



Rodamin 123 Etiketli Bor Nitrür Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu ve *in vitro* Biyogörüntüleme Potansiyelinin Araştırılması

Characterization of Rhodamine 123-Labeled Boron Nitride Nanoparticles and Investigation of *in vitro* Bioimaging Potential

Erdal Eroğlu * 

Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Manisa, TÜRKİYE
Sorumlu Yazar / Corresponding Author *: erdal.eroğlu@cbu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 25.08.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 07.12.2020

Atıf şekli/How to cite EROĞLU, E. (2021). Rodamin 123 Etiketli Bor Nitrür Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu ve *in vitro* Biyogörüntüleme Potansiyelinin Araştırılması. DEUFMD 23(68), 595-605.

Araştırma Makalesi/Research Article

DOI:10.21205/deufmd.2021236821

Öz

Bu çalışmanın amacı bor nitrür (BN) nanoparçacıklarının floresan bir boya olan rodamin 123 (Rd) ile etiketlenmesi ve biyogörüntüleme amaçlı kullanımının *in vitro* ortamda araştırılmasıdır. Öncelikli olarak, rodamin 123 etiketi bor nitrür nanoparçacıklarına glutaraldehid çapraz bağlayıcısı aracılığıyla bağlanarak BN-Rd nanoparçacıkları üretilmiş ve SEM, UV-görünür bölge spektroskopisi, MTT hücre proliferasyon testi, ışık mikroskobu ve floresan mikroskobu analizleri ile karakterize edilmiştir. Sitotoksik olmayan konsantrasyonlardaki BN-Rd nanoparçacıkları insan prostat kanseri hücreleri (PC-3) ile insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK-293) üzerine uygulanmış ve hücreler floresan mikroskobu altında incelenerek BN-Rd'nin biyogörüntüleme potansiyeli *in vitro* ortamda araştırılmıştır. Sonuç olarak, SEM analizlerinde ~40 nm boyuta sahip olduğu belirlenen BN ve BN-Rd 30 µg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermiştir. Işık mikroskobu altında incelenen nanoparçacık uygulanmış hücre morfolojileri MTT sonuçlarını destekler nitelikte bulunmuştur. Her iki hücre hattı üzerine de uygulanan BN-Rd'nin 10 µg/ml konsantrasyonda hücreler ile etkileşime geçtiği ve hücrelerin *in vitro* ortamda floresan mikroskobu altında ışığa yaptığı gözlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular ışığında rodamin 123 floresan boyası ile etiketli bor nitrür nanoparçacıklarının biyogörüntüleme uygulamalarında kullanım potansiyeli ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Bor Nitrür Nanoparçacıkları, Rodamin 123, Biyogörüntüleme

Abstract

The aim of this study is to label boron nitride (BN) nanoparticles with a fluorescent dye, rhodamine 123 (Rd), and to investigate its use for bioimaging *in vitro* condition. First, BN-Rd nanoparticles were produced by binding rhodamine 123 tag to boron nitride nanoparticles via glutaraldehyde crosslinker and characterized by SEM, UV-visible spectroscopy, MTT cell proliferation test, light microscope and fluorescence microscope analyses. BN-Rd nanoparticles at non-cytotoxic concentrations were applied on human prostate cancer cells (PC-3) and human embryonic kidney cells (HEK-293) and the

bioimaging potential of BN-Rd was investigated *in vitro* by examining the cells under fluorescence microscopy. As a result, BN and BN-Rd, which were determined to have a size of ~40 nm in SEM analysis, showed a cytotoxic effect at concentrations of 30 µg/ml and above. The nanoparticle-treated cell morphologies examined under a light microscope was found to support MTT results. It was observed that BN-Rd, at a concentration of 10 µg/ml applied on both cell lines interacted with the cells and the cells fluoresced under a fluorescence microscope *in vitro*. In the light of the findings obtained from this study, the potential use of boron nitride nanoparticles labeled with rhodamine 123 fluorescent dye in bioimaging applications has been revealed.

Keywords: Boron Nitride Nanoparticles, Rhodamine 123, Bioimaging

1. Giriş

Biyolojik görüntüleme olarak da bilinen biyogörüntüleme, hastalıkların teşhisinde ve tedavisinde sıklıkla kullanılan biyolojik bileşenlerin takip edilmesine dayanan noninvazif bir tekniktir [1,2]. Hareket solunum gibi yaşamsal faaliyetleri etkilemeden hücre içi yapıların veya canlılardaki dokuların üç boyutlu olarak gözlemlenmesini sağlamaktadır [3]. Son yıllarda, oldukça verimli yeni floresan problemlerin geliştirilmesi ve buna paralel olarak mikroskopi tekniklerinin daha yüksek seviyeye ulaşması, biyogörüntüleme alanında görüntü kalitesini arttırıldığı üst düzey teknolojilerin üretilmesini sağlamıştır [1]. Örnek olarak, floresan boya ile etiketlenmiş nanotaşıyıcıların canlı sistemlerde ve hücre modellerinde taşınımının takip edilmesine dayanan floresan biyogörüntüleme, yeni bir akım olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle farklı problemlerle etiketlenmiş ve ligandlarla hedefe yönlendirilmiş nanotaşıyıcıların kanserli dokunun görüntülenmesinde kullanımı rutin olarak araştırılan konuların başında gelmektedir [4].

Floresin, rodamin, fikobiliprotein, yeşil floresan proteini ve porfirin gibi farklı floroforların biyogörüntüleme amaçlı kullanımı yaygın olarak kabul görmektedir [5]. Florofor tiplerinden biri olan rodamin 123 505 nm'de absorpsiyon ve 525 nm'de de floresan ışınım yapması sebebiyle kimya, biyoloji ve tıp gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır. Nispeten toksisitesinin düşük olması, ucuz olması, ticari olarak kolay tedarik edilebilmesi, yüksek kuantum verimi, noninvazif olarak tespit edilebilir olması, hücre zarını kolayca geçebilmesi, hücre içi metabolik yolları etkilememesi ve mitokondride birikerek hücreyi boyaması gibi sebepler, rodamin boyasını biyogörüntüleme ve ilaç aktarımı gibi çalışmalarda tercih edilir hale getirmiştir [6,7].

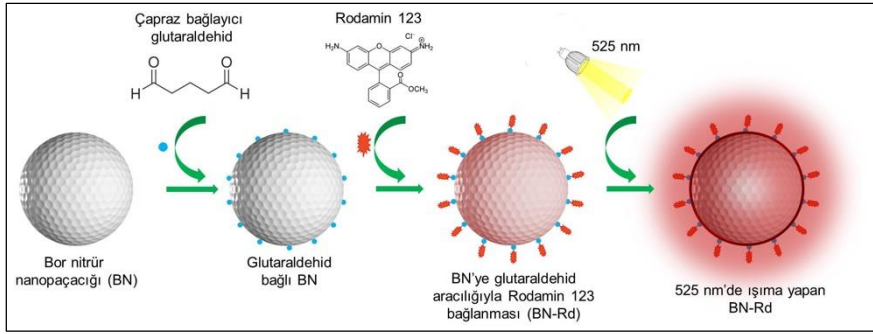
Nanoparçacıklar birçok fiziksel ve kimyasal üstün özelliklere sahip olması sebebiyle ilaç/antioksidant madde aktarımından biyogörüntülemeye kadar geniş alanda kullanım potansiyeline sahiptirler [7,8,9]. Aktarımı yapılmak istenen etken madde porlu yapıdaki nanomalzemelere daha verimli şekilde yüklenebilirken yüzeylerinde bulundukları yüksek orandaki serbest atomlar, fonksiyonel grupların kovalent olarak bağlanmasına olanak sağlamaktadır. Nanoparçacıkların boyutları ayarlanabilmekte ve yüzey modifikasyonları ile nanoparçacıklara istenilen özellikler kazandırılabilir [7,10]. Pasif hedefleme, tümörlü bölgedeki hücreler arasındaki mesafenin normal dokudaki hücrelere oranla daha açık olması ve buna bağlı olarak tümörlü dokunun 40-200 nm aralığındaki nano-yapılara daha geçirgen olması olarak tanımlanmaktadır. Tümörlü dokuda pasif hedefleme ile 10-100 kat daha fazla nanoparçacık birikimi olduğu gözlemlenmiştir [11,12].

Doğal olarak bulunmayan bor nitrid, bor ve azotun bir araya getirilmesiyle sentetik olarak üretilmektedir. Beyaz karbon veya beyaz grafit olarak da isimlendirilen bor nitridün kristal yapısı karbona benzemektedir. Üstün kimyasal, elektriksel ve ısıl özelliklere sahip bir bileşik olan bor nitrid, elektrik-elektronik endüstrisinden seramik endüstrisine kadar bir çok alanda kullanılmaktadır [13,14]. Dünya bor rezervlerinin %73'ünü elinde bulduran ülkemizde %36'sı cam, %31'i seramik, %9'u temizlik-deterjanı, %7'si tarım, %4'ü tutkal ve %14'ü diğer alanlar [15] olmak üzere kullanılan borun katma değeri daha yüksek, biyomedikal alanında da kullanılabilen ürünlere dönüştürülmesi ülke ekonomisi için oldukça önemlidir. Bor nitrid nanoparçacıkları üzerine yapılan araştırma sayısı çalışılan diğer

nanomalzemelere oranla oldukça geride kalmıştır. Buna rağmen son yıllarda bor ve türevlerinin kullanıldığı ilaç aktarımı ve biyogörüntüleme gibi farklı alanlardaki araştırmalar ilgi çekmeye başlamıştır [16-18].

Literatürdeki mevcut çalışmalarla, kalsiyum fosfat [19], silika [20], karbon [21], gümüş [22], jelatin-metakrilol [23] gibi farklı nanomalzemelerin biyogörüntüleme amaçlı kullanım potansiyeli ortaya konmuştur. Ayrıca, bor nitrür nanopulları [24], bor nitrür nano yaprakları [25] ve bor nitrür nanotüpleri [7] gibi

farklı morfolojilere sahip bor nitrür türevlerinin biyogörüntüleme uygulamalarında kullanılabileceği belirtilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, rhodamin 123 floresan boyasıyla etiketlenmiş bor nitrür nanokürelerinin biyogörüntüleme potansiyeli araştırılmayan konular arasındadır. Yaptığımız bu çalışmada, rodamin 123 floresan boyası ile etiketlenen bor nitrür nanoparçacıklarının (BN-Rd) biyogörüntüleme amaçlı kullanımı *in vitro* ortamda ilk defa araştırılmıştır. Böylece bor ürünlerinin katma değeri daha yüksek alanlarda kullanım potansiyeli ortaya konmuştur (Şekil 1).



Şekil 1. Bor nitrür nanoparçacıklarına rodamin 123 etiketinin bağlanması ve biyogörüntüleme amaçlı kullanımı.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

İnsan embriyonik böbrek hücreleri (HEK-293) Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI'dan ve insan prostat kanseri hücreleri (PC-3) Doç. Dr. Harika ATMACA'dan temin edilmiştir. Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) besiyeri, fetal sığır serumu (FBS) ve tripan mavisi Gibco firmasından, esansiyel olmayan aminoasit Capricorn firmasından, antibiyotik/antimikotik Biological Industries firmasından, glutaraldehid ve MTT boyası (thiazolyl blue tetrazolium bromide) Sigma firmasından, dimetil sülfoksit (DMSO) Merck firmasından, tripsin Biowest firmasından ve bor nitrür nanoparçacıkları (40-50 nm) Nanokar firmasından satın alınmıştır.

2.2. BN nanoparçacığına rodamin 123 bağlanması

Ticari bir firmadan satın alınan BN nanoparçacıkları (10 mg/ml) deiyonize su (d-su) içerisinde süspansiyon edilmiştir. Süspansiyona glutaraldehid (%0,1) ve rodamin 123 (100 µg/ml) eklendikten sonra solüsyon karıştırıcı üzerinde 40°C sıcaklıkta 200 rpm dönüş hızında

72 saat karıştırılmıştır. Reaksiyon sonunda, karışım 15.000 rpm'de santrifüjlenerek nanoparçacıklar dibe çöktürülmüş ve serbest haldeki bağlanmayan rodamin kalıntıları süpernatantla birlikte ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, nanoparçacık pelleti iki defa daha d-su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sırasında nanoparçacıkları sıvı ortamdaki ayırmak için, santrifüj işlemi tekrar edilmiştir. Son yıkamadan sonra elde edilen nanoparçacıklar 37°C sıcaklıktaki bir etüvde bir gece bekletilerek kurutulmuştur. Elde edilen toz haldeki nanoparçacıklar karanlık bir ortamda oda sıcaklığında kullanılmaya kadar ependorf tüp içerisinde muhafaza edilmiştir. Nanoparçacıklar deneylerde kullanılmadan önce d-su içerisinde süspansiyon edilerek (1 mg/ml) stok solüsyon hazırlanmış ve 5 dk sonikasyonla tutularak homojenizasyon sağlanmıştır.

2.3. BN/BN-Rd nanoparçacıklarının floresan mikroskopunda görüntülenmesi

BN-Rd'nin ışımaya yapıp yapmadığını belirlemek için yapılan bu analizde, cam bir lam üzerine yayılan bir miktar stok solüsyon hiçbir işlem

yapılmadan direk olarak floresan mikroskobu altında görüntülenmiştir.

2.4. UV-görünür bölge spektroskopisi

BN ile Rd arasındaki etkileşimi gösterebilmek için ultraviyole görünür bölge (UV-GB) spektroskopisi analizi yapılmıştır (Thermo Scientific Evolution 201). d-su içerisinde seyreltilen BN ve BN-Rd nanoparçacıkları kuvvet içerisine aktararak 250-400 nm aralığındaki floresan spektrumunda incelenmiştir.

2.5. Taramalı elektron mikroskobu analizi

BN ve BN-Rd nanoparçacıklarının morfolojileri ve boyutları taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Carl Zeiss 300VP) kullanılarak incelenmiştir. Analiz için toz haldeki BN veya BN-Rd nanoparçacıkları cam bir yüzey üzerine yayılmış ve direk olarak elektron mikroskobunda incelenmiştir. SEM görüntüleri üzerinde rastgele seçilen en az 200 farklı nanoparçacığın boyutu ImageJ programı kullanılarak ölçülmüş ve ölçümlerin ortalaması alınarak nanoparçacıkların boyutları belirlenmiştir. Ayrıca, element kompozisyonuna bağlı olarak BN nanoparçacıklarının varlığını doğrulamak için enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisi kullanılmıştır.

2.6. Hücre kültürü çalışmaları

Bu çalışmada özellikle insan kaynaklı hücre hatları tercih edilmiş olup, kanser modeli olarak insan prostat kanseri hücreleri (PC-3) ve normal hücre modeli olarak epitel hücresi olan insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK-293) kullanılmıştır. Her iki hücre tipi de %10 FBS, %1 antibiyotik/antimikotik ve %1 esansiyel olmayan aminoasitleri içeren besiyerinde (DMEM-10) 37°C'de %5 CO₂ ortamında tutularak büyütülmüşlerdir. Her deney öncesinde, tripsinizasyon işlemi ile toplanan hücreler tripan mavisi ile boyanarak hücre canlılığı belirlenmiş ve hücre canlılığı %90'ın altında olan kültürler deneylere dahil edilmemiştir. Hücre sayımı Neubauer sayım kabı kullanılarak yapılmıştır.

2.7. MTT hücre proliferasyon testi

BN ve BN-Rd nanoparçacıklarının hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi MTT hücre proliferasyon testi kullanılarak belirlenmiştir. Tiripsinizasyon işlemi ile toplanan ve sayımı yapılan hücreler DMEM-10 besiyeri içerisinde seyreltilerek süspansiyon haline getirilmiştir. Hücre süspansiyonu 96-kuyulu test

mikroplakasının her kuyucuğuna 1×10^4 hücre/kuyu (100 µl) olacak şekilde eklenmiştir. Hücreleri içeren plaka 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat bekletildikten sonra kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılarak, DMEM-10 içerisinde seyreltilen BN veya BN-Rd (5-40 µg/ml) solüsyonundan 100 µl eklenmiştir. Kontrol grubu hücrelerini içeren kuyulara sadece 100 µl DMEM-10 besiyeri eklenmiştir. Tekrar inkübatöre yerleştirilen mikroplakalar 24 ve 48 saat olmak üzere 2 farklı zaman aralığında test edilmek üzere inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon zamanı sonunda her bir kuyucuğa 10 µl tetrazolyum boyası (5 mg/ml) eklenmiş ve mikroplaka 2 saat daha inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve oluşan formazan kristalleri 100 µl DMSO içerisinde çözülmüştür. Kuyuların absorbanı 570 nm, 690 nm (arka plan) dalga boylarında ölçülmüş ve 570 nm'de ölçülen absorban değerinden 690 nm'de ölçülen absorban değeri çıkarılmasıyla elde edilen değerler hücre canlılığı hesaplamalarında kullanılmıştır. Nanoparçacık uygulanan gruplardaki hücre canlılığı, kontrol grubu ile oranlanarak "%" cinsinden hesaplanmıştır.

2.8. Hücrelere BN/BN-Rd uygulanması ve ışık/floresan mikroskobunda görüntüleme

Sitotoksosite sonuçlarına bağlı olarak belirlenen uygun nanoparçacık konsantrasyonları (10 ve 20 µg/ml), 12-kuyulu plaka içerisinde büyütülen hücrelere uygulanmıştır. Her bir kuyuya 1 ml DMEM-10 besiyeri içerisinde seyreltilen hücreler (1×10^5 hücre/ml) eklenmiş ve plaka bir gece inkübatörde tutulmuştur. Ertesi gün kuyulardaki eski besiyeri DMEM-10 içerisinde seyreltilen BN veya BN-Rd nanoparçacık solüsyonları ile yer değiştirilmiştir. Kontrol kuyularındaki besiyeri 1 ml DMEM-10 ile yer değiştirilmiştir. İnkübatörde 24 saat bekletilen hücreler inkübasyon sonunda iki defa 1 ml steril PBS ile yıkanmış ve hücrelere tutunmayan nanoparçacıkların kuyulardan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Taze besiyeri eklenen hücreler floresan mikroskobu (Olympus, IX53) altında incelenmiştir. Ayrıca, nanoparçacık uygulanmış hücreleri morfolojik açıdan incelemek için ışık mikroskobu (Olympus, CKX53) kullanılmıştır.

2.9. İstatistiksel analizler

Bu çalışmada yer alan tüm deneyler birbirinden bağımsız üç tekrar halinde gerçekleştirilmiş ve çizilen grafiklerde bu deneylerden elde edilen

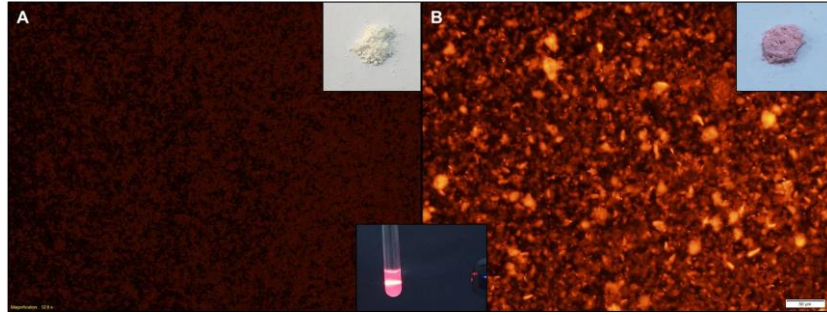
verilerin ortalaması, hesaplanan standart sapmalar ile birlikte gösterilmiştir. MTT canlılık testi sonuçları bir istatistik programı (Minitab 17) kullanılarak analiz edilmiş ve gruplar arasındaki farklar Two-way ANOVA ile test edilmiştir ($p < 0.05$).

3. Bulgular

3.1. Rodamin 123 bağlı BN nanoparçacıkları

Reaksiyon sonunda bağlanmayan rodamin 123 boya kalıntıları d-su ile yıkama işlemi sonucu uzaklaştırılmış ve sentezlenen BN-Rd toz halinde oda sıcaklığında saklanmıştır. Toz haldeki BN beyaz renkte gözlenirken, BN-Rd açık pembe renkte gözlenmiştir (Şekil 2). Gerektiğinde toz haldeki nanoparçacıklar d-su ile karıştırılmış (1mg/ml) ve sonikatörde 5 dk tutularak süspansiyon hale getirilmiştir. Süspansiyon içerisindeki nanoparçacıkların lazer

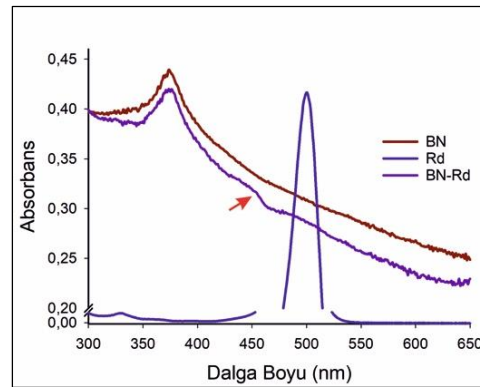
işaretleyicisi ile elde edilen görüntüsü Şekil 2'de gösterilmiştir. Floresan mikroskobu görüntülerine göre kontrol grubunda ışığa gözlenmez iken, BN-Rd nanoparçacık aglomeratlarında kuvvetli ışığa gözlenmiştir (Şekil 2). Yıkama işlemi yapılması ve nanoparçacıkların etrafında çok kuvvetli sinyaller gözlenmesi sebebiyle rodamin 123 boyasının BN'ye bağlandığı sonucuna varılmaktadır. Ayrıca d-su içerisinde süspansiyon edilerek hazırlanan ve oda sıcaklığında 6 aya kadar bekletilen BN-Rd stok solüsyonu aktivitesini korumuş ve sinyal gücünde kayıp gözlenmemiştir. Bekleme süresi sonunda, BN-Rd dibe çöktürüldüğünde, hem BN-Rd'nin renginde hem de süpernatantın renginde değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum, Rd ile BN arasında glutaraldehid aracılı kovalent bağ oluşumuna işaret etmektedir.



Şekil 2. Floresan mikroskobu görüntüleri; A) BN ve B) BN-Rd. Toz formundaki nanoparçacıklar görüntüler içerisinde sağ üst köşede, süspansiyon içerisinde dağılmış nanoparçacıkların lazer işaretleyicisi görüntüsü şekil içerisinde altta gösterilmiştir.

3.2. UV-görünür bölge spektroskopisi

Rodamin 123 boyasının BN nanoparçacıklarına bağlandığı UV-GB spektroskopisi analizi ile doğrulanmıştır. Rd'nin UV-GB spektroskopisinde 500 nm dalga boyunda pik verdiği daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir [26]. Yaptığımız çalışmada da Rd 500 nm dalga boyunda net bir pik sergilemiştir. BN'de 500 nm civarında bir pik görülmez iken BN-Rd'de 450 nm'ye doğru ufak bir kayma ile Rd spesifik piki gözlenmiştir (Şekil 3). BN-Rd'de gözlenen Rd pikinin çok keskin olmamasının sebebi BN'ye bağlanan Rd konsantrasyonun düşük olmasıdır.

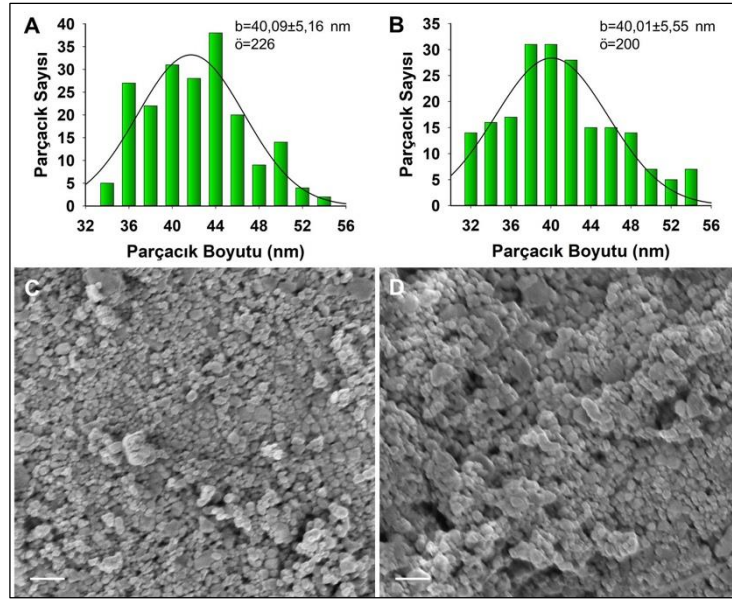


Şekil 3. UV-görünür bölge spektroskopisi

3.3. Taramalı elektron mikroskobu ile morfoloji ve boyut analizi

SEM analizlerinde nanoparçacıkların boyut ve morfolojileri incelenmiş ve EDX analizi ile B ve N elementlerinin varlığı doğrulanmıştır. Fotoğraflar üzerinde ImageJ programı ile yapılan ölçümlere bağlı olarak BN ve BN-Rd'nin boyutları sırasıyla $40,09 \pm 5,16$ nm ve $40,01 \pm 3,55$ nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4). Rodamin 123 bağlanmasıyla nanoparçacık boyutunda kayda değer bir değişim gözlenmemiştir. EDX analizinde bor nitrürün yapısında bulunan

karakteristik elementler bor ve azotun yanısıra tuz kaynaklı sodyuma ve nanoparçacıkların yayıldığı cam yüzeyden kaynaklı silisyuma rastlanmıştır. SEM analiz sonuçları ticari firmanın belirttiği boyutu teyit eder nitelikte bulunmuştur. Nanoparçacık morfolojisi düzgün olmayan küreciklerin oluşturduğu aglomeratlar olarak gözlenmiştir. Örnek toz halde incelendiği için BN/BN-Rd aglomeratlarının görüldüğü düşünülmemekte olup, *in vitro* çalışmalarda d-su içerisinde süspansiyon edilen stok solüsyonu sonikasyon işlemi uygulanarak homojenize edilmiştir.

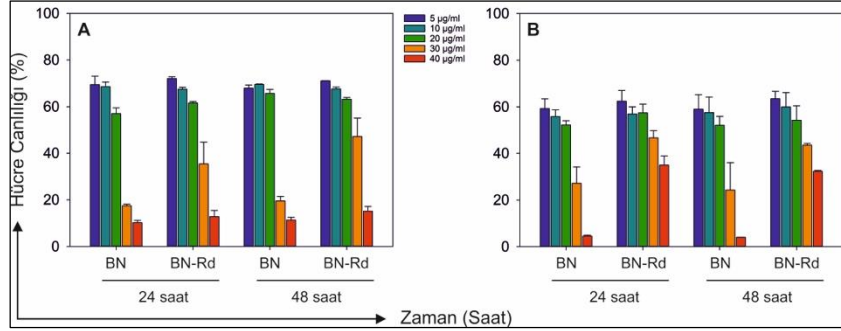


Şekil 4. SEM analizi. ImageJ programında ölçülen nanoparçacıkların boyut dağılımını gösteren histogram grafikleri; A) BN ve B) BN-Rd. SEM görüntüleri; C) BN ve D) BN-Rd nanoparçacıkları. Şekil içerisindeki ölçek barları 200 nm uzunluğa eş değerdir. (b: boyut; ö=örneklem sayısı)

3.4. MTT hücre proliferasyon testi

Farklı konsantrasyonlarda (5-40 $\mu\text{g/ml}$) hazırlanan BN ve BN-Rd nanoparçacıkları PC-3 ve HEK-293 hücrelerine ayrı ayrı uygulanmıştır. BN ve BN-Rd nanoparçacıkları her iki hücre hattı canlılığı üzerinde de konsantrasyona bağlı bir etki gösterirken, inkübasyon zamanı hücre sitotoksitesi üzerinde etki göstermemiştir (Şekil 5). Özellikle, 24 saatlik inkübasyon sonunda yüksek konsantrasyonlarda (30 ve 40 $\mu\text{g/ml}$) hücre canlılığı %50'nin altına düşmüştür. Bu konsantrasyonlarda, BN BN-Rd'ye oranla

daha fazla sitotoksite sergilemiştir. BN 30 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda PC-3 hücre canlılığını 24'üncü saat sonunda %17'ye düşürürken, BN-Rd uygulaması sonunda hücre canlılığı %35 olarak belirlenmiştir. HEK-293 hücreleri üzerinde de benzer şekilde BN (30 $\mu\text{g/ml}$) uygulanan grupta hücre canlılığı %27 hesaplanırken, BN-Rd (30 $\mu\text{g/ml}$) uygulanan grupta hücre canlılığı %47 olarak belirlenmiştir. Aynı hücrelere 40 $\mu\text{g/ml}$ nanoparçacık uygulandığında 24 saat sonundaki hücre canlılığı BN grubunda %5 iken BN-Rd grubunda %35 olarak ölçülmüştür.

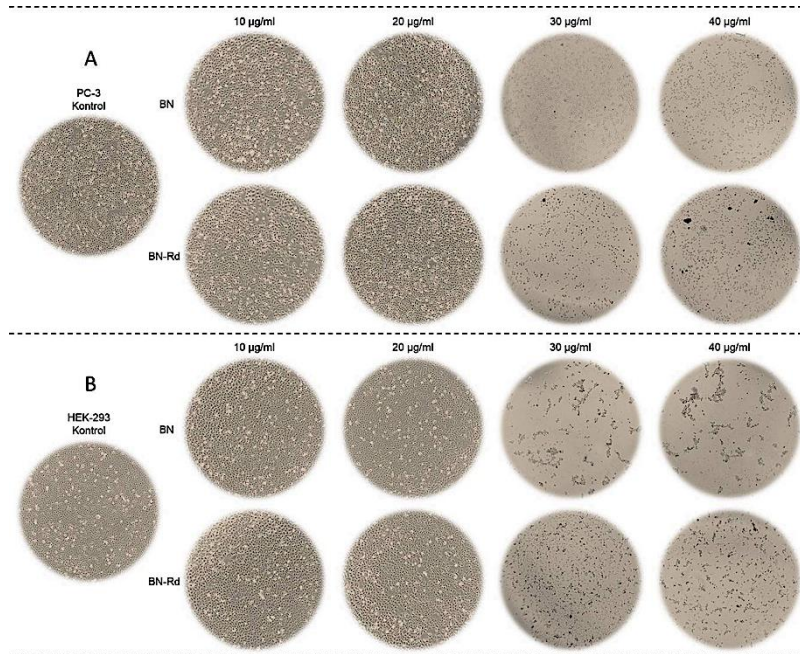


Şekil 5. MTT Hücre canlılık testi. BN ve BN-Rd'nin 5-40 µg/ml konsantrasyon aralığında; A) PC-3 hücreleri, B) HEK-293 hücreleri üzerindeki etkisi.

3.5. BN/BN-Rd uygulanan hücrelerde ışık mikroskobu ile morfoloji analizi

Sitotoksosite testi uygulanan PC-3 ve HEK-293 hücreleri ışık mikroskobu ile görüntülenerek nanoparçacıkların hücre morfolojisi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 6 A ve B). MTT proliferasyon testini destekler nitelikte bulgular elde edilmiş olup, hiçbir uygulamaya maruz bırakılmamış kontrol grubu hücreleri ile kıyaslandığında 10 ve 20 µg/ml BN ve BN-Rd hücre morfolojilerinde kayda değer bir değişime neden olmamıştır. Diğer yandan 30 ve 40 µg/ml

nanoparçacık uygulanan gruplarda hücre morfolojileri gözle görülebilir oranda değişime uğramıştır. Özellikle BN (30 µg/ml) uygulanmış gruplarda hücre morfolojilerindeki değişim daha yoğun gözlenirken, BN-Rd (30 µg/ml) uygulanan gruplarda hücre bütünlüğünü devam ettiren bazı hücre kümelerinin varlığı dikkat çekmektedir. Sonuç olarak, BN uygulanmış hücrelerde BN-Rd uygulanmış hücelere oranla daha fazla morfolojik değişim gözlenmiştir.

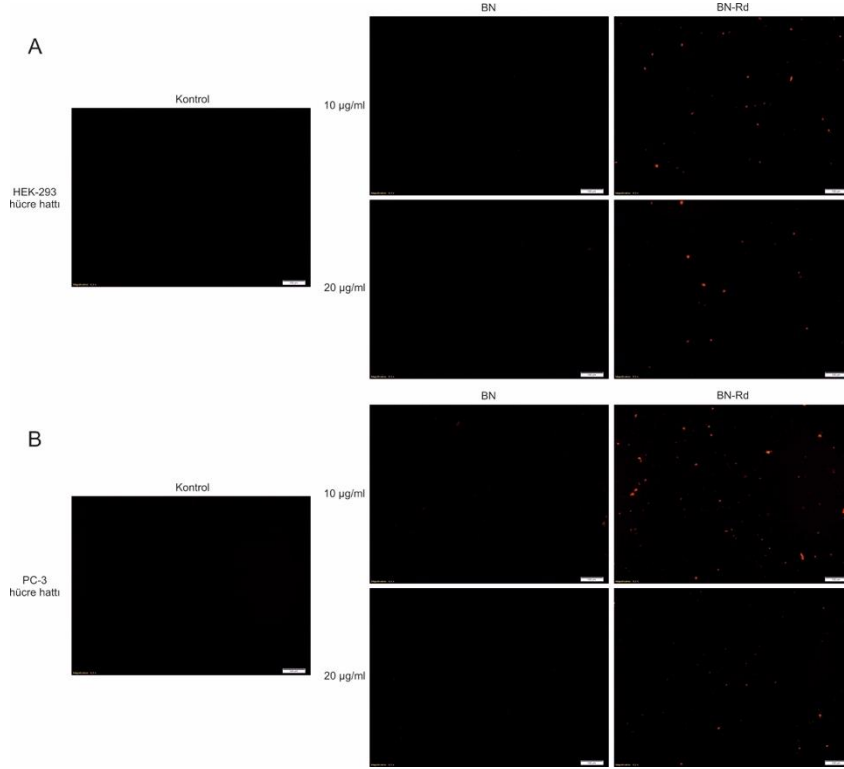


Şekil 6. Işık mikroskobu ile hücre morfolojisi analizi. BN ve BN-Rd'nin 10-40 µg/ml konsantrasyon aralığında; A) PC-3 hücreleri, B) HEK-293 hücreleri üzerindeki etkisi.

3.6. BN/BN-Rd uygulanan hücrelerin floresan mikroskopunda görüntülenmesi

MTT hücre proliferasyon testi ve morfoloji analizi bulgularına dayanarak belirlenen konsantrasyonlardaki (10 ve 20 µg/ml) BN ve BN-Rd nanoparçacıkları PC-3 ve HEK-293 hücrelerine uygulanmış ve bir günlük inkübasyon sonrasında hücre kültürlerinden çekilen floresan mikroskopu görüntüleri Şekil 7'de verilmiştir. Hiçbir uygulamaya maruz bırakılmamış kontrol grubu ve BN uygulanmış gruplarda ışımaya gözlenmez iken BN-Rd uygulanan gruplarda her iki hücre hattında da ışımaya gözlenmiştir. Yapılan hücre kültürü denemelerinde inkübasyon süresinde dibe çöken ve hücrelere bağlanmayan nanoparçacıkların yanlış pozitif sonuç vermesini önlemek amacıyla floresan mikroskopu analizlerinden önce hücreler iki defa PBS ile

yıkamış ve son olarak kuyulara taze besiyeri eklenmiştir. Buna göre elde edilen sinyallerin hücre içerisine girmiş veya hücrelere bağlanmış nanoparçacıklardan kaynaklandığı söylenebilmektedir. Floresan mikroskopu görüntülerine göre 10 µg/ml BN-Rd konsantrasyonunda daha yoğun ışımaya gözlenmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak ileride yapılması planlanan *in vivo* denemelerde daha düşük konsantrasyon olan 10 µg/ml BN-Rd tercih edilecektir. Görüntüler incelendiğinde bu konsantrasyonda insan prostat kanseri PC-3 hücrelerinde insan epitel hücresi HEK-293 hücrelerine oranla daha yoğun ışımaya gözlenmiştir. Bu farkın sebebinin, kanserli hücre membranının yüksek geçirgenliğinden [27] veya kanserli hücreler arasındaki boşluğun daha geniş olmasından [9,10] kaynaklandığı yorumu yapılabilir.



Şekil 7. Floresan mikroskopu analizi. BN ve BN-Rd'nin 10 ve 20 µg/ml konsantrasyon aralığında; A) PC-3 hücreleri, B) HEK-293 hücreleri üzerindeki etkisi. Şekil içerisindeki ölçek barları 100 µm uzunluğa eş değerdir.

4. Tartışma ve Sonuç

Yapılan çalışmada, biyogörüntüleme amaçlı kullanılmak üzere bor nitrür nanoparçacıkları

rodamin 123 floresan boyası ile etiketlenmiş ve üretilen nanoparçacıklar *in vitro* ortamda enstrümental analizler ve hücre kültürü çalışmaları ile karakterize edilmiştir. Elde edilen

sonuçlar *in vivo* çalışmalar için ümit vaat edici niteliktedir.

Rodamin 123 floresan boyası glutaraldehit çapraz bağlayıcı ajanı ile başarılı şekilde bor nitrür nanoparçacıklarına kovalent olarak bağlanmıştır. SEM analizlerine göre fotoğraflanan nanoparçacık boyutu ticari firmanın belirttiği şekilde yaklaşık 40 nm olarak belirlenmiştir. Rodamin 123 bağlanmasıyla nanoparçacık boyutunda bir değişiklik gözlenmemiştir. Literatürde, nanoparçacık büyüklüğünün ve şeklinin hücre içerisine girişte ve hücreden uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmektedir [28]. Buna göre, küçük (~50 nm) boyutlu ve küresel şekilli nanoparçacıkların (çubuksu şekilli nanoparçacıklara göre) hücre içerisine daha hızlı ve yüksek konsantrasyonda alındığı bildirilmektedir [28,29]. Bu sonuçlara göre çalışmamızda kullandığımız yaklaşık 40 nm boyuta sahip ve küresel şekilli BN nanoparçacıklarının biyogörüntüleme için ideal boyuta ve şekle sahip olduğu sonucuna varılabilir.

Hücre canlılığı testlerine göre 20 µg/ml eşik değeri olarak bulunmuş olup bu konsantrasyonun üzerinde hücre canlılığı %50'nin altına düşerken bu konsantrasyon ve altında hücre canlılığı %60-70 civarında tespit edilmiştir. Literatürde 10 µg/ml üzerindeki bor nitrür nanotüplerinin tetrazolyum tuzları ile etkileşerek MTT test sonuçlarını etkileyebileceğini ve hatalı sonuç vereceği tartışılmaktadır [30]. Bu durum, hücrelerin ışık mikroskopunda oldukça sağlıklı gözlemlendiği konsantrasyonlarda (5-20 µg/ml), MTT testinde hücre canlılığının %60-%70 gibi düşük sayılabilecek bir değerde ölçülmesinin sebebini açıklamaktadır. Işık mikroskobu altında yapılan morfoloji analizi de MTT hücre canlılığı testini destekler nitelikte olup, 20 µg/ml üzerindeki konsantrasyonlarda hücre morfolojisinde gözle görülebilir değişimler gözlenmiştir. Benzer şekilde, başka bir çalışmada da MTT testi sonuçlarına göre bor nitrür nanotüplerinin HEK-293 hücreleri üzerinde 20 µg/ml üzerindeki konsantrasyonlarda sitotoksik olduğu ve hücre morfolojisinde değişimlere yol açtığı rapor edilmiştir [31]. Yaptığımız MTT hücre canlılığı analizlerine göre 30 µg/ml ve 40 µg/ml BN konsantrasyonlarının sitotoksik etki gösterdiği ışık mikroskobu görüntüleri ile de doğrulanmıştır. Bu çalışmada, elde ettiğimiz

bulgular doğrultusunda 10 µg/ml ve 20 µg/ml konsantrasyonlar hücrelere uygulanarak BN-Rd'nin biyogörüntüleme uygulamalarında kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

BN-Rd uygulanan PC-3 ve HEK-293 hücrelerinde floresan mikroskobu altında ışımaya görülmüştür. BN-Rd (10 µg/ml) uygulanan prostat kanseri hücre tipi olan PC-3 hücrelerinin sağlıklı epitel hücre tipi olan HEK-293 hücrelerine oranla daha yoğun ışımaya yaptığı gösterilmiştir. Bu bulgular kanserli hücre zarının daha geçirgen olması veya tümör dokusunun normal dokuya göre daha fazla geçirgen olması durumu ile açıklanabilir. Yapılan çalışmalarda BN nanoparçacıklarının hücre içerisine endositoz yoluyla girebildiği bilinmektedir [18,32]. Tümör dokusunun yüksek geçirgenliğine dayanan pasif hedefleme yönteminde 40-200 nm aralığındaki nanoparçacıklar tercih edilmektedir [9,10]. Çalışmamızda kullanılan nanoparçacık boyutunun (40 nm) pasif hedefleme (dolayısıyla biyogörüntüleme) için uygun olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak *in vitro* ortamda en uygun konsantrasyon olarak belirlenen 10 µg/ml BN-Rd konsantrasyonunun *in vivo* testler ve klinik çalışmalarla desteklenmesi ve bor nitrür nanoparçacıklarının biyogörüntüleme amaçlı kullanım potansiyelinin daha ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Katma değeri yüksek bor ürünlerinin sağlık alanında kullanımı, zengin bor yataklarına sahip ülkemizin ekonomisine katkı sağlayacaktır.

Teşekkür

Bu çalışmanın ön deneme sürecine katkı sağlayan İzmir Özel Yeşeren Fen Lisesi öğretmenlerinden Adil CAN'a ve öğrencisi İdil Bilge TUNÇ'a teşekkür ederim.

Kaynakça

- [1] Apostolova, N., Rovira-Llopis, S., Baldoví, H.G., Navalón, S., Asiri, A.M., Victor, V.M., Garcia, H., Herance, J.R. 2015. Ceria nanoparticles with rhodamine B as a powerful theranostic agent against intracellular oxidative stress, RSC Advances, Cilt. 5(97), s. 79423-79432. DOI: <https://doi.org/10.1039/c5ra12794g>
- [2] Aydın, H. 2018. Nanoyapılı Hegzagonal Bor Nitrür Üretimi ve Karakterizasyonu, Fırat Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, Cilt. 30(2), s. 269-275. DOI: <https://dergipark.org.tr/en/pub/fumbd/issue/39197/461582>
- [3] Chessel, A. 2017. An Overview of data science uses in bioimage informatics, Methods, Cilt. 115, s. 110-118. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.12.014>

- [4] Etimaden - TÜRKİYE'DE BOR. <http://www.etimaden.gov.tr/turkiyede-bor> (Erişim Tarihi 29.07.2020)
- [5] Forster, S., Thumser, A.E., Hood, S.R., Plant, N. 2012. Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in in vitro drug transport assays, *PLoS ONE*, Cilt. 7(3), s. e33253. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033253>
- [6] Kainthola, A., Bijalwan, K., Negi, S., Sharma, H., Dwivedi, C. 2020. Hydrothermal synthesis of highly stable boron nitride nanoparticles, *Materials Today: Proceedings*, Cilt. 28, s. 138-140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.452>
- [7] Kumar, V., Lahiri, D., Lahiri, I. 2018. Synthesis of Boron Nitride Nanotubes and Boron Nitride Nanoflakes with Potential Application in Bioimaging, *Materials Today: Proceedings*, Cilt. 5(8), s. 16756-16762. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.06.037>
- [8] Pamukcu, A., Portakal, H.S., Eroglu, E. 2018. Terapötik Moleküllerin Aktarımında Kullanılan Yeni Nesil Biyomalzemeler, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Cilt. 11(3), s. 524-542. DOI: 10.18185/erzifbed.339405.
- [9] Kutova, O.M., Guryev, E.L., Sokolova, E.A., Alzeibak, R., Balalaeva, I.V. 2019. Targeted Delivery to Tumors: Multidirectional Strategies to Improve Treatment Efficiency, *Cancers*, Cilt. 11(1), s. 68. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers11010068>
- [10] Raj, S., Khurana, S., Choudhari, R., Kesari, K.K., Kamal, M.A., Garg, N., Ruokolainen, J., Das, B.C., Kumar, D. 2019. Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy, *Seminars in Cancer Biology*, DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.11.002>
- [11] Eroglu, E., Portakal, H.S., Pamukcu, A. 2020. A New Generation Nanotherapeutic: pHEMA-Chitosan Nanocomposites in siRNA Delivery, *Current Nanoscience*, 16. DOI: 10.2174/1573413716666200110093715.
- [12] Eroglu, E., Tiwari, P.M., Waffo, A.B., Miller, M.E., Vig, K., Dennis, V.A., Singh, S.R. 2013. A nonviral pHEMA+chitosan nanosphere-mediated high-efficiency gene delivery system, *International journal of nanomedicine*, Cilt. 8, s. 1403-1415. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S43168>
- [13] Malik, N., Arfin, T., Khan, A.U. 2019. Chapter 13 - Graphene nanomaterials: chemistry and pharmaceutical perspectives. ss. 373-402. Malik, N., Arfin, T., Khan, A.U. ed. 2019. *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*, Elsevier, 551s. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00002-3>
- [14] Han, W., Ma, Z., Liu, S., Ge, C., Wang, L., Zhang, X. 2017. Highly-dispersible boron nitride nanoparticles by spray drying and pyrolysis, *Ceramics International*, Cilt. 43(13), s. 10192-10200. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.05.045>
- [15] Pandey, S., Bodas, D. 2020. High-quality quantum dots for multiplexed bioimaging: A critical review, *Advances in Colloid and Interface Science*, Cilt. 278, s. 102137. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102137>
- [16] Qi, J., Hu, X., Dong, X., Lu, Y., Lu, H., Zhao, W., Wu, W. 2019. Towards more accurate bioimaging of drug nanocarriers: turning aggregation-caused quenching into a useful tool, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Cilt. 143, s. 206-225. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.05.009>
- [17] Shen, Q., Wang, S., Yang, N. Di, Zhang, C., Wu, Q., Yu, C. 2020. Recent development of small-molecule organic fluorophores for multifunctional bioimaging in the second near-infrared window, *Journal of Luminescence*, Cilt. 225, s. 117338. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2020.117338>
- [18] Sukhorukova, I.V., Zhitnyak, I.Y., Kovalskii, A.M., Matveev, A.T., Lebedev, O.I., Li, X., Gloushankova, N.A., Golberg, D., Shtansky, D.V. 2015. Boron Nitride Nanoparticles with a Petal-Like Surface as Anticancer Drug-Delivery Systems, *ACS Applied Materials & Interfaces*, Cilt. 7(31), s. 17217-17225. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.5b04101>
- [19] Tabaković, A., Kester, M., Adair, J.H. 2012. Calcium phosphate-based composite nanoparticles in bioimaging and therapeutic delivery applications, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, Cilt. 4(1), s. 96-112. DOI: 10.1002/wnan.163
- [20] Zhang, W.H., Hu, X.X., Zhang, X.B. 2016. Dye-doped fluorescent silica nanoparticles for live cell and in vivo bioimaging, *Nanomaterials*, Cilt. 6(5), s. 81. DOI: 10.3390/nano6050081
- [21] Chandra, S., Das, P., Bag, S., Laha, D., Pramanik, P. 2011. Synthesis, functionalization and bioimaging applications of highly fluorescent carbon nanoparticles, *Nanoscale*, Cilt. 3(4), s. 1533-1540. DOI: 10.1039/CONR00735H
- [22] Singh, A., Jha, S., Srivastava, G., Sarkar, P., Gogoi, P. 2013. Silver Nanoparticles As Fluorescent Probes: New Approach For Bioimaging, *International Journal of Scientific & Technology Research*, Cilt. 2(11), s. 153-157.
- [23] Xue, Y., Lee, J., Kim, H.-J., Cho, H.-J., Zhou, X., Liu, Y., ... Khademhosseini, A. 2020. Rhodamine Conjugated Gelatin Methacryloyl Nanoparticles for Stable Cell Imaging, *ACS Applied Bio Materials*, Cilt. 3(10), s. 6908-6918. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/acsabm.0c00802>
- [24] Kumar, V., Nikhil, K., Roy, P., Lahiri, D., Lahiri, I. 2016. Emergence of fluorescence in boron nitride nanoflakes and its application in bioimaging, *RSC Advances*, Cilt. 6(53), s. 48025-48032. DOI: 10.1039/c6ra05288f
- [25] He, Z., Zhao, J., Li, F., Zhang, D., Guo, F., Guo, H., Wang, X., Hu, H. 2021. In situ synthesis of polymer-modified boron nitride nanosheets via anionic polymerization, *Applied Surface Science*, Cilt. 537(53), s. 147966. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.147966>
- [26] Kumari, R., Singh, S., Monisha, M., Bhowmick, S., Roy, A., Das, N., Das, P. 2016. Hierarchical coassembly of DNA-triptycene hybrid molecular building blocks and zinc protoporphyrin IX, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, Cilt. 7(1), s. 697-707. DOI: <https://doi.org/10.3762/bjnano.7.62>
- [27] Zalba, S., Ten Hagen, T.L. 2017. Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy, *Cancer*

- treatment reviews, *Cilt.* 52, s. 48-57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.008>
- [28] Chithrani, B.D.; Chan, W.C.W. 2007. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes, *Nano Letters*, *Cilt.* 7, s. 1542-1550. DOI: 10.1021/nl070363y.
- [29] Chithrani, B.D.; Ghazani, A.A.; Chan, W.C.W. 2006. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells, *Nano Letters*, *Cilt.* 6, s. 662-668. DOI: 10.1021/nl052396o.
- [30] Ciofani, G., Danti, S., Genchi, G.G., Mazzolai, B. Mattoli, V. 2013. Boron Nitride Nanotubes: Biocompatibility and Potential Spill-Over in Nanomedicine, *Small*, *Cilt.* 9, s. 1672-1685. DOI: 10.1002/sml.201201315
- [31] Horváth, L., Magrez, A., Golberg, D., Zhi, C., Bando, Y., Smajda, R., Horvath, E., Forró, L., Schwaller, B. 2011. In Vitro Investigation of the Cellular Toxicity of Boron Nitride Nanotubes, *ACS NANO*, *Cilt.* 5, s. 3800-3810. DOI: 10.1021/nn200139h.
- [32] Rasel, A., Li, T., Nguyen, D., Singh, S., Zhou, Y., Xiao, Y., Gu, Y.T. 2015. Biophysical response of living cells to boron nitride nanoparticles: uptake mechanism and bio-mechanical characterization. *Journal of Nanoparticle Research*, *Cilt.* 17(11), s. 441. DOI: 10.1007/s11051-015-3248-2.