

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



Kuantum nokta [qdot] temelli biyosensörün konjuktivaya uygulanması

Proje No:
THD-2017-7769

Proje Türü
Tıp ve Sağlık Bilimleri

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. İsmail Hakkı NUR
ERÜ. Veteriner Fakültesi

Araştırmacılar
Doç.Dr.Şerife SAÇMACI / ERÜ. Fen Fak. Kimya Böl.
Arş. Görv. Hacı KELEŞ /ERÜ. Veteriner Fak. Anatomi ADalı.

Nisan 2018
KAYSERİ

TEŞEKKÜR: Hızlı destek proje kapsamında yürütülen Poje Kod No: THD-2017-7769 Kuantum nokta qdot temelli biyosensörün konjuktivaya uygulanması” alı çalışmamıza ERÜ BAP Birimi tarafından desteklendiği için başta proje yürütücüsü olarak şahsım ve çalışma arkadaşlarım adına teşekkür ediyorum.

ÖZET: Asit kullanılarak yüzeyi fonksiyonlaştırılmış CdSe/ZnS kuantum nokta temelli Qdot655 nano partikül kullanılarak konjuktivadan emilimleri ve vücuttaki dağılımları belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla İnvivo imaging görüntüleme sistemi kullanıldı. Elde edilen bulgulara göre ilk önce burun mukozasında , kulakların ön kenarında ,elleribde ve kuyrukta hızlıca yayıldığı görüldü. Konjuktivanın lenf drenji yavaş olmasına rağmen genel dolaşım sistemine katıldığı belirlendi.

Anahtar kelimeler: lenf, konjuktiva, rat

ABSTRACT: We tried to determine the absorption from the conjunctiva and their distribution in the body using Qdot655 nanoparticle based on surface-functionalized CdSe / ZnS quantum dot using acid. For this purpose, the in vivo imaging system was used. According to the findings, it was first seen to spread rapidly in the nasal mucosa, at the front edge of the ears, in the hands and in the tail. Although the lymph drainage of the conjunctiva is slow, it has been shown to participate in the general circulatory system.

Key words: lymph, conjunctiva ,rat

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Konjuktiva ile vücudun genel dolaşım sistemi hakkında bir fikir edinmek. Elde edilen sonuçlar, Kuantum Nokta Qdot Temelli Biyoalgılayıcı Prob Kullanılarak Gözdeki Lenf Drenajının Varlığı Üzerine Bir Araştırma'nın bir yan çalışması olarak yapıldı. Konjuktivadan emilen sıvının genel dolaşım sistemine geçiş zamanları hakkında fikir vermesi bakımından önemlidir. Çünkü konjuctiv doku glokom gibi göz hastalıklarında göz iç basıncına neden olan sıvının dışarıdaki drenaj parçasıdır. Bu nedenle önemlidir.

İÇİNDEKİLER

Kodu	İçeriği	Sayfa NO
	Teşekkür	İ
	ÖZET	İi
	ABSRACT	İii
	ÇALIŞMANIN AMAÇ VE KAPSAMI	iv
1	GİRİŞ	1
2	MATERYAL METOD	3
3	BULGULAR	4
3.1.	Dişi bulgular.....	4
3.1.1	Enjeksiyon yapıldığında	4
3.1.2.	Enjeksiyondan 15-20 dk sonra	5
3.1.3	Enjeksiyondan 30 dk sonra	6
3.1.4.	Enjeksiyondan 60 dk sonra	7
3.2	Erkek Bulgular.....	8
3.2.1	Enjeksiyondan hemen sonra.....	8
3.2.2.	Enjeksiyondan 15-20 dk sonra	9
3.2.3.	Enjeksiyondan 30 dk sonra	10
3.2.4.	Enjeksiyondan 60 dk sonra	11
4	TARTIŞMA ve SONUÇ	12
4.1	Ulaşılması düşünülen hedefler.....	14
5	KAYNAKLAR	15

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Konjunktiva gözün aksesuar elemanlarından olup, zarsel tabiatlı bir dokudur. Dolaşım sistemi bakımından oldukça zengin olup serbest kenarı kornaya kadar yaklaşır. Gözün medial açısında caruncula lacrimalis adı verilen bir kabartı yapar. Glandula lakrimalisin ve konjunktivanın lenf damarları lenfonodium mandibulanisa drene olur. Üst göz kapağın konjktivasının sınırları n.oftalmikustan, alt göz kapağının konjktivasının sınırları ise n.maksillaristen gelir [1].

En yüksek lenfatik damar yoğunluğuna sahip dokuların dermis ve oral mukoza zarları olduğunu gösterdik. Aksine, nazal mukoza zarı, vomeronazal organın altındaki en bazal kısımları haricinde, lenfatiklerden yoksundur.[2]. Göz kapakları ve konjunktivanın lenfatikleri, alt nazal konkavitetlerle bağlantılıdır. Serebro-omurilik sıvısının [BOS], optik sinir ve NLD lenfatikler yoluyla drenaj yapabildiğini, Fila olfakteri ile nazal mukoza zarına akıtılan BOS'un solunum havasının nemlendirilmesinde görev yapar. Bununla birlikte, kafadaki lenfatik paterni, BOS ve diğer interstisiyel sıvıları alıp iletmek hala tam olarak anlaşılammıştır [2]. Son zamanlarda, CNS'nin plasenta dışında, lenfovasküler sisteme sahip olmayan tek organ sistemi kabul edilmesine rağmen son yıllarda yapılan çalışmalarda lenf sistemine sahip dolaşımın varlığını ortaya konulmuştur. [Aspelund ve ark. 2015; Louveau ve ark. 2015]. Konjunktivayı drene eden derin bir sistem ve göz kapakları tanımlanmamıştır. Önceki histolojik ve mürekkep enjeksiyon çalışmaları ile derin bir toplama lenf sistemi önerilmiş olmasına rağmen, konjunktivayı drene eden ve göz kapaklarının ve yüzün lenfatiklerine bağlanan derin bir yolu gösteren ayrıntılı bir çalışma yapılmamıştır [5-9]. Yüzeysel venin lenfatik drenaj olarak şekillenen konjunktiva drenajı; Derin lenfatik sistem konjunktivayı boşaltırken, yüzeysel lenfatik sistem ile preseptal orbicularis kasiyla bağlantılı olduğu , ekstremite venöz sistemine benzer ancak alt ekstremitenin aksine bir miktar kapakçık bulunduğu tespit edildi. Yüzeysel Lenfatik Sistem

medialde nazolabial yağ bölmesi ve lateral orbital yağ bölmesi içinde yer aldığı toplandığı tespit edildi. Derin Lenfatik Sistem. Yüzün derin lenfatik sistemi, konjonktivayı doğrudan alt göz kapağı lateralinde üçüncü tarsal plak ve Meibomian bezlerinden geçen ön-toplayıcılardan drene etmiştir. Derin lenfatik sistem, göz kapağı derisinden ve yüzün yukarısında tarif edildiği gibi yüzeysel lenfatik sistem ile bağlantı ile birleştirildi [10-11].

Normalde lenfatik damarlarla donatılan vücuttaki çoğu dokulardan farklı olarak, oküler dokular heterojendir: konjunktiv, lenfatikler bakımından zengindir, kornea ve retina bunlardan yoksundur. Bununla birlikte, iltihaplı korneada lenfanjiyogenez indüklenir. Son zamanlarda, endotel olmayan LYVE-1 + hücrelerinin büyük bir popülasyonunun, çoğu oküler dokularda bulunduğu bildirilmiştir. Korneanın aksine, normal konjonktivanın hem kan hem de lenfatik damarlarla [14,34–39], dokunun temel metabolik fonksiyonlarını desteklediği gibi, gözün ön kompartmanına hücreli immün efektörler sağlaması da sağlanır. Son zamanlarda yapılan iki çalışma, normal konjonktivanın, kemik iliği kaynaklı LYVE-1 + makrofaj soyu hücrelerinin büyük bir popülasyonuna sahip olduğunu göstermiştir [Şekil 3] [14,15]. Açık bir kanıt olmamasına rağmen, bu hücrelerin inflamasyon sırasında kornea lenfanjiyogenezine katkıda bulunabileceği hipotezi akla yatkındır [12,13].

2. BÖLÜM

MATERYAL ve METOT

Bu araştırma TOA-2017-7362 kodlu Kuantum Nokta Qdot Temelli Biyoalgılayıcı Prob Kullanılarak Gözdeki Lenf Drenajının Varlığı Üzerine Bir Araştırma'da kullanılan farelerin konjunktivalarındaki emiliminin vücuttaki dağılım süresini ve yerlerini incelemek üzere tasarlanmıştır. Bu amaçla 5'er adet erkek ve dişi Wistar albino rat kullanıldı. Hayvanlara cerrahi herhangi bir işlem uygulanmadı. Araştırmada Veteriner Anatomi laboratuvarına alınan İn-vivo görüntüleme cihazı Syngene GBOX:XRQ cihazı kullanıldı. Hamilton enjektör kullanılarak konjunktivaya 1 µl Qdot655 damlatıldı. 30 ve 60.dk daki invivo görüntüleri alındı. Qdot655 ITK Carboxyl [Invitrogen] için Epimid wave 655nm emisyon filtresi kullanıldı Tarama süresi 720 ile 900 ms arasında uygulandı. Görüntüler otomatik olarak alındı. Çalışmada Veteriner Fakültesi Anatomi lab, DEKAM ve ERNAM laboratuvar imkanları kullanıldı.

Görüntülerin işlenmesi ve gerekli raporların alınması için Syngene tools yazılım programı kullanıldı.

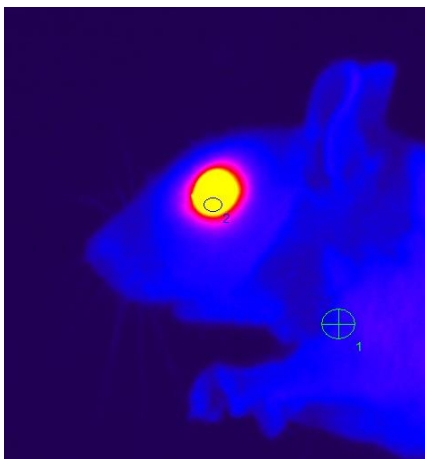
3. BÖLÜM

BULGULAR

Erkek ve dişilerin konjunktivasındaki, lenf sisteminin genel dolaşıma katılınca kadar süreleri hakkında bir fikir edinmek üzere tasarlanana çalışmada erkek ve dişi arasında herhangi bir farkın olmadığı tespit edildi. Göze damlatılan Qdot655'in enjeksiyondan hemen sonraki görüntüleri ile 60 dk dansonraki görüntüleri arasında ciddi bir farkın olmadığı tespit edildi. Yapılan görüntüleme işlemlerinde ilk 20 dk. Kol ve bacaklarında hatta kulak ve kuyruklarında görüntü alınamazken 30 dk dan itibaren kuyruklarında ve kulaklarında floresan görüntü elde edildi. Ön bacaklarda ve burun ucunda ışımaya tespit edilmesinin sebebi olarak tarafımızca yapılan yorumunda ana dolaşım sistemine geçtikten hemen sonra aorta vasıtasıyla bütün vücuda yayılması olarak yorumlandı.

3.1 Dişi BULGULAR

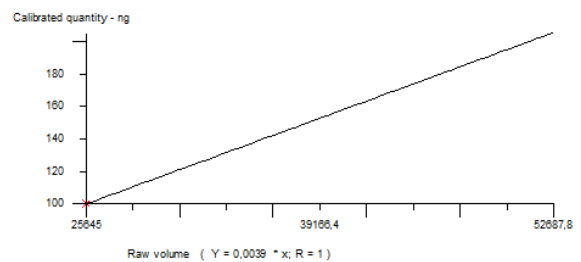
3.1.1 Enjeksiyon yapıldığında



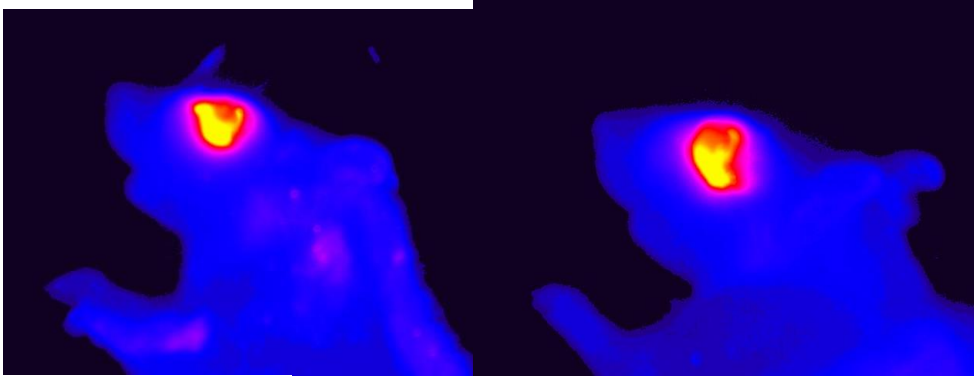
Spot	Raw vol.	ng
Spot 1	25645,00	100,00
Spot 2	52960,00	206,51

Quantity calibration details

Curve type Linear through origin (single standard value)
Units ng

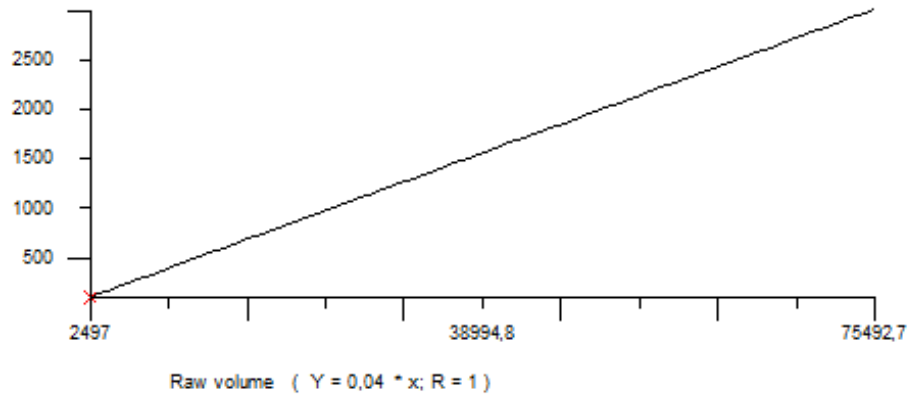


3.1.2. Enjeksiyondan 15-20 dk sonra



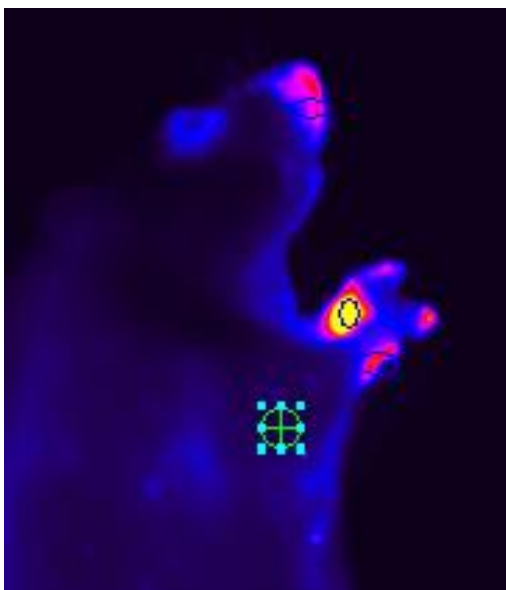
Spot	Raw vol.	ng
Spot 1	2497,00	100,00
Spot 2	76229,00	3052,82
Spot 3	28416,00	1138,01
Spot 4	62151,00	2489,03

Calibrated quantity - ng



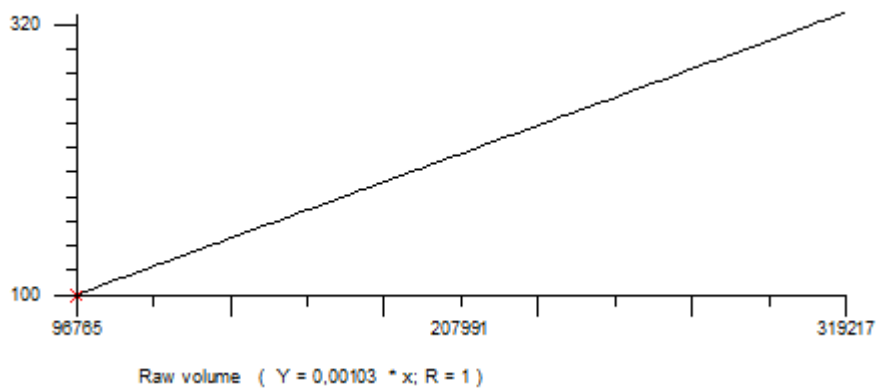
Spot	Raw vol.	Assigned quantity
1	2497,0	100,0

3.1.3.Enjeksiyondan 30 dk sonra

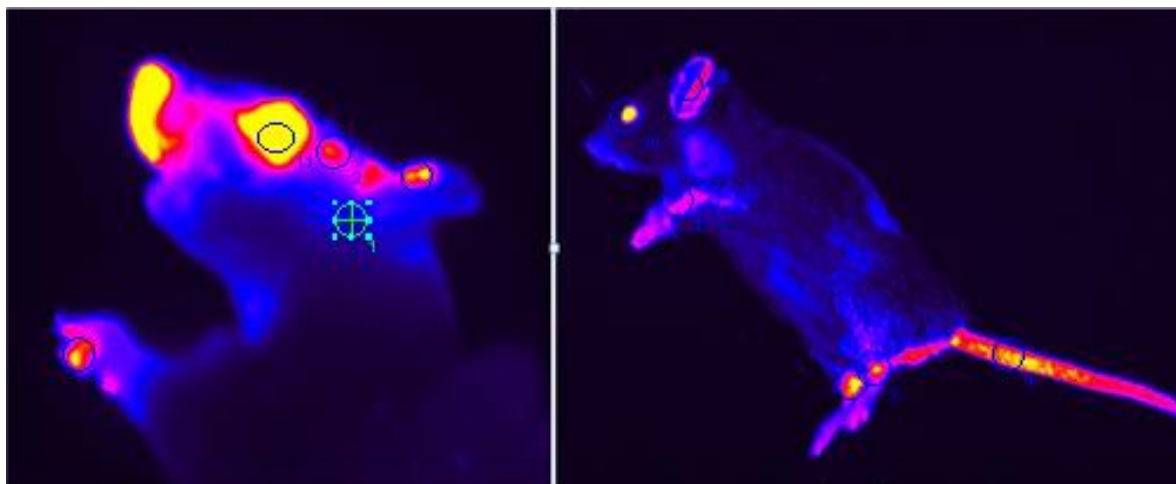


Spot	Raw vol.	ng
Spot 1	96765,00	100,00
Spot 2	301402,00	311,48
Spot 3	311001,00	321,40
Spot 4	321463,00	332,21

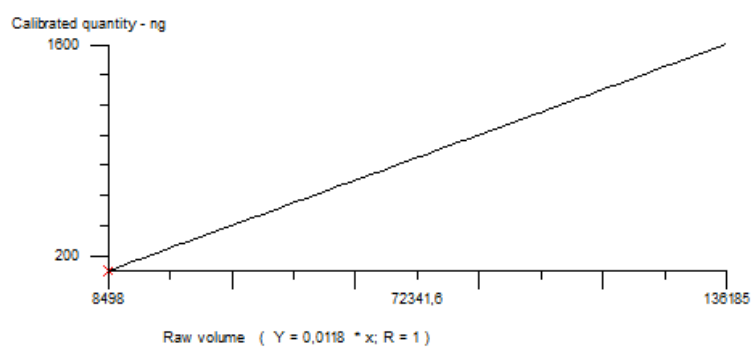
Calibrated quantity - ng



3.1.4. Enjeksiyondan 60 dk sonra

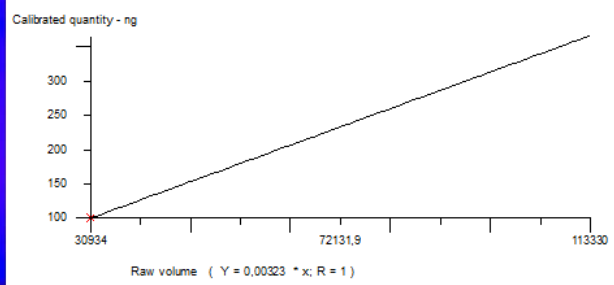
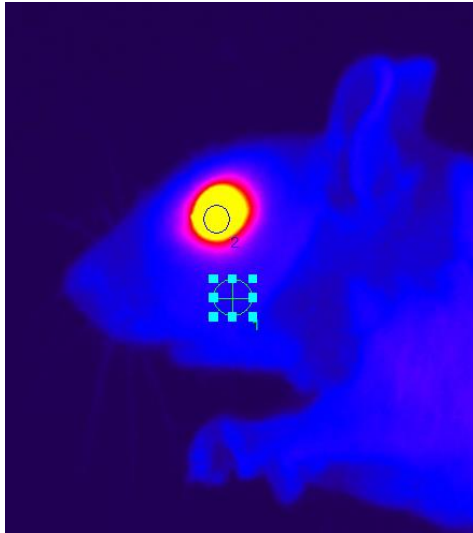


Spot	Raw vol.	ng
Spot 1	8498,00	100,00
Spot 2	116603,00	1372,12
Spot 3	102860,00	1210,40
Spot 4	125013,00	1471,09
Spot 5	80434,00	946,51
Spot 6	95559,00	1124,49
Spot 7	67711,00	796,79
Spot 8	72231,00	849,98
Spot 9	96953,00	1140,89
Spot 10	47411,00	557,91
Spot 11	137474,00	1617,72



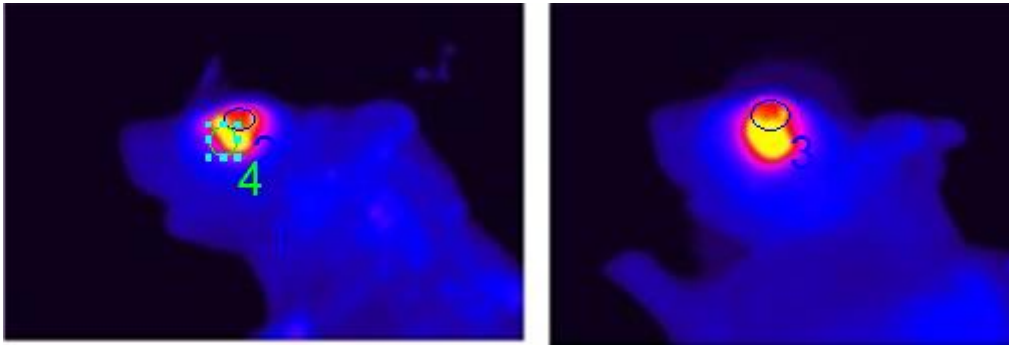
3.2 ERKEK BULGUAR

3.2.1 Enjeksiyondan hemen sonra

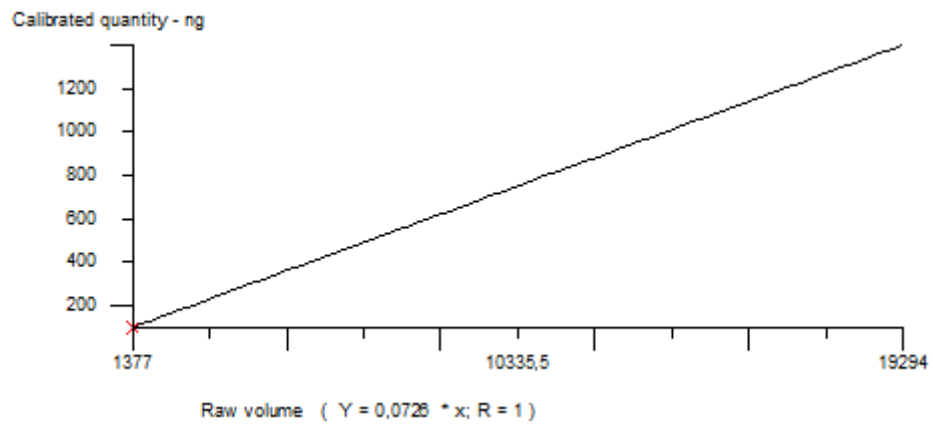


Spot	Raw vol.	ng
Spot 1	30934,00	100,00
Spot 2	114161,00	369,05

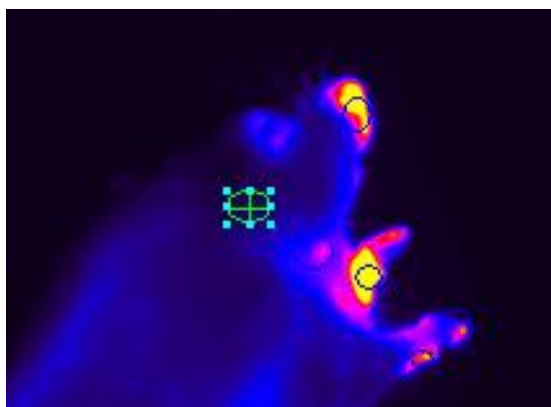
3.2.2. Enjeksiyondan 15-20 dk sonra



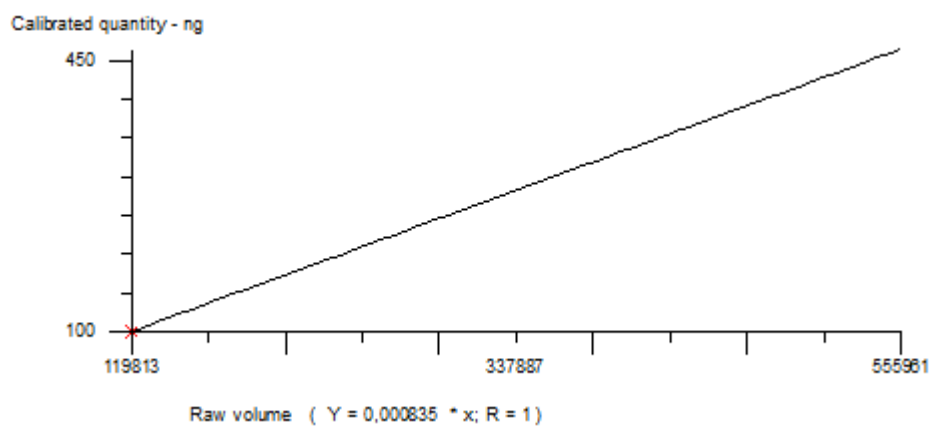
Spot	Raw vol.	ng
Spot 1	1377,00	100,00
Spot 2	12574,00	913,14
Spot 3	19474,00	1414,23
Spot 4	12573,00	913,07



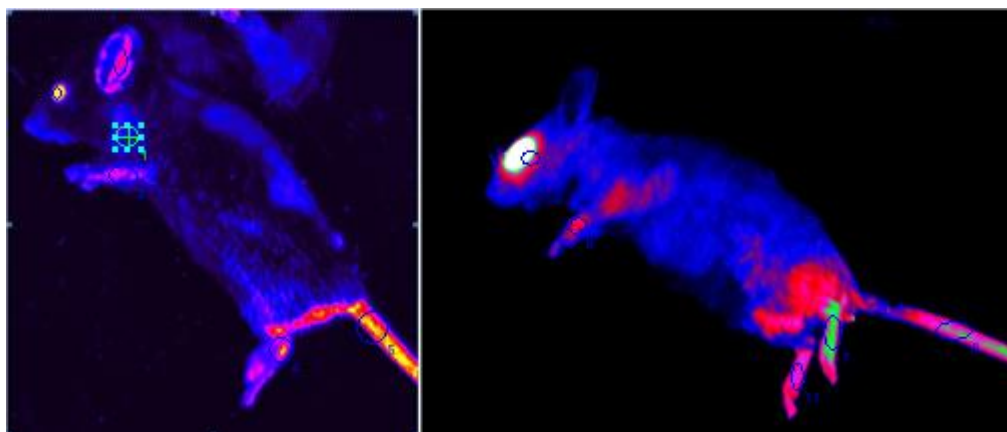
3.2.3. Enjeksiyondan 30 dk sonra



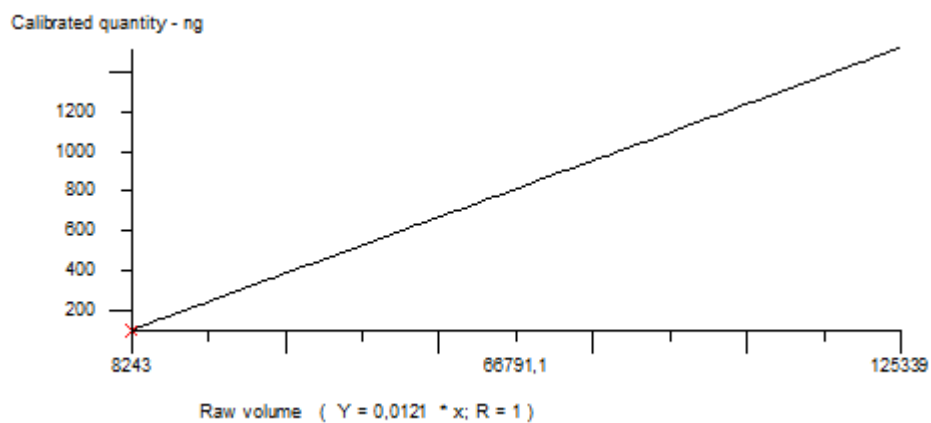
Spot	Raw vol.	ng
Spot 1	119813,00	100,00
Spot 2	385034,00	321,36
Spot 3	203751,00	170,06
Spot 4	212064,00	177,00
Spot 5	560366,00	467,70
Spot 6	374005,00	312,16



3.2.4. Enjeksiyondan 60 dk sonra



Spot	Raw vol.	ng
Spot 1	8243,00	100,00
Spot 2	49094,00	595,58
Spot 3	69511,00	843,27
Spot 4	69065,00	837,86
Spot 5	126521,00	1534,89
Spot 6	43208,00	524,18
Spot 7	39229,00	475,91
Spot 8	71428,00	866,53
Spot 9	41792,00	507,00
Spot 10	20224,00	245,35
Spot 11	53005,00	643,03



4. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma aslında başlı başına geniş bir proje olabilecek nitelikte bir çalışmadır. Çünkü günümüzde gözün gerek iç drenajı gerekse dış drenajı üzerine yapılan çalışmalar çok nadir sayıdadır. Günümüzde gözün iç tansiyonunun açıldığı lenf yumrusu ile beyin zarlarının taşıdığı lenf damarlarının da drenajını aynı lenf yumrusuna yapması, buna parotis tükrük bezinin lenf yumrusununda katılması başta, Parkinson ve Ms hastalıklarının tedavisinde yep yeni araştırma imkanları yaratması bakımından önemlidir.

Konu ile ilgili asıl söz konusu proje kapsamında yapılan literatür çalışmasında konjunktiva ile genel dolaşımın arasındaki ilişkinin geçisi üzerine önceliğin hangi sisteme ait olduğu hakkında herhangi bir bilgiye rastlanılmaması bakımından da önemlidir.

Yürütülen bu çalışmada ilk bir saat içinde mandibular lenf yumrusunda bir floresan görüntü alınmadı. Ancak TOA-2017-7362 kodlu Kuantum Nokta [Qdot] Temelli Biyoalgılayıcı Prob Kullanılarak Gözdeki Lenf Drenajının Varlığı Üzerine Bir Araştırma projesinde submandibular lenf yumrusuna açıldığı tespit edilmiştir. Yürütülen bu çalışmada süreler bakımından 30. Ve 60. Dk da görüntü alınması ile ilgili olduğu için birkaç saat sonra lenf yumrusuna drenajı tespit etmek imkanımız olmamıştır.

Kulağa bölgesinde floresan görüntü alınmasının sebebi literatürde [14] belirttiği gibi ventral ve rostral ekstraorbital lakrimal bezlerden kaynaklanmaktadır. Kanal, gözün dorsolateral bölgesinde konjunktivaya açılan intraorbital lakrimal bezle birleşir. Sıçanlarda ayrıca exorbital bezi lakrimal sıvısının üretiminde aktiftir. Kulağın biraz altında ve hemen önünde bulunan ekstraorbital lakrimal bezin antero-dorsal sınır kanalı, konjunktivaya açılmadan önce intraorbital lakrimal bezden biriyle birleşmek için gözün dorso-lateral

bölgesine doğru ilerler. Bu nedenle floresan görüntünün göz çevresinde kuvvetli olmasının sebebi bu birleşmelerdir. Konjunktival lenfatik sistemin bozuk olduğu durumlarda göz, gözün [cameraoculi anterior] içinden gelen sıvıyı subkonjunktival boşluğa boşluğa bıraktığı bilindiği için kusurlu lenfatik sistem, sıvıyı subkonjunktival lenf sistemi ile drene edilemeyeceği için göz iç basıncının yükselmesine neden olabilir. Konjunktiva gözdeki en lenfatik gelişmiş dokudur. Dolyısıyla GİB azaltmaya gerek duyulan cerrahisini işlemler sırasında kullanılan koterizasyon lenfatik yapılara zarar verebileceği husus dikkati çekmiştir [15].

Bir grup araştırmacı gözün ön kamaradaki veya vitrözdeki enjekte edilen markerların lenf düğümlerine ulaşmak için konjunktival lenfatikler kullandığını bildirmişlerdir [16,17]. Bununla birlikte, maküler ödemde sızan interstisyel sıvının emilim mekanizması açık değildir. Yapılan son araştırmalarda, vitreustan drenajın konjunktival lenfatikler aracılığıyla olabileceği öne sürülmüştür [17].

Sonuç: yukarıdaki bilgiler ışığında konjunktivanın lenf damarları bakımından zengin olduğu, GİB'nın drenajında sağlıklı konjektif dokunun önemli olduğu hatta GİB'nın lenfatiklere drenajını konjunktival lenf sistemiyle olabileceğine dair görüşlere kısmen katılmaktadır. Çünkü konjunktival lenf sistemi parotis ve mandibular lenf yumrusu ile irtibatlı oldu gibi humor aquousus'un hem konjunktival hemde schlemm kanalı aracılığıyla mandibular lenf yumrusuyla irtibatı bilinmektedir. Yapılan çalışmada görüleceği üzere konjunktival lenf drenajı yaklaşık birsaatlik zaman diliminde Rat modeli olarak bütün vücut sistemiyle irtibatlı olduğu ortaya konulmuştur.

Biyouyumlu problemlerin gelecekteki gelişimi ve daha duyarlı hiperspektral görüntüleme yöntemleri yine de bu dezavantajları atlatabilir ve klinik öncesi bulguların kör edici göz hastalığının tedavisine yönelik klinik çalışmalara dönüştürülmesini sağlayacaktır.

4.1 Ulaşılması düşünölen hedefler:

Türkiye şartlarında hiç denenmemiş bu çalışma bir ön çalışma niteliğindedir. Konjuktiv doku göz iç basıncıyla koordineli çalışmaktadır. Bu koordinasyonu ortaya koyabilmek adına:

1-konjuktiv dokunun özellikle limbus bölgesinde immun histokimyasal floresan yapısını çıkartabilmek ona uygun proteinle Qdot655 'i birbirine bağlayarak bir nanopartikül prob elde etmek, ve bu probu kullanılarak floresan mikroskobunda tespit edilmesi,

2- Glukom tedavsinde kullanılan çeşitli prostoglandin türevi kimyasallar kullanılarak gözdeki lenf kanalları üzerinde indükleyici etkilerini tespit etmek,

3- Paramanyetik Qdot'lar kullanılarak Micro-CT görüntüsünü alabilmek suretiyle göz ile lenf yumrusu arasındaki irtibat ortaya konulmalıdır.

5.BÖLÜM

KAYNAKLAR

- 1- Necdet Dursun, Veteriner Anatomi III, Medisan Yayinevi, [2014], 47, 165-166
- 2- Melanie Lohrberg & JOrg Wilting. The lymphatic vascular system of the mouse head. *Cell Tissue Res* [2016] 366:667–677
- 3- Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsen TV, Karaman S, Detmar M, Wiig H, Alitalo K [2015] A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med* 212: 991–999
- 4- Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J [2015] Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523:337–341
- 5- Cook BE Jr, Lucarelli MJ, Lemke BN, et al. Eyelid lymphatics II: A search for drainage patterns in the monkey and correlations with human lymphatics. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* [2002];18:99–106.
- 6- Collin HB. Ocular lymphatics. *Am J Optom Arch Am Acad Optom.* [1966]; 43:96–106.
Clodius L, Földi M, Földi E, Kubik S. *Textbook of Lymphology.* 6th ed. Munich: Elsevier; [2005].
- 7- Aglianó M, Lorenzoni P, Volpi N, et al. Lymphatic vessels in human eyelids: An immunohistological study in dermatochalasis and chalazion. *Lymphology* [2008];41:29–39.
- 8- Cook BE Jr, Lucarelli MJ, Lemke BN, et al. Eyelid lymphatics I: Histochemical comparisons between the monkey and human. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* [2002];18:18–23.
- 9- Sajna Shoukath and all The Lymphatic Anatomy of the Lower Eyelid and Conjunctiva and Correlation with Postoperative Chemosis and Edema. [2016]. DOI: 10.1097/PRS.0000000000003094

- 10- Tourani SS, Taylor GI, Ashton MW. Understanding the three-dimensional anatomy of the superficial lymphatics of the limbs. *Plast Reconstr Surg*. [2014];134:1065–1074.
- 11- L. Chen Ocular lymphatics: state of the art review. *Lymphology*. [2009] June ; 42[2]: 66–76.
- 12- Javadi MA, Yazdani S, Sajjadi H. Chronic and delayed-onset mustard gas keratitis: Report of 48 patients and review of literature. *Ophthalmology*. [2005]; 112:617–625. [PubMed: 15808253]
- 13- Henry J. Baker, J. Russell Lindsey and Steven H. Wesibrot. The Laboratory Rat. [2005]. AMERICAN COLLEGE OF LABORATORY ANIMAL MEDICINE SERIES. *Volume I Biology and Diseases*
- 14- Singh D. Conjunctival lymphatic system. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. [2003] ;29[4]:632–633.
- 15- Camelo S, Kezic J, Shanley A, Rigby P, McMenemy PG. Antigen from the anterior chamber of the eye travels in a soluble form to secondary lymphoid organs via lymphatic and vascular routes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. [2006] ;47[3]:1039–1046. [PubMed]
- 16- Camelo S, Lajavardi L, Bochot A, et al. Drainage of fluorescent liposomes from the vitreous to cervical lymph nodes via conjunctival lymphatics. *Ophthalmic Research*. [2008] ;40[3-4]:145–150. [PubMed]