] Yao, G., Wang, L., Wu, Y., Smith, J., Xu, J., Zhao, W., Lee, E., Tan, W., FloDots: luminescent nanoparticles, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 518-524, **2006**.
- [44] Bagwe, R.P., Hilliard, L.R., Tan, W., Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding, *Langmuir*, 22, 4357-4362, **2006**.
- [45] Zhao, X., Bagwe, R.P., Tan, W., Development of Organic-Dye-Doped Silica Nanoparticles in a Reverse Microemulsion, *Advanced Materials*, 16, 173-176, **2004**.

- [46] Shibata, S., Taniguchi, T., Yano, T., Yamane, M., Formation of water-soluble dye-doped silica particles, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 10, 263-268, **1997**.
- [47] Tapeç, R., Zhao, X.J., Tan, W., Development of organic dye-doped silica nanoparticles for bioanalysis and biosensors, *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2, 405-409, **2002**.
- [48] Van Blaaderen, A., Vrij, A., Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent, monodisperse silica spheres, *Langmuir*, 8, 2921-2931, **1992**.
- [49] Yamauchi, H., Ishikawa, T., Kondo, S., Surface characterization of ultramicro spherical particles of silica prepared by w/o microemulsion method, *Colloids and Surfaces*, 37, 71-80, **1989**.
- [50] Wang, L., Yang, C., Tan, W., Dual-luminophore-doped silica nanoparticles for multiplexed signaling, *Nano letters*, 5, 37-43, **2005**.
- [51] Wang, L., Tan, W., Multicolor FRET silica nanoparticles by single wavelength excitation, *Nano letters*, 6, 84-88, **2006**.
- [52] Fadeel, B., Garcia-Bennett, A.E., Better safe than sorry: understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications, *Advanced drug delivery reviews*, 62, 362-374, **2010**.
- [53] Lazau, C., Mocanu, L., Miron, I., Sfirloaga, P., Tanasiea, G., Tatu, C., Gruiab, A., Grozescu, I., Consideration regarding the use of TiO₂ doped nanoparticles in medicine, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2, 257-263, **2007**.
- [54] Yamaguchi, S., Kobayashi, H., Narita, T., Kanehira, K., Sonezaki, S., Kudo, N., Kubota, Y., Terasaka, S., Houkin, K., Sonodynamic therapy using water-dispersed TiO₂-polyethylene glycol compound on glioma cells: comparison of cytotoxic mechanism with photodynamic therapy, *Ultrasonics sonochemistry*, 18, 1197-1204, **2011**.
- [55] Aldeek, F., Muhammed, M.H., Palui, G., Zhan, N., Mattoussi, H., Growth of highly fluorescent polyethylene glycol-and zwitterion-functionalized gold nanoclusters, *ACS nano*, 7, 2509-2521, **2013**.
- [56] Chen, H., Li, S., Li, B., Ren, X., Li, S., Mahounga, D.M., Cui, S., Gu, Y., Achilefu, S., Folate-modified gold nanoclusters as near-infrared fluorescent probes for tumor imaging and therapy, *Nanoscale*, 4, 6050-6064, **2012**.

- [57] Xie, J., Zheng, Y., Ying, J.Y., Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters, *Journal of the American Chemical Society*, 131, 888-889, **2009**.
- [58] Yuan, X., Luo, Z., Zhang, Q., Zhang, X., Zheng, Y., Lee, J.Y., Xie, J., Synthesis of highly fluorescent metal (Ag, Au, Pt, and Cu) nanoclusters by electrostatically induced reversible phase transfer, *Acs Nano*, 5, 8800-8808, **2011**.
- [59] Fu, C.-C., Lee, H.-Y., Chen, K., Lim, T.-S., Wu, H.-Y., Lin, P.-K., Wei, P.-K., Tsao, P.-H., Chang, H.-C., Fann, W., Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 727-732, **2007**.
- [60] Chang, Y.-R., Lee, H.-Y., Chen, K., Chang, C.-C., Tsai, D.-S., Fu, C.-C., Lim, T.-S., Tzeng, Y.-K., Fang, C.-Y., Han, C.-C., Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds, *Nature nanotechnology*, 3, 284-288, **2008**.
- [61] Chen, G., Qiu, H., Prasad, P.N., Chen, X., Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics, *Chemical reviews*, 114, 5161-5214, **2014**.
- [62] Dubertret, B., Skourides, P., Norris, D.J., Noireaux, V., Brivanlou, A.H., Libchaber, A., In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles, *Science*, 298, 1759-1762, **2002**.
- [63] Matsumura, Y., Maeda, H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer research*, 46, 6387-6392, **1986**.
- [64] Tang, L., Yang, X., Yin, Q., Cai, K., Wang, H., Chaudhury, I., Yao, C., Zhou, Q., Kwon, M., Hartman, J.A., Investigating the optimal size of anticancer nanomedicine, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 15344-15349, **2014**.
- [65] Fang, C.Y., Vijayanthimala, V., Cheng, C.A., Yeh, S.H., Chang, C.F., Li, C.L., Chang, H.C., The Exocytosis of Fluorescent Nanodiamond and Its Use as a Long-Term Cell Tracker, *Small*, 7, 3363-3370, **2011**.
- [66] Lim, Y.T., Kim, S., Nakayama, A., Stott, N.E., Bawendi, M.G., Frangioni, J.V., Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging, *Molecular imaging*, 2, 15353500200302163, **2003**.
- [67] Larson, D.R., Zipfel, W.R., Williams, R.M., Clark, S.W., Bruchez, M.P., Wise, F.W., Webb, W.W., Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo, *Science*, 300, 1434-1436, **2003**.

- [68] Hong, G., Diao, S., Chang, J., Antaris, A.L., Chen, C., Zhang, B., Zhao, S., Atochin, D.N., Huang, P.L., Andreasson, K.I., Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window, *Nature Photonics*, 8, 723-730, **2014**.
- [69] Flusberg, B.A., Cocker, E.D., Piyawattanametha, W., Jung, J.C., Cheung, E.L., Schnitzer, M.J., Fiber-optic fluorescence imaging, *Nature methods*, 2, 941-950, **2005**.
- [70] Kircher, M.F., Mahmood, U., King, R.S., Weissleder, R., Josephson, L., A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation, *Cancer research*, 63, 8122-8125, **2003**.
- [71] Talanov, V.S., Regino, C.A., Kobayashi, H., Bernardo, M., Choyke, P.L., Brechbiel, M.W., Dendrimer-based nanoprobe for dual modality magnetic resonance and fluorescence imaging, *Nano letters*, 6, 1459-1463, **2006**.
- [72] Elson, D., Requejo-Isidro, J., Munro, I., Reavell, F., Siegel, J., Suhling, K., Tadrous, P., Benninger, R., Lanigan, P., McGinty, J., Time-domain fluorescence lifetime imaging applied to biological tissue, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3, 795-801, **2004**.
- [73] Bloch, S., Lesage, F., McIntosh, L., Gandjbakhche, A., Liang, K., Achilefu, S., Whole-body fluorescence lifetime imaging of a tumor-targeted near-infrared molecular probe in mice, *Journal of biomedical optics*, 10, 054003-054003-8, **2005**.
- [74] Godavarty, A., Sevick-Muraca, E.M., Eppstein, M.J., Three-dimensional fluorescence lifetime tomography, *Medical physics*, 32, 992-1000, **2005**.
- [75] Marquis, B.J., Love, S.A., Braun, K.L., Haynes, C.L., Analytical methods to assess nanoparticle toxicity, *Analyst*, 134, 425-439, **2009**.
- [76] Service, R.F., Nanotechnology. Can high-speed tests sort out which nanomaterials are safe?, *Science (New York, NY)*, 321, 1036, **2008**.
- [77] Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M., Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, *Nature materials*, 8, 543-557, **2009**.
- [78] Yazdi, A.S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S.K., Tardivel, A., Couillin, I., Tschopp, J., Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β , *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 19449-19454, **2010**.

- [79] Fritsche, A., Haenle, M., Zietz, C., Mittelmeier, W., Neumann, H.-G., Heidenau, F., Finke, B., Bader, R., Mechanical characterization of anti-infectious, anti-allergic, and bioactive coatings on orthopedic implant surfaces, *Journal of materials science*, 44, 5544-5551, **2009**.
- [80] Richard, C., Kowandy, C., Landoulsi, J., Geetha, M., Ramasawmy, H., Corrosion and wear behavior of thermally sprayed nano ceramic coatings on commercially pure Titanium and Ti-13Nb-13Zr substrates, *International Journal of Refractory Metals and Hard Materials*, 28, 115-123, **2010**.
- [81] Puckett, S.D., Taylor, E., Raimondo, T., Webster, T.J., The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment, *Biomaterials*, 31, 706-713, **2010**.
- [82] Hussain, S.M., Braydich-Stolle, L.K., Schrand, A.M., Murdock, R.C., Yu, K.O., Mattie, D.M., Schlager, J.J., Terrones, M., Toxicity evaluation for safe use of nanomaterials: recent achievements and technical challenges, *Advanced Materials*, 21, 1549-1559, **2009**.
- [83] Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Nakazato, Y., Arimori, A., Isobe, M., Tochigi, S., Kondoh, S., Hirai, T., Akase, T., Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65, 199-201, **2010**.
- [84] Yuan, Y., Liu, C., Qian, J., Wang, J., Zhang, Y., Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells, *Biomaterials*, 31, 730-740, **2010**.
- [85] Shi, Z., Huang, X., Cai, Y., Tang, R., Yang, D., Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells, *Acta biomaterialia*, 5, 338-345, **2009**.
- [86] Sonavane, G., Tomoda, K., Makino, K., Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66, 274-280, **2008**.
- [87] Mondéjar, S.P., Kovtun, A., Epple, M., Lanthanide-doped calcium phosphate nanoparticles with high internal crystallinity and with a shell of DNA as fluorescent probes in cell experiments, *Journal of Materials Chemistry*, 17, 4153-4159, **2007**.
- [88] Sokolova, V., Knuschke, T., Kovtun, A., Buer, J., Epple, M., Westendorf, A.M., The use of calcium phosphate nanoparticles encapsulating Toll-like receptor ligands and the antigen hemagglutinin to induce dendritic cell maturation and T cell activation, *Biomaterials*, 31, 5627-5633, **2010**.

- [89] Zhang, L.W., Monteiro-Riviere, N.A., Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake, *Toxicological Sciences*, 110, 138-155, **2009**.
- [90] Schübbe, S., Cavelius, C., Schumann, C., Koch, M., Kraegeloh, A., STED microscopy to monitor agglomeration of silica particles inside A549 cells, *Advanced Engineering Materials*, 12, 417-422, **2010**.
- [91] Cho, E.B., Volkov, D.O., Sokolov, I., Ultrabright fluorescent silica mesoporous silica nanoparticles: control of particle size and dye loading, *Advanced Functional Materials*, 21, 3129-3135, **2011**.
- [92] Avnir, D., Levy, D., Reisfeld, R., The nature of the silica cage as reflected by spectral changes and enhanced photostability of trapped rhodamine 6G, *The Journal of Physical Chemistry*, 88, 5956-5959, **1984**.
- [93] Daberkow, T., Meder, F., Treccani, L., Schowalter, M., Rosenauer, A., Rezwan, K., Fluorescence labeling of colloidal core-shell particles with defined isoelectric points for in vitro studies, *Acta biomaterialia*, 8, 720-727, **2012**.
- [94] Lesniak, A., Fenaroli, F., Monopoli, M.P., Åberg, C., Dawson, K.A., Salvati, A., Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells, *ACS nano*, 6, 5845-5857, **2012**.
- [95] Walczyk, D., Bombelli, F.B., Monopoli, M.P., Lynch, I., Dawson, K.A., What the cell "sees" in bionanoscience, *Journal of the American Chemical Society*, 132, 5761-5768, **2010**.
- [96] Fenoglio, I., Fubini, B., Ghibaudi, E.M., Turci, F., Multiple aspects of the interaction of biomacromolecules with inorganic surfaces, *Advanced drug delivery reviews*, 63, 1186-1209, **2011**.
- [97] Xu, Z., Wang, S.-L., Gao, H.-W., Effects of nano-sized silicon dioxide on the structures and activities of three functional proteins, *Journal of hazardous materials*, 180, 375-383, **2010**.
- [98] Di Marco, M., Shamsuddin, S., Razak, K.A., Aziz, A.A., Devaux, C., Borghi, E., Levy, L., Sadun, C., Overview of the main methods used to combine proteins with nanosystems: absorption, bioconjugation, and encapsulation, *Int J Nanomedicine*, 5, 37-49, **2010**.
- [99] Wu, P., He, X., Wang, K., Tan, W., Ma, D., Yang, W., He, C., Imaging breast cancer cells and tissues using peptide-labeled fluorescent silica nanoparticles, *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 8, 2483-2487, **2008**.

