

**BİZMUT OKSİT NANOPARTİKÜLÜNÜN SIĞIR BÖBREK MDBK
HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK VE GENETİK HASAR
POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASAWİR ESAMALDEEN EBRAHİM MOHAMED

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
MAYIS - 2019**

**BİZMUT OKSİT NANOPARTİKÜLÜNÜN SIĞIR BÖBREK MDBK
HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK VE GENETİK HASAR
POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASAWİR ESAMALDEEN EBRAHİM MOHAMED

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

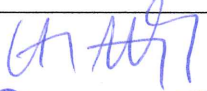


**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Ayla ÇELİK**

**MERSİN
MAYIS - 2019**

ONAY

Asawir ESAMALDEEN EBRAHIM MOHAMED tarafından Prof. Dr. Ayla ÇELİK danışmanlığında hazırlanan “Bizmut Oksit Nanopartikülünün Sığır Böbrek MDBK Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik ve Genetik Hasar Potansiyelinin İncelenmesi” başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 29/05/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Ayla ÇELİK	
Üye	Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ	
Üye	Doç. Dr. Rukan GENÇ ALTÜRK	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 05./09/2019 tarih ve 2019.22/822 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
 - Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi
- beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copy rights of this thesis to the Mersin University.

29/MAYIS/ 2019



ASAWIR ESAMALDEEN EBRAHIM MOHAMED

ÖZET

BİZMUT OKSİT NANOPARTİKÜLÜNÜN SIĞIR BÖBREK MDBK HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK VE GENETİK HASAR POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

Bu çalışmada; genotoksik etkiyi belirlemek için tek hücre jel elektroforez (komet) yöntemi ve apoptotik etkiyi belirlemek için akım sitometri yöntemi kullanılmıştır. MDBK hücre hattı 30µg/ml, 60µg/ml ve 90µg/ml olmak üzere üç ayrı konsantrasyonda 90-210nm boyut aralığına sahip Bizmut Oksit nanopartikülü ile muamele edilmiştir. Pozitif kontrol olarak H₂O₂(hidrojen peroksit), 10mM kullanılmıştır. Bu çalışmada; Bi₂O₃ nanopartikülünün tüm konsantrasyonlarında Genetik Hasar İndeksi ve Hasarlı Hücre Yüzdesi değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir(p>0,05). Akım sitometri analizinde ise 30µg/ml'lik konsantrasyonda erken ve geç apoptotik, canlı ve nekrotik hücre sayısında artış gözlenmiş ve bu artışın negatif kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir(p<0.05). Akım sitometri parametreleri arasında negatif ve pozitif yönde korelasyon belirlenmiştir. Komet parametreleri arasında çok yüksek pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Komet parametreleri ile akım sitometri analizinde erken, geç apoptotik hücre sayısı parametreleri arasında pozitif yönde orta ve zayıf düzeyde ama nekrotik hücre sayısı ile ise negatif yönde zayıf korelasyon tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bizmut Oksit, Nanopartikül, MDBK Hücre Hattı, Apoptoz, Akım Sitometri, Komet

Danışman: Prof. Dr. Ayla ÇELİK, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

AN INVESTIGATION OF POTENTIAL OF APOPTOTIC AND GENETIC DAMAGE OF BISMUTH OXIDE NANOPARTICLES ON BOVINE KIDNEY MDBK CELL LINE

The aim of this study was to determine the *in vitro* genetic damage potential and apoptotic effects of bismuth oxide nanoparticle having a size range of 90-210 nm. Study; to determine the genotoxic effect, single cell gel electrophoresis (Comet) method and flow cytometry method were used to determine the apoptotic effect. The MDBK cell line was treated with Bismuth oxide at three different concentrations of 30µg /ml, 60µg /ml and 90µg/ml. H₂O₂ (hydrogen peroxide) values were taken into consideration as a positive control. In this study, an increase in terms of the genetic damage index and percentage of damaged cells values was observed in all concentrations of Bi₂O₃ nanoparticle. This increase was not statistically significant ($p > 0.05$). Flow cytometry analysis showed an increase in the number of early and late apoptotic, live and necrotic cells at a concentration of 30mg / ml and this increase was statistically significant with negative control ($p < 0.05$). A high positive and negative correlation was determined between flow cytometry parameters. It is determined that there is negative and positive correlation among flow cytometry parameters and there is very high positive correlations among comet parameters. We found that there is a medium and weak positive correlation between comet parameters and early, late apoptotic cell count parameters, but there is a weak negative correlation with necrotic cell counts.

Keywords: Bismuth Oxide, Nanoparticle, MDBK Cell Line, Apoptosis, Flow Cytometry, COMET

Advisor: Prof. Dr. Ayla ÇELİK, Department of Biology, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecinde yol gösterici tecrübe, bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her anlamda yardımcı olan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ayla ÇELİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması kapsamında hücrelerin kültüre edilmesinde bilgi ve deneyimini paylaşan ve akım sitometri analizindeki katkılarından dolayı Öğr. Gör. Derya Yetkin'e teşekkür ederim.

Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi ve korelasyon değerlerinin belirlenmesinde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN'e (Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Ana Bilim Dalı) teşekkür ederim.

Bu proje Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri biriminin 2018-3-TP2-3068 Proje numarasıyla desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Deneylerim süresince yardımlarından faydalandığım ve her zaman yanımda destek olan laboratuvar arkadaşım Doktora Öğrencisi Gizem GÜLER'e (Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı) çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, hem maddi hem manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem HANAN MUSTAFA'ya, kardeşlerime ve sevgili arkadaşım Monti'ya çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Nanoteknoloji'nin Tanımı	3
2.2. Nanoteknoloji'nin Tarihçesi	4
2.3. Nanoteknoloji'nin Kullanım Alanı	5
2.3. 1.Sağlık ve Tıp Sektörü	6
2.3.2. Kimya ve çevre Sektörü	7
2.3.3. Katliz Sektörü	8
2.3.4. Gıda Sektörü	8
2.3.5. Tarım Sektörü	9
2.3.6. Tekstil Sektörü	9
2.3.7. kozmetik Sektörü	10
2.4. Nanopatiküller	10
2.4.1. Nanopatiküllerin Özellikleri	11
2.4.1.1. Özgül Yüzey Alanı (m ² /g)	12
2.4.1.2. Manyetik Özellikler	12
2.4.1.3. Optik Özellikler	13
2.4.1.4. Elektriksel Özellikler	13
2.4.1.5. kimyasal Özellikler	13
2.4.1.6. Diğer Özellikler	13
2.4.2. Nanopatiküllerin Sınıflandırılması	14
2.4.3. Metal Bazlı Nanopatiküller	14
2.4.4. Nanopatiküllerin Etkileri	14
2.4.5. Nanopatiküllerin Hedef Organlar Üzerindeki Toksik Etkileri	15
2.4.6. Nanopatiküllerin Maruziyeti ve Toksisitesi	15
2.5. Bizmut ve Tarihte Kullanımı	16
2.5.1. Tarihçe	16
2.5.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	17
2.5.3. Kullanım Alanları	18
2.5.4. Bizmut Nanopatiküllerin Toksisitesi	19
2.5.5. Bizmut Oksit	19
2.6. MDBK Hattı Genel Özellikleri	20
2.7. Genotoksisite	21
2.8. Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (KOMET- THJE)	23
2.8.1. komet Testinin Aşamaları	26
2.8.2. komet Testinin Dızavantajları	28
2.9. Apoptosis	28
2.10. Akım Sitometri Yöntemi	29
2.10.1. Akım Sitometri Çalışma Prensibi	30
2.10.2. Akım Sitometri Uygulamaları için Yapılan Hazırlıkları	30

	Sayfa
2.10.2.1. Hücre Konsantrasyonunun Belirlenmesi	30
2.10.2.2. kalibrasyon ve Önemi	30
2.10.2.3. Hücrenin Optik Özelliklerinin Belirlenmesi	31
2.10.2.4. Hücre Gruplaması(Cell Sorting)	31
2.10.2.5. Hücre Gruplayıcılar	31
2.10.2.6. Örnek Ekstraksiyonu ve Hazırlanışı	31
2.10.2.7. Etiketleme	31
2.10.2.8. Tek Sıra Akışı	32
2.10.2.9. Lazer Aydınlatması	32
2.10.3. Akım Sitometrisi Deneyi 4 Aşamadan Oluşur	33
2.10.4. Akım Sitometrinin Avantajları ve Dezavantajları	33
2.10.4.1. Akım Sitometrinin Avantajları	33
2.10.4.2. Akım Sitometrinin Dezavantajları	33
3. MATERYAL ve YÖNTEM	34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Bi ₂ O ₃ Konsantrasyonlarının Hazırlanması	34
3.1.2. MDBK Hücre Konsantrasyonlarının Hazırlanması	35
3.1.2.1. Medyum Hazırlanması	35
3.1.2.2. Hücrelerin Pasajlanması	35
3.1.3. MDBK Hücre Kültürünün Bizmut ve Hidrojen peroksit ile Muamele Edilmesi	35
3.1.4. Çözeltilerin Hazırlanması	36
3.1.5. Kullanılan Cihazlar	37
3.2. Yöntem	38
3.2.1. Bizmut oksit ile Muamele Edilmiş MDBK Hücre Hattı Preparatlarına Komet Yöntemi Uygulanması	38
3.2.2. Bizmut oksit ile Muamele Edilmiş MDBK Hücre Hattı Preparatlarına Akım Sitometri Uygulanması	38
3.2.2.1. Hücrelerin Sayılması	39
3.3. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	41
4.1. Bulgular	41
4.1.1. Komet Analiz Sonuçları	41
4.1.2. Akım Sitometri Analiz Sonuçları	44
4.2. Akım Sitometri Yöntemi ve Komet Analiz Yöntemi Korelasyon Değerlendirmesi	48
4.3. Tartışma	49
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	59

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Tıp Alanındaki Nanoteknolojik Beklentiler	6
Tablo 2.2. Bizmut element özellikleri	18
Tablo 4.1. Bi ₂ O ₃ Nanopartikülü ile Muamele Edilmiş MDBK Hücrelerinde Komet Sayım Verileri	42
Tablo 4.2. Bi ₂ O ₃ Nanopartikülü ile Muamele Edilmiş MDBK Hücrelerinde Komet Parametreleri ve İstatistiksel Sonuçlar	43
Tablo 4.3. Bi ₂ O ₃ Nanopartikülü ile Muamele Edilmiş MDBK Hücrelerinde Akım Sitometri Sonuçları	45
Tablo 4.4. Bi ₂ O ₃ Nanopartikülü ile Muamele Edilmiş MDBK Hücrelerinde İstatistiksel Akım Sitometri Sonuçları	47
Tablo 4.5. Akım Sitometri Yöntemi ve Komet Analiz Yöntemi Korelasyon Tablosu	48



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Nanometre Boyutunu Anlatan Örnekler	3
Şekil 2.2. Nanoteknolojinin Kullanım Alanları	5
Şekil 2.3. Nanopartiküllerin En Çok Kullanış Özellikleri	12
Şekil 2.4. Nanopartiküllerin Giriş Yolları ve Etkiledikleri Başlıca Sistemler	15
Şekil 2.5. Bizmut Elementi	17
Şekil 2.6. a. Primer Sığır Böbrek Hücreleri, 100X. b. 32. Alt Kültürde Kurulmuş Sığır Böbrek Hücreleri (MDBK), 100 X. c. Vesiküler Stomatitis Virusun –Enfekte Etmiş Olduğu MDBK Hücreleri, 100 X	20
Şekil 2.7. Madin-Darby Sığır Böbrek(MDBK) Hücre Hattı	21
Şekil 2.8. Genotoksinlerin DNA Üzerindeki Etki Mekanizması ve Sonuçları	22
Şekil 2.9. Komet Testinde DNA Hasarı Baş ve Kuyruk	24
Şekil 2.10. KOMET Yönteminin Genel Basamakları	25
Şekil 2.11. a: Normal DNA, b, c, d: Hasarlı DNA (Comet)	27
Şekil 2.12. Apoptotik Hücre Ölümünün Farklı Aşamaları	29
Şekil 2.13. Hücre Süspansiyonun Borudan Akışı ve Hücrelerin Lazer Işınından Geçerek Küresel ve Oval Hücrelerin Birbirinden Ayrılması	32
Şekil 3.1. Bi ₂ O ₃ Nanopartikülüne ait Boyut Ölçüm Sonuçları	34
Şekil 3.2. Sığır Böbrek Hücre kültürleri (MDBK), 10 X.	36
Şekil 4.1. Floresan Mikroskofta Komet Görüntüleri	43
Şekil 4.2. Komet Analiz Sonuçlarının Konsantrasyonlara Göre Dağılımı	44
Şekil 4.3. Akım Sitometri Analizde Hücrelerin Dağılım Grafikleri	46
Şekil 4.4. Sitometri Analiz Sonuçlarının Konsantrasyonlara Göre Dağılımı	47

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
NP	Nanopartikül
Nm	Nanometre
Bi ₂ O ₃	Bizmut Oksit
MDBK	Madin-Darby Sığır Böbrek Hücre Hattı
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
NNF	Ulusal Nanoteknoloji Girişimi
STM	Taramalı Tünelleme Mikroskobu
V	Volt
°C	Santigrat ve Celsius
Å	Angstrom
MPa	Megapascal Basınç Birimi
UV	Ultraviyole
HF	Hidrojen Florür
HNO ₃	Nitrik Asit
HepG2	Hepatokarsinoma Hücresi
NRK-52E	Böbrek Epitelyal Hücresi
GSH	Glutasyon
MDA	Malondialdehid
BVDV	Bovine Viral Diarrhea
KA	Kromozom Aberasyonu
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
SCE	Kardeşkromatid Değişimi
MN	Mikronükleus
Sn	Saniye
TUNEL	TdT-dUTP nick-end-labelling
LSM	Konfokal Mikroskopi
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
Na ₂ O ₂	Sodyum Peroksit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
CO ₂	Carbon Dioxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
PBS	Phosphate-Buffered Saline
LMA	Düşük Erime Noktalı Agaroz
NMA	Yüksek Erime Noktalı Agaroz
GHI	Genetik Hasar İndeksi
HHY	Hasarlı Hücre Yüzdesi
GA	Geç Apoptotik Hücre
(5- ALA)	5-aminolevulinik Asit
8-OHdG	8-hid- Roksi Deoksiguanozin
Cu	Bakır
PBS	Fosfat Tamponu
MEITAM	İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji klasik olarak doğal, matematiksel, bilgisayar ve malzeme gibi bilimlerin benzersiz bir kombinasyonunu temsil ederek, nanometreler ölçeğinde fiziksel maddeleri araştırıp ve manipüle eden bütünleyici bir disiplindir [1].

Nanoteknolojinin gelişmesi ile birlikte nanokristal, nanopartikül, nanotüp gibi nano boyutlu malzemelerin üretilmesi sağlanabilmektedir. Son yıllarda büyük önem kazanan nanopartiküller nanoteknolojinin asıl temelini oluşturmaktadır. Nanopartiküller nanometre ölçeğinde (100 nanometre boyutundan daha az) parçacıklardır. Tüm alanlarda bunu sağlayan tek düzelik, davranış ya da özel görsel özellikler gibi maddi şeyler olabilir [2].

Nanomalzemeler boyut, yapı, kompozisyon ve şekil gibi doğal ve fizikokimyasal özelliklerden bağımsız olarak, evrensel olarak küçük boyutlu ve yüzey alanı ile kombinasyonunun bir anahtar özelliği ile karakterize edilmiştir. Artan yüzey enerjisi ve nanopartiküllerin değiştirilmiş kimyasal potansiyeli, mekanik, manyetik, optik ve katalitik özelliklerini dönüştürerek ; kimyasal sentez, enerji tedariki, inşaat ve nakliye, gıda üretimi, veri depolama gibi çeşitli endüstrilerde ve telekomünikasyon, biyoteknoloji, sağlık ve tüketici ürünlerinin üretimi gibi alanlarda yeni performans seviyelerine izin verilmektedir [3].

Biyolojik açıdan nanoteknolojinin amacı geniş çaplı olarak tüm insanlığın biyolojik sistemlerine kapsamlı izleme, kontrol, savunma ve iyileştirme olarak tasarlanabilir, en sonunda tıbbi fayda sağlamak için mühendislik cihazları ve nanoyapılarını kullanarak moleküler düzeyde çalışmalara olanak sağlamaktadır [4].

Günümüzde nano ölçekli teknolojiye gelişmeler sayesinde hayatın hemen hemen tüm alanında nanopartiküller kullanılmaya başlanmıştır [5].

Nanopartiküller özelliklerine göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Nanopartiküllerin çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle, ilaçtan sanayiye kadar çeşitli alanlara çalışmaya olanak sağlamakta fakat insanların nanopartiküllere karşı yoğun bir şekilde maruz bırakılmaması gerekmektedir. Günümüzde nanoteknolojinin birçok alanda kullanımı daha fazla nanopartiküle maruz kalma anlamına gelmektedir, bu nedenle, sağlıkla ilgili tehlikelerini önlemek için nanopartiküllerin potansiyel etkilerini incelemek gereklidir [2].

Bazı çalışmalarda, in vivo ve in vitro nanopartiküllere maruz kalınması halinde toksik etkileri olduğu görülmüştür. Şu anda biyomedikal, teşhis ve tedavi amaçlı olarak artan sayıda nanopartikül uygulanmaktadır. Bununla birlikte, biyomedikal alanda nanopartiküllerin kullanımı düşük biyobozunurluk, küçük boyutlu nanopartiküllerin solunması, tüketimi veya cilt teması (insanlarda ve hayvanlarda hücrelere ve dokulara nüfuz ederek biyokimyasal hasara neden olabilir) sakıncalı olabilmekte ve ayrıca bu nanomalzemelerin birçoğu klinik çalışmalara

dönüştürülemediğinden dolayı, bu nanopartiküllerin biyogüvenlik ve biyo uygulaması daha fazla araştırılmalıdır [6].

Bu günlerde nanoteknolojinin birçok alanda kullanımı nanopartiküller ile daha fazla temas anlamına gelecektir. Bu nedenle nanopartiküllerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki potansiyel etkilerinin incelenmesi gerekmektedir [7].

Bu çalışmada 90-210nm boyut aralığına sahip Bizmut oksit nanopartikülünün sığır böbrek MDBK hücre hattı kültürlerinde *in vitro* genetik hasar potansiyeli ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



KAYNAK ARAŞTIRMALARI

1.1. Nanoteknoloji'nin Tanımı

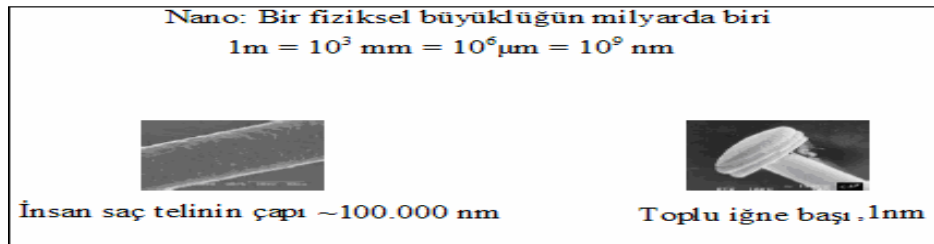
Nanoteknoloji içinde nanometre boyutunda bileşenleri bulunan malzemelerin oluşturulması ve kullanılması anlamına gelir. Şu anda Nano teknik bir birim olarak kullanılıyor ve bir metrenin milyarda birini temsil etmektedir [8].

Genellikle metre ile birlikte kullanılmıştır, Ancak genel olarak söylenecek olursa, nanoteknoloji maddeyi dolaylı olarak atom boyutuna yani "nano-boyutuna" indirgeme işidir. Nano terimi bir şeyin bir milyarda biri anlamına gelir. "Nanoteknoloji", "nanobilim" gibi başında "nano" öneki bulunan terimler, "nanometre" teriminden gelmektedir. Temel olarak nanometre, bir ölçüm skalasıdır. Bir metrede 1.000.000.000 nanometre vardır, yani bir nanometre, bir metreden bir milyar kere küçüktür [9].

Nanoteknolojiyi ilk anlamı, ünlü fizikçi Richard Feynman tarafından atomların direkt kontrolü aracılığıyla bir sentezin olasılığından bahsettiği konuşması "There's Plenty of Room at the Bottom" sırasında tartışılmıştır. "Nanoteknoloji" terimi 1974'te Norio Taniguchi tarafından kullanılmıştır. Bu şekilde, 1980'lerde nanoteknolojinin dalı olarak ortaya çıkmaktadır. Teorik ve kamu işlerinin birleşmesiyle olmuştur. Bu birleşim, nanoteknoloji için ve maddenin atomik kontrolüne biraz daha dikkat çeken yüksek görünürlüklü deneysel gelişmeler için kavramsal bir çerçeve geliştirmiş ve yaygınlaştırmıştır [10].

Nanoteknoloji atomlarla oynayan bir teknolojidir, atom ve molekülleri tek tek manipüle ederek istenilen yapının oluşturulması ilkesine dayanır ve atomlar ayrı ayrı işleme tabii tutulur ve yaklaşık 100-1000 atom bir araya gelerek nano ölçeklerde bir nesneyi oluşturmaktadır [11].

Maddeleri moleküler ya da nanometre düzeyinde ele alan bir mühendislik bilimi olan nanoteknoloji, daha güçlü ve daha hafif elektronik materyallerin kullanıldığı yeni bir çağ vaat ederek bilim adamlarının son yıllarda umutlarını arttırmaya devam etmektedir. Mühendisler ve bilim insanları her gün daha küçük boyutlara inmeye, daha az yer kaplayan, daha az enerji harcayarak daha hızlı çalışabilen aygıtlar yapmaya çalışmışlardır. Şekil 2.1'de nanometre boyutunu anlatan örnekler verilmiştir [12].



Şekil 2.1. Nanometre Boyutunu Anlatan Örnekler [13].

1.2. Nanoteknoloji'nin Tarihçesi

Nanoteknoloji vizyonunun ortaya çıkışı, 1959 yılında fizikçi Richard Feynman'ın, moleküler boyutlarda malzeme ve cihaz üretimi ile elde edilebilecek başarılar üzerine ünlü konuşmasına kadar uzanabilir. Bu konuşmasında Feynman minyatürize edilmiş enstrümanlar ile nano yapıların ölçülebileceği ve yeni amaçlar doğrultusunda kullanılabilceğinin altını çizmiştir. Araştırmacılar daha küçük boyutlarda çalışmaya başladıkça, birçok sorun ortaya çıkmaya başlamıştır. Boyutlar ne kadar küçük olursa, yapılan işi takip etmek o kadar zor olacaktır. 1981'de IBM tarafından yeni bir mikroskop türü "Scanning Tunneling Microscope" (STM) geliştirilmiş ve bu önemli gelişmeye katılan araştırmacılar, keşifleri ile 1986 yılında Nobel Fizik Ödülü'nü almışlardır [14].

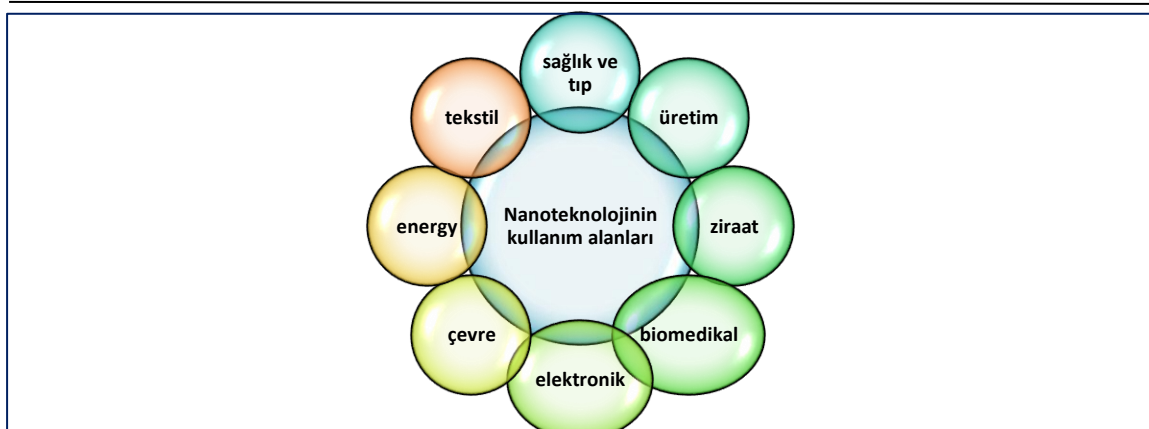
1990'larda Rice Üniversitesinde Richard Smalley öncülüğündeki araştırmacılar tarafından 60 karbon atomunun simetrik biçimde sıralanmasıyla elde edilen futbol topu şeklindeki "fullerene" molekülleri geliştirilmiştir. Elde edilen molekül 1 nanometre büyüklüğünde ve çelikten daha güçlü, plastikten daha hafif, elektrik ve ısı geçirgen bir yapıya sahipti. Bu araştırmacılar 1996 yılında Nobel Kimya ödülünü almışlardır. 1991 yılında Japon NEC firması araştırmacılarından birinin, Sumio Iijima'nın, karbon nano tüpleri bulunduğunu duyurmuştur. Karbon nano tüpler, fullerene molekülünün esnetilmiş bir şekli olup benzer şekilde önemli özelliklere sahipti; çelikten 100 kat daha güçlü ve ağırlığı çeliğin ağırlığının 6'da 1'i kadardı. 90'larda ayrıca Feynman'ın fikirleri Eric Drexler tarafından yazılan kitapta "Engines of Creation" geliştirildi. Drexler'in fikirleri şüpheyle karşılanmasına karşın 1992 yılında yayınlamış olduğu kitabında "Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation" genel kavram ve düşüncelerini detaylı analiz ve tasarımlar ile ayrıntılı olarak anlatmıştır. 1999 yılında ABD'deki Bill Clinton hükümeti, ilk resmi hükümet programını, Nanoteknoloji araştırma, geliştirme ve ticarileştirme hızını artırmayı amaçlayan Ulusal Nanoteknoloji Girişimi'ni başlattı. 2001 yılında Avrupa Birliği, Çerçeve Programı için öncelik alanı olarak Nanoteknoloji çalışmalarını içeriyordu. Japonya, Tayvan, Singapur, Çin, İsrail ve İsviçre, benzer programlar başlattılar ve 21. yüzyılın ilk küresel teknoloji yarışına katılma çabalarını hızlandırdılar (Url-1)[15].

Başkan Clinton ABD Ulusal Nanoteknoloji Girişimi için yaptığı bütçe onayıyla nanoteknolojinin önemine dünya çapında dikkat getirdiği zaman nanoteknoloji Amerika'da 2001 yılında daha fazla kamusal alana girdi. Başlangıç için Amerika'da nanoteknoloji için ayrılan bütçe 442 milyon dolar oldu. Bunun yanısıra Amerika'da ulusal güvenlik için nanoteknoloji stratejik bir önem taşımaktadır. 3 yıl sonra; Aralık 2003'te Başkan Bush 21.yy nanoteknolojik araştırmalar ve geliştirmeler için ayrılan bütçenin 849 milyon dolar olduğunu açıklamıştır. Bu gelişmelerden sonra şüphesiz nanoteknolojik araştırmalar için birçok ülke bütçe ayırmaya

başlamıştır. Fakat nanoteknoloji gelişiminde, günümüzde ilk sırayı Amerika ve Japonya oluşturmaktadır. Başlangıçta nanoteknolojik araştırmalarda Japonya önde olmasına rağmen günümüzde Amerika, nanoteknoloji açısından Japonya'dan daha öndedir. ABD, Japonya, Almanya, İngiltere, Çin, Avustralya, Rusya ve hatta Singapur ile Tayvan gibi ülkeler, nano teknoloji konusunda sürekli olarak çalışmaktadırlar. Pazar araştırma şirketi Lux Research 'ün yayınladığı raporda, özel şirketler ve üniversitelerin 2004 yılı boyunca nano teknoloji araştırmalarına 8.6 milyar dolar ödenek aktaracakları bildirilmiştir. Bu rakamın şimdiye kadar sektörde akan en yüksek rakam olduğu belirtilmiştir. Aralarında General Electric ve Intel gibi devlerin de bulunduğu 1500 şirket, nano teknoloji adına giderek artan oranlarda yatırım yapmaktadırlar. ABD hükümeti 1.6 milyar dolar ile nano teknolojiye en çok kaynak ayıran devlet olmuştur [16].

1.3. Nanoteknoloji'nin Kullanım Alanları

Nanobilim ve nanoteknoloji son derece küçük şeylerin çalışılması ve uygulanmasıdır ve kimya, biyoloji, fizik, malzeme bilimi ve mühendislik gibi diğer tüm bilim alanlarında kullanılmaktadır. Nanoteknoloji sayesinde tıp, elektronik, biyomateryaller ve enerji üretimi gibi çok çeşitli uygulamalarla birçok yeni malzeme ve cihaz yaratılabilir. Bu malzemelerin bir kısmı günlük hayatımızda kullanım alanı olarak yerini almışken, bir kısmı ise araştırmacılar tarafından, problemlere çözüm olabilmek amacıyla araştırma aşamasındadır [17].



Şekil 2.2. Nanoteknolojinin kullanım Alanları [18].

1.3.1. Sağlık ve Tıp Sektörü

Nanoteknoloji yaşayan sistemlere moleküler seviyelerde müdahale etme imkanı oluşturabilir ve yaşayan organizmalar ile etkileşime geçebilecek boyutlarda araçlar üretilmesi ile bir çok yeni teşhis ve tedavi yöntemlerinin gelişmesi olasıdır. Sadece hastalığın bulunduğu ve/veya yayıldığı bölgelere saldırarak ilaç veren makineler, insan vücudu içinde hareket edilmesine imkan sağlayan teşhis araçları, nano-teknolojinin tıp ve sağlık sektörü üzerindeki potansiyel uygulamaları olarak gösterilebilmektedir [19].

Bilimsel ve bilimsel analiz alanları, çeşitli programlar için nanomateryallerin özel niteliklerini kullanmıştır (örneğin, mobil resim ve kanser tedavisi için terapötikler için karşılaştırma sağlayıcıları). Bu çoklu alanı açıklamak için biyomedikal nanoteknoloji, biyonanoteknoloji ve nanotıp gibi koşullar kullanılır [20].

Nanomalzemelere, bilimsel unsurlar veya bileşenler ile arayüz oluşturarak özellikler kazandırılabilir. Bu nedenle, nanomateryallerin hem in vivo hem de in vitro biyomedikal analiz ve programlar için yararlı olabileceği bildirilmiştir. Şimdiye kadar, nanomalzemelerin kimya ile birleştirilmesi, analitik araçların, karşılaştırma sağlayıcıların, sistematik kaynakların, fiili fiziksel rehabilitasyon programlarının ve ilaç dağıtım sektörünün büyümesine yol açmıştır, hatta vücuda ek bir bağışıklık sistemi de kazandırabilirler. Hedef hücrelerin özellikleri programlandığında, mesela grip virüslerine saldırabilir ve bünye hastalanmadan virüs istilasını durdurabilirler. Aynı zamanda vücuttaki her bulguyu rapor edip bir nevi doktorluk da yapabilirler. Nanoteknolojinin özellikle sağlık konusunda sorunların çözümüne ve yaşamın uzatılmasına yönelik sağlayacağı katkılar, insanoğlunun nanoteknolojiye olan ilgisini artırmaktadır. Bu kapsamda, gelecekte tıp alanındaki nanoteknolojik beklentiler Tablo-2.1’da gösterilmiştir [21]

Tablo2.1. Tıp Alanındaki Nanoteknolojik Beklentiler [21]

Tıp Alanındaki Nanoteknoloji Beklentileri	Yıl
Yaşlılara yönelik bakımın yaygınlaşması ve hayat tarzı kaynaklı hastalıkların önlenmesi	2010
Tek kart üzerinde kişinin tıbbi geçmişini n saklandığı sistemlerin Kullanılması	2011
Atar damarları etkileyen ateros kloroz hastalığının cerrahi işlem gerektirmeden erken tanısı vetedavisi	2012
Ateros kloroz oluşum mekanizmasının ortadan kaldırılması	2013
Alzheimer hastalığı ile kanser hücrelerinin ilk ortaya çıktıkları organdan başka yere giderek çoğalması (metastaz)’nın ortadan kaldırılması	2013
Oral insulin tedavisi ve viral karaciğer hastalıklarını tedavi eden ilaçların kullanıma girmesi	2014

Lokal tıkanmas onucu kalp kasının bir bölümünün fonksiyonlarını kaybetmesine karşı (Myokard enfaktüsü) hücre tedavisi	2015
Tüm kanserlerin kandan erken tanınmasını sağlayan sistemlerin Kullanılması	2015
Ekzema gibi alerjilerin tedavisi	2016
Bilinmeyen hastalıkların dünyayı tehdit etmeden önlenmesi	2016
Genetik tanı ile kanserlerin önlenmesi	2017
Tüm kanserlerin 5 yıllık sağ kalım süresinin % 70'in üzerine çıkması, Kök hücre tedavisi kullanılarak hasarlı organların rejenerasyonu	2020
Yaşlanmanın ortadan kaldırılması	2021

Nanoteknoloji tıp dünyasında bir nimet olarak görülüyor, zira bunlar akıllı ilaçlar denen şeyin yaratılmasına yardımcı olabilir. Bunlar, diğer geleneksel ilaçların sahip olduğu yan etkileri olmadan insanların daha hızlı tedavi edilmesine yardımcı olur [22].

Tıpta nanoteknolojinin araştırması, doku rejenerasyonu, kemik onarımı, bağışıklık ve kanser, diyabet ve diğer yaşamı tehdit eden hastalıklar gibi rahatsızlıkların iyileştirilmesi gibi alanlara odaklanmaktadır. Nanoteknoloji tıpta büyük ilerlemeler sağlama potansiyeline sahiptir. Nanobotlar tıkanıklıkları gidermek için bir hastanın arterlerine gönderilebilir. Ameliyatlar daha hızlı ve daha doğru olabilir. Yaralanmalar hücre-hücre tamir edilebilir. Hasar görmüş genleri sabitleyerek genetik koşulları iyileştirmek bile mümkün olabilir. Nanoteknoloji, ilaç üretimini iyileştirmek, ilaçları moleküler düzeyde uyarlamak ve daha etkili hale getirmek ve yan etkileri azaltmak için de kullanılabilir. Nanotıp, küresel olarak "ilaca uygulanan nanoteknoloji" olarak tanımlanmaktadır. Geleneksel sağlık bakım prosedürlerini geliştirmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Nanotıp, tıpta sıklıkla yetersiz olan teşhis ve tedavi planlarını eskimiş olabilir. Moleküler tanıma işlemi ile belirli hücrelerin tanınması için moleküllerin oluşturulduğu yerlerde nanopartiküller belirli bir hastalık veya duruma çekici olacak şekilde tasarlanabilir; örneğin kanser. Bu ilaç dağıtım sisteminde mühendislik parçacıkları kanser hücrelerini arar ve kemoterapi gibi bir ilaç yükünü doğrudan bu kanser hücrelerine gönderir. Geleneksel kemoterapiye göre avantajı doğumda olacaktır. Kemoterapi ilacı sadece kanser hücrelerine saldırarak vücudun geri kalan kısmına dokunulmamış olur. Sonuç kemoterapiden daha az hastalık ve daha az kullanıldığı için gerçek ilaç maliyetinde bir azalmadır. Nano-mühendislik ilaçlar bilinen biyolojik hedeflere spesifik olarak bağlanmak için tasarlanabilir. Bu tasarlanmış ilaçlar, sadece sağlıklı doku üzerinde değil, hedeflenen spesifik hastalık dokusu üzerinde hareket eder. Ek olarak bu ilaçlar bireye özgü olarak tasarlanmıştır [23].

1.3.2. Kimya ve Çevre Sektörü

Nanoteknolojik ürünler, süreçler ve uygulamaların, sera gazı ve tehlikeli atıkların azaltılmasının yanı sıra hammadde, enerji ve su tasarrufu sağlayarak çevre ve iklim korumasına

önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Nanomalzemelerin kullanılması bu nedenle belirli çevresel faydalar ve sürdürülebilirlik etkileri vaat ediyor. Bununla birlikte, nanoteknolojinin şu anda araştırmalarda veya pratik uygulamalarda olsun, çevre korunmasında oldukça alt rol oynadığını unutmayın. Çevre mühendisliği şirketleri kendi alanlarında nanoteknolojiye sadece sınırlı bir önem vermektedir. Bir ürünün çevreye olan hem olumlu hem de etkilerinin olumsuz belirlenmesi yaşam döngüsünün bitiminde hammaddeden üretime kadar tüm yaşam döngüsünün incelenmesini gerektirir. Kural olarak, çevresel faydaların tanımları, ürünlerin üretilmesinde harcanan kaynak ve enerji miktarını dikkate almamaktadır [24].

1.3.3. Kataliz Sektörü

Maddenin katalizör avantajları, özellikle nanopartiküllerden dolayı, inanılmaz oranda büyük yüzey yeri miktarına bağlıdır. Katalizde nanopartiküllerin geleceği program, enerji mobilinden katalitik konvertörlere ve fotokatalitik aletlere kadar değişmektedir. Kataliz de maddelerin geliştirilmesi için gereklidir. Takı nanoparçacıkları şimdi bir sonraki otomobil katalitik dönüştürücüler oluşturmada kabul ediliyor çünkü nanopartiküllerin çok yüksek olması gereken platin miktarını azaltabilir, ancak, metan normal hava ile birleştiğinde otomatik olarak yanacaklarını gösteren testler nedeniyle bazı sorunlar gündeme gelmiştir. Nanofiltrasyon, önemli bir program olarak gelebilir, ancak gelecekteki analizler olası zehirlenmeleri incelemek için temkinli olmalıdır [25].

1.3.4. Gıda Sektörü

Gıda alanında nanoteknolojinin uygulamaları dört ana başlıkta tanımlanabilir:

- 1- Gıda işleme ve fonksiyonel ürün geliştirme
- 2- Biyolojik olarak aktif maddelerin ve gıdaların taşınması ve serbest bırakılması
- 3- Patojenlerin tespiti ve gıda güvenliğinin geliştirilmesi
- 4- Ürün kalitesini ve raf ömrünü olumlu etkileyen ambalajlama sistemlerinin geliştirilmesi.

Gıda alanında, nanoteknoloji tekniklerinin ve araçlarının işlenmesi, üretimi ve paketlenmesi için kullanıldığı NANOGIDA'nın geliştirilmesi ile nanoteknoloji gelişmeleri ortaya çıkmıştır. Nanoteknolojinin gıda sistemlerinde uygulamaları hızla gelişmektedir. Bu teknoloji tarafından üretilen yoğunluğa rağmen, yeni gıda ürünlerinin potansiyel faydalarına dikkat çekilmiştir, çünkü bu ürünlerin güvenliği hakkında henüz bilgi sahibi olmadığından halk sağlığı üzerindeki etkileri konusunda endişeler bulunmaktadır. Nanoteknoloji ürünlerinin üretimi, kontrolü ve güvenliği için kısa sürede ulusal ve uluslararası yasal düzenlemelerin uygulanması

çok önemlidir. Böylece, bu ürünlerin güvenliği ile ilgili kaygılar ortadan kalkacak ve bu teknolojinin maksimum kullanımı sağlanacaktır [26].

1.3.5. Tarım Sektörü

Nanomalzemelerin tarımda uygulanması özellikle bitki koruma ürünlerinin uygulamalarını azaltmak, döllenme sırasında besin kayıplarını en aza indirmek ve optimize edilmiş besin yönetimi yoluyla verimi arttırmak için kullanılmaktadır. Tarımdaki bu potansiyel avantajlara rağmen, henüz nanoteknoloji uygulamasının diğer sektörleri ile karşılaştırıldığında daha büyük ölçüde pazara sunulmamıştır [27].

Nanoteknolojinin tarımda büyük potansiyele sahiptir, ancak üretim süreçlerinin ölçeğinin arttırılması ve maliyetlerin düşürülmesi gibi riskle ilgili birkaç konu ele alınmalıdır. Bu açıdan, özellikle çekici olan, insan sağlığı ve çevre üzerinde düşük etki gösteren proteinler ve karbonhidratlar gibi biyopolimerlerden türetilmiş nanopartiküllerdir. Örneğin, agrokimyasallar ve biyostimülanlar için zehirli olmayan ve sürdürülebilir dağıtım sistemleri olarak nişasta bazlı nanopartiküllerin potansiyeli kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Ticari açıdan bakıldığında, mevcut tarımsal kimyasal firmalar nanoteknolojinin potansiyelini araştırmakta ve özellikle, kasıtlı olarak üretilen nano boyuttaki aktif bileşenlerin bitkilerde yararlı bileşenlerin daha fazla etkinliğini veya daha fazla nüfuzunu sağlayıp sağlayamayacağı araştırılmıştır. Bununla birlikte, şimdiye kadarki nano boyut, özellikle büyük ölçekli üretimin ilgisi ve buna dahil olan maliyetler göz önünde bulundurulduğunda, ürün özelliklerinde önemli gelişmelere sahip olduğunu göstermemiştir [28].

1.3.6. Tekstil Sektörü

Nanomalzemelerin benzersiz ve yeni özellikleri büyük ekonomik potansiyeli nedeniyle sadece bilim insanlarını ve araştırmacıları değil, aynı zamanda işletmeleri de cezbetmiştir. Nanoteknolojinin ayrıca tekstil endüstrisi için gerçek bir ticari potansiyeli vardır. Bu, esas olarak, kumaşlara farklı özellikler kazandırmak için kullanılan geleneksel yöntemlerin, genellikle kalıcı etkilere yol açmadığı ve aklama veya aşınmadan sonra işlevlerini yitireceği gerçeğinden kaynaklanmaktadır. Nanoteknoloji, kumaşlar için yüksek dayanıklılık sağlayabilir, çünkü nano-parçacıklar geniş yüzey alanı-hacim oranına ve yüksek yüzey enerjisine sahiptir. Böylece kumaşlar için daha iyi bir afinite sunar ve fonksiyonun dayanıklılığında bir artışa neden olur. Ek olarak, kumaşların nano-parçacıklarla kaplanması, kumaşın nefes alma yeteneğini veya el hissini etkilemeyecektir. Tekstildeki nanofiberler küçük uygulama alanlarını kaplamakla birlikte, normal tekstil malzemesi ile birlikte yaygın uygulama alanına sahiptir [29].

Tekstil, nano elyaf ve elektrostatik iplik eğirme özelliği sayesinde çok işlevli hale gelmektedir. Bu sayede tekstil ürünleri artık giyim eşyası dışında uygulamalara sahiptir. Bunlar yüksek performanslı teknik tekstiller, biyomedikal tekstiller ve çevre dostu tekstil ürünlerini nasıl unutabiliriz [30].

1.3.7. Kozmetik Sektörü

Nanoparçacıklar ve diğer nanoyapılı malzemeler, malzemenin hacimli formuyla çalışırken elde edilemeyen benzersiz özelliklere sahiptir. Bu benzersiz özellikler birçok endüstrinin başvurmuş olduğu bir alan haline gelmiştir ve kozmetik endüstrisi de nanoteknoloji tarafından sunulan fırsatlardan en iyi şekilde yararlanmaya istekli hale gelmiştir [31].

Nanomalzemesler, nemlendirici ve yaşlanma karşıtı kremlerden saç bakımına kadar geniş bir ürünün performansını denemek ve geliştirmek için kullanılmaktadır. Kozmetik ürünlerde nanopartiküllerin kullanımı ikiye ayrılır. 1. UV filtreleme ve 2. Aktif bileşenlerin verilmesidir. Lipit nanoparçacıklarından dendrimer veya aşırı dallı polimerlere kadar, nemlendiriciler, yaşlanma karşıtı kremler ve diğer cilt bakım ürünlerindeki kozmetik bileşenler için çok çeşitli nanoyapılar önerilmiştir. Yine, bu nanoyapılı malzemeler aktif bileşenin deri hücrelerine daha etkili bir şekilde verilmesini göstermiştir [32].

Bununla birlikte, bu yeni malzemelerin güvenliği konusunda hala bazı tartışmalar vardır ve kozmetikte nanomalzemelerin düzenlenmesi dünyanın birçok yerinde geniş veya belirsizdir. Bununla birlikte, nanomalzemelerin insan sağlığı üzerindeki uzun vadeli etkilerini daha iyi anlamak için daha çok çalışma yürütülmektedir. Bu arada kozmetik üreticileri giderek daha çok nanoformüle ürünler geliştirmektedirler. Nanoemülsiyonlar ve nanokristaller cilt bakım ürünlerinde gittikçe daha popüler hale gelmektedir ve genellikle çok az toksikolojik etkiye sahip organik malzemelerden üretilmektedirler. Mevcut değişikliklerin sonucu ne olursa olsun, nanomateryallerin kozmetik endüstrisinin geleceğinde yoğun bir şekilde yer alması muhtemel görünmektedir [33].

1.4. Nanopartiküller

Nanoteknoloji, atomik ve moleküler yapılar düzeyinde materyallerin, cihazların ve fonksiyonel sistemlerin geliştirilmesidir. Günümüzde nanoteknolojideki gelişmeler artmıştır ve bu alandaki yatırımlar sürekli artmaktadır. Nanoteknoloji gelişimi ile nanokristaller, nanopartiküller ve nanotüpler gibi nano ölçekli materyaller üretmek mümkündür. Nanopartiküller nanoteknolojinin temeli olduğu için büyük önem taşımaktadır [2].

Nanopartiküller sentetik veya doğal kaynaklı bir makro molekülden sentezlenir. Nanopartiküller için benzersiz bir tanımın bulunmamasına rağmen, genellikle 100 nm den 1 nm'e kadar bir boyuta sahip parçacıklar olarak adlandırılırlar. Genellikle polimerik yapılar kullanılmaktadır, her polimerin kendine has özelliği yanında nanopartikül halinde çeşitli özellikler kazanmaktadırlar. Örneğin biyobozunur, biyoyumlu, termal özellikler kazanmaları gibi, nanopartiküller, en yaygın olarak metal oksit seramikler, metaller, silikatlar ve oksit olmayan seramikler olmak üzere çok çeşitli malzemelerden yapılabilmektedir [34].

Nanopartiküller küçük partikül boyutlarına sahiptir. Nanopartiküller kolaylıkla sterilize edilebilirler bir maddenin iletkenliği, reaktifliği, elastisitesi, sertliği, rengi, sıcaklık ve basınca dayanımı bu değişimden etkilenir ve bu değişimler daha küçük, daha hızlı, daha akıllı, daha ucuz ve daha güvenli çözümler için anahtar role sahiptir. Bu bağlamda nanopartikülleri tüm bu çözümlere katkı sağlayacak malzemelerin inşasında kullanılacak temel yapıtaşları olarak görmek mümkündür [35].

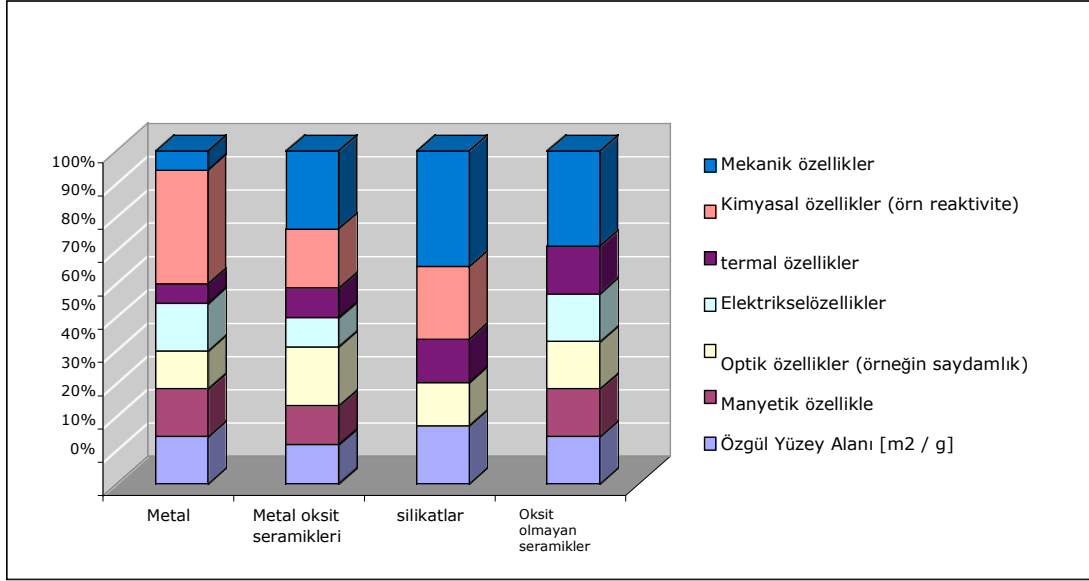
Nanopartiküller, kütle malzemeleri ile atomik veya moleküler yapılar arasında bir köprü oldukları için büyük bir bilimsel ilgi haline gelmişlerdir. Bir dökme materyal, boyutuna bakılmaksızın sabit fiziksel özelliklere sahip olmalıdır, ancak nano ölçekte boyut bağımlılık özelliklerine sıklıkla rastlanır. Böylece, malzemelerin özellikleri, büyüklükleri nano ölçüme yaklaştıkça ve bir malzemenin hacminin yüzdesine göre yüzeyin yüzdesi olarak önemli hale geldikçe değişmektedir [36].

Bir mikrometreden (veya mikrondan) daha büyük hacimli malzemeler için, yüzeyin yüzdesi, malzemenin kütledeki hacimle ilgili olarak önemsenmemektedir. Bu nedenle nanopartiküllerin ilginç ve bazen beklenmedik özellikleri büyük olasılıkla materyalin küçük hacimli kütlelerinin katkılarına hakim olan malzemenin geniş yüzey alanına bağlıdır [37].

NP'ler, yüksek yüzey alanı ve nano boyutlarından dolayı benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Optik özelliklerinin, görünür bölgedeki emilim nedeniyle farklı renkler kazandıran büyüklüğe bağlı olduğu bildirilmiştir. Onların reaktivitesi, tokluğu ve diğer özellikleri de onların eşsiz boyutlarına, şekline ve yapısına bağlıdır. Bu özellikler nedeniyle kataliz görüntüleme, tıbbi uygulamalar, enerji tabanlı araştırma ve çevresel uygulamaları içeren çeşitli ticari ve evsel uygulamalar için uygun adaylardır [38].

1.4.1. Nanopartiküllerin özellikleri

Nanopartiküller üretildikleri dökme malzemenin daha büyük partikülleri ile karşılaştırıldığında, spesifik özelliklere (boyut, dağılım, morfoloji, vb.) dayalı tamamen yeni veya geliştirilmiş özellikleri göstermiştir [39].



Şekil 2.3. Nanopartiküllerin Kullanım Şekilleri [40].

1.4.1.1. Özgül Yüzey Alanı (m²/g)

Nanopartiküller, nanopartiküllerin azalan boyutu ile hacim oranına daha yüksek bir yüzey sunmaktadır. Yüzey alanının stabilizasyonu, nanopartiküller topolojisi (pürüzlülük) ve destek malzemesi ile ara yüz de ilgili yönler olsa da, spesifik yüzey alanı katalitik reaktivite ve diğer özellikleri (örneğin sensörler) için uygundur. Bunun iyi örnekleri, çok yüksek yüzey alanlarının ve yüksek dayanımlı gözenekliliğin, son teknoloji katalizörlere kıyasla üstün katalitik aktiviteye yol açtığı asil metal bazlı katalizörlerdir. Metal partiküllerin spesifik yüzey alanı arttıkça, belirli uygulamalardaki biyolojik etkinliği de yüzey enerjisindeki artışa bağlı olarak artabildiği rapor edilmiştir [40].

1.4.1.2. Manyetik Özellikler

Nano ölçekte parçacık büyüklüğünün azaltılması genellikle geliştirilmiş manyetik davranışla sonuçlanır (büyük eşdeğerlere kıyasla). Örneğin, mükemmel manyetik malzemeler (transformatörlerde uygulanabilirlik, farklı sensörler vb.) ve ayrıca nano boyutlu yapı bloklarından oluşan katı manyetik malzemeler (yay değişimi mıknatısları olarak adlandırılır). Yüksek yoğunluklu ortamların ve tıbbi uygulamaların depolanması, yukarıdakilerden yararlanan temel uygulamalardır. Nanopartiküller matris veya substratta homojen olarak dağılırlarsa depolama malzemesi olarak kullanılabilirler [40].

1.4.1.3. Optik Özellikler

Emilim veya soğurma dalga boyu, boyut seçimi, ligandlar ile etkileşimlerle kontrol edilebilir. Örneğin, nanoparçacık boyutu ışığın kritik dalga boyunun altındaysa, saydamlık elde edilebilir. Bu uygulama nanopartikülleri (örneğin metaller, silikatlar veya metal oksitli seramikler) bariyer filmler ve kaplama uygulamaları için çok uygun hale getirir ve saydamlığı diğer özelliklerle (UV emilimi, iletkenlik, mekanik mukavemet, vb.) birleştirir. Ayrıca, kozmetik uygulamalar için ilginç optik (ışık emici / filtreleme) özellikler kullanılabilir [40].

1.4.1.4. Elektriksel Özellikler

Taşınma nanopartiküllerin bireysel özellikleri ile kontrol edilebilir. Örneğin, kimyasal yapı ve boyut, iyonik potansiyeli veya elektron ilgisini kontrol etmektedir. Nanopartiküller tipik olarak daha ince bir tabaka ve daha güvenilir bir elektriksel yol sağlayan daha fazla noktadan noktaya temas sağlamaktadır [40].

1.4.1.5. Kimyasal Özellikleri

Aşağıdaki kimyasal özelliklerden bazıları şunlardır:

- 1.) Yüzeyin üstünlüğü, nano ölçekteki malzemelerin davranışlarındaki değişimin temel nedenlerinden biridir. Nanopartiküllerdeki tüm atomların yarısına kadar yüzey atomlarıdır, elektriksel ulaşım gibi özellikler artık katı hal yığınsal olgusu tarafından belirlenmez.
- 2.) Nanopartiküllerdeki atomlar, daha büyük yapıdaki atomlardan daha yüksek ortalama enerjiye sahiptir, çünkü yüzey atomlarının daha büyük bir oranı vardır. Örneğin katalitik materyaller, katalizörün nano boyutta küçültülmesiyle maruz kalan yüzey atomu başına daha büyük bir kimyasal aktiviteye sahiptir.
- 3.) Moleküler mono tabakalar yüzey özelliklerini değiştirmek ve kontrol etmek ve nanopartiküller arasındaki etkileşime aracılık etmek için kullanılabilir [40].

1.4.1.6. Diğer Özellikleri

Yüksek yoğunluklu veri depolama gibi nanopartiküllerin diğer özelliklerinden bahsedilmiştir. Ancak, bu daha çok bir mülkten daha çok bir uygulama alanı olarak düşünülebilir (esas olarak manyetik davranışlarından kaynaklanır).Yüksek anizotropy manyetik nanopartiküllerin özel düzenini kullanarak veri depolama yoğunluğunu arttırmak için yüksek bir potansiyel vardır. Belirtilen diğer özellikler arasında biyolojik özellikler / biyoaktivite

bulunur. Bu bir özellik kendisi değil, nanopartiküllerin yüksek özgül yüzey alanı ve kimyasal özelliklerinin bir kombinasyonu olarak görülmemiştir [40].

1.4.2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

Nanopartiküller, boyut, morfoloji, fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre farklı tiplerde sınıflandırılabilir. Bazıları karbon bazlı, seramik, metal, yarı iletken, polimerik ve lipid bazlı nanopartiküllerdir [41].

1.4.3. Metal Bazlı Nanopartiküller

Metal nanopartiküller metal öncülerden hazırlanırlar. Bu nanopartiküller kimyasal, elektrokimyasal veya fotokimyasal yöntemlerle sentezlenebilir. Kimyasal yöntemlerde metal nanopartiküller, çözelti içindeki metal iyonu öncüllerini kimyasal indirgeyici maddelerle azaltarak elde edilir. Bunlar küçük molekülleri adsorbe etme ve yüksek yüzey enerjisine sahip olma yeteneğine sahiptir. Bu nanopartiküller araştırma alanlarında, biyomoleküllerin tespiti ve görüntülenmesi, çevresel ve biyoanalitik uygulamalarda kullanılmaktadır [42].

Bi_2O_3 önemli metal oksitlerden biridir ve biyomolekül adsorpsiyonu için uygun bir ortam sağlar. Toksik olmadığı belirtilen Bi_2O_3 'ler, daha büyük avantajları ve yeni özellikleri (daha yüksek spesifik yüzey, daha fazla yüzey serbest enerjisi ve iyi elektrokimyasal kararlılık, vb.) nedeniyle düzenli boyuttaki partiküllerden daha iyi adsorpsiyon özelliğine sahiptir [43].

1.4.4. Nanopartiküllerin Etkileri

Nanopartiküller insanlara, doğaya ve canlılara birçok yararlar sağlamaktadır. Nanopartiküllerinin en büyük yararı tıp alanındadır. Geleneksel yöntemlerle tedavi edilemeyen hastalıklar kolayca nanopartiküller kullanılarak tedavi edilebilir. Nanoteknoloji araştırmaları hastalar için yeni ürünler ve araçlar ile yeni tedavilere, modern teşhislere, tedavi yöntemlerine ve hayati materyallere ihtiyaç duyarlar [44].

Hastalıkların erken teşhisi ve tedavisi ile yaşam kalitesini, yaşam standartlarını ve insan yaşamını arttırmak mümkündür, nanopartiküller tüm bunları başarmak için vazgeçilmez hale gelmiştir [41].

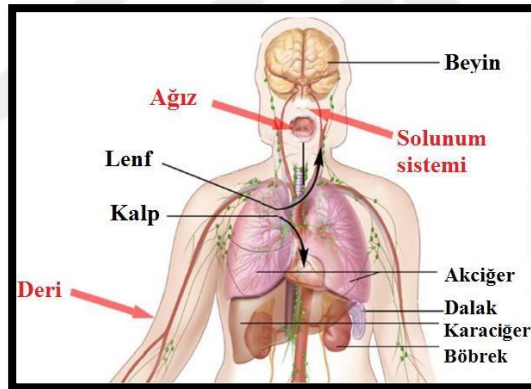
Nanopartiküller her gün yeni bir avantaj sunmaktadır. Elektronik, ilaç, medikal cerrahi, gıda, ambalaj, aydınlatma, giyim vb. alanlarında kullanılmakta, ama herhangi bir bilimin yapabileceği iyiliğin her zaman yan etki olasılığı vardır. Bilimsel araştırmaları ve yeteneklerin kötüye kullanımını önlemek için bir kontrol ve denge sistemi mevcuttur [45].

Nanopartiküllerin dünyaya sunduğu avantajlar ve gelişmelere rağmen, nanoteknolojinin yayılması konusunda ciddi tartışmalar yaşanmakta ve böylece son zamanlarda dünyada dezavantajlarıyla bağlantılı potansiyel riskleri beklenmektedir [46].

1.4.5. Nanopartiküllerin Hedef Organlar Üzerindeki Toksik Etkileri

Çeşitli hayvan modellerini kullanan son çalışmalar, nanopartiküllerin farklı organlarda biriktiğini ve farklı sağlık risklerine neden olma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmaların çoğu kısa süreli nanopartiküllere maruz kalan sistemler kullanılarak yapılmıştır. Nanopartiküllerin uzun vadeli etkilerini değerlendiren daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır [47].

Nanopartiküllerin toksikokinetik özelliklerini değerlendiren bazı çalışmalar mevcutken bunların birçoğu sadece toplam ilacı veya yükü incelemekte, ancak nanopartikülleri kendileri ölçmemekte veya kapsüllenmiş ilacın oranını belirlememektedir. Sonuç olarak ilaç nanopartikül sistemlerinin gerçek farmakokinetikleri iyi tanımlanmamıştır. Ayrıca akciğerler, karaciğer, dalak ve böbrekler de dahil olmak üzere birçok nanopartikülün biriktiği dokularda benzer sorunları ele almak için ek stratejilere ihtiyaç vardır [48].



Şekil 2.4. Nanopartiküllerin Giriş Yolları ve Etkiledikleri Başlıca Sistemler [49].

1.4.6. Nanopartiküllerin Maruziyeti ve Toksisitesi

Nanopartikül maruziyeti ve toksisitesi yoğunluğun artmasıyla kullanılan nanomalzemeler, hem iş sağlığı hem de halk sağlığına maruz kalmaya yol açar. Deriye maruz kalmanın aksine, nanopartiküller bir görüntüleme ajanı olarak veya doğrudan teşhis ve teşhiste, bir görüntüleme ajanı olarak veya biyolojik bir sensör olarak doğrudan transplantasyon yoluyla aktif veya yardımcı bir ajan olarak verilebilir [50].

Nanopartiküller, parçacık boyutuna ve yüzey özelliklerine bağlı olarak birçok cihaz ve sistem tarafından absorbe edilebilir ve reaksiyona girebilir. Ancak ana maruziyet yolları solunum sistemi, gastrointestinal (GI) sistem ve deri iken ikincil hedef organ olarak böbrek, kalp ve beyin söylenebilir [51].

Nanopartiküllerin toksik etki potansiyelleri partikül boyutu, aglomerasyon/agregasyon derecesi, boyut dağılımı, şekli, kristal yapısı, kimyasal kompozisyonu, yüzey kimyası, yüzey yükü, yüzey alanı, miktarı, çözünürlüğü gibi fizikokimyasal parametrelere bağlı olup farklı hücre ve dokularda farklı yanıtlara sebep olabilmektedir [52].

Son yıllarda nanopartiküllerin toksik potansiyeli üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen yeni parçacık tasarımlarının, tasarım yöntemlerinin ve parçacık kullanımının sonuçları yetersizdir. Genel olarak, nanopartiküllerin toksik etkileri için mekanizmalar aşağıdaki şekilde rapor edilmiştir;

- Hücre duvarı ve plazma zarı hasarı
- Elektron transport ve aerobik solunum ile etkileşim
- Oksidatif stres indüksiyonu
- Hücre sinyal yolağında aktivasyon
- İyon dengesinde bozulma
- Bazı nanopartiküllerden toksik metal iyonlarının açığa çıkması
- Lizozomal membran bütünlüğünde bozulma
- Fagositoz olayının gerçekleşmemesi, yetersizlik
- Hücre iskelet fonksiyonları ile etkileşim
- DNA ve kromozomal hasar

Nanopartiküllerin çevre ve insan sağlığı üzerine etkileri konusunda çalışmalara son 15-20 yılda hız verilmesine rağmen toksisite ile ilgili cevaplandırılması gereken halen birçok eksik nokta mevcuttur [53].

Nanopartiküller arasında bizmut nanopartikülü, küresel nanopartiküllerin bir çeşididir ve karışık renkler veya belirgin aglomerasyonu yoktur ve kendine has özellikleri nedeniyle yoğun olarak çalışılmıştır [54].

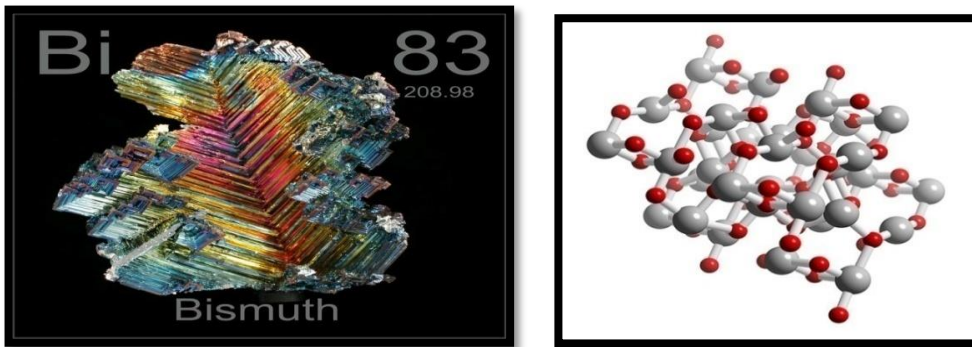
1.5. Bizmut ve Tarihte Kullanımı

1.5.1. Tarihçe

Bizmutun antik çağda Asya, Mısır, Roma ve Çin'de kullanıldığına dair bazı bilgiler bulunmaktadırdır. İnkaların da bronz alaşımlarıyla bıçak yapımında kullandıkları rapor edilmiştir. Ancak ilk olarak 1450 yılında Alman keşiş Basil Valentine tarafından tanımlanmıştır. İlk bulunduğu yıllarda kurşun ve kalay ile karıştırılmıştır. 1753 yılında Claude François Geoffroy tarafından kalaydan daha ağır bir metal olduğu ve kurşun formu olmadığı tespit edilmiştir. Eski Almandada bizmut için "beyaz kütle", "beyaz madde" anlamındaki "wissmuth" kelimesi kullanılmıştır. Daha sonra bu kelimedden Latince "bisemutum" kelimesi türetilmiştir [55].

1.5.2. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bizmut, kimyasal sembolü "Bi" olan bir yarı metaldir , Bizmut periyodik tablonun 5A grubundaki azot ailesinin en metalsi ve en az bulunan elementidir. Bizmut, bütün metaller içinde en diyamagnetik ve cıvadan sonra ısı iletkenliği en düşük olanıdır. Parlak, kaba kristalli ve gevrek bir metaldir; çok sert ve sünek olmamakla birlikte oldukça dövülendir. Doğada genellikle element halinde bulunur. Bazı durumlarda sülfür ve oksit gibi bileşikler halinde bulunabilir. Çoğunlukla kalay, kurşun gibi cevherlerle bir aradadır ve arıtma sırasında bir yan ürün olarak ayrılır. Bizmut oda sıcaklığında kararmayan bir metaldir ancak ısı ile temas ettiğinde yüzeyinde kahverengimsi sarı renkte bir oksit katmanı oluşur. Bizmut tuzları tıpta sindirim bozukluklarının tedavisi, sindirim yollarının X ışınlarıyla incelenmesi, deri yaralarının ve enfeksiyonlarının tedavisi gibi alanlarda kullanılır [56].



Şekil 2.5: Bizmut Elementi [57].

Elektrik iletkenliği düşük ve ısı iletkenliği cıvadan sonra en düşük elementtir. Katılaştığında ve soğurken genişleme yüzde oranı 3.3'e kadar genişler ve hacmi büyür. Sodyum hidroksitte ve klorür asidiyle beyaz bir çökelti oluşturur [58].

Bizmutinit veya bizmut trisülfür önemli bizmut mineralleridir. Bu minerale “bizmutglans” denir. Bizmutun en önemli ikinci minerali magmatik kayalarda manyetit, pirit, kalkopirit, sfalerit, galenit gibi minerallerle birlikte kalay-tungsten yataklarında bulunan bizmut trioksittir [58].

Tablo 2.2. Bizmut Elementinin Özellikleri[59,60].

Özellik	Değer
Atom Numarası	83
Grup	Metal
Kristal Yapısı	Rombohedral
Atomik Ağırlığı	208,98037
Proton Sayısı ve Elektron Sayısı	83
Nötron Sayısı	126
Değerlik (valans)	3,5
Erime Noktası	271.3 °C
Kaynama Sıcaklığı	1560 °C ±5 °C
Yoğunluk	9.8 g/cm ³
Özgül Isı	0.12 J/gK
Manyetiklik	Diyamanyetik

1.5.3. Kullanım Alanları

Bizmut katı halde genişleme özelliği sebebiyle ince ayrıntılı metal döküm parçalarının üretiminde kullanılır. Bazı kimyasal işlemlerde iyi bir katalizördür. Bizmutun radyoaktif izotopu Bi-210, nükleer sayma aletlerinin ayarları için beta standardı olarak kullanılmaktadır. Bazı bileşikleri boyalarda pigment ürünü olarak kullanılır. Lehimlerde kurşun yerine kullanılabilir. Düşük erime noktalı alaşımlar oluşturmak için kalay, demir ve kadmiyum gibi metallere bizmut katılır. Bizmut alaşımları katılaştığında hafifçe donar. Bu sebeple kalıplarda çok net ve keskin hatlar oluşturur. Bizmut alaşımlı dökümler, plastik veya başka bir malzeme ile kaplanabilir. Nükleer reaktörlerde soğutma sıvısı olarak kullanılabilir. Bizmut, bileşik ve alaşımlarının kullanıldığı bazı ürünler şunlardır; özel lehimler, otomatik püskürtme başlıkları, otomatik kapı düzenekleri, elektrik sigortaları, basınçlı gaz silindirlerinin güvenlik tapaları, yangın dedektörleri, termoelektrik sistemler, akrilik lifler, boyalar, plastikler, kozmetik ürünler, özel yapıştırıcılar, seramik, porselen, cam, radyografi, ilaçlar, akrilik elyaf, lehimler, plazma ekranlar, diskler, yakıt depoları emniyet aparatları, tüfekler, gres yağları vb. Bizmutun doğadaki tek izotopu Bi-209'un yarılanma ömrü 19 kentilyon yıldır. Buna göre bizmutun, evrenin yaşından 1 milyar kat daha fazla bir sürede bozunduğu anlamı çıkmaktadır.

100 gram bizmut, evrenin başlangıcı olarak varsayılan 14 milyar yıl önce herhangi bir yerde bulunsaydı bugüne kadar gramı bozulmadan ulaşabilirdi. Bizmut olağanüstü uzun yarılanma ömrü sebebiyle bilinen bütün kimyasal, tıbbi ve endüstriyel uygulamalar arasında en kararlı ve radyoaktif olmayan madde gibi muamele görmektedir. Bizmut tuzları, sindirim sistemi bozuklukları, yaralar ve enfeksiyonların tedavisi için bazı ilaçlarda kullanılır ve bazı egzama türlerinde toz formu doğrudan uygulanabilir. Uzun süre aşırı oranda bizmuta maruz kalan bir insanda zihin bulanıklığı, hafıza kaybı, koordinasyon eksikliği, spazmlar, eklem ağrıları ve kalp rahatsızlıkları görülebilir. Mide rahatsızlıklarında kullanılan ilaçlarda bizmut bileşenleri bulunmaktadır [60].

1.5.4. Bizmut Nanopartiküllerinin Toksikitesi

Bizmut bileşikleri, soluma veya yutmanın ardından orta düzeyde emilimi azdır, fakat ölçülmüş veriler yoktur. Bizmutun en yüksek konsantasyonlara ulaştığı organlar böbrek ve karaciğerdir. Bizmut esas olarak idrarla atılır. Tüm vücuttaki tutulum sonucunda biyolojik yarılanma süresi 5 gündür, ancak bizmut bileşikleriyle tedavi edilen hastaların böbreklerinde yıllarca kaldığı rapor edilmiştir. Yüksek düzeyde maruziyet, proksimal renal tübüllerin dejenerasyonu ve nekrozu, yağlı değişiklikler, karaciğer nekrozu, nörodejenerasyon, deri döküntüleri ve bağırsak pigmentasyonu ile ilişkili böbrek yetmezliğine yol açtığı rapor edilmiştir. Mesleki maruziyet bildirilmemiştir. Genel nüfus için gıda ile günlük tüketilen miktar 5-20µg olup çok daha az miktarda hava ve suda bulunduğu rapor edilmiştir. Geçmişte nüfusun belirli sektörlerinde önemli bir ölçüde maruz kalmasının sonunda bizmut bileşikleri terapötik olarak kullanılmıştır. Bizmut bileşiklerinin kozmetik kullanımı hala yaygındır. Bizmut subnitrat, kalp ve böbrek dokularında metalotiyonin indüklemek ve sırasıyla doksorubisin (Adriamisin) ve sisplatin bileşiklerinin toksisitesini azaltmak için kullanılmıştır[61].

Bizmut bileşikleri aynı zamanda nanomalzemelerin üretiminde ve özellikle bakteriyel mide-bağırsak enfeksiyonları tedavisinde de kullanılmıştır. Bizmutun radyoizotopları radyasyon tedavisi için değerlendirilmektedir [62,63].

1.5.5. Bizmut Oksit

Bizmut oksit, rombik şekilli kristaller ile karakterize edilen kokusuz sarı bir tozdur. endüstride yaygın olarak bulunan bizmut bileşiklerinden biridir. Bizmut cevherinin ürettiği ham maddedir [58].

Nanoteknoloji laboratuvarlarında yüksek hassasiyetle saflık ve tane boyut değerlerine bağlı kalarak üretilen Bi_2O_3 nanopartikülleri optik ve elektronik uygulamalar için geliştirilmiştir [64].

Bizmut oksit insanlar için en az zehirli ağır metal olarak görülür ve iyi antibakteriyel özellikleri için tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılır. Bizmut oksit nanopartikülleri in vivo ve in vitro deneylerde farklı boyutlarla kullanılmıştır. Bizmut oksit nanopartikülleri insan lenfositlerinde ve murin fibroblast hücrelerinde komet yöntemi ile genotoksik aktivite göstermediği belirlenmiştir ve ayrıca hücre ölümünü tetiklediği bildirilmiştir. Bazı bizmut oksit bileşiklerinin antibakteriyel aktivite sergiledikleri, antitümör, antifungal ve sitotoksik aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir. Abudayyak ve arkadaşları bir çalışmada memeli hücrelerinde Bi_2O_3 nanopartiküllerin toksisitesini değerlendirmek için karaciğerde (HepG2 hepatokarsinoma hücresi), böbrek (NRK-52E böbrek epitelyal hücresi), bağırsakta (Caco-2 kolorektal adenokarsinoma hücresi) ve akciğerde (A549 akciğer karsinom hücresi) toksik etkilerini araştırmışlardır. Bi_2O_3 nanopartiküllerinin (~ 149.1 nm) tüm hücreler tarafından kolayca alındığı ve sitotoksik ve genotoksik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir [65].

Nanopartiküllerin, birçok mikroorganizma kökenli enfeksiyon hastalıkları başarıyla tedavi etmek için yeni bir alternatif olduğu belirtilmiştir. Son zamanlarda, sıfır-değerli bizmut koloidal nanopartiküllerinin bakterisit aktivitesinin *Streptococcus mutans* büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu alanda yapılan bir çalışmada 77nm boyutunda kullanılan Bizmut oksit nanopartiküllerinin *Candida albicans'a* karşı fungisidal aktivitesi ve bunların antibiyofilm yetenekleri analiz edilmiştir ve bizmut oksit, bizmut metalik tuzunun ve bizmut nitratin antimikotik aktiviteleri de karşılaştırılmıştır [66].

1.6. MDBK Hücre Hattı Genel Özellikleri

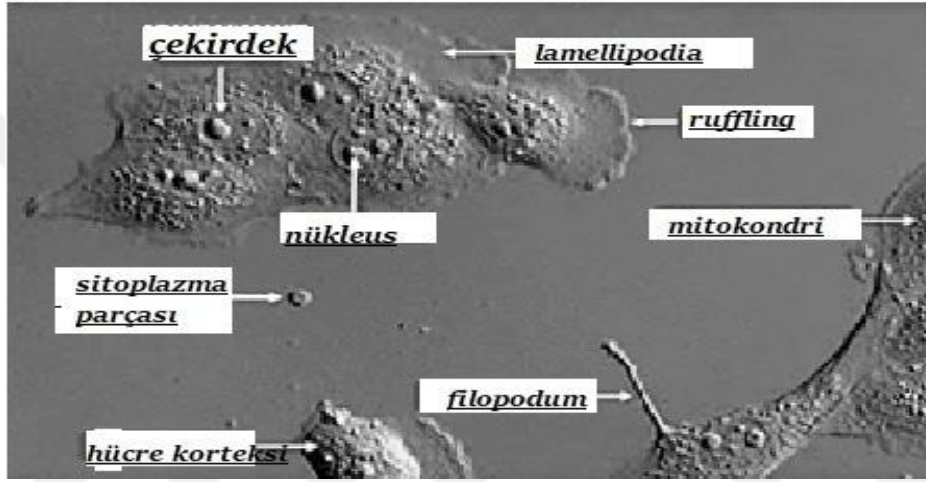
Yetişkin bir sığırın (*Bos taurus*) böbrek dokusundan elde edilen epitelyal hücre hattıdır. Hücreler orijinal olarak Temmuz 1967'de donmuş bir ampul (F-145) olarak ATCC (American Type Culture Collection)'den elde edilmiştir. Özellikle viral kontaminantların tespitinde kullanılan bir hücre hattıdır [67].



Şekil 2.6. a. Primer Sığır Böbrek Hücreleri, 100X. b. 32. Alt kültürde kurulmuş Sığır Böbrek Hücreleri (MDBK), 100 X. c. Vesiküler Stomatitis Virusun Enfekte Etmış Olduğu MDBK Hücreleri, 100 X. [68]

Dünya çapındaki laboratuvarlarda çeşitli uygulamalar için epitel hattı kullanılmaktadır. Bu epitelial hücre hattı, aşilar olarak uygulanan zayıflatılmış virüslerin üretiminde kullanılmaktadır.

- **Morfoloji ve Üreme Özellikleri:** Yapışık, epitelyum benzeri hücreler.
- **Organizma:** *Bos taurus* (sığır) - **Doku:** **Organ:** Böbrek - **Hastalık:** Normal, erkek.
- **Ortam:** Temel Besleyici Ortam (Eagle) (2 mM L-glutaminli) ve Earle' ün BSS (1. 5 g/L sodyum bikarbonat).
- **İmmunolojisi:** Hüresel keratin için immünofloresan ile pozitif [68,69].

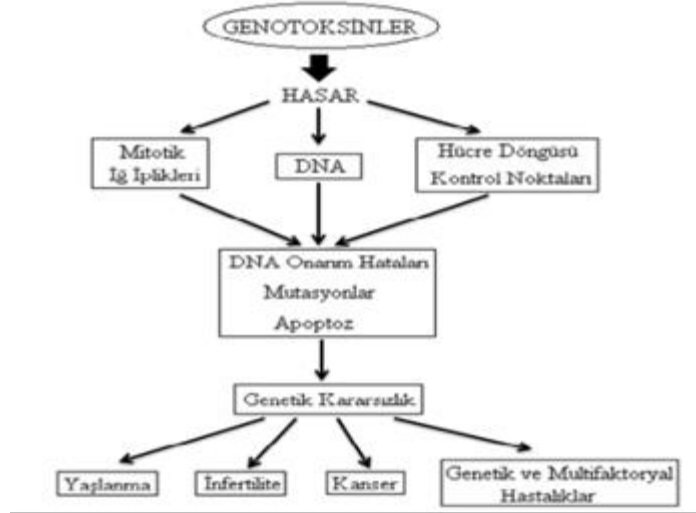


Şekil 2.7. Madin-Darby Sığır Böbrek(MDBK) Hücre Hattı [70].

1.7. Genotoksisite

Toksikolojinin dalından biri genetik toksikoloji, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında hücrelerin DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir disiplindir ve farklı ajanların meydana çıkardığı genetik hasarın değerlendirilmesinde önemli bir rol oynar.

DNA molekülünde mutasyonlara sebep olan DNA üzerindeki ajanlar ya da mutajenler, etkilerini doğrudan veya genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterirler. DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yolaklardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açmaktadır [71].



Şekil 2.8. Genotoksinlerin DNA Üzerindeki Etki Mekanizması ve Sonuçları [71].

Genetik bilginin nesiller arasındaki güvenli transferini sağlamak için DNA yapısını korumalıyız. DNA, çevresel faktörleri veya normal metabolik aktiviteler gibi birçok zararlı etkene sürekli maruz kalır ve hasara neden olur. DNA hasarı, kendiliğinden veya DNA'nın doğal metabolizması sırasında çevresel faktörlerin etkisi altında oluşabilir. Ancak DNA tamir yolları, meydana gelebilecek DNA hasarını tanımlamak ve düzeltmek için hücrede sürekli olarak aktive edilir. DNA hasarı kısa vadede, replikasyonun durmasına, proteolitik aktivitenin indüksiyonuna, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, deoksiribonükleotid trifosfat miktarı ve bileşiminde değişikliklere; uzun dönemde ise mutasyona ve kromozom anomalilerine neden olur. DNA hasarı az ölçüde ise DNA onarım mekanizmaları tarafından verimli bir şekilde tamir edilir. DNA hasarı ağır seviyede apoptotik mekanizmaları uyararak hücre ölümüne sebep olur. Orta dereceli hasarlar çoğunlukla mutasyonla ortaya çıkmaktadır. Normal DNA metabolizması sırasında DNA hasarı kendi kendine ya da çevresel etkenlerin etkileriyle oluşmaktadır [72].

Genotoksisiteyi belirlemek için farklı yöntemler tanımlanmıştır:

1. Kromozom anormalliği testi.
2. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi.
3. Kardeş kromatid değişimi testi
4. Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz ileri mutasyon testi.
5. Mikroçekirdek testi.
6. Bakteriyel geri mutasyon testi
7. Tek hücre jel elektroforezi [73].

1.8. Tek Hücre Jel Elektroforezi (KOMET- THJE)

Gen düzeyinde DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) molekülü üzerinde oluşan kırıkların tayini prensibine dayanan Komet yöntemi, pek çok DNA hasarının ve onarımının belirlenmesinde, biyoizleme ve maruziyet çalışmalarında yaygın kullanım alanı bulmuştur. Komet yöntemi, basit, hassas ve hızlı bir yöntem olduğundan genetik toksikoloji çalışmalarında oldukça kullanışlı ve tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Bu hasarların başlıcaları;

- Oksidatif DNA hasarı,
- Tek ve çift sarmal kırıkları,
- DNA'da mutasyonlar,
- DNA ilaç etkileşimleri gibi bir takım yapısal bozulmalardır [73].

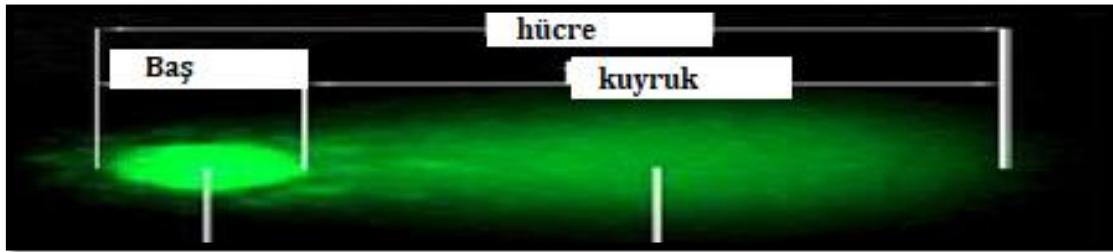
Komet yöntemin kromozom aberasyonu (KA), kardeş kromatid değişimi (SCE), mikronukleus (MN) gibi DNA hasarı belirlemede kullanılan sitogenetik test yöntemlerine göre avantajlara sahiptir [74]:

1. Komet yöntemi düşük düzeydeki DNA hasarlarını gösterebilmesi
2. Az sayıda hücre ile analizin gerçekleştirilebilmesi
3. Fazla ekipman gerektirmemesi
4. Kolaylıkla uygulanabilmesi
5. Ucuz ve hızlı elde edilmesi
6. Değişik hücre ve doku grupları ile çalışılabilmesi
7. Sonuçların birkaç saat içinde elde edilip değerlendirilmesi
8. Güvenli ve ekonomik olması nedeniyle giderek yaygınlaşan bir kullanım alanı bulmaktadır [75].

Nötral teknik ilk olarak 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından modifiye edilerek hücredeki DNA hasarının doğrudan gösterilmesinde "Microgel Electrophoretic Technique" olarak sunulmuştur. Ostling ve Johanson agarozda süspanse edilerek radyasyona maruz bırakılmış hücreleri lam üzerine yaymış ve ardından yüksek tuz ve deterjanla muamele işlemine ve ardından elektroforeze tabi tuttukten sonra akrinin oranj gibi DNA boyayabilen floresan bir boya ile boyamışlardır. Eğer DNA kırık içeriyorsa, gevşemiş ve kırılmış DNA fragmanları nedeni ile elektrik yük kazanmış olan DNA, çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü vermiş, bu nedenle hasarlı hücreler COMET olarak adlandırılmıştır. DNA hasarını saptamak için kuyruk uzunluğu ölçülmüş, ve kuyruk uzunluğunun radyasyon dozunun fonksiyonu olduğu rapor edilmiştir. Ancak nötral şartlar altında proteinlerin tam olarak uzaklaştırılmaması nedeniyle DNA çift sarmal kırıklarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek

sarmal kırıklarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysa DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan çift sarmaldan çok tek sarmalda hasar meydana getirmektedir [75].

Bu nedenle Singh ve ark. (1988) bazik komet metodunu tanımlamışlardır. Böylece "tek sarmal kırıkları" denilen ve sadece bazik teknikle ortaya çıkarılabilen DNA tek sarmal kırıklarının tanımlama imkânı doğmuştur. Kullanılan daha güçlü lizis koşulları proteinlerin % 95 inden fazlasını yok edebilmekte, böylelikle modifiye edilmiş THJE tekniği bireysel hücrelerin hemen hepsinde DNA hasar büyüklüğünün doğrudan tespitini sağlamaktadır. Hasara uğramamış olan DNA çekirdek sınırları içerisinde yapısını korumaktadır. DNA hasara uğradığında yapı bozulmaya başlar. Bu durumda DNA zincirleri yoğunlaşmış yapılarını kaybederler ve ana çekirdek bölgesinden dışarı doğru uzanırlar. Ortama bir elektrik akımı uygulandığında DNA yapısı itibarıyla katoda (+uç) doğru hareket etmektedir. Ana çekirdeği oluşturan ve hasarlı olmayan DNA zinciri çok büyük olduğu için çekirdek bölgesini terk edemeyip yerinde kalmaktadır. Diğer taraftan küçük DNA parçaları akım uygulama sürecine bağlı olarak ana DNA'dan ayrılarak göç edebilmektedirler. Böylece ana çekirdek bölgesini terk eden DNA'nın miktarı hücrede meydana gelen DNA hasarının miktarının göstergesi olarak kabul edilmektedir. Lam üzerinde agar gömülmüş haldeki hücrelerde kırık uçlar elektroforez işlemi esnasında pozitif elektrot tarafına doğru hareket ederler ve floresan boyama ile gözlenebilen kuyruklu yıldız (KOMET/COMET) benzeri görüntüler meydana gelir [76].



Şekil 2.9. DNA Hasarında Baş ve Kuyruk [77].

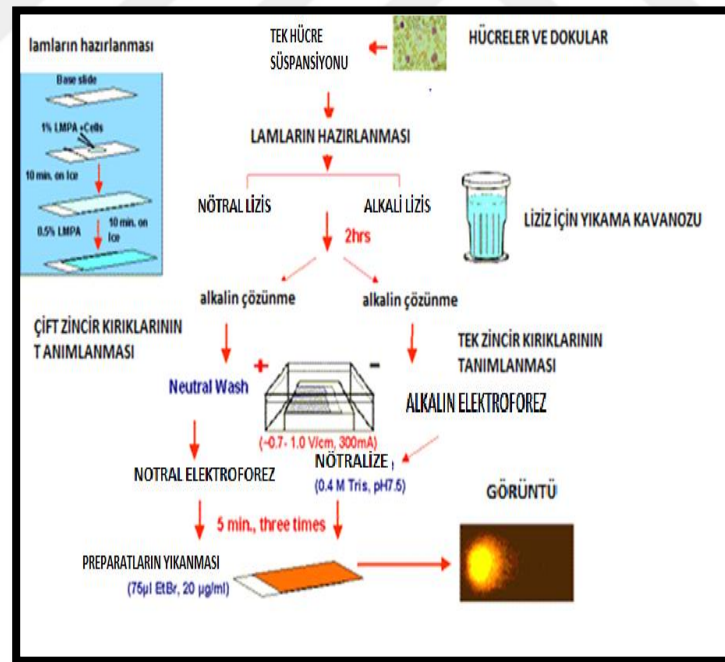
Komet Testinin Özelliklerine Bakıldığında;

- Pratikdir.
- Güçlüdür.
- Çok yönlüdür.
- Güvenilir, hızlı ve duyarlıdır.
- Analiz için az sayıda hücre yeterlidir.
- Göreceli olarak ucuz ve uygulaması kolaydır.
- Tek bir hücre düzeyinde elde edilen veriler oluşturur.

- Hem bölünen hem de bölünmeyen hücelere uygulanabilir.
- DNA onarım ve onarım kinetiğinin çalışılmasında da kullanılabilir.
- Sadece DNA hasarlarının varlığını belirlemekle kalmaz tipini de belirler.
- Kültüre alınmış hüceler ve doğrudan canlıdan alınan hücelere uygulanabilir.
- Prokaryot ve ökaryotik organizmalardan bir çok hücre tipine uygulanabilir [71].

KOMET yönteminin genel basamakları

- I. Hücelerin izolasyonu
- II. Preperatların hazırlanması
- III. Lizis
- IV. DNA sarmalının çözülmesi
- V. Elektroforez
- VI. Nötralizasyon
- VII. Boyama
- VIII. Değerlendirme ve sayım

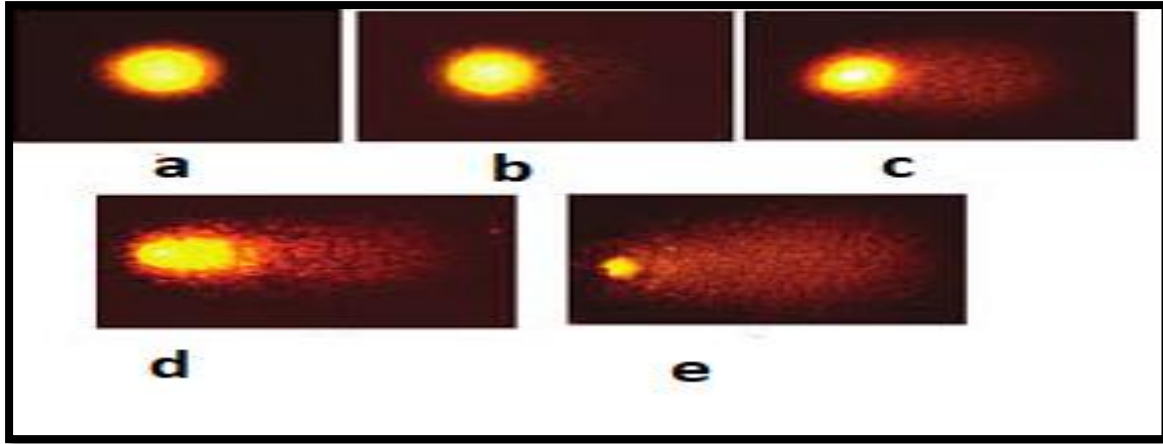


Şekil 2.10. KOMET Yönteminin Genel Basamakları [76].

1.8.1. Komet Testinin Aşamaları :

- I. **Preparasyon Aşaması;** Bu aşamada, hücreler agar ile karıştırılarak lam üzerine yayılır.
- II. **Lizis;** Bu aşama agara gömülü halde lam üzerine yayılmış olan hücrelerin hücre zarı ve proteinlerin yıkımını içermektedir. Bu aşamada çıplak DNA elde edilir. Bu işlem için önceden hazırlanan ve +4°C'de soğutulmuş saklanan lizis solüsyonu kullanılmaktadır. Lizis çözeltisindeki tuz; DNA'nın proteinler ve hücre ile olan bağlarını ve RNA (Ribo Nükleik Asit) yapısını bozmaktadır. Deterjanlar ise hücre membran yapısını bozar. Böylece lizis uygulaması sonucunda hücre yapısındaki membran, proteinler, RNA ile sitoplazmik ve çekirdek bileşenleri parçalanmaktadır. Bunun sonucunda da nükleoid olarak adlandırılan ve komet oluşumunun gözleneceği DNA yumağının kalması sağlanmaktadır.
- III. **DNA Sarmalının Açılması (Unwinding);** Bu aşamada lizis işleminden geçirilen preparatlar elektroforez tankına yerleştirilir ve tank soğuk elektroforez çözeltisi (pH:13) ile doldurulur. Bu esnada DNA zincirleri ayrılarak tek iplik haline gelmektedirler. Böylece bazik şartlar altında yürütülen bu test alkali komet testi olarak adlandırılmaktadır.
- IV. **Elektroforez Aşaması;** Bu aşamada DNA sarmalının açılması işlemi tamamlanan preparatlara aynı tank solüsyonu içerisinde elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu esnada; tek iplik DNA üzerindeki kırık parçalar ve kırılma ile oluşan DNA ilmekleri eksi (-) yüklü olmaları nedeniyle boyutlarına bağlı olarak değişen hızlarda artı (+) uca doğru göç etmektedirler.
- V. **Nötralizasyon;** Elektroforez işleminden sonra tanktan çıkarılan preparatlar nötralizasyon işlemine alınmaktadır. Buradaki amaç pH ayarlamasını sağlamaktır. Bunun için preparatlar soğuk nötralizasyon tamponu içeren şalelere alınmak ya da tamponu direkt olarak üzerlerine damlatmak suretiyle nötralize edilmektedir.
- VI. **Değerlendirme;** Etidyum bromür ile boyanan preparatlardan floresan mikroskop ile elde edilen DNA görüntüleri değerlendirilir. Komet yönteminde sonuçların değerlendirilmesi için farklı teknikler kullanılmaktadır. Burada kullanılan en yaygın parametreler; kuyruklu hücrelerin yüzdesi, kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentidir. Gelişmiş teknolojik imkanlara sahip olmayan laboratuvarlarda hasarlı hücreler görsel sayma yöntemi ile değerlendirilmektedir. Teknikte hasarsız hücrelerin incelenmesinde yuvarlak kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümü vardır. Hücrelerin bu görünümü göç etmemiş olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamış ise göç uzunluğu fargmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyesine bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçü nedeniyle düzensiz kenarlı bir görünüm alır. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu görünüme düşük düzeyde göç denir. Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız (comet, yüksek göç) şeklini alır. Son aşama ise

apoptosistir. Bu uzama hasar ile doğru orantılıdır. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesine eşitir [75].



Şekil 2.11. a.Normal DNA, b, c, d ,e : Hasarlı DNA (Komet)[72].

Oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri çeşitli alt kategorilerde sınıflandırılarak puanlandırılır. Hasar bulunmayan DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar hasarın derecesine göre 1 den 4'e kadar puan verilir ve sonuçlar arbitrary unit (AU) olarak değerlendirilir. Gelişmiş laboratuvarlarda sonuçların değerlendirilmesinde kamera bağlı, bilgisayar sistemine sahip görüntü analiz sistemiyle hasarlı hücrelerin baş uzunluğu baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi gibi çeşitli komet parametreleri ölçülebilmektedir. komet ölçümü için özel bilgisayar yazılımları kullanılarak bu parametreler başarılı ve objektif olarak ölçülür [75].

Son yıllarda geliştirilen Laser scanning microscopy (LSM) teknolojisi ile sarmal kırıklarındaki farklılıklar kolaylıkla belirlenebilmektedir. Canlı popülasyonlarının genetik bütünlüğü, kimyasal ve fiziksel genotoksik ajanlara maruziyetle sonuçlanan endüstriyel faaliyetler, yaşam biçimi, çeşitli tıbbi tedaviler, iklim değişiklikleri ve birçok stres faktörü nedeniyle giderek artan bir baskı altındadır. Gözle sayım, Tip 0 (kuyruk yok)'dan Tip 4 (hemen hemen tüm DNA kuyruk bölgesinde)'e kadar beş farklı kategoride incelenmektedir. Her örnek için 100 komet sayılır ve sayılırken her bir komet görüntüsüne 0-4 arasında değer verilir. Sonuçta toplam skor 0-400 arasında bir değer olarak karşımıza çıkmaktadır. Gözle yapılan analize göre 5 sınıfa ayrılan kometlerin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan parametrelerden iki tanesi hasarlı hücre yüzdesi ve genetik hasar indeksidir.

Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY)= Tip 2 + Tip3 + Tip4 .

Genetik Hasar İndeksi (GHI)= [Tip 1+ (2xTip2)+(3xTip3)+(4xTip4)] [78].

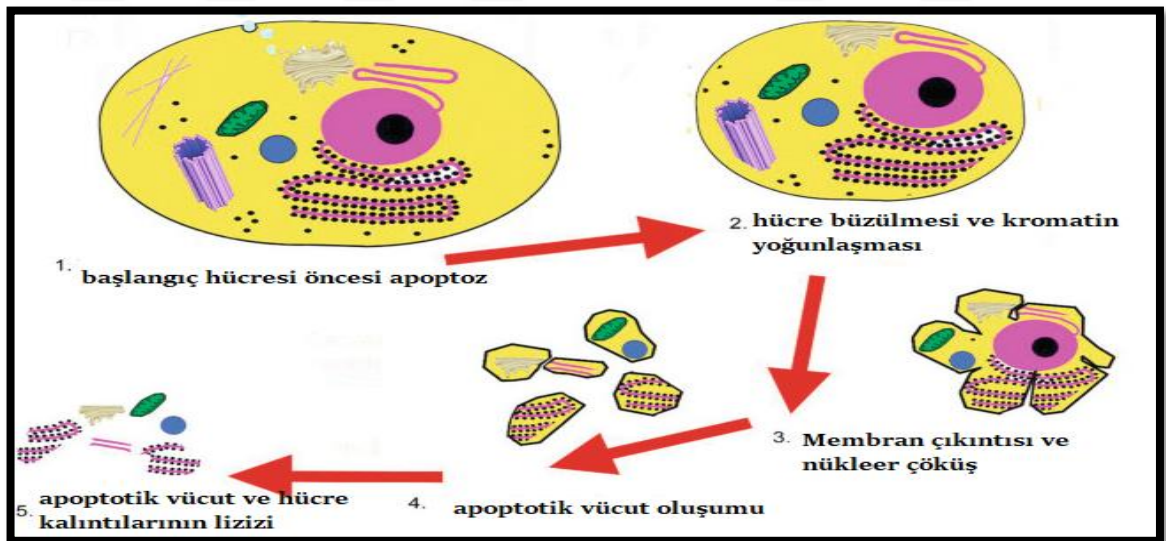
1.8.2. Komet Testinin Dezavantajları

Tekniğin aşamalarındaki bazı farklılıklar farklı sonuçlara yol açsa da, aynı protokolü uygulayan farklı laboratuvarların sonuçlarında da farklılık olabilmektedir. Bu değişiklikler genellikle sayımı gerçekleştiren kişilerden kaynaklanmaktadır [75].

1.9. Apoptozis

Canlılarda her hücrenin belli bir yaşam süresi vardır. Hücre ölümüyle hücre çoğalması arasında kontrollü bir denge vardır. Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz Yunancada ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal anlamına gelir. Apo: ayrı, Ptozis: düşme demektir. Apoptoz terimi ilk kez 1972'de Avusturyalı bir patolog olan J.F.K. Kerr tarafından kullanılmıştır. Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, inflamatuvar cevap oluşturmadan hücrelerin ölümü ile sonuçlanan bir seri kontrollü olaylar zinciridir. İstenmeyen hücrelerin uygun zamanda çevre dokularda herhangi bir hasara neden olmadan ortadan kaldırılması ve hücre dönüşümünün düzenlenmesi sırasında görülür [79].

Organik olaylar, hücrelerde büzülme ve şişkinlik, nükleer parçalanma, kromatin ve DNA parçalanması, apoptoz sürecinin bir parçasıdır ve hücre değişir ve hücrenin ölümüne yol açar (Şekil 2.11).



Şekil 2.12. Apoptotik Hücre Ölümünün Farklı Aşamaları [80].

DNA hasarına bağlı hücre ölümü apoptoz, nekroz ve otofaji tarafından gerçekleştirilir. Bu farklı hücre inaktivasyonu formlarından apoptoz DNA hasarından sonra görülen ana ölüm yoludur. Hücreler, ölüm reseptörü veya intrinsik mitokondriyal yol aracılığıyla genotoksik stres üzerine apoptosise uğramaktadırlar. Apoptozun iki yolu vardır bir hücrenin DNA hasarının

saptanması nedeniyle kendi genlerinden veya proteinlerinden birini tahrip edecek bir sinyal aldığı "intrensek yol" demektir ve bir hücrenin, organizmadaki diğer hücrelerden apoptosisi başlatmak için bir sinyal aldığı "ekstrensek yoludur". Apoptoz, Biyoloji'de özellikle Embriyoloji ve Moleküler Biyoloji'de çok önemli bir yere sahiptir. Bu olay Gelişim Biyolojisi'nde (embriyoloji) ve temel tıp bilimlerinde birçok olayın açıklanmasında kullanılmıştır.

Bazı önemli tıbbi süreçlere neden olan ve hastalıkları önleyen bir rol oynar. Organizmaların kendi hücrelerini yok etmesine izin verdiği için önemli bir evrimsel adaptasyondur [81].

Apoptozun belirlemek için kullanılan yöntemler:

1. Floresan mikroskopisi
2. Giemsa boyama
3. Hemotoksilen-eozin boyama
4. Anneksin V yöntemi
5. Faz kontrast mikroskopisi
6. Elektron mikroskopisi
7. Western blotting
8. Kaspaz-3 yöntemi
9. TUNEL(TdT-dUTP nick-end-labelling) yöntemi
10. M₃₀ yöntemi
11. Agaroz jel elektroforezi
12. ELİSA(Enzyme linked immuno sorbent assay)
13. Akım sitometri yöntemi [82].

1.10. Akım Sitometri Yöntemi

Akım sitometri, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Akım sitometrisi ile süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece;

- Hücre ya da partikülün immunofenotipi,
- DNA içeriği,
- Enzim aktiviteleri,
- Hücre membran potansiyeli,
- Canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir [83].

1.10.1. Akım Sitometrinin Çalışma Prensibi

Her bir hücre veya partikül lazer demetinin içinden geçerken saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayılan floresan ışığı bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, analog sinyallere dönüştürülürler. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır. Histogram, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur. Ölçüm sırasında hücreler canlı veya sabit olmalıdır, ayrıca sıvı içinde hücreler tek tek askıda olmalıdır. Hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresan ışığı yayarlar. Floresan ışığın yoğunluğu her bir hücre için eş zamanlı olarak birçok farklı dalga boylarında ölçülür. Floresan propelleri hücrelerin spesifik bileşenlerinin sayılarını rapor etmek için kullanılır. Akım sitometri yöntemi aynı zamanda hücreler arası serbest kalsiyum, zar potansiyeli, pH veya serbest yağ asitlerindeki hızlı değişiklikleri de izleyebilir. Akım sitometriler; akışkanlar, lazer optikler, elektronik dedektörler, analog dijital çevrimciler ve bilgisayarları içerir. Optik kısım lazer ışığı yayar ve ışını birkaç hücre çapının oluşturduğu demet üzerine odaklar [84].

1.10.2. Akım Sitometri Uygulamaları İçin Yapılan Hazırlıklar

1.10.2.1. Hücre Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Akım sitometri ile analiz edilen hacimler çok küçük olduğu için, yaklaşık 10^3 /ml'den az olanlar konsantre edilmelidir. Hazırlık sırasında;

- Santrifüj
- Teğetsel akış filtrasyonu
- Polikarbonat zar filtreleri
- Gravitasyon filtrelemesi (nükleopor) uygun işlemlerdir [84].

1.10.2.2. Kalibrasyon ve Önemi

Çok yüksek doğruluk oranlarında sitometriler, sinyalleri değerlendirirken bazı hedef hücreleri kaçırabilirler. Araçların kalibrasyonu, kaçan hücrelerle ilgili doğrulamayı sağlar. Bu yüzden, örneklerin hücre konsantrasyonu da kalibre edilmiş olmalıdır [84].

1.10.2.3. Hücrenin Optik Özelliklerinin Belirlenmesi

İleri ışık saçılmaları hücre boyutu ile ilgili bilgiler verir. Fluorosen ile boya içeriği belirlenir. Parametrelerin her biri için hücre sinyalleri bölünerek, her bir populasyon için normalize edilebilir. Eğer logaritmik amplifikatör kullanılırsa, veriler genellikle bu normalizasyon yapılmadan önce lineerleştirilir [84].

1.10.2.4. Hücre Gruplaması(Cell Sorting)

Bazı sitometrilerin hücrelerin tüplere konuşu sırasında agar plaklar üzerinde direkt gruplanması mikrobiyologlar için bir avantajdır. Farklı bakteri, maya ve fungus türleri için, farklı görüntüleme ve hücre gruplama stratejileri olmalıdır [84].

1.10.2.5. Hücre Gruplayıcılar

Bazı akışkan sitometreler partikülleri fiziksel olarak gruplayabilir .

- Damlacık Saptırma (Droplet deflection) gruplayıcıları: Damlacık içeren hücreye elektrik yüklenir. Örnek elektrikli alandan geçerken, yüklü damlacıklar toplama cihazına sapar. Bu gruplayıcılar hızlıdır. Grublama hızı 10.000 h/sn'dir [84].
- Mekanik gruplayıcılar: Hücreler akışkandan geçerken toplanıp, yakalama tüplerinde biriktirilir. Grublama hızı 100 hücre/sn. olup yavaş, Ucuzdur, Düzeneklerin kurulması ve kullanılması kolaydır [84].

1.10.2.6. Örnek Ekstraksiyonu ve Hazırlanışı

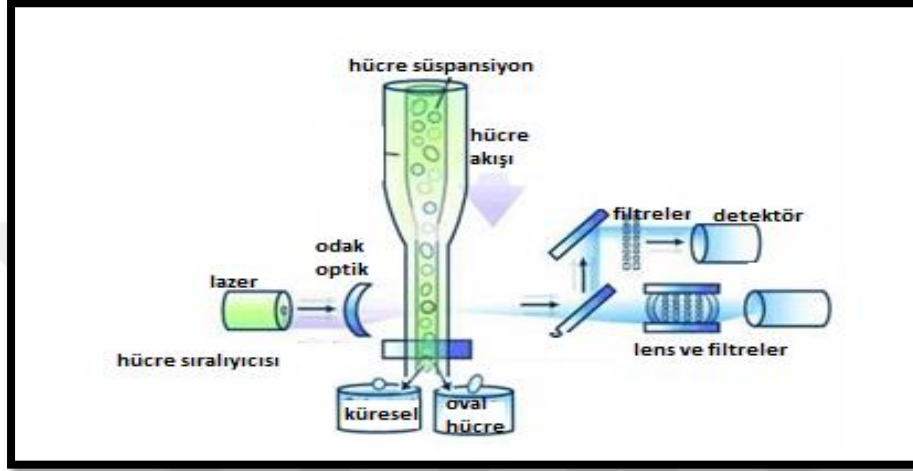
Akım sitometri serbest partiküllü tuzlu çözelti içerisinde serbestçe asılı duran hücre tiplerini analiz edebilir. Örnek türüne bağlı olarak birçok teknik uygulanabilir [84].

1.10.2.7. Etiketleme

Akım sitometri, hücre yüzeyinde veya içindeki spesifik kimyasalların varlığına çok bağlıdır. Hücreler çok küçüktür ve doğal olarak güçlü fluorosen veren molekülleri yoktur. Bu yüzden hücreler etkili fluorosen yayan kimyasal boyalarla etiketlenir. Hücreler hakkında spesifik bilgiler elde etmek için bu kimyasal boyalar yüzeydeki hücre moleküllerine veya hücre içine biyolojik olarak tutturulur [84].

1.10.2.8. Tek Sıra Akışı

Etiketlenmiş hücrelerin bulunduğu çözelti dar bir bölgeden akıtılır ve içindeki hücreler tek sıra şeklinde geçmeye zorlanır. Bu durum dar, kılcak tüpler kullanılarak veya hidrodinamik odaklanma ile sağlanır. Lazer Aydınlatması Lazer ışığı, akan örnek üzerinde hücreleri aydınlatmak üzere odaklanır. Hücrelere bağlı boya etiketler optik olarak uyarılır ve floresan yayar. Bir molekül hücrenin hızına ve odaklanan ışığın büyüklüğüne bağlı olarak farklı sayılarda yayılım yapar [84].



Şekil2.13. Hücre Süspansiyonunun Borudan Akışı ve Hücrelerin Lazer Işınından Geçerek küresel ve Oval Hücrelerin Birbirinden Ayrılması [84].

1.10.3. Akım Sitometrisi Deneyi 4 Aşamadan Oluşur:

1) Numune Hazırlama:

Hücreler özel biyoışaretleyiciler ile işaretlenir. Günümüz teknolojisi bir akış sitometrisi deneyinde yaklaşık 18 adet biyoışaretleyicinin bir arada kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır.

2) Enstrüman Kalibrasyonu:

Kalibrasyon aşamasında kullanılacak biyoışaretleyicilere göre, dedektörler ayarlanır ve kontrol örnekleri kullanılarak bu dedektörlerin kalibrasyonları yapılır. Her deney için cihaz kalibrasyonunun yapılması gerekmektedir.

3) Veri Toplama:

Bu aşamada hücreler akış sitometrisi içerisinde yer alan tüpten geçirilir ve lazerin önünde bir anda tek bir hücre geçişi olması sağlanır. Hücre ve lazer ışığının çarpışması sonucu ışık saçılır. Saçılan ışık farklı optik filtreler ile kombinlenmiş dedektörler tarafından toplanır ve ışık

yoğunluğu değerleri veri analizi için bilgisayara gönderilir. Meydana gelen saçılma hücrenin büyüklüğüne, iç yapısına ve hücrenin biyolojik özelliklerine göre farklılık gösterir.

4) Veri Analizi:

Bilgisayara gönderilen ışınma değerleri ile çeşitli saçılım grafikleri elde edilir. Bu grafikler üzerinden uzmanlar biyolojik bilgilerini kullanarak aradıkları hücre grubunun kanda olup olmadığını, varsa hangi oranlarda olduğunu tesbit edebilirler [85].

1.10.4. Akım Sitometrinin Avantajları ve Dezavantajları

2.10.4.1. Akım Sitometrinin Avantajları

- **Hız:** Hızlıdır, saniyede binlerce bireysel hücreyi test edebilme potansiyeli vardır.
- **Duyarlılık:** Hücrelerin floresansı manuel epifluoresen mikroskobu ile ölçülebilecek kadar parlak değildir. Akım sitometri ile bu hücreler belirlenip, ölçülebilir.
- **Doğruluk:** Tek tip mikro küreciklerin ışık saçılımı ve floresen ölçümleri için varyasyon sabiti (CV=standart sapma/ortalama); %1 gibi çok küçük değerde olur.
- **Gruplama:** Akım sitometrinin en güçlü ve kendisine özgü avantajı, herhangi bir optik karakteristiğe veya bunların kombinasyonlarına bağlı olarak hücrelerin fiziksel olarak birbirlerinden ayırabilmesidir. Böylece daha ileri analizler yapabilmek için, spesifik hücrelerin saf örneklerini elde etmek mümkün olur [85].

2.10.4.2. Akım Sitometrinin Dezavantajları

- **Sınırlı çözümüleme:** Akım sitometriler tipik olarak sadece ileri yapısal detayları değil de pik yapan veya entegre sinyalleri ölçebilir. Fitoplanktonları veya türlerinin nadiren belirleyebilir. Oysa hücreler optik karakteristiklerine göre sınıflandırılır. Epi floresen mikroskobu ve görüntü analizi gibi diğer metotlar bir plankton örneğinde, heterojenite ile ilgili çok daha büyük çözümüleme imkanı sağlar.
- **Küçük örnek boyutu:** Birçok akım sitometri çok küçük hacimleri (<0.5 mm) analiz eder. Oysa, hücreler en az yaklaşık 10^3 /ml olarak bulunurlar. Bu yüzden prekonsantrasyon veya cihaz modifikasyonu olmadan doğru bir şekilde analiz edilemezler. Akım sitometriler çok doğru ölçümler yapabiliyor olmalarına rağmen, bu ölçümler kullanılan örneğin özelliğine göre kalibrasyonuna bağlıdır [85].

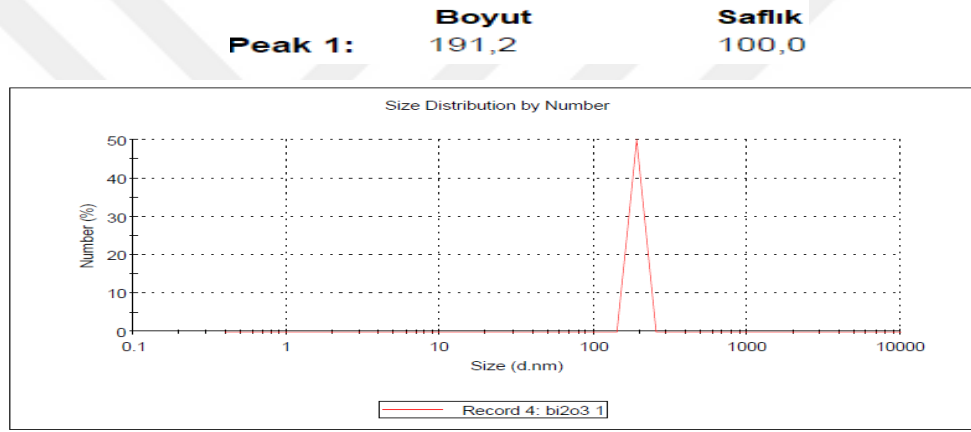
3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bizmut oksit (Bi_2O_3) (Yüksek saflıkta,% 99.95, CAS Numarası 1314-23-4 Sigma), Üreticiye göre, Bizmut oksit Nanopowder, Crystal Fazs: monoclinic, APS: 90-210 nm, Renk: sarı, Gerçek Yoğunluk: 5.89 g / cm^3 . Steril distile su kullanılarak bir Bi_2O_3 (500 μl) stok çözeltisi hazırlandı ve 4 ° C'de karanlıkta saklandı. DMEM ve fetal Buzağı serumu(Sigma). Bu çalışmada kullanılan diğer kimyasallar veya çözücüler hücre kültürü, HPLC veya analitik derecedeydi.

Bu çalışmada boyutları (90-210) nm arasında olan bizmut oksidin üç farklı konsantrasyonu(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kullanılmıştır.

Bu tezde kullanılan Bi_2O_3 nanopartikülünün boyut ölçümü MEITAM'da bulunan nanosizer cihazın (Malvern) 'nda ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları şekil 3.1'de sunulmuştur.



Şekil 3.1. Bi_2O_3 Nanopartikülüne ait Boyut Ölçüm Sonuçları

3.1.1. Bi_2O_3 Konsantrasyonlarının Hazırlanması

1,5 mg Bi_2O_3 500 μl steril distile su içerisinde çözdürüldü.

- ✓ 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bi_2O_3 konsantrasyonu için;
4x10⁵ hücre elde etmek için 990 μl medium içine hazırlanan solüsyondan 10 μl eklendi.
- ✓ 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bi_2O_3 konsantrasyonu için;
4 x 10⁵ hücre elde etmek için 980 μl medium içine hazırlanan solüsyondan 20 μl eklendi.
- ✓ 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bi_2O_3 konsantrasyonu için;
4 x 10⁵ hücre elde etmek için 970 μl medium içine hazırlanan solüsyondan 30 μl eklendi.

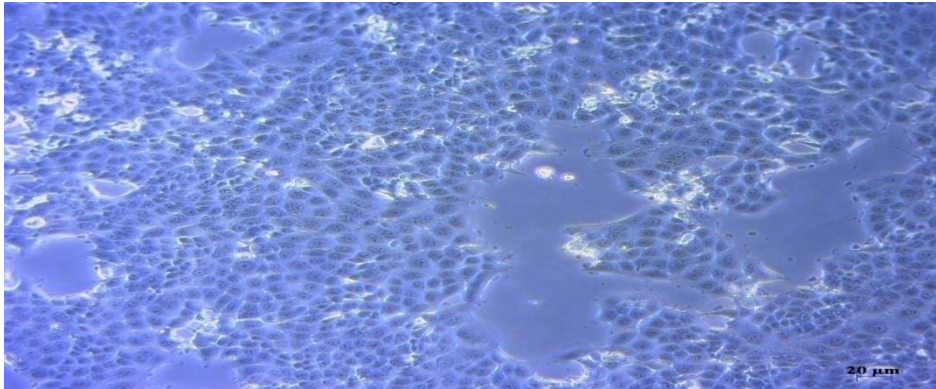
3.1.2. MDBK Hücre Kültürünün Hazırlanması

3.1.2.1. Medyum Hazırlanması

Çalışmamızda kullandığımız MDBK hücreleri için DMEM medyumunu (2,5 mM L-Glutamin+) bazal medyum olarak kullanıldı. Bazal medyum içine inaktive edilmiş %10 fetal sığır serumu (FBS) eklenerek katkılı medyum hazırlandı. Hazırlanan katkılı medyum +4°C'de muhafaza edildi.

3.1.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

% 80 oranında çoğalan hücrelerde, hücre tabakasının üzerindeki ortam steril serolojik pipet yardımıyla çekildi. 37°C'de ısıtılmış fosfat tamponlu serum (PBS) hücre tabakasının üzerine eklenerek hücrelerin üzerinde kalan ortam medyumunu uzaklaştırıldı. Ardından bu tampon da ortamdaki hücreleri uzaklaştırıldı ve ortama hücrelerin yüzeyini kaplayacak miktarda % 0,25 tripsin/PBS eklendi. Tripsin eklenmiş hücreler yaklaşık 5 dakika 37°C'de inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücre tabakasının yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskop altında kontrol edildi ve ayrılma gerçekleşmiş ise Tripsin hücrelerin üzerinden çekildi. Hücrelerin üzerinden çekilen miktar kadar katkılı medyum eklendi ve hücre öbeklerini kırmak için şiddetli bir şekilde pipetaj yapıldı. 1 ml hücre mikrofüj tüpüne alındı. Hücreler mikroskopta sayıldı. Hücrelerin ne kadar seyreltilmesi gerektiğine ve ekim konsantrasyonuna karar verildi. Karar verilen miktarda hücre, yeni flaska aktarıldı. Önceden 37°C'ye ısıtılmış yeni medyum, hücrelerin üzerine eklendi. Flask (kültür şişesi) nazikçe çevrildi ve hücrelerin eşit şekilde dağılması sağlandı. Daha sonra hücreler inkübatöre yerleştirildi. 2-3 günde bir hücreler % 80 konfluent oluncaya kadar medyum değiştirilerek inkübe edildi. Deney için yeterli sayıda hücreye ulaşana kadar bu işlem tekrarlandı.



Şekil 3.2. Sığır Böbrek Hücre Kültürleri (MDBK), 10 X.

3.1.3. MDBK Hücre Kültürü'nün Bizmut ve Hidrojen Peroksit ile Muamele Edilmesi

- MDBK hücreleri yukarıda anlatıldığı gibi 1ml taze DMEM içerisine konuldu, daha sonra 37°C %5 CO₂ küvoz içerisinde gece boyu dinlendirildi.
- Sterilize edilmiş 30 µg/ml, 60 µg/ml ve 90 µg/ml filtreler ile Bi₂O₃ nanopartikül solüsyonu ve pozitif kontrol olarak kullanılan H₂O₂ (10Mm) kültür ortamına eklendi ve 72 saat muamele edildi.
- Ardından hücreler, ependorf tüplerinin içine konuldu ve süzüntüleri temizlemek için 2000 rpm'de santrifüjlendi.
- Hücreler PBS'de yeniden askıya alındı. Bu yıkama 3 kez tekrar edildi.
- Bu süzüntü temizlendikten sonra hücreler sayıldı ve analizler için hücreler ayrıldı.

3.1.4. Çözeltilerin Hazırlanması

- Homojenizasyon Tamponu

0,89 gr EDTA ve 0,438 gr NaCl %10'luk DMSO çözeltisi içinde (10 ml DMSO ve 90 ml distile su) çözülerek hazırlanmıştır.

- Lizis Çözeltisi - (500 ml - Ph10)

75,05 gr NaCl, 18,6 gr EDTA, 0,6 gr Trizma (tris) üzerine 350 ml saf su ilave edildi. 20 dk sonra 4 gr NaOH eklenerek saf su ile 445 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu solüsyondan 71 ml alındı, üzerine 8 ml DMSO ve 1 ml Triton-X-100 eklenerek hazırlandı.

- Fosfat tamponu (PBS)

0,96 gr PBS 100 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

- Düşük erime noktalı agaroz (LMA)

0,065 gr LMA 10 ml PBS içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

- Yüksek erime noktalı agaroz (NMA)

0,25 gr NMA 50 ml PBS içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. NMA, lamaları kaplamak için kullanılmıştır.

- Elektroforez çözeltisi - (1,5 lt - pH 13)

18 gr NaOH, 0,63 gr EDTA üzerine 1,5 lt olana kadar saf su ilave edilerek hazırlanmıştır.

- Nötralizasyon çözeltisi - (500 ml - pH 7,5)

24 gr Trismabase 500 ml'ye kadar saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

- Etidyum bromür boya solüsyonu

5 mg etidyum bromüre 50 ml saf su ilave edilerek stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözülden 1:4 oranında seyreltilerek hazırlanan çözelti kullanılmıştır.

- Annexin V solüsyonu

10 x FITC Annexin V Buffer'dan 1 ml alınır ve üzerine 9 ml distile su eklenir.

3.1.5. Kullanılan Cihazlar

- ❖ Santrifüj (Nüve-NF 815)
- ❖ Ph metre (inolab wtw)
- ❖ Elektroforez (thermoscientific, EC300XL2)
- ❖ Floresan mikroskopu (olympus, BX51 mikroskop)
- ❖ Manyetik karıştırıcı (misung scientific, MS300HS)
- ❖ Hassas terazi (Kern, ALJ 220-24)
- ❖ Akım sitometri cihazı (BD Facs Aria III)
- ❖ Nanosizer (Malvern)

Yöntem

3.2.1. Bizmut Oksit ile Muamele Edilmiş MDBK Hücre Hattı Preparatlarına Komet

Yöntemi Uygulanması

- Bizmut oksit ile muamele edilmiş 3 farklı konsantrasyondaki hücreler PBS ile 1:10 oranında seyreltildi.
- Lamlar kodlandı.
- Her konsantrasyondan örnek alınması için 250 µl LMA+30 µL örnek karıştırıldı.
- Karışımlar önceden NMA ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel ile kapatıldı.
- Lamlar, 15 dakika +4°C'de bekletildi.
- Lameller, lamların üzerinden alındı ve şalelere konuldu, üzerine 80 ml lizis çözeltisi eklendi ve 1 saat +4°C'de bekletildi.
- Lizisten çıkarılan preparatlar elektroforez tankına yerleştirildi.
- Elektroforez çözeltisiyle tank dolduruldu ve 20 dakika çalıştırılmadan bekletildi.
- 20 dakika 25V (volt) 300 mA'da (miliamper) elektroforez edildi.
- Elektroforezden çıkarılan preparatlar 15 dakika nötralizasyon çözeltisinde bekletildi.
- Nötralizasyondan çıkarılan preparatlar 10 dakika soğuk etanolde bekletildi.
- Etanolden çıkarılan preparatlar kurutma kâğıdı üzerine yayıldı.
- Kurutma işleminden sonra etidyum bromür ile boyanan preparatlar floresan mikroskopunda sayıldı.

3.2.2. Bizmut Oksit ile Muamele Edilen MDBK Hücre Hattı Preparatlarına Akım Sitometri

Yöntemi Uygulanması

- Bu test için büyümekte olan hücrelerin konfluent olmalarının ardından Bizmut dozları hücrelere analiz saatinden 24 saat önce 6 well plate 400.000 hücre olacak şekilde eklendi. Süre sonunda (72 saat) hücrelerin üzerindeki katkılı ve bizmut konsantrasyonu içeren medyum uzaklaştırıldı.
- Hücreler 3 mL DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) ile 3 defa yıkandı.
- Son yıkamada kullanılan DPBS çekildikten sonra hücrelere 2 mL % 0,05 tripsin-EDTA eklenerek 5 dk boyunca 37 °C'de inkübe edildi.
- Tripsin inaktivasyonunu sağlamak için flaska 2 mL FBS katkılı DMEM medyumunu eklendi ve flastaki hücre süspansiyonu 15 mL falkon tüpüne aktarıldı.

- 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen tüpten süpernatant uzaklaştırılarak, pellet 1 mL katkılı medyum ile resüspand edildi.
- Cedex cihazı ile hücre canlılığı ve sayıları belirlendi.
- Süspansiyon hücreler santrifüj edildi. Pellet olarak elde edilen hücreler iki kez soğuk DBPS ile yıkanarak 1X Binding Buffer ile 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde hazırlandı.
- Her bir tüp için 100 μ l (1×10^5) süspansiyon 5 ml'lik FACS tüplerine aktarıldı. Daha sonra yukarıda verilen tabloya göre tüplere uygun boya veya boyalar 5 μ l ve 10 μ l hacimde eklenerek 15 dakika boyunca karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon işlemi tamamlandığında kullanılacak kontrol ve deney tüplerinin tamamına 400 μ l 1X binding buffer eklenerek BD FACS ARIA III cihazında analiz yapıldı.

3.2.2.1. Hücrelerin Sayılması

Hücre sayımı için Cedex XS (Roche, Mannheim, Germany) cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz tripan mavisi boyama yöntemini ile yarı-otomatik olarak hücre konsantrasyonu ve canlılığı hakkında bilgi sağlayan yüksek doğrulukla ölü canlı ayırımı yapmaktadır. Hücrelere tripsinizasyon işlemi yapıldıktan sonra 5 dakika 1000 rpm de santrifüj yapılmıştır. Elde edilen pelletin üzerindeki süpernatant atılıp hücrelere 1 ml besiyeri eklenmiştir ve hücreler resüspand edilmiştir. Resüspand edilen hücrelerden 20 μ l alınarak 0.2 ml'lik eppendorf içerisine aktarılmıştır. Bu hücrelerin üzerine ise canlı hücrelerin içerisine girerek ölü ve canlı hücre ayırımı sağlayan 1:1 oranında steril distile su ile seyreltilmiş 20 μ l Tripan Mavisi (Roche, Mannheim, Germany) eklenmiştir. Elde edilen karışım pipetaj işlemi ile homojen hale getirildikten sonra cihazın özel lamı olan Smart Slides (Roche, Mannheim, Germany) haznesine bu karışımdan 20 μ l eklenmiştir. Daha sonra örnek lam içinde Cedex XS hücre sayım cihazına yerleştirilmiş sayım gerçekleştirilmiştir.

- Deneyde her grup için n=4 tekrar yapılmıştır.

3.3. İstatistiksel Analiz

Tüm parametreler için normallik kontrolü Shapiro Wilk's testi ile yapılmıştır. Deney protokolleri sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde STATISTICA 13.0 analiz programı kullanılmıştır. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını incelemek amacıyla uygulanan konsantrasyonlar hem kendi aralarında hem pozitif kontrol değerleri hem de negatif kontrol değerleri arasında kıyaslanmıştır. Tüm analizler yapılırken deney protokollerinden elde edilen verilerin ortalamaları kullanılmıştır. Gruplar arasındaki fark Kruskal Wallis programı ile analiz edilmiştir. Değerlendirilmeler yapılırken p değeri (güven Aralığı) 0.05 olarak alınmıştır. Komet ve akım sitometri parametreleri arasında ilişkinin belirlenmesi için Pearson korelasyon analizi uygulanmıştır.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Çalışmada, Bi₂O₃ nanopartikülünün üç konsantrasyonuna (30µg/ml, 60 µg/ml ve 90 µg/ml) maruz bırakılmış MDBK hücre hatlarından elde edilen preparatların genotoksisite ölçümleri komet test yöntemi ile belirlenmiştir. Her bir konsantrasyona ait preparattan 100 hücre sayılmış ve sayılan hücreler uğramış oldukları hasara göre Tip 0, Tip 1, Tip 2, Tip 3 ve Tip 4 olmak üzere beş grupta sınıflandırılmıştır. Yapılan sayımlar sonucu iki farklı parametre olan hasarlı hücre yüzdesi ve genetik hasar indeksi aşağıdaki formüller kullanılarak belirlenmiştir.

Genetik hasar indeksi (GHI): [(Tip0x0) + (Tip1x1) + (Tip 2x2) + (Tip3x3) + (Tip4x4)]

Hasarlı hücre yüzdesi (HHY): (Tip2) + (Tip3) + (Tip4)

Hücre canlılığı ise akım sitometri yöntemi ile tayin edilmiştir. Akım sitometri yönteminde hücreler erken ve geç apoptotik, canlı ve nekrotik özelliklerine göre değerlendirilmiştir. Yaklaşık 4x10⁵ hücre akım sitometri cihazından geçirilerek Bizmut oksit nanopartikülüne maruz kalmış MDBK hücrelerinin apoptotik sürece sürüklenme miktarı belirlenmiştir.

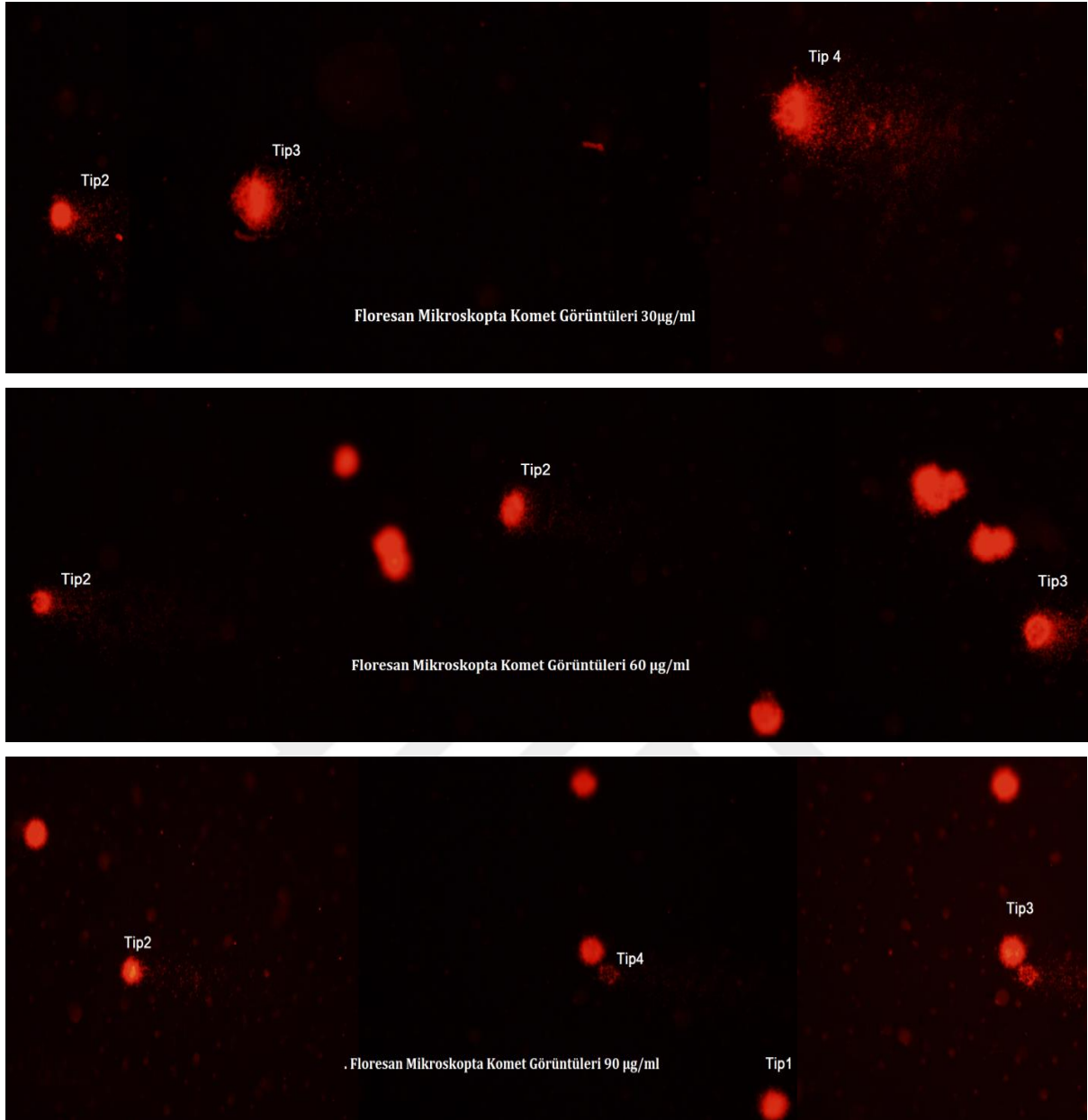
4.1.1. Komet Analiz Sonuçları

Uygulanan konsantrasyonlar sonucunda MDBK hücre hattından elde edilen komet sonuçları Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Floresan mikroskop altında elde edilen görüntüler Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

Konsantrasyon artışına paralel olarak GHI ve HHY parametrelerinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.2). GHI parametresi bakımından negatif kontrol grubu ile 30µg/ml'lik ve 60µg/ml'lik ve 90µg/ml'lik konsantrasyon grubu arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmamıştır (p>0,05). HHY parametresi bakımından negatif kontrol grubu ile 30µg/ml'lik ve 60µg/ml'lik ve 90µg/ml'lik konsantrasyon grubu arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmamıştır (p>0,05).

Tablo 4.1. Bi₂O₃ Nanopartikülü ile Muamele Edilmiş MDBK Hücrelerinde Komet Sayım Verileri

Uygulama	Tekrar Sayıları	Tip 0	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	GHI	HHY
30 µg/ml Bi ₂ O ₃	1.tekrar	69	22	8	1	0	41	9
	2.tekrar	80	15	2	0	0	30	5
	3.tekrar	77	17	5	1	0	30	6
	4.tekrar	62	32	5	0	0	45	6
60 µg/ml Bi ₂ O ₃	1.tekrar	82	15	3	1	0	21	3
	2.tekrar	85	11	3	1	2	20	4
	3.tekrar	96	3	1	1	0	5	1
	4.tekrar	86	8	4	1	0	22	6
90 µg/ml Bi ₂ O ₃	1.tekrar	88	8	4	0	0	16	4
	2.tekrar	97	1	1	1	0	7	2
	3.tekrar	92	4	2	0	0	15	4
	4.tekrar	84	11	2	2	0	25	5
NK (Negatif Kontrol)	1.tekrar	86	11	2	1	0	18	3
	2.tekrar	84	13	3	0	0	19	3
	3.tekrar	77	17	5	1	0	30	6
	4.tekrar	86	12	2	0	0	16	2
PK (Pozitif Kontrol) (H ₂ O ₂) (10mM)	1.tekrar	34	42	14	7	3	103	24
	2.tekrar	26	32	21	14	7	144	24
	3.tekrar	30	37	17	11	5	124	33
	4.tekrar	24	38	20	12	6	138	38

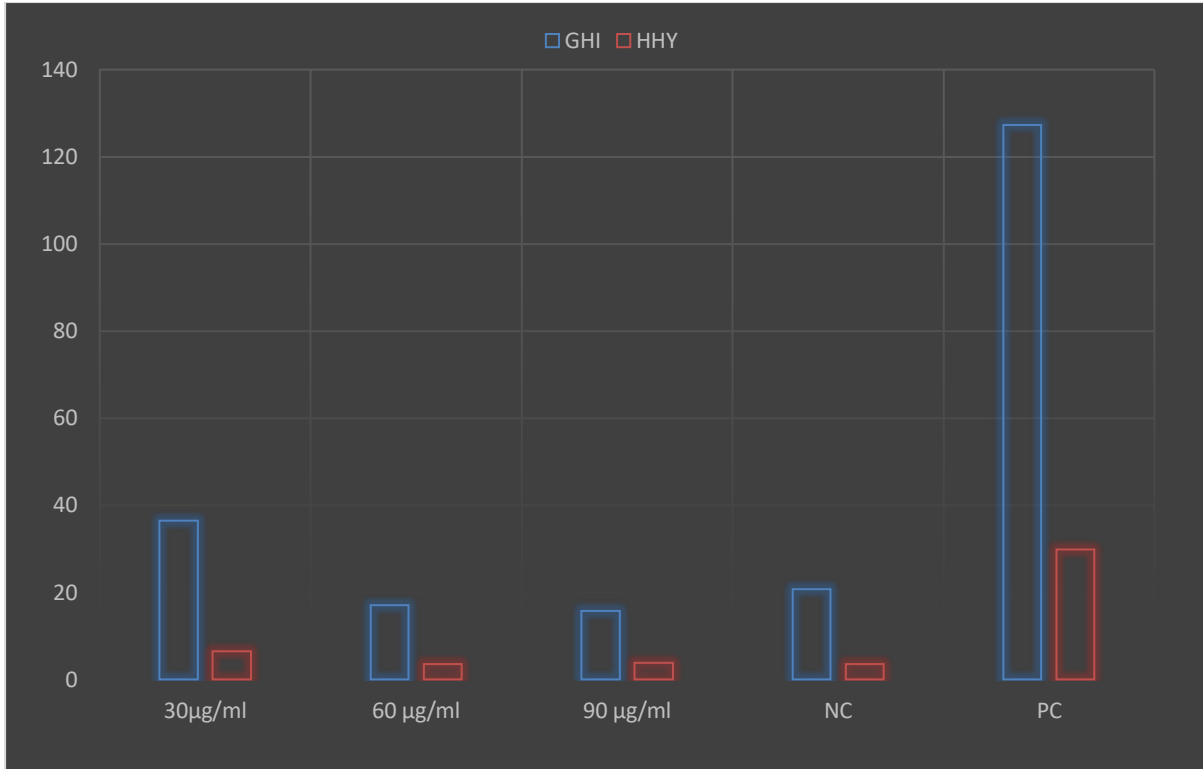


Şekil: 4.1. Floresan Mikroskopta Komet Görüntüleri

Tablo 4.2. Bi₂O₃ Nanopartikül ile Muamele Edilmiş MDBK Hücrelerinde Komet Parametleri ve İstatistiksel Sonuçlar

Uygulama	GHI±S.H	HHY±S.H
30 µg/ml	36.5±7.68	6.50±1.73
60 µg/ml	17.0±8.04	3.50±2.08
90 µg/ml	15.7±7.36	3.75±1.25
Negatif Kontrol	20.75±6.29	3.50±1.73
Pozitif Kontrol(H ₂ O ₂)	127.25±18.2*	29.75±6.94*

*p<0,05 Negatif kontrolle karşılaştırıldığında



NK: Negatif kontrol - PK: Pozitif kontrol (H_2O_2) - GHI: Genetik Hasar İndeksi - HHY: Hasarlı Hücre Yüzdesi

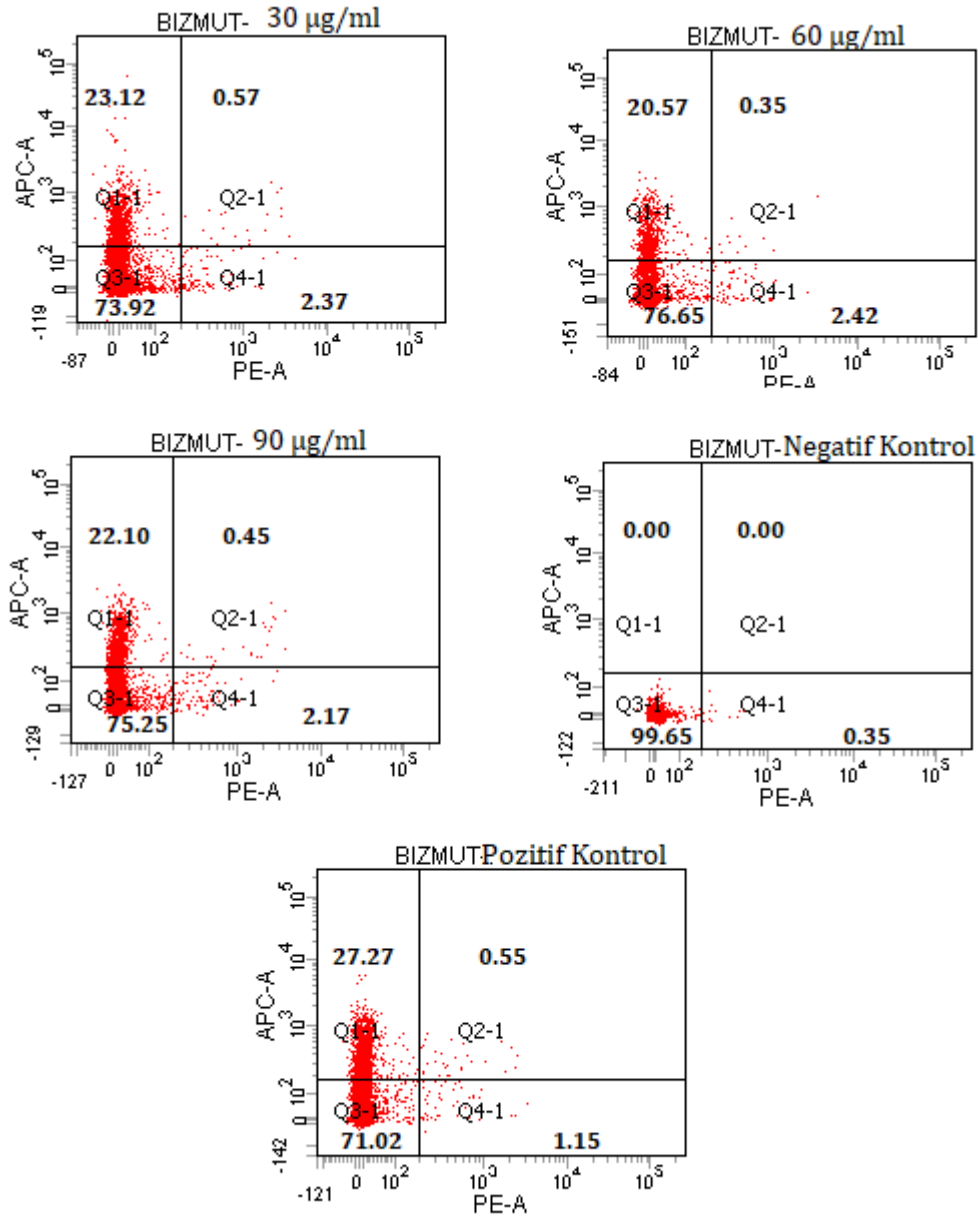
Şekil 4.2. Komet Analiz Sonuçlarının konsantrasyonlara göre Dağılımı

4.1.2. Akım Sitometri Analiz Sonuçları

MDBK hücrelerine uygulanan akım sitometri sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.3.'de sunulmuştur. Akım sitometri analizine ait istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.4'de verilmiştir. Konsantrasyon artışına paralel olarak Erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik hücre sayısında artış gözlenmemiştir (Şekil 4.3). 30µg/ml'lik konsantrasyon göz önüne alındığında Erken ve geç apoptotik, nekrotik hücre ve canlı hücre sayısı bakımından negatif kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark vardır ($p<0.05$). 60µg/ml'lik ve 90 µg/ml'lik konsantrasyon göz önüne alındığında Erken apoptotik, nekrotik ve canlı hücre sayısı bakımından negatif kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark vardır ($p<0.05$). Pozitif kontrol ile negatif kontrol arasında Erken ve geç apoptotik, nekrotik hücre ve canlı hücre sayısı bakımından anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 4.3. Bi₂O₃ Nanopartikülü ile Muamele Edilmiş MDBK Hücrelerinde Akım Sitometri Sonuçları

Uygulama		Değerlendirilen Hücre sayısı	Erken Apoptotik Hücre (%)	Geç Apoptotik Hücre (%)	Canlı Hücre (%)	Nekrotik Hücre (%)
30 µg/ml	1. Tekrar	3711	30.6	0.8	66.5	2.1
	2. Tekrar	3794	21.3	0.6	75.9	2.2
	3. Tekrar	3494	18.7	0.4	78.6	2.3
	4. Tekrar	3865	21.9	0.5	74.7	2.9
60 µg/ml	1. Tekrar	3034	21.3	0.4	76.1	2.2
	2. Tekrar	3151	22.1	0.3	75.5	2.1
	3. Tekrar	3009	20.3	0.2	77.0	2.5
	4. Tekrar	3066	18.6	0.5	78.0	2.9
90 µg/ml	1. Tekrar	3809	19.7	0.2	78.3	1.8
	2. Tekrar	3740	26.4	0.6	70.6	2.3
	3. Tekrar	3465	25.1	0.7	72.3	1.9
	4. Tekrar	4486	17.2	0.3	79.8	2.7
Negatif Kontrol	1. Tekrar	2588	0	0	99.7	0.3
	2. Tekrar	3049	0	0	99.6	0.4
	3. Tekrar	3101	0	0	99.9	0.1
	4. Tekrar	3062	0	0	99.4	0.6
Pozitif Kontrol (10mM) H ₂ O ₂	1. Tekrar	4681	27.8	0.6	70.3	1.2
	2. Tekrar	4962	29.9	0.6	68.5	1.0
	3. Tekrar	4401	25.8	0.7	72.2	1.4
	4. Tekrar	4866	25.6	0.3	73.1	1.0



Şekil 4.3. Akım Sitometri Analizde Hücrelerin Dağılım Grafikler

Q1= Erken Apoptotik

Q2= Geç Apoptotik

Q3= Canlı hücre

Q4= Nekrotik hücre

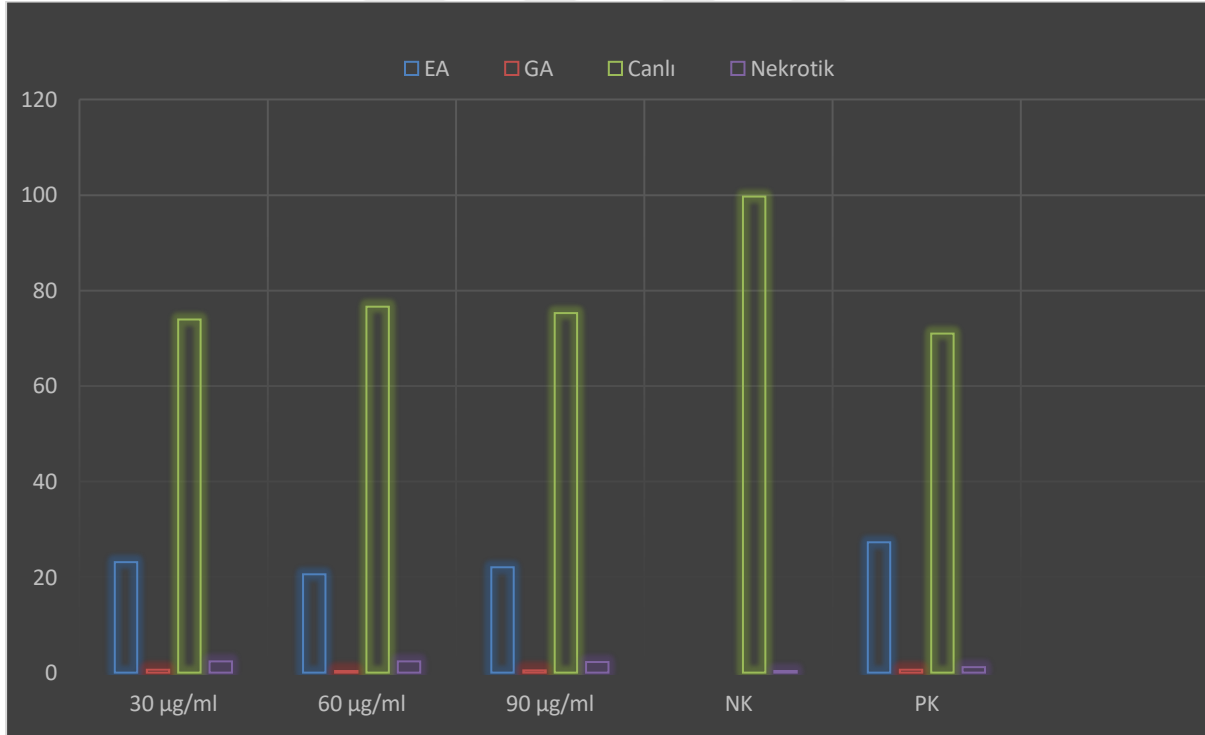
PE-A = Phycoerythrin

APC-A= Allophycocyanin

Tablo 4.4. Bi₂O₃ Nanopartikülü ile Muamele Edilmiş MDBK Hücrelerinde İstatistiksel Akım Sitometri Sonuçları

Uygulama	Değerlendirilen Hücre sayısı Ortalama ± SH	Erken Apoptosis hücre (%) Ortalama±SH	Geç Apoptosis hücre (%) Ortalama±SH	Canlı hücre (%) Ortalama±SH	Nekrotik hücre (%) Ortalama±SH
30 µg/ml	3716±80.41	23.12±5.17*	0.57±0.17*	73.92±5.21*	2.37±0.36*
60 µg/ml	3065±30.94	20.57±1.50*	0.35±0.12	76.65±1.09*	2.42±0.35*
90 µg/ml	3875±216,79	22.10±4.36*	0.45±0.23	75.25±4.48*	2.17±0.41*
Negatif Kontrol	2950±121.17	0.00±0.00	0.00±0.00	99.65±0.21	0.35±0.21
Pozitif Kontrol (H ₂ O ₂)	4727±123.46	27.27±2.01*	0.55±0.17*	71.02±2.04*	1.15±0.19*

* p<0,05 negatif kontrolle karşılaştırıldığında



EA: Erken Apoptotik - GA: Geç Apoptotik - NK: Negatif kontrol- PK: Pozitif kontrol (H₂O₂)

Şekil 4.4. Akım Sitometri Analiz Sonuçlarının Konsantrasyonlara Göre Dağılımı

4.2. Akım Sitometri Verileri ve Komet Analiz Verileri Arasındaki Korelasyon Sonuçları

Tablo 4.5 akım sitometri verileri ve komet analiz verileri arasındaki korelasyon sonuçlarını göstermektedir. Akım sitometri verileri arasında yapılan korelasyon analizinde geç ve erken apoptotik hücre sayısı arasında pozitif yönde çok yüksek korelasyon tespit edilmiştir. Erken apoptotik hücre sayısı ve canlı hücre sayısı arasında negatif yönde çok yüksek korelasyon tespit edilmiştir. Geç ve canlı hücre sayısı arasında negatif yönde çok yüksek korelasyon tespit edilmiştir. Geç apoptotik hücre sayısı ile nekrotik hücre sayısı arasında pozitif yönde zayıf korelasyon tespit edilmiştir. Canlı hücre sayısı ile nekrotik hücre sayısı arasında negatif yönde yüksek korelasyon tespit edilmiştir.

Komet analiz parametreleri olan GHI ve HHY değerleri arasında pozitif yönde çok yüksek korelasyon tespit edilmiştir. Nekrotik hücre sayısı ile hem GHI hem de HHY değerleri arasında negatif yönde zayıf korelasyon tespit edilmiştir. Canlı hücre sayısı ve nekrotik hücre sayısı ile GHI ve HHY değerleri arasında negatif yönde zayıf korelasyon tespit edilmiştir. Geç apoptotik hücre sayısı ile GHI ve HHY değerleri arasında pozitif yönde zayıf korelasyon, Erken apoptotik hücre sayısı ile GHI ve HHY değerleri arasında pozitif yönde orta derecede korelasyon tespit edilmiştir.

Tablo 4.5. Akım Sitometri Yöntemi ve Komet Analiz Yöntemi Korelasyon Tablosu

	Erken apoptotik hücre	Geç apoptotik hücre	Canlı hücre	Nekrotik hücre	GHI	HHY
Erken apoptotik hücre	1					
Geç apoptotik hücre	0.872****	1				
Canlı hücre	-0.998****	-0.877****	1			
Nekrotik hücre	0.581**	.0521*	-0.633***	1		
GHI	0.446**	0.361*	-0.400*	-0.282*	1	
HHY	0.440**	0.343*	-0.396*	-0.266*	0.962****	1

**** Çok yüksek korelasyon, *** Yüksek korelasyon, ** Orta derece korelasyon, * Zayıf korelasyon

4.3. Tartışma

Bu çalışmada 30, 60, ve 90 µg/ml'lik konsantrasyonlarda Bi₂O₃ nanopartikülü (90-210nm) ile muamele edilmiş sığır böbrek (MDBK) hücrelerinde genotoksik ve apoptotik etki araştırılmıştır. Genotoksik etki Komet yöntemi ile ve hücre canlılığı/apoptotik etki ise akım sitometri analizi yöntemi ile belirlenmiştir. Genetik hasar ve apoptotik etki arasındaki ilişki korelasyon çalışması ile belirlenmiştir. Bu çalışmada Bi₂O₃ nanopartikülünün tüm konsantrasyonlarında GHI ve HHY değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Akım sitometri analizinde ise 30µg/ml'lik konsantrasyonda erken ve geç apoptotik, canlı ve nekrotik hücre sayısında artış gözlenmiş ve bu artışın negatif kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (p<0.05).

Bizmut oksit nanopartiküllerinin *in vitro* olarak sitotoksik etkileri üzerine az sayıda çalışma vardır. Farklı tip, boyut ve konsantrasyonlarda hazırlanmış nanopartiküllerin etkilerinin incelendiği farklı hücre tipleri ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda genetik hasar ve hücre canlılığı açısından elde edilen verilerde tartışmalı sonuçlar rapor edilmiştir.

Bazı bizmut oksit bileşiklerinin antibakteriyel aktivite sergiledikleri, antimikrobiyal, antifungal aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir. Bu alanda Hernandez ve arkadaşları tarafından Bizmut kolloidal nanopartiküllerinin bakterisit aktivitesi *Streptococcus mutans* ile test edilmiştir ve *Streptococcus mutans*'ın büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bizmut oksit nanopartiküllerinin *Candida albicans*'a karşı fungisidal aktivitesi incelenmiş ve bunların antibiyofilm yeteneklerin analiz edilmiştir. 77nm boyutunda bizmut oksit nanopartiküllerinin *C. albicans* büyümesini (koloni büyüklüğünün% 85 oranında azalmasına) ve biyofilm oluşumunu engellediği ve antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu sonuçların en etkili oral antiseptik ve ticari antifungal ajanlar olan klorheksidin, nistatin ve terbinafin ile elde edilenlerden daha etkili olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar bizmut oksit kolloidal nanopartiküllerinin bir oral antiseptik içine dahil edilmek üzere fungisid ajan olarak çok ilginç bir aday olabileceğini düşündürmektedir [66]. Hücre bazda karşılaştırma yapıldığında toksik etki açısından çalışmamızla uyum sağlamaktadır.

Abudayyak ve arkadaşları, Bi₂O₃ nanopartiküllerinin toksik etkilerini dört farklı hücre tipinde "karaciğer (HepG2 hepatokarsinoma hücresi), böbrek (NRK-52E böbrek epitelyal hücresi), bağırsak (Caco-2 kolorektal adenokarsinoma hücresi) ve akciğer (A549 akciğer karsinom hücresi)" hücrelerinde değerlendirmişlerdir. Bi₂O₃ nanopartikülleri (~ 149.1 nm) tüm hücreler tarafından kolayca alınmıştır ve sitotoksik ve genotoksik etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Ana hücre ölüm yollarının HepG2 ve NRK-52E hücrelerinde apoptosis olduğu ve Bi₂O₃ nanopartiküllerinin A549 ve Caco-2 hücrelerinde nekrotik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, glutatyon (GSH), malondialdehid (MDA) ve 8-hidroksi deoksiganin (8-

OHdG) seviyeleri, A549 hücresi hariç HepG2, NRK-52E ve Caco-2 hücrelerinde önemli ölçüde değişmiştir[65]. Bizim çalışmamızda da kullandığımız Bi_2O_3 nanopartikülü sığır böbrek hücreleri üzerinde nekrotik etkiye sahiptir. İki çalışma değerlendirildiğinde nekrotik etki açısından birbirini desteklemektedir. Ayrıca, Özcan ve arkadaşları tarafından 8-hidroksi deoksiganin (8-OHdG) seviyelerindeki artışın oksidatif strese cevap olarak oluşan DNA hasar belirteci olduğu rapor edilmiştir. 8-hidroksi deoksiganin (8-OHdG) seviyelerinin artmış olması DNA'daki hasarı göstermesi açısından önemlidir. Reaktif oksijen türleri DNA'da bazıları etkileyerek değişme uğratırlar ve değişen bazların oluşturduğu ürünlere, timin peroksil radikalleri, hidroksi hidroperoksit, timin glikol, 5-hidroksime-tilurasil, 5-formilurasil ve 5-hidroksi 5-metilhidanto- in gibi 20'den fazla örnek verilebilir. Bu hasara uğrayan bazlar içerisinde en fazla bilineni 8-OHdG (8-hidroksi deoksiganozin)'dir. Bu yüzden 8-OHdG formunda oksidatif değişikliğe uğramış DNA, DNA hasarının miktarının belirlenmesinde kullanılır. Hidroksil radikalleri ($OH\bullet$), guanin molekülünde 8. pozisyonda etkileşerek oksidasyona yol açar. Değişikliğe uğrayan DNA'nın oksidatif hasarı sonucunda 8-OHdG (8-hidroksi deoksiganozin) oluşur. Ayrıca Cu^{+2} iyonları DNA'nın özellikle guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlanır ve H_2O_2 ile etkileşime girerek DNA hasarına katkıda buldukları bildirilmiştir [86].

Ahamed ve arkadaşları tarafından insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerinde Bi_2O_3 nanopartiküllerinin doza bağımlı sitotoksikite ve apoptoz yanıtı incelenmiştir ve Bi_2O_3 nanopartiküllerinin potansiyel sitotoksikite mekanizmalarının oksidatif stres yoluyla oluştuğunu rapor etmişlerdir. Fizikokimyasal çalışmada, Bi_2O_3 nanopartiküllerinin ortalama yapı olarak 97nm olan kristal yapıya ve küresel biçime sahip olduğunu göstermişlerdir ve toksisite çalışmalarında Bi_2O_3 nanopartiküllerinin hücre canlılığını azalttığını ve 50-300 $\mu g/ml$ konsantrasyon aralığında doza bağlı olarak membran hasarını indüklediğini göstermişlerdir. Ayrıca MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsünün bozulduğu da rapor edilmiştir. Bi_2O_3 nanopartiküllerinin MCF-7 hücrelerinde oksidatif strese neden olduğu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, yüksek lipid peroksidasyonu, glutation'un (GSH) azaltılması ve düşük süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ile belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, harici antioksidan N-asetil-sisteinin takviyesi, Bi_2O_3 nanopartiküllerinin neden olduğu oksidatif stres ve hücre ölümünün etkisini neredeyse ortadan kaldırmıştır. Ayrıca MCF-7 hücrelerinin Bi_2O_3 nanopartiküllerine maruz kalması, Bcl-2, Bax ve kaspaz-3 genlerinin ekspresyon düzeyinin artması apoptotik tepkiye neden olduğunu göstermiştir. Toplamda, Bi_2O_3 nanopartiküllerinin MCF-7 hücrelerinde sitotoksikiteyi, redoks homeostazını Bax / Bcl-2 yolu ile modüle ederek indükledikleri bildirilmiştir. Bu çalışmada, Bi_2O_3 nanopartikülünün hücre canlılığını etkilediği ve apoptotik etkiye neden olduğu ile ilgili sonuç bizim çalışmamızda MDBK hücrelerindeki Bi_2O_3 nanopartikülünün ortaya çıkarmış olduğu erken apoptotik hücre ve nekrotik hücre sayısındaki

artışı gösteren akım sitometri sonuçlarıyla örtüşmektedir. Ayrıca, akım sitometri ve komet analiz parametreleri arasında orta ve düşük düzeyde korelasyonun bulunması iki analizin birbirine destekler nitelikte olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, komet analizinde DNA hasar parametrelerindeki negatif kontrole nazaran artışın istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Tip4 komet parametresinin artış göstermesi apoptotik yanıtın bir belirteci olarak alınabileceği daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir [87,88]. MCF7 hücrelerinde apoptotik gen ekspresyon düzeylerindeki artış bizim çalışmamızın Komet analizi verileri ile örtüşmektedir[89].

Diğer bir çalışmada Akbarzadeh ve arkadaşları, oral epidermoid karsinoma hücreleri (KB) ve akciğer kanseri (A549) hücre hatları üzerinde bizmut oksit folat ve 5-aminolevulinik asit (5- ALA) etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada bizmut oksit nanopartikülünün hücreler üzerinde meydana getirdiği sitotoksik etki hem tek başına hem de folat (5- ALA) ile birlikte kullanılarak değerlendirilmiştir. KB ve A549 hücreleri 10, 20, 50 ve 100 µg / ml konsantrasyonlarda Bi₂O₃ nanopartikülleriyle ve folat-5-ALA-konjüge edilmiş Bi₂O₃ nanopartikülleriyle inkübe edilmiştir. Sitotoksik etki MTT metoduyla test edilmiştir. Ayrıca, muamale edilen hücrelerde nanopartiküllerin indüklediği apoptoz Caspases-3 aktivite deneyi ve akım sitometri analizi kullanılarak elde edilmiştir. Başarıyla sentezlenmiş olan ortalama 19.2 ± 6.5 nm büyüklüğündeki Bi₂O₃ nanopartikülleri, daha sonra 5-ALA ve folat ile konjüge edilmiştir. Bi₂O₃ veya folat konjüge edilmiş nanopartiküller, hücreler tarafından konsantrasyona bağlı bir şekilde kolayca alınmıştır ve sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Her iki bileşik için de 50 µg/ml'den daha fazla konsantrasyonlarda önemli hücre ölümü kaydedilmiştir. Hazırlanan nanopartiküller düşük inkübasyon sürelerinde düşük sitotoksikite göstermişlerdir. Bununla birlikte nanopartiküllerin artan konsantrasyonları ile sitotoksikite düzeyinin arttığı rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda da Bi₂O₃ nanopartikülünün akım sitometri analizinde erken ve nekrotik hücre sayısı parametrelerinde artış gözlenmiş olması hücre ölümüne neden olduğunu göstermesi açısından veriler birbirini destekler niteliktedir ve kullanılan partikül büyüklüğünün farklı olması nedeniyle partikül büyüklüğü açısından iki çalışmayı karşılaştırmak uygun olmasa da KB ve A549 hücrelerinin nanopartiküle vermiş oldukları yanıt açısından benzerlik göstermektedir [90].

Liu ve arkadaşları insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293) bizmut nanopartikülünün hücreler tarafından alınması ve toksisitesini araştırdıkları çalışmada böbrek hücreleri tarafından hücre içine alındığını, otofajinin indüklendiğini ve LC3II proteininin miktarının arttığını ve bizmut nanopartikülünün embriyonik böbrek hücreleri üzerine toksik etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir [91]. Bizim çalışmamızla toksisite etkisi açısından benzerlik göstermektedir.

Shakibaie ve arkadaşları boyutları 20-120 nm arasında olan ve bakteriyel kökenli Bizmut nanopartiküllerinin A549, MCF-7 gibi kanser hücrelerinde ve 3T3 normal fibroblast

hücrelerinde sitotoksik potansiyele sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Bizmut nanopartiküllerinin kimyasal yapıları ve yüzeylerinde bulunan organik ve inorganik bileşiklerin onların sitotoksitelerinde etkili rol oynadıkları belirtilmektedir [92]. Bizmut nanopartikülünün toksik etkiye sahip olması bizim çalışmamızda akım sitometri sonuçları ile örtüşür niteliktedir.

Reus ve arkadaşları LASİS yöntemiyle sentezlenmiş olan 250 nm boyutundaki bizmut nanopartiküllerinin etkilerini incelemek için BALB/c 3T3 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, nanopartiküllerin hücelere giriş yaparak hücrenin morfolojik yapısının bozulduğunu ve hücre ölümünün apoptotik sürece bağlı olduğunu TUNEL yöntemi kullanarak rapor etmişlerdir. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz yöntem apoptotik hücrelerin belirlenmesine dayalı bir yöntem olması nedeniyle akım sitometri analizinde hem erken hem de geç apoptotik hücrelerin sayısındaki artış Reus ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir [93].

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar son yıllarda oldukça geniş kullanım alanı bulunan bizmut oksit nanopartikülün avantajlarının ve dezavantajlarının belirlenebilmesinde oldukça önemlidir. Özellikle yangın söndürücü alanlarda ve mikro-elektronik endüstrisinde (sensör teknolojisi, optik kaplama, seramik cam üretimi, boya, içme suyu, maden suyu) çeşitli amaçlarla kullanılarak birçok durumda hizmet kolaylığı sağlamaktadır. Ayrıca kozmetik ürünlerde sağladığı yararlarının yanı sıra tıbbi ilaç sektöründe yer alarak, başta mide rahatsızlıkları olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığından hayati faydaları söz konusudur. Son zamanlarda, Bi_2O_3 nanopartiküllerin uygulamaları özellikle biyo görüntüleme, biyo-algılama, biyomoleküler algılama ve X-ışını radyo-duyarlılığı gibi biyolojik bilimlerde geniş bir alan almıştır.

Çalışmada kullanılan Komet analiz parametreleri olan GHI ve HHY değerleri arasında pozitif yönde yüksek korelasyon bulunması bu iki parametrenin birbirini tamamlayıcısı olduğu sonucuna varılmaktadır. Akım sitometri analizinden elde edilen sonuçlara göre analiz parametreleri arasında yüksek pozitif ve negatif korelasyon bulunması parametrelerin analizde kullanılabilen parametreler olduğunu göstermektedir. Komet analiz parametreleri olan GHI ve HHY değerleri ve akım sitometri parametreleri olan erken/geç apoptoz, canlı ve nekrotik hücre sayıları arasında hem negatif hem de pozitif yönde korelasyon bulunması bu iki yöntemin birbirini destekler nitelikte olduğunu sonucunu doğurmaktadır.

Sonuç olarak, Bi_2O_3 nanopartiküllerinin DNA hasarı, apoptoz etkileri, elde edilen sonuçlara ve bu literatüre göre tüketici ürünlerindeki uygulamalarıyla ilişkili güvenlik konusundaki endