

In vivo floresan görüntüleme ve in vivo uygulamalarda kullanılan florofor bileşikler

In vivo fluorescence imaging and fluorophores used in in-vivo applications

Erdal Tunç

Gönderilme tarihi: 09.07.2019

Kabul tarihi: 30.09.2019

Özet

Geleneksel olarak kültür ve hücre izlemelerinde kullanılan floresan ışımaya dayalı görüntüleme teknikleri, son on-yıllarda in vivo izlemelerde de kullanılmaya başlanmıştır. Çoğunlukla küçük laboratuvar hayvanlarına uygulanan FLIM, FRET, FRI gibi in vivo görüntüleme düzenekleri hedeflenen bir proteinin veya biyo-molekülün gerçek zaman-mekanda in vivo görüntülerinin alınmasında kullanılırlar. Bu düzenekler genel olarak hayvanın üzerine konacağı sahne, bir floresan uyarıcı ışık kaynağı, gelen ve emisyon ışık filtreleri, kamera aparatı (CCD kamera) ve dataları alıp analiz eden bir yazılım programı elemanlarından oluşmaktadır. Floresan işaretleme esasına dayalı çalışan herhangi bir in vivo izleme sisteminin dizaynı iki adımda gerçekleştirilir; öncelikle izleme için hedef seçilen protein veya biyo-molekül uygun bir florofor ile işaretlenir, daha sonra işaretli biyo-molekül canlı bünyede görüntülenir. In vivo uygulamalarda kullanılan floresan problemler; hedef gözetmeyen problemler, hedefli aktif problemler, hedefli aktive edilebilen problemler ve nano-partiküller şeklinde sınıflandırılabilirler. İlave olarak, bir söndürücüye konjuge floresan problemler, hedeflerine bağlandıktan sonra quantum verimlerini arttıran florofor problemler, organellere spesifik olarak bağlanan floresan problemler, iki foton absorpsiyonu esasına dayalı çalışan floresan problemler, dönebilen konjuge grup içeren florofor problemler ve yakın kızılötesi nanopartiküller diğer önemli floresan prob kategorilerini oluşturmaktadırlar. Genel olarak floresan boya boyaların hedef/arka-plan ışımaya kontrastı, hedefine özgün bağlanma, quantum verimi, absorpsiyon ve emisyon dalga boyları, suda çözünürlük, hücreye nüfuz edebilme ve floresan yaşam-süresi gibi özelliklerinin geliştirilmesi; bu boya maddelerini klinik kullanım açısından elverişli hale getirecektir. Bu derlemede floresan ışımaya mekanizması, floresan ışımaya prensibine dayalı olarak çalışan ve önemli görülen in vivo görüntüleme teknikleri ve florofor bileşikler hakkında bilgi verilmesi ve konuyla ilgili önemli çalışmaların gözden geçirilmesi hedeflenmiştir.

Anahtar kelimeler: Floresan ışımaya, floresan prob, görüntüleme tekniği, biyomolekül.

Tunç E. In vivo floresan görüntüleme ve in vivo uygulamalarda kullanılan florofor bileşikler. Pam Tıp Derg 2020;13:235-247.

Abstract

Fluorescence imaging techniques that are conventionally used in culture and cell assays have started to be used in in-vivo assays in the last decades. In vivo fluorescent assay set-ups such as FLIM, FRET, FRI, which are mostly applied to small laboratory animals, are used for taking spatiotemporal in vivo images of any targeted protein or biomolecule. Those set-ups constitute mainly from animal placement stage, an excitation light source, excitation and emission light filters, camera (charge couple device, CCD) and data collecting/processing software components. Design of any in vivo assay system, which works based on fluorophore labeling, includes two steps; firstly, any targeted protein or biomolecule is tagged with appropriate fluorophore and then, this tagged protein is visualized in the body of living animal. In vivo fluorescent probes can be classified as non-targeting probes, active targeting probes, activable targeting probes and fluorescent nanoparticles. Besides, quencher-conjugated fluorescent probes, turn-on fluorophore probes which increase their quantum yields upon binding to their targets, organelle-specific fluorescent probes, two-photon absorption (TPA) fluorescent probes, rotatable conjugated moiety-containing fluorophore probes, near-infrared (NIR) nanoparticles are other important fluorescent probe categories. In general, fluorescent dyes require improvements in their properties of background/target ratios, specificity, quantum yields, absorption and emission wavelengths, water solubility, cell permeability and fluorescent lifetimes, for use in clinical applications. In this study, it was aimed to review important studies and provide knowledge about general mechanism of fluorescence, some important fluorescence-based in vivo imaging techniques and in-vivo applicable fluorophore compounds.

Key words: Fluorescence, fluorescent probe, imaging technique, biomolecule.

Tunç E. In vivo fluorescence imaging and fluorophores used in in-vivo applications. Pam Med J 2020;13:235-247.

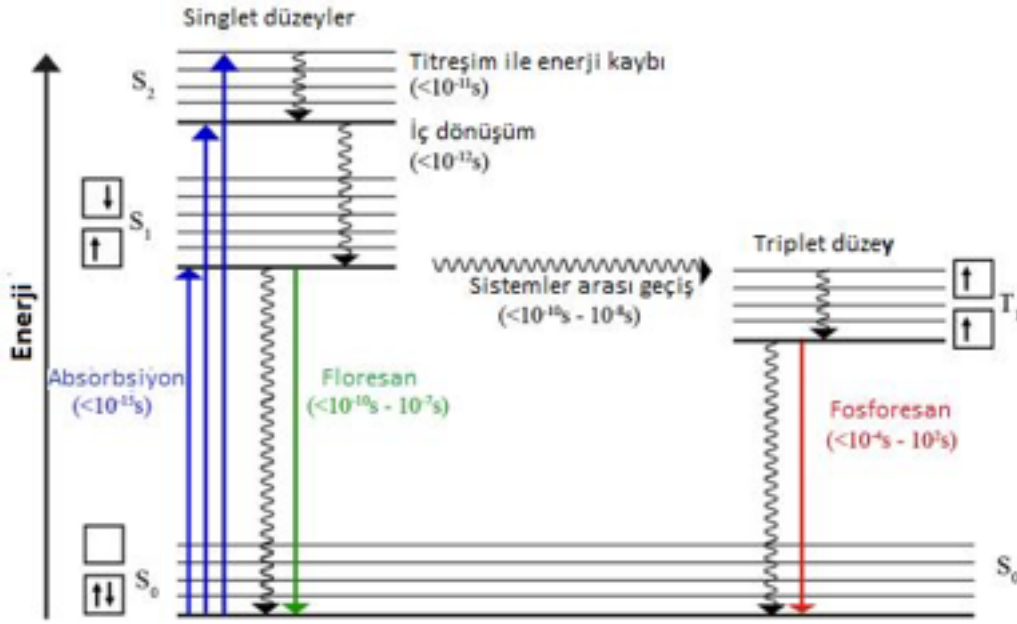
Giriş

Optik görüntüleme teknikleri, gösterdikleri yüksek çözünürlük gücü ve hassasiyetlerinden dolayı uzun yıllardan beri histoloji, biyo-izleme ve mikroskopi uygulamalarında kullanılmaktadırlar [1]. Bu bağlamda ele alınan floresan teknikler, floresan bileşiklerin gerçekleştirdikleri floresan ışımaya olgusunu görüntüleme teknolojisi haline dönüştüren tekniklerdir. Bir dalga boyundaki ışığa maruz kaldığında, daha uzun dalga boyunda ışık üreten maddelere floresan maddeler denir [2, 3]. Kimyasal olarak floresan bileşikler, genellikle aromatik yapıdadırlar ve konjuge pi bağları (moleküler kompozisyonda tekli bağ ile ayrılan çift bağlar) içerirler. Ancak son zamanlarda aromatik olmayan bazı biyomakromoleküllerin ve polimerlerin de (protein fibriller, polipeptidler, poli-amido aminler, poli-etilenimin, çok dallı yapı gösteren poli-amino ester ve poli-ürea dendrimerler) agregat halde ve solüsyon içerisinde floresan özellik gösterebildikleri rapor edilmiştir [4, 5]. Herhangi bir florofor (bir kimyasal bileşiğe bağlandığında ona floresan özellik kazandıran floresan boya maddesi, reaktif boya), bir ışık kaynağından gelen ışığa maruz kaldığında uyarılır ve bu uyarılma sürecinde, florofor molekülün zayıf bağlı elektronlarından biri yüksek enerji düzeylerine çıkar. S1 veya S2 düzeyleri olarak tanımlanan singlet durumlarda (singlet states) elektronun kendi eksenine çevresindeki dönüş yönü (spin) değişmez. Daha sonra elektron temel haline (ground state) geri dönerken (S0) dışarıya enerji verir. Dışarıya enerji verme iki şekilde olur. Floresan molekül ışımaya yapmadan ısı enerjisi yayabilir veya ışımaya yaparak floresan foton yayabilir. Floresan foton yayma durumunda floresan ışımaya gerçekleşmiş olur. Floresan yaşam süresi (birçok floresan protein ve floresan boya için 1 il 5 ns arasındaki bir süre), bir florofor molekülün uyarılmaya bağlı olarak elektronik uyarılma düzeyi olan S1'de ne kadar süreyle kaldığını ifade eder. Kimi durumlarda uyarılmaya bağlı olarak elektron, singlet durumdan triplet duruma (triplet state) geçer. Triplet duruma geçen elektronun dönüş yönü değişir. Elektronun triplet durumdan temel duruma dönerken yaptığı ışımaya fosforesan (phosphorescence) ışımaya denir. (Şekil 1, 2 ve 3'üncü kaynaklardan uyarlanmıştır) [2, 3, 6, 7].

Bütün bu fiziko-kimyasal süreçlerin sonucu olarak floresan bileşik, kendisini uyarın ışığa

(gelen ışığa) nisbeten daha büyük dalga boylu/ daha düşük enerjili ışımaya yapar veya soğurduğu ışıktan farklı renkte ışık verir. Floresan bileşiklerin absorbe ettikleri ışık ile çıkardıkları ışığın dalga boyları arasındaki farka stokes değişimi denir. Elektronların oluşturduğu enerji değişiminin tabiatı gereği stabil ve parlak ışımaya veren florofor bileşiklerin absorbe ettikleri ve çıkardıkları ışıkların dalga boyları 300 ile 700 nm arasında değişmektedir [3, 5, 7, 8]. Ancak bu aralığın dışındaki dalga boylarında absorpsiyon ve emisyon yapan florofor bileşikler de mevcuttur [9-12]. Ultraviyole dalga boylarındaki gelen ışıklar, moleküllerde iyonizasyona yol açtıklarından dolayı floresan uyarıcı ışık olarak kullanılamazlar [3, 5, 7, 8].

Floresan ışımaya dayalı floresan mikroskopi tekniği 1911 yılından beri bilimsel araştırmalarda kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda oluşturulan kompleks düzenekler yardımıyla floresan görüntüleme teknikleri *in vivo* izleme çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. *In vivo* floresan görüntüleme teknikleri olarak FLIM (fluorescence lifetime imaging, floresan yaşam-sürelili görüntüleme), FRET (Förster resonance energy transfer, Förster veya floresan rezonans enerji transferi) ve FRI (fluorescence reflectance imaging, whole body fluorescence reflectance imaging, floresan-reflektans görüntüleme) teknikleri özellikle canlı deneysel çalışmalarda kullanılmaktadırlar. İlk olarak 1946 yılında teorik çerçevesi ortaya konan FRET tekniği *in vivo* protein etkileşim çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Yine FLIM ve FRI teknikleri son yıllarda *in vivo* izlemelerde kullanılmaya başlanan ve *in vivo* görüntüleme açısından gelecek vadede önemli tekniklerdir [1, 2, 13, 14]. Sözü edilen *in vivo* izleme düzeneklerinin etkin kullanımları, uygun floresan boyaların veya florofor bileşiklerin seçilmesini veya kimi durumlarda uygun konjugatların kimyasal olarak sentezini gerekli kılmaktadır. Bu bağlamda kullanılacak olan ideal bir floresan materyalin *in vivo* ortamda kararlı olması, hedeflenen bölgede toplanabilmesi ve kontrast oluşturarak hedefi görünür hale getirebilmesi gerekmektedir. Yine floresan materyalin yüksek floresan etkinliğe sahip olması, suda iyi çözünbilmesi ve biyolojik bünyeye uyumlu olması göz önünde bulundurulması gereken diğer özelliklerdir [14, 15]. Bu derlemede floresan ışımaya dayalı *in vivo* görüntüleme sistemleri ve yukarıda ifade edilen



Şekil 1. Floresan ve fosforesan ışımaya yol açan foto-fiziksel süreçleri gösteren Perrin-Jablonski diagramı. Diagramda bir sistemdeki elektronların bulunabilecekleri $S=0$, $S=1$ veya $S=2$ olarak ifade edilen farklı enerji seviyeleri verilmiştir. Elektronların spin quantum sayıları ($-1/2$, $+1/2$) ile karakterize açısal hızları vardır. Bir elektronun singlet düzeyi olarak tanımlanan düzende; $S=0$ temel seviyeyi, $S=1$ ilk uyarılma seviyesini göstermektedir. Uygun enerjili bir foton bir moleküle çarptığında, ilgili molekül enerji soğurur (fotonun enerjisini alır) ve bir elektronu quantum dönme sayısını koruyarak, yüksek enerji seviyesine çıkar. İç dönüşüm kavramı, ışımaya olmadan en düşük uyarılma düzeyine (en düşük titreşim düzeyine) geçişi ifade eder. Bir süre sonra ilgili elektron temel enerji düzeyine iner ve bu esnada floresan ışımaya meydana gelir. Kutu içerisindeki oklar farklı düzeylerdeki elektronların dönüş yönlerini göstermektedirler. Okların yönleri göz önüne alındığında elektronların dönüş yönlerinin (spinlerinin) singlet halde değişmediği, ancak triplet halde değiştiği görülmektedir.

ideal bir floresan maddede bulunması gereken özellikleri belli oranlarda taşıyan farklı florofofor bileşikler ve bu bileşiklerin çalışma prensipleri hakkında bilgi verilmesi hedeflenmiştir. Dünya ölçeğinde üzerinde çalışmaların sürdüğü *in vivo* floresan görüntüleme teknolojisi ile ilgili olarak oldukça sınırlı miktarda Türkçe literatür bulunmaktadır. Bundan dolayı bu derleme, gelecekte bu konuyla ilgili çalışma yapacak olan araştırmacılara konuya giriş düzeyinde Türkçe kaynak oluşturacaktır.

İn vivo floresan görüntüleme teknikleri

Çok farklı düzenekler geliştirilmiş olmasına rağmen floresan görüntüleme teknikleri temel olarak, floresan mikroskopiye dayalı incelemeler ve floresan ışımaya dayalı makroskobik inceleme düzenekleri olarak kategorize edilebilirler. İn vivo floresan görüntüleme teknikleri, kamera ve uygun filtre sistemlerinden oluşan makroskobik izleme teknikleridir. Bu tekniklerle incelenen

objeler fare, sıçan gibi küçük laboratuvar hayvanlarıdır [15]. Bu derlemede, *in vivo* floresan görüntüleme teknikleri olarak FLIM, FRET ve planar yakın kızılötesi floresan görüntüleme (planar NIR fluorescence imaging, FRI) teknikleri ele alınmıştır [1, 13].

FLIM (Fluorescence lifetime imaging, Floresan yaşam-süreli görüntüleme) tekniği

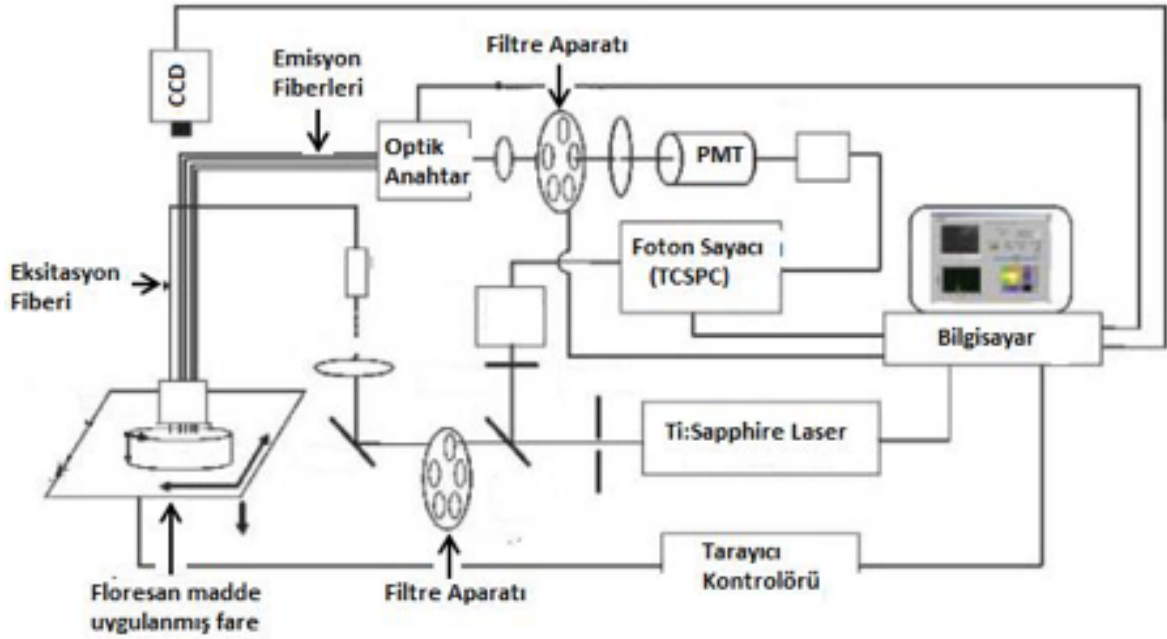
Bir florofofor bileşiğin floresan yaşam-süresi, ilgili florofoforun ortalama olarak ne kadar süreyle uyarılmış halde kalabildiğini ifade etmektedir. Herhangi bir florofoforun yaşam-süresi ısı, pH, viskozite, iyon konsantrasyonu, oksijen doymumu, protein veya moleküllerle yaptığı bağlar gibi moleküler-çevresel etmenlere bağlıdır. Bu derleme kapsamında incelenen birinci *in vivo* floresan görüntüleme tekniği olarak FLIM, canlı doku ortamına verilmiş olan florofofor bileşiklerin karakteristik emisyon yaşam-süreleri arasındaki farklılardan yararlanma ve bu prensibe dayalı

olarak oluşan ışımaların görüntüye çevrilmesi esasına bağlı olarak çalışır. Başka bir ifade ile, özellikle uyarım ve emisyon spektrumları çakışan florofor bileşiklerin uyarılmış halde kalma süreleri (floresan yaşam-süreleri) üzerinden ayrılmaları ve bu farklılığın görüntüleme teknolojisine dönüştürülmesi FLIM tekniğinin esasını oluşturmaktadır [16-18]. Floresan yaşam-süresi, bir florofor bileşiğin yapısal özelliği olmakla birlikte, ilgili floroforun içinde bulunduğu mikro-çevreden de etkilenir. Dolayısıyla FLIM tekniği, izlenen floroforun çevre şartları hakkında da bilgi verir [19]. Bu özelliğin sonucu olarak bazı durumlarda FLIM tekniği, aynı floroforun çevreleriyle değişik etkileşimler içerisinde olan farklı kısımlarının ayırt edilmesinde de kullanılır [20]. Bu prensibe göre çalışan bir FLIM düzeneği; optik anahtar, ayarlanabilir vuruşlu lazer kaynağı, zaman bağdaşımı foton sayacı (time-correlated single photon counter, TCSPC), foto-çoğaltıcı tüp (Photomultiplier tube, PMT), ısı kontrollü tarama sahnesi, ışığı aktaran fiberler, soğutmalı CCD kamera, uygun floresan filtreler, görüntüleri alan ve analiz eden bir yazılım programından oluşmaktadır. Floresan yaşam-süresi görüntüleme, görüntüyü oluşturan datalar, zaman (time domain) veya frekans ölçümleri (frequency domain) esas alınarak alınır ve işlenir [13]. Zaman ölçümlü FLIM düzeneğinde veriler TCSPC sayacı üzerinden okunur. Bu düzenekte incelenecek örnek, yüksek frekansta vuruş yapan lazer ışıkla taranır. Lazer vuruş anı ile oluşan floresan fotonun varış anı arasındaki zaman belirlenir ve bu şekilde tek tek bütün floresan fotonlar için elde edilen datalar kaydedilir. Ayrıca fotonun elde edildiği anda lazer ışığının odaklandığı pozisyonda değerlendirilir. Bu parametrelerin işlenmesiyle fotonların dağılımları ve oluş zamanları (lazer vuruşlarına nispetle) koordinat sistemi üzerinde gösterilir. Sonuçta iki boyutlu taramalardan üç boyutlu data dizileri elde edilmiş olur [20]. Frekans ölçümlü FLIM düzeneğinde ise ölçüm ışığın dalga modeli (analog dalga formu) üzerinden gerçekleştirilir. İncelenecek materyal modüle edilmiş veya vuruşlu ışık ile uyarılır. Neticede gelen uyarıcı ışıkla kıyaslandığında, örnek materyalin yaydığı floresan ışığın modülasyon derecesi düşer ve ışık faz değişimine uğrar. Bu değişim değerlerinin ölçümüne dayalı datalar elde edilir. Başka bir ifade ile gelen uyarıcı ışığa kıyasla örnek materyalin yaydığı floresan ışığın modülasyon derecesinde meydana gelen düşme

ve faz değişimi değerlerinden floresan yaşam-süresi belirlenir [20]. FLIM tekniği, hücrelerin fonksiyonlarının değerlendirilmesinde, protein-protein etkileşim çalışmalarında, protein izleme çalışmalarında ve DNA yapı çalışmalarında kullanılan bir tekniktir. FLIM tekniğine dayalı *in vivo* çalışmalar ile özellikle hastalıkların gelişim seyirlerine bağlı olarak gelişen ve hücre fonksiyonlarını etkileyen moleküler değişimlerin izlenmesi yapılabilmektedir. Özellikle yakın kızıl ötesi floresan problemlerin kullanıldığı FLIM çalışmalarıyla derin dokuların ve tümörlerin gelişim seyirlerinin izlenmesi olanaklı hale gelmektedir [13]. İlave olarak ilaçların vücuttaki dağılımları ve metabolizmaları ile ilgili çalışmalarda, doku canlılığını izleme ve pigmentasyon ile ilişkili deri hastalıkları çalışmalarında FLIM tekniğinden faydalanılmaktadır (Şekil 2, 13'üncü kaynaktan uyarlanmıştır) [16].

FRET (Förster resonance energy transfer, Förster veya floresan rezonans enerji transferi) tekniği

Bu derlemede ele alınan ikinci teknik olarak FRET tekniği, iki floresan bileşik arasında dipol-dipol eşleşmesi mekanizması ile ışısız enerji transferi prensibine dayalı çalışan bir tekniktir. Özgün dalga boylu ışınla uyarılan birinci florofor bileşik (donör), rezonans enerji transferi yoluyla ikinci florofor bileşiği (alıcı) uyarır. Bu şekilde uyarılmış olan alıcı florofor bileşik emisyon yaparak, ortama foton yayar. Rezonans enerji transferinin gerçekleşmesi için donör ve alıcı florofor bileşiklerin çok yakın pozisyonda olmaları (1-10 nm mesafede) ve uygun yönlerde dizilmiş bulunmaları gerekir. Yine FRET'in oluşması için donör emisyonu ile alıcının uyarılma enerjileri arasında spektral uyum olması da gerekir. Bu teknik özellikle protein-protein etkileşim çalışmalarında kullanılmaktadır. Çalışılacak proteinlere, doğal floresan proteinlerle kaynaştırma veya uygun florofor bileşiklere bağlama yöntemlerinden birisi kullanılarak floresan özellik kazandırılır. Bu şekilde floresan olarak işaretlenmiş iki protein arasındaki etkileşim durumu izlenir [6, 21, 22]. Işıma yoğunluğu (steady-state, intensity based) veya floresan yaşam-süresi (FLIM-FRET) prensiplerine göre çalışan FRET görüntüleme düzenekleri bulunmaktadır [21, 23]. Işıma yoğunluğuna dayalı FRET ölçümlerinde donör ve alıcı moleküllerin floresan ışıma yoğunlukları



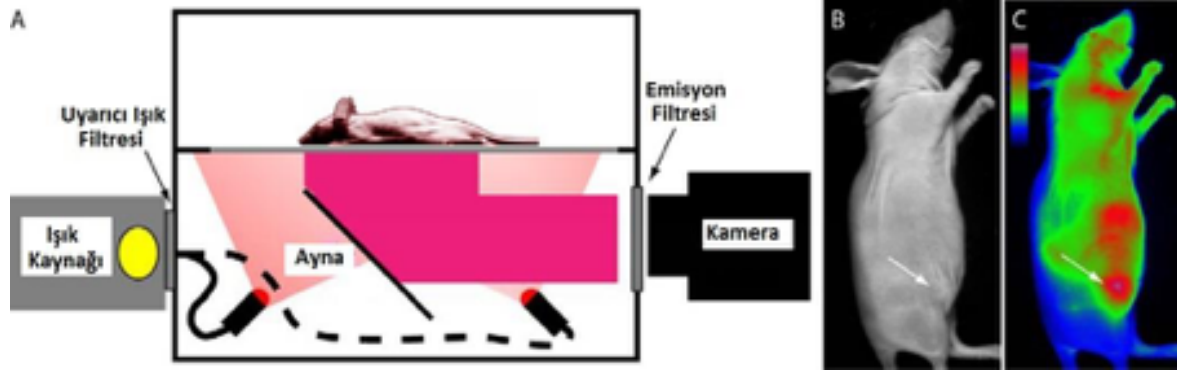
Şekil 2. A) FLIM (Fluorescence lifetime imaging, Floresan yaşam-sürelili görüntüleme) tekniği ile in vivo fare izleme düzeneğinin şematize gösterimi.

konsantrasyona bağlıdır. FLIM-FRET tekniğinde ise donör bileşiğin floresan yaşam-süresinin ölçülmesi esastır [20]. Çalışılan proteinlerin floresan proteinlerle füzyon yapması esasına göre oluşturulmuş FRET düzenekleri olduğu gibi, floresan boyalarla işaretleme esasına göre oluşturulmuş olan FRET düzenekleri de bulunmaktadır [22-24].

FRI (Fluorescence reflectance imaging, Floresan-reflektans görüntüleme) tekniği

Üçüncü olarak planar yakın kızılötesi floresan görüntüleme tekniğinde fare veya sıçanlara verilen floresan probalar, FRI sistemi ile izlenir (Şekil 3, 1'inci kaynaktan uyarlanmıştır). Bu teknik, birden fazla hayvanın bir anda izlenmesini olanaklı kılan ve kolay görüntü analizine olanak sağlayan önemli bir tekniktir. Bir planar yakın kızılötesi floresan görüntüleme düzeneği, başlıca; üzerine hayvanların konacağı destek düzeneklerini içeren görüntüleme kabini (light-tight imaging chamber), CCD (charge coupled device) kameraya dayalı prelinik FRI sistemi, geniş bantta ışık yayan (xenon) ışık kaynağı, uyarıcı ışık filtreleri, emisyon ışık filtreleri,

soğutmalı dijital kamera ve görüntüleri toplayan ve analiz eden bir software programı parçalarından oluşmaktadır. Düzenek kabaca şöyle çalışır: Kullanılan floresan probun absorpsiyon ve emisyon dalga boylarına uygun floresan filtreler seçilir. Uyarıcı ışık kaynağı ile denek hayvan arasına, emisyon filtresi denek hayvan ile kamera arasına yerleştirilir. Anestezik madde (%2 izofluran veya 100 mg/kg ketamin-10 mg/kg ksilazin kokteyli maddelerinden birisi) verilerek uyuşturulmuş olan hayvan, görüntüleme kabini içerisindeki platformun üzerine yerleştirilir. Denek hayvanın platforma, esas görüntü alınacak vücut bölgesinin (region of interest, ROI) kameranın görüş açısı içerisinde olacak şekilde yerleştirilmesi, istenen görüntünün elde edilmesi açısından önemlidir. Kamera ve ilgili yazılım programı yardımıyla görüntüler toplanır ve analiz edilir. Son olarak hayvan, soğutma yastığı (warming pad) üzerine alınır ve uyanması beklenir [1]. Yukarıda ana-hatlarıyla ifade edilen görüntüleme düzeneklerinin istenen verimde çalışması, takibi yapılacak olan protein veya moleküllerin uygun floresan işaretleyicilerle işaretlenmiş olmasına bağlıdır.

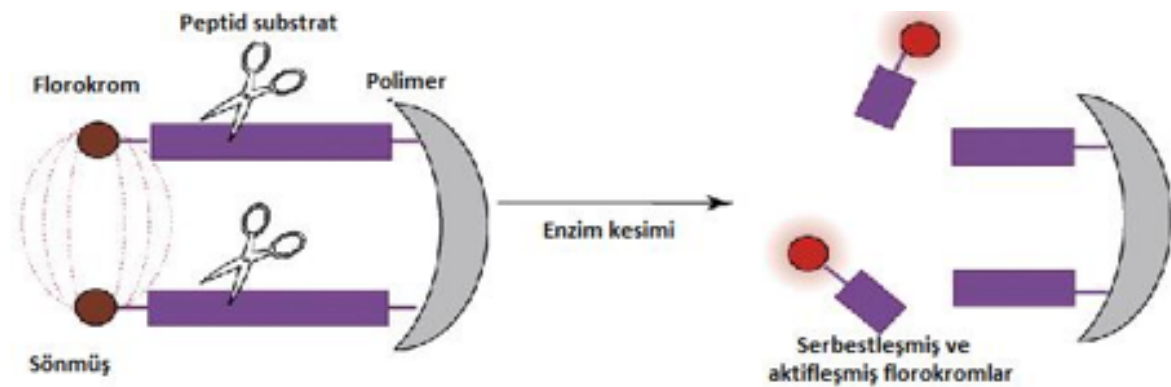


Şekil 3. A) Planar FRI sisteminin basit şematize görünümü. B) Subkutanöz tümörü bulunan farenin aydınlık saha görüntüsü. C) Aynı farenin yakın kızılötesi floresan proba (630 nm' de uyarılan ve 700 nm'de emisyon yapan IntegriSense 680 probu) işaretli görüntüsü.

Önemli floresan problemler

Floresan görüntüleme düzeneği oluşturmak üzere kullanılan problemler, hedef gözetmeyen problemler ve hedefli problemler olarak kategorize edilebilirler. Hedef gözetmeyen problemler, sistemik izlemelerde kullanılmaktadırlar. Bu tip problemler, deney hayvanlarında (sıçan, fare, domuz) kan akımı, klirens, damar izleme ve lenf nodlarının takibi çalışmalarında kullanılmaktadırlar. Hedefli problemler, (florokrom, florofofor veya kromofor bileşikler) hedef bölgedeki hücrelerin reseptörlerine bağlanan ligandlara konjugat olarak bağlanırlar [15, 25]. Hedefli problemlere örnek olarak kanserli hücrelerin takibinde kullanılan ve kanser hücrelerine bağlanan ligandlara konjuge olan problemlerden söz edilebilir. Bu tip izleme düzeneklerinde hedefli problemlerin konjuge oldukları ligandlar, kanserli hücrelere özgü yüzey reseptörlerine bağlanırlar. Sözü edilen ligandlar küçük moleküller, peptidler, proteinler veya antikorlar olabilirler. Bu kategori hedefli problemler,

aktif problemler (active probes) olup, özgün dalga boylu ışıkla uyarıldıklarında hemen floresan ışığa yaparlar. Bunlara ilave olarak aktive edilebilen hedefli problemler (activable probes) denilen bir grup problem, enzim çalışmalarında kullanılmaktadırlar. Bu problemlerin çalışma sisteminde; iki veya daha fazla kromofor bileşik, aktivitesi test edilecek enzimin özgün olarak kesebildiği bir peptid bağlayıcı aracılığıyla belli bir yakınlık derecesinde bağlanırlar. Bu öyle bir yakınlık mesafesidir ki, bu şekilde bağlı oldukları halde birbirlerinin floresan emisyonlarını söndürürler ve nihayetinde problemler bağlı halde floresan ışığa meydana getiremezler. Ancak, tutundukları peptid bağlayıcıların kırılması ve serbestleşmeleri durumunda floresan bileşikler normal floresan işlevlerini görmeye başlarlar. Bu durumda florofofor bileşiklerin serbestleşmeleri ve normal floresan işlevlerini görmeye başlamaları, ilgili enzimin peptid bağlayıcıyı kestiği anlamına gelir (Şekil 4, 15'inci kaynaktan uyarlanmıştır) [15].



Şekil 4. Enzimatik kesim ile aktifleşen yakın kızılötesi florojenik problemlerin çalışma mekanizmalarının şematize görünümü.

Herhangi bir florofor bileşik hedef molekülüne (örneğin aminoasit veya proteine) doğrudan bağlanabilir veya floresan özelliği olmayan başka bir bileşikle konjugat oluşturmuş halde hedef molekülüne yönlendirilebilir. Konjuge florofor bileşik düzeneğinde, floresan özelliği olmayan bileşik hedef moleküle bağlanmadan önceki süreçte söndürücü (quencher) görevini üstlenir ve florofor bileşiğin ışımaya yapmasını engeller. Ancak hedef molekül ile etkileşme olduğunda, konjuge çifti oluşturan söndürücü bileşik ile floresan ışımaya yapacak olan bileşik arasındaki kimyasal bağ kırılır ve serbestleşen florofor bileşiğin gerçekleştirdiği floresan ışımaya görünür hale gelir. Bu durumda floresan ışımaya gözlenmesi, konjuge florofor bileşiklerin hedef molekülleri ile etkileştikleri anlamına gelir. Örneğin biyotiyol (biothiol) bileşikler (sistein, homosistein, glutatyon) ile etkileşen kumarin-malonitril (coumarin-malonitrile) konjuge floresan bileşikleri bu şekilde çalışmaktadırlar. Bu düzenekte kumarin florofor, malonitril söndürücü olarak görev yapar [26]. Geliştirilmiş olan bazı florofor problemler ise hedef moleküllere bağlanmadıkları sürece ışımaya yapmazlar veya düşük düzeyde ışımaya yaparlar. Ancak hedeflerine bağlandıktan sonra ışımalarını yoğunlaştırırlar (quantum verimlerini arttırmırlar). Bu tip problemlerin ayrıca söndürücü moleküllerle konjuge edilmeye ihtiyaçları yoktur. Örneğin Alzheimer hastalığına bağlı olarak beyinde oluşan amiloid- β plaklarına bağlanan DANIR floroforlar bu kategoride değerlendirilen problemlerdir [26, 27]. Yine albümin proteinine bağlandıktan sonra floresan ışımalarını anlamlı düzeyde arttıran uzak kızıl-ötesi spektrumdaki indosiyanın türevi ile kan beyin bariyerini aşarak β -amiloid peptide bağlandıktan sonra aktifleşen yakın kızıl-ötesi spektrumdaki NIAD-4 florofor bileşikleri bu kategoride değerlendirilebilirler [15]. Ayrıca hücre zarına, lizozomlara ve mitokondrilere spesifik olarak bağlanabilen lipofilik floresan problemler geliştirilmiştir. Bu problemler sayesinde sözü edilen organeller *in vivo* olarak izlenebilmektedirler. Bu tip problemlere örnek olarak son zamanlarda geliştirilmiş olan ve lizozoma bağlanabilen CTNF126 (cell-tracking NIR fluorophore 126, hücre izleyen yakın kızıl-ötesi florofor 126) probundan söz edilebilir. Yine CTNF103 floresan probu bu kategoride değerlendirilebilir [28]. Benzer şekilde mitokondri organeline bağlanan ve mitokondrinin canlı olarak izlenmesini olanaklı kılan florofor bileşikler de mevcuttur. Mitokondriye seçici

bir şekilde bağlanan ve splendor adı verilen florofor bileşik BTB (2,1,3-benzothiadiazole) türevi olarak sentezlenmiştir. Spesifik olarak mitokondrinin iç ve dış zarında bulunan adenin nükleotid translokaz (ANT) molekülüne bağlandığı düşünülmektedir. Bu şekilde mitokondriye bağlanan splendor, yeşil floresan ışımaya vererek mitokondrinin canlı olarak izlenmesini olanaklı kılmaktadır [29]. Bazı floresan problemler canlı hücrede ancak yüksek hidrojen iyon konsantrasyonu ortamında, örneğin lizozomlarda, proton bağlandıktan sonra ışımaya yapmaya başlarlar. H-ICG (H-indocyanine green, H-indosiyanın yeşili) ve pH duyarlı siyanin (pH-sensitive cyanine) boyaarı bu tip problemlere örnek gösterilebilir [1].

İki fotonun lineer olarak absorbe edilmesi ve buna bağlı olarak floresan uyarımının meydana gelmesi esasına göre çalışan floresan problemler (floreforlar) da mevcuttur. Bu düzenekte uygulanan tek fotonun enerjisi floresan uyarım için yeterli değildir. Özellikle enerjisi düşük dolayısıyla dalga boyu büyük fotonlarla uyarılan floroforlar bu kategoride ele alınmaktadırlar. Bu floroforlar büyük dalga boylu ışıkla çalıştıkları için özellikle derin doku çalışmalarında, tek foton floroforlara göre daha kullanışlıdırlar. Bu tip problemlerin çalışma düzenlerinde, florofor bileşik, uyarıcı lazer ışığın fokus yaptığı bölgeden uyarılır (iki foton absorbe eder), bu durum hem çözünürlüğü artırır ve hem de istenen spesifik ışımaya net olarak elde edilmesini (arka-plan floresan ışımaya minimum düzeyde olmasını) sağlar. Squarinler (squaraine dyes), BODIPY, pirimidinyum (pyridinium), pirimidin (pyrimidine), ve trifenilamine (triphenylamine) türevleri iki foton absorpsiyonu esasına göre çalışan önemli florofor bileşiklerdir [26, 30, 31]. Yine voltaja duyarlı sentetik sRhoVR (sulfonated rhodamine voltage reporters) florofor bileşikleri bu kategorinin içinde değerlendirilebilirler. Bu floroforlar canlı dokuya uygulandıklarında hücrelerin plazma zarlarına lokalize olmakta (örneğin nöronların zarlarına) ve membranda depolarizasyon olması durumunda floresan ışımalarını arttırmaktadırlar. sRhoVR floroforları kültür hücrelerinde ve canlı hayvanlarda uzun süreli takibi gerektiren membran potansiyeli çalışmalarında kullanılabilirler [31].

Bazı florofor bileşikler dönebilen konjuge gruplar (rotatable conjugated moiety) içerirler. Dönebilen konjuge grubun serbest

olarak döndüğü koşullarda (viskoz olmayan ortamlarda) ilgili floresan bileşik floresan ışımaya yapamaz. Ancak dönebilen konjuge grubun kısıtlı olarak dönebildiği koşullarda (viskoz ortamlar) ilgili floresan bileşik ışımaya yapar. Çiftli membran sistemi ile çevrili mitokondri yüksek viskozite göstermektedir. Bundan dolayı mitokondri ile ilgili görüntüleme çalışmalarında bu tip dönebilen konjuge grup içeren florofoz bileşikler kullanılabilirler [26].

Organik florofozların yanı sıra, son yıllarda *in vivo* görüntülemeye kullanılmak üzere yakın kızılötesi floresan nano-partiküllerin (NIR nanoparticles) geliştirilmesine dönük çalışmalar yapılmaktadır. Yarı iletken nano-kristal tabiatındaki quantum lekeleri (Quantum Dots, QDs) bu bağlamda önemlidirler. Dar ve ayarlanabilir emisyon bantları, yüksek molar tükenim katsayıları, yüksek quantum verimleri, geniş ve etkili stokes değişim değerleri ve fotosolmaya dirençli olma gibi özellikleri, quantum lekelerini *in vivo* görüntüleme açısından elverişli hale getirmektedir. Quantum lekeleri kadmiyum telurid (cadmium telluride) ve indiyum fosfamid (indium phosphamide) gibi bileşiklerin oluşturdukları materyallerden oluşmaktadır. Bu nano-partiküller 2 ile 10 nm eninde olup 200 ile 10.000 arasında değişen sayıda atom içerirler. Önceleri görünür ışık spektrumunda emisyon yapan quantum lekeleri biyolojik uygulamalarda kullanılırken, son zamanlarda yakın kızılötesi spektrumda emisyon yapan quantum lekelerinin geliştirilmesi üzerine çalışılmaktadır. Ebatlarına, kimyasal kompozisyonlarına ve yüzey kimyalarına bağlı olarak emisyonlarının görünürden kızılötesine kolayca değiştirilebilmesi quantum lekelerini biyolojik kullanım için çok elverişli hale getirmektedir. Quantum lekeleri hücre mikroskopisi uygulamalarının yanı sıra canlı hayvan incelemelerinde de kullanılabilirlerdir. Kızılötesi quantum leke partikülleri hayvanlara subkutanöz veya intravenöz olarak enjekte edilmek suretiyle canlı hayvanda amaçlanan izleme yapılabilir. Bu şekilde fare ve domuzlarda kan damarları ve lenfatik sistem izlemeleri yapılmıştır. Yine bir çalışmada bovin serum albümini ile kaplanmış CdMnTe/Hg quantum leke partikülleri anjiyografik kontrast ajanı olarak kullanılmıştır [1]. Kadmiyum, teluryum ve selenyum gibi elementlerin akut ve kronik toksik etki

göstermeleri, bu gibi elementlerden oluşmuş quantum leke partiküllerini *in vivo* izleme açısından sakıncalı hale getirmektedir [1].

Yakın kızılötesi boyalara bağlanmış nano-partiküller (NIR dye-labeled nanoparticles) *in vivo* görüntüleme amacıyla kullanılan farklı bir grup floresan bileşiği ifade etmektedir. Bu bileşiklerin çekirdek kısımlarını yakın kızılötesi floresan boya oluştururken, kabuk kısımlarını silika, kalsiyum fosfat veya organik nano-partiküller oluşturmaktadır. Nano-partiküller yakın kızılötesi boyalara kovalent veya kovalent olmayan bağlarla bağlanabilirler. Bazı özellikleri bu tip bileşikler *in vivo* izleme açısından avantajlı hale getirmektedir. Kabuk yapısı yakın kızılötesi boyaları koruduğu için yüksek fotokararlılık (maruz kalınan ışığın kimyasal etkisine gösterilen direnç) gösterirler. Kabuk partikülleri hidrofilik materyallerden oluşturulmak suretiyle ilgili bileşiğin sudaki çözünürlüğü artırılabilir. Bileşiği oluşturan boya ve nano-partikül molekül sayıları arasındaki oran değiştirilerek bileşiğin floresan özelliği artırılabilir. Yine farklı biyo-molekülleri, kabuk yapısında bulunan fonksiyonel gruplara konjuge etmek suretiyle çoklu fonksiyon gösteren nano-partiküller oluşturulabilir. İndosiyanın yeşili boyasına bağlanmış silika nanopartiküller kullanılarak sıçanlarda *in vivo* izleme yapılmıştır [1].

Görünür spektrumda ışımaya veren florofoz bileşiklere kıyaslandıklarında yakın kızıl ötesi florofoz bileşikler dokudan geçerken daha az foton kaybına uğrarlar, çözünürlük ve dokuya nüfuz edebilme özellikleri de daha yüksektir. İlave olarak görünür ışık spektrumundaki florofoz bileşiklere kıyasla daha düşük düzeyde oto floresan (uyaran etkisi dışında kendiliğinden floresan ışımaya yapma) özellik gösterirler [1, 26]. Her ne kadar 700-1000 nm arası dalga boylarında ışımaya yapan florofoz bileşikler yakın kızıl ötesi olarak kabul edilirlse de, *in vivo* izleme için kullanılan florofoz bileşiklerin çoğunluğu 700-900 nm arası dalga boylarında ışımaya yaparlar [1, 26]. Yakın kızıl ötesi florofoz bileşiklerin bağlandığı organik moleküller (çeşitli peptidler, antikozlar ve siRNA), NIRF (near infra-Red fluorescence optical imaging, yakın kızılötesi floresan görüntüleme) görüntüleme tekniği ile *in vivo*/sistemik olarak izlenebilirler. Derin dokuda canlı izlemenin mümkün hale geldiği bu teknik ile yürütülen bir çalışmada;

farelerde, deneysel olarak oluşturulan romatoid artrit olgusuna bağlı olarak gelişen kıkırdak hasarı izlenmiştir. İzleme düzeneği için tip II kollajen proteinine bağlanan MMP750 ve Alexa Fluor 680 floresan boya ları farelere sistemik olarak verilmiş ve *in vivo* görüntüleme sistemi ile izleme yapılmıştır. İzleme düzeneği, romatoid artrit olgusuna bağlı olarak gelişen kıkırdak hasarını başarı ile göstermiştir [1, 32]. Yine yakın kızılötesi spektrumda ışımaya yapan florofor bileşiklerin imaj destekli cerrahi operasyonlarda, alınacak dokuların görüntü eşliğinde daha hassas bir şekilde alınmasının yolunu açacağı öngörülmektedir. Bu şekilde cerrahi operasyonların etkinliğinin artırılması hedeflenmektedir. Örneğin tümoral dokuların temizlenmesi operasyonlarında *in vivo* uygulanabilen bu florofor bileşiklerden faydalanılabilir [26]. *In vivo* ve *in selulo* çalışmalarda kullanılan bazı florofor bileşikler ve özellikleri Tablo 1’de verilmiştir.

Floresan ışımaya dayalı görüntüleme tekniklerinin avantajları-dezavantajları ve konuyla ilgili gelecek perspektifleri

Floresan görüntülemeye dayalı teknikler; üzerinde çalışılan canlı organizmaya müdahaleyi gerektirmeyen, canlı dokuda olağan hücresel işlevleri bozmayan, yüksek çözünürlüklü görüntü elde edilmesini sağlayan, kesin sonuç veren, hassas ve ucuz tekniklerdir [26]. Klinik kullanım açısından floresan boya ların bazı özelliklerinin ileriye götürülmesi gerekmektedir. Bu bağlamda floresan boya ların hedef/arka-plan ışımaya kontrastı (target:background ratio), hedefine özgün bağlanma, quantum verimi, absorpsiyon ve emisyon dalga boyları, suda çözünürlük, hücreye nüfuz edebilme ve floresan yaşam-süresi gibi özelliklerinin geliştirilmesi; bu boya maddelerini klinik kullanım açısından elverişli hale getirecektir. Yine ideal bir floresan boya maddesinin optik/fiziksel kararlılık göstermesi ve sitotoksik etki göstermemesi de gerekmektedir [26]. *In vivo* ve canlı hücre

çalışmalarında hücreye veya dokuya dışarıdan verilen floresan ajanın yapacağı ışımaya yanısıra, hücrede bulunan NADH, FAD, flavinler, keratin, kollajen, elastin, triptofan, tirozin, porfirin, lipofusinler, retinol ve melanin gibi bazı biyolojik maddelerin de oto-floresan ışımaya yapabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Anılan biyolojik maddelerin oto-floresan ışımaya oluşturmaları, sinyal karışımına ve istenen floresan sinyallerin net olarak alınmamasına yol açabilir. Endojen florofor bileşikler olarak kabul edilmekte olan bu oto-floresan bileşikler her hücreye özgün bir oto-floresan özellik kazandırmaktadırlar. Hücre gruplarının bu özgün oto-floresan özellikleri, onların doku veya organ ortamında tespitine ve bazı hastalık durumlarında geçirdikleri değişimlerin değerlendirilmesine yardımcı olabilmektedir. Halihazırda oto-floresan özellik, kolon-rektum ve akciğer kanserlerinin tanısında kullanılmaktadır [17, 33]. Klasik floresan boyama ve floresan reporter genlerle izleme düzeneklerinin yanısıra floresan görüntülemenin bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) teknikleri ile bir araya getirildiği multimodal düzenekler, daha ileri canlı izlemeler yapılmasını kolaylaştırmaktadırlar. İfade edilen çok kısımlı kompleks teknikler, özellikle fotonların yeterince penetre olamadıkları kalın dokularda ve üç boyutlu görüntü elde edilmesi çalışmalarında yararlı olmaktadır [15]. Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında önemli görülen floresan görüntüleme teknikleri ve florofor bileşikler hakkında verilen bilgiler, bu konu hakkındaki çok geniş literatürden çok küçük bir kesit niteliğindedir. Bu konudaki teknolojilerin devamlı olarak ilerlemesi, daha fazla moleküler hedefin ve hastalığın *in vivo* olarak izlenmesini olanaklı kılacaktır. Özellikle floresan nanopartiküllerin gelecekte daha yaygın olarak *in vivo* izlemelerde kullanılacakları öngörülmektedir.

Çıkar ilişkisi: Yazarlar çıkar ilişkisi olmadığını beyan eder.

Tablo 1. Yaygın olarak kullanılan florofor bileşikler ve özellikleri.

Adı	PADB (nm)	PEDB (nm)	Bağlandığı önemli ligandlar	Önemli özellikleri	Kaynak
Alexa Fluor 750	752	776	Triozin-ilişkili proteinin(TRP2) antikoruna bağlanırlar	İn vivo çalışmaya uygun	salk.edu [9] Fenton et al [10]
Indocyanine green	750-810	>800	Plazma albümin, HDL, LDL	İn vivo çalışmaya uygun Toksik değil, Yarı ömrü kısa	Zhang et al [1] Yoneya et al [11] Alander et al [12]
Squarainler	630	650		Yakın kızıl-ötesi İn vivo izleme için uygun	Zhang et al [1] Freidus et al [26]
Fluorescein	495	519		pH duyarlı, Tıbbi tanı uygulamalarda görüntüleme ajanı kullanılmaktadır.	salk.edu [9] Robertson et al [33] Alford et al [34]
Bodipy FL	503	512	İlaç, peptid, karbonhidrat	İn vivo çalışmaya uygun	salk.edu [9] Giedt et al [35] thermofisher.com [36]
Bodipy R6G	528	547	Phalloidin ve Arg-Gly-Asp (RGD) peptid'e konjuge olabilmektedir	Radyoaktif versiyonu in vivo çalışmada kullanılmış	Alford et al [34] emu.uct.ac.za [37] Liu et al [38]
Cy 5.5	675	694		İn vivo çalışmaya uygun	salk.edu [9] Lee et al [39]
Niad-4	475-480	625-650	B-amiloid	İn vivo çalışmaya uygun	Rao et al [15] Bae et al [40]
Tokyo green	491	510		Hidrofobik, Toksik değil	Alford et al [34] Mottram et al [41]
Oregon green	490-496	514-524	Türevi kalsiyum indikatörü	Türevi, hücre içi kalsiyum düzeylerinin İn vivo izlenmesinde kullanılmıştır	Alford et al [34] Mottram et al [41] Cirillo et al [42]
Rhodamine 110	505	527	Enzim aktivite çalışmalarında kullanılmaktadır	Canlı hücrelerde çalışılmış	Alford et al [34] Beija et al [43]
Rhodamine X (6-carboxy-X-rhodamine,6-ROX)	575	602	GmSA ile konjuge formu D-galaktoz reseptörü,Hücre-içi civa sensörü	İn vivo çalışmaya uygun	Alford et al [34] Zhang et al [44] Hama et al [45]
6-TAMRA (6-carboxytetra methylrhodamine)	555	580	G5 dendrimer-leri ve folik asit ile konjuge halde folik asit reseptörüne bağlanır	İn vivo çalışmaya uygun	Alford et al [34] Thomas et al [46]
Rhodol türevleri	490-550	520-580		Foto-kararlıdır, İyon izlemeleri için uygundur	Whitaker et al [47] Poronik et al [48] Li et al [49]
Texas red	588-589	601-615	Dana serum albüminine konjuge olabilmektedir	İn vivo çalışmaya uygun	salk.edu [9] Alford et al [34] Miller et al [50]

PADB: pik absorpsiyon dalga boyu, PEDB: pik emisyon dalga boyu, HDL:yüksek dansiteli lipoprotein, LDL:düşük dansiteli lipoprotein, GmSA: galaktozamine konjuge serum albümini.

Kaynaklar

1. Zhang X, Bloch S, Akers W, Achilefu S. Near-infrared molecular probes for *in vivo* imaging. *Curr Protoc Cytom* 2012;chapter12:unit12.27. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1227s60>
2. Suhling K, Hirvonen LM, Levitt JA, et al. Fluorescence lifetime imaging (FLIM): basic concepts and some recent developments. *Med Photon* 2015;27:3-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medpho.2014.12.001>
3. Sauer L, Andersen KM, Dysli C, Zinkernagel MS, Bernstein PS, Hammer M. Review of clinical approaches in fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *J Biomed Opt* 2018;23:091415. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.9.091415>
4. Li Q, Tang Y, Hu W, Li Z. Fluorescence of nonaromatic organic systems and room temperature phosphorescence of organic luminogens: the intrinsic principle and recent progress. *Small* 2018;14:e1801560. <https://doi.org/10.1002/sml.201801560>
5. Basic principles of fluorescence spectroscopy. Available at: https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527316698_c01.pdf. accessed data 18 Mart 2019. (Accessed March 18, 2019.)
6. Süel G. Use of fluorescence microscopy to analyze genetic circuit dynamics. *Methods Enzymol* 2011;497:275-293. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385075-1.00013-5>
7. Hausteil E, Schwillle P. Trends in fluorescence imaging and related techniques to unravel biological information. *HFSP J* 2007;1:169-180. <https://doi.org/10.2976/1.2778852>
8. Donya M, Radford M, ElGuindy A, Firmin D, Yacoub MH. Radiation in medicine: origins, risks and aspirations. *Glob Cardiol Sci Pract* 2014;2014:437-448. <http://dx.doi.org/10.5339/gcsp.2014.57>
9. Table of fluorochromes. Available at: <https://www.salk.edu/pdf/fluorochrome-table.html>. accessed data 3 Mayıs 2019. (Accessed May 3, 2019.)
10. Fenton KE, Martirosyan NL, Abdelwahab MG, Coons SW, Preul MC, Scheck AC. *In vivo* visualization of GL261-luc2 mouse glioma cells by use of Alexa Fluor-labeled TRP-2 antibodies. *Neurosurg Focus* 2014;36:E12. <http://thejns.org/doi/abs/10.3171/2013.12.FOCUS13488>
11. Yoneya S, Saito T, Komatsu Y, Koyama I, Takahashi K, Duvoll-Young J. Binding properties of indocyanine green in human blood. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1286-1290
12. Alander JT, Kaartinen I, Laakso A, et al. A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery. *Int J Biomed Imaging* 2012;2012:940585. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/940585>
13. Hassan M, Riley J, Chernomordik V, et al. Fluorescence lifetime imaging system for *in vivo* studies. *Mol Imaging* 2007;6:229-236. <https://doi.org/10.2310/7290.2007.00019>
14. Miao Y, Gu C, Zhu Y, Yu B, Shen Y, Cong H. Recent progress in fluorescence imaging of the near-infrared II window. *Chembiochem* 2018;19:2522-2541. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800466>
15. Rao J, Dragulescu-Andrasi A, Yao H. Fluorescence imaging *in vivo*: Recent advances. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:17-25. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.003>
16. Dancik Y, Favre A, Loy CJ, Zvyagin AV, Roberts MS. Use of multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging to investigate skin pigmentation *in vivo*. *J Biomed Opt* 2013;18:26022. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.2.026022>
17. Chorvat D Jr, Chorvatova A. Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues. *Laser Phys Lett* 2009;6:175-193. <https://doi.org/10.1002/lapl.200810132>
18. Won Y, Park B, Kim I, Lee S. Fluorescence lifetime measurement with confocal endomicroscopy for direct analysis of tissue biochemistry *in vivo*. *Heliyon* 2016;2:e00139. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00139>
19. De Los Santos C, Chang CW, Mycek MA, Cardullo RA. FRAP, FLIM, and FRET: detection and analysis of cellular dynamics on a molecular scale using fluorescence microscopy. *Mol Reprod Dev* 2015;82:587-604. <https://doi.org/10.1002/mrd.22501>
20. Becker W. Fluorescence lifetime imaging—techniques and applications. *J Microsc* 2012;247:119-136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2012.03618.x>
21. Fruhwirth GO, Matthews DR, Brock A, et al. Deep-tissue multi-photon fluorescence lifetime microscopy for intravital imaging of protein-protein interactions. *Proc of SPIE* 2009;7183:71830L. <https://doi.org/10.1117/12.817129>
22. Fruhwirth GO, Fernandes LP, Weitsman G, et al. How Förster resonance energy transfer imaging improves the understanding of protein interaction networks in cancer biology. *Chemphyschem* 2011;12:442-461. <https://doi.org/10.1002/cphc.201000866>
23. Kaminski CF, Rees EJ, Schierle GS. A quantitative protocol for intensity-based live cell FRET imaging. *Methods Mol Biol* 2014;1076:445-454. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-649-8_19
24. Ma T, Hou Y, Zeng J, et al. Dual-ratiometric target-triggered fluorescent probe for simultaneous quantitative visualization of tumor microenvironment protease activity and pH *in vivo*. *J Am Chem Soc* 2018;140:211-218. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b08900>

25. Stockert JC, Blázquez-Castro A. Fluorescence microscopy in life sciences. In: Chapter 3 dyes and fluorochromes. Bentham e-books, Bentham Science Publishers 2017;61-95. Available at:<https://books.google.com.tr/books?id=4stFDwAAQBAJ&g=PA61&dq#v=onepage&q&f=false>. accessed data 8 Temmuz 2019. (Accessed July 8, 2019.)
26. Freidus LG, Pradeep P, Kumar P, Choonara YE, Pillay V. Alternative fluorophores designed for advanced molecular imaging. *Drug Discov Today* 2018;23:115-133. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.008>
27. Fu H, Cui M, Zhao L, et al. Highly sensitive near-infrared fluorophores for *in vivo* detection of amyloid- β plaques in alzheimer's disease. *J Med Chem* 2015;58:6972-6983. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00861>
28. Park GK, Lee JH, Levitz A, et al. Lysosome-targeted bioprobes for sequential cell tracking from macroscopic to microscopic scales. *Adv Mater* 2019;31:e1806216. <https://doi.org/10.1002/adma.201806216>
29. Pedro Carvalho PPHR, Correa JR, Guido BC, et al. Designed benzothiadiazole fluorophores for selective mitochondrial imaging and dynamics. *Chem Eur J* 2014;20:15360-15374. <https://doi.org/10.1002/chem.201404039>
30. Zhang Q, Tian X, Zhou H, Wu J, Tian Y. Lighting the way to see inside two-photon absorption materials: structure-property relationship and biological imaging. *Materials (Basel)* 2017;10:E223. <https://doi.org/10.3390/ma10030223>
31. Kulkarni RU, Vandenberghe M, Thunemann M, et al. *In vivo* two-photon voltage imaging with sulfonated rhodamine dyes. *ACS Cent Sci* 2018;4:1371-1378. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00422>
32. Cho H, Bhatti FU, Lee S, Brand DD, Yi AK, Hasty KA. *In vivo* dual fluorescence imaging to detect joint destruction. *Artif Organs* 2016;40:1009-1013. <https://doi.org/10.1111/aor.12685>
33. Robertson TA, Bunel F, Roberts MS. Fluorescein derivatives in intravital fluorescence imaging. *Cells* 2013;2:591-606. <https://doi.org/10.3390/cells2030591>
34. Alford R, Simpson HM, Duberman J, et al. Toxicity of organic fluorophores used in molecular imaging: literature review. *Mol Imaging* 2009;8:341-354. <https://doi.org/10.2310/7290.2009.00031>
35. Giedt RJ, Koch PD, Weissleder R. Single cell analysis of drug distribution by intravital imaging. *PLoS One* 2013;8:e60988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060988>
36. BODIPY dye series-section 1.4. Available at:<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/fluorophores-and-their-amine-reactive-derivatives/bodipy-dye-series.html>. accessed data 21 Mayıs 2019. (Accessed May 21, 2019.)
37. Probes for actin. Available at:http://www.emu.uct.ac.za/sites/default/files/image_tool/images/430/lecture-4-intracellular-localisation/actin.pdf accessed data 21 Mayıs 2019. (Accessed May 21, 2019.)
38. Liu S, Lin TP, Li D, et al. Lewis acid-assisted isotopic ^{18}F - ^{19}F exchange in BODIPY dyes: facile generation of positron emission tomography/fluorescence dual modality agents for tumor imaging. *Theranostics* 2013;3:181-189. <https://doi.org/10.7150/thno.5984>
39. Lee KH, Nam H, Won JS, et al. *In vivo* spinal distribution of Cy5.5 fluorescent dye after injection via the lateral ventricle and cisterna magna in rat model. *J Korean Neurosurg Soc* 2018;61:434-440. <https://doi.org/10.3340/jkns.2017.0252>
40. Bae S, Lima E, Hwang D, Huh H, Kim SK. Torsion-dependent fluorescence switching of amyloid-binding dye NIAD-4. *Chemical Physics Letters* 2015;633:109-113. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2015.05.010>
41. Mottram L, Boonyarattanakalin S, Kovel RE, Peterson BR. The Pennsylvania Green Fluorophore: a hybrid of Oregon Green and Tokyo Green for the construction of hydrophobic and pH-insensitive molecular probes. *Org Lett* 2006;8:581-584. <https://doi.org/10.1021/ol052655g>
42. Cirillo G, Luca DD, Papa M. Calcium imaging of living astrocytes in the mouse spinal cord following sensory stimulation. *Neural Plast* 2012;2012:425818. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/425818>
43. Beija M, Afonso CAM, Martinho JMG. Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem Soc Rev* 2009;38:2410-2433. <https://doi.org/10.1039/b901612k>
44. Zhang Y, Guo S, Jiang Z, Mao G, Ji X, He Z. Rox-DNA functionalized silicon nanodots for ratiometric detection of mercury ions in live cells. *Anal Chem* 2018;90:9796-9804. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01574>
45. Hama Y, Urano Y, Koyama Y, Gunn AJ, Choyke PL, Kobayashi H. A self-quenched galactosamine-serum albumin-rhodamineX conjugate: a "smart" fluorescent molecular imaging probe synthesized with clinically applicable material for detecting peritoneal ovarian cancer metastases. *Clin Cancer Res* 2007;13:6335-6343. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1004>
46. Thomas TP, Myaing MT, Ye JY, et al. Detection and analysis of tumor fluorescence using a two-photon optical fiber probe. *Biophys J* 2004;86:3959-3965. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.034462>
47. Whitaker JE, Haugland RP, Ryan D, Hewitt PC, Haugland RP, Prendergast FG. Fluorescent rhodol derivatives: Versatile, photostable labels and tracers. *Anal Biochem* 1992;207:267-279. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90011-U](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90011-U)
48. Poronik YM, Clermont G, Blanchard-Desce M, Gryko DT. Nonlinear optical chemosensor for sodium ion based on rhodol chromophore. *J Org Chem* 2013;78:11721-11732. <https://doi.org/10.1021/jo401653t>

49. Li L, Wang S, Lan H, et al. Rhodol derivatives as selective fluorescent probes for the detection of Hg^{II} ions and the bioimaging of hypochlorous acid. *ChemistryOpen* 2018;7:136-143. <https://doi.org/10.1002/open.201700154>
50. Miller DR, Hassan AM, Jarrett JW, et al. *In vivo* multiphoton imaging of a diverse array of fluorophores to investigate deep neurovascular structure. *Biomed Opt Express* 2017;8:3470-3481. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.003470>

Teşekkür: Sağladığı geniş elektronik veri tabanları olanağından dolayı Çukurova Üniversitesi Kütüphanesi'ne teşekkür ederim.