- [100] Lu, J., Zenobi, R., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for identifying the composition of labeled proteins, *Analytical biochemistry*, 269, 312-316, **1999**.
- [101] Dowlut, M., Hall, D.G., Hindsgaul, O., Investigation of nonspecific effects of different dyes in the screening of labeled carbohydrates against immobilized proteins, *The Journal of organic chemistry*, 70, 9809-9813, **2005**.
- [102] Roy, S., Dixit, C.K., Woolley, R., MacCraith, B.D., O'Kennedy, R., McDonagh, C., Novel multiparametric approach to elucidate the surface amine-silanization reaction profile on fluorescent silica nanoparticles, *Langmuir*, 26, 18125-18134, **2010**.
- [103] Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., Dawson, K.A., Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 14265-14270, **2008**.
- [104] Shmanai, V.V., Nikolayeva, T.A., Vinokurova, L.G., Litoshka, A.A., Oriented antibody immobilization to polystyrene macrocarriers for immunoassay modified with hydrazide derivatives of poly (meth) acrylic acid, *BMC biotechnology*, 1, 4, **2001**.
- [105] Ye, Z., Tan, M., Wang, G., Yuan, J., Development of functionalized terbium fluorescent nanoparticles for antibody labeling and time-resolved fluoroimmunoassay application, *Talanta*, 65, 206-210, **2005**.
- [106] Gubala, V., Le Guevel, X., Nooney, R., Williams, D.E., MacCraith, B., A comparison of mono and multivalent linkers and their effect on the colloidal stability of nanoparticle and immunoassays performance, *Talanta*, 81, 1833-1839, **2010**.
- [107] Halimani, M., Chandran, S.P., Kashyap, S., Jadhav, V., Prasad, B., Hotha, S., Maiti, S., Dendritic effect of ligand-coated nanoparticles: enhanced apoptotic activity of silica-berberine nanoconjugates, *Langmuir*, 25, 2339-2347, **2009**.
- [108] Woolley, R., Roy, S., Prendergast, Ú., Panzera, A., Basabe-Desmonts, L., Kenny, D., McDonagh, C., From particle to platelet: optimization of a stable, high brightness fluorescent nanoparticle based cell detection platform, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9, 540-549, **2013**.
- [109] Estévez, M.-C., O'Donoghue, M.B., Chen, X., Tan, W., Highly fluorescent dye-doped silica nanoparticles increase flow cytometry sensitivity for cancer cell monitoring, *Nano Research*, 2, 448-461, **2009**.

- [110] Cai, L., Chen, Z.-Z., Chen, M.-Y., Tang, H.-W., Pang, D.-W., MUC-1 aptamer-conjugated dye-doped silica nanoparticles for MCF-7 cells detection, *Biomaterials*, 34, 371-381, **2013**.
- [111] Xu, H., Yan, F., Monson, E.E., Kopelman, R., Room-temperature preparation and characterization of poly (ethylene glycol)-coated silica nanoparticles for biomedical applications, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66, 870-879, **2003**.
- [112] Murcia, M.J., Naumann, C.A., Biofunctionalization of fluorescent nanoparticles, *Nanotechnologies for the life sciences*, **2007**.
- [113] Thorek, D.L., Tsourkas, A., Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells, *Biomaterials*, 29, 3583-3590, **2008**.
- [114] Rancan, F., Gao, Q., Graf, C., Troppens, S., Hadam, S., Hackbarth, S., Kembuan, C., Blume-Peytavi, U., Rühl, E., Lademann, J.r., Skin penetration and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability, *ACS nano*, 6, 6829-6842, **2012**.
- [115] Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Meng, H., Kabehie, S., George, S., Zink, J.I., Nel, A.E., Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs, *ACS nano*, 3, 3273-3286, **2009**.
- [116] Radu, D.R., Lai, C.-Y., Jeftinija, K., Rowe, E.W., Jeftinija, S., Lin, V.S.-Y., A polyamidoamine dendrimer-capped mesoporous silica nanosphere-based gene transfection reagent, *Journal of the American Chemical Society*, 126, 13216-13217, **2004**.
- [117] Zhu, S.G., Xiang, J.J., Li, X.L., Shen, S.R., Lu, H.b., Zhou, J., Xiong, W., Zhang, B.C., Nie, X.M., Zhou, M., Poly (l-lysine)-modified silica nanoparticles for the delivery of antisense oligonucleotides, *Biotechnology and applied biochemistry*, 39, 179-187, **2004**.
- [118] Pan, L., He, Q., Liu, J., Chen, Y., Ma, M., Zhang, L., Shi, J., Nuclear-targeted drug delivery of TAT peptide-conjugated monodisperse mesoporous silica nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 134, 5722-5725, **2012**.
- [119] Stöber, W., Fink, A., Bohn, E., Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *Journal of colloid and interface science*, 26, 62-69, **1968**.
- [120] Rossi, L.M., Shi, L., Quina, F.H., Rosenzweig, Z., Stöber synthesis of monodispersed luminescent silica nanoparticles for bioanalytical assays, *Langmuir*, 21, 4277-4280, **2005**.

- [121] Ullah, S., Ferreira-Neto, E.P., Pasa, A.A., Alcântara, C.C., Acuna, J.J., Bilmes, S.A., Ricci, M.L.M., Landers, R., Fermino, T.Z., Rodrigues-Filho, U.P., Enhanced photocatalytic properties of core@ shell SiO₂@ TiO₂ nanoparticles, *Applied Catalysis B: Environmental*, 179, 333-343, **2015**.
- [122] Livage, J., Henry, M., Sanchez, C., Sol-gel chemistry of transition metal oxides, *Progress in solid state chemistry*, 18, 259-341, **1988**.
- [123] Li, Z., Hou, B., Xu, Y., Wu, D., Sun, Y., Hu, W., Deng, F., Comparative study of sol-gel-hydrothermal and sol-gel synthesis of titania-silica composite nanoparticles, *Journal of Solid State Chemistry*, 178, 1395-1405, **2005**.
- [124] Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65, 55-63, **1983**.
- [125] Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R.W., Villanueva, Á., MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta histochemica*, 114, 785-796, **2012**.
- [126] Büber, E., *IKK/NF-kappaB Sinyal İletim Yolunun Prostat Kanserinin Gelişim Sürecindeki Rolü*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı, Ankara, **2011**.
- [127] Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J.C., Turck, M., Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *American journal of clinical pathology*, 45, 493, **1966**.

özgeçmiş

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Ehsan Sanattalab

Doğum Yeri : Tabriz-IRAN

Medeni Hali : Bekar

E- posta : EHSANSANATTALAB@YAHOO.COM

Adresi : Seyran Bağları Mahallesi, Bağlar Caddesi, 93/7, Çankaya, Ankara.

Eğitim

Lisans :

Tabriz Üniversitesi, Malzeme Mühendisliği Bölümü, Seramik Mühendisliği Dalı

Yüksek lisans :

Hacettepe Üniversitesi, Biyo Mühendislik Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi :

İngilizce (iyi)

İş Deneyimi : 4 YIL

Deneyim Alanları : Nanobiyomalzemeler, Nanopartikül Üretimi, Hücre Kültürü Uygulamaları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi :

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar : ANALYSIS AND MODELING OF LOCALIZED HEAT GENERATION BY TUMOR-TARGETED NANOPARTICLES (MONTE CARLO METHODS), EHSAN SANATTALAB, AHMAD SALMANOGLI, ERHAN PISKIN, J.NANOPHOTON. doi:10.1117/1.JNP.10.026029

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar :

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
Biyomühendislik ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih 07/06/2017

Tez Başlığı / Konusu: ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ FLORESAN GÖRÜNTÜLEME İÇİN FLORESAN BOYALAR İLE ETİKETLENMİŞ İNORGANİK NANOPARTİKÜLLER

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 58 sayfalık kısmına ilişkin, 07/06/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar ~~hariç~~/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

07.06.2017

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Ehsan Sanattalab
Öğrenci No: N13120490
Anabilim Dalı: Biyomühendislik
Programı: Biyomühendislik
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

(Prof. Dr. Tülin Kutsal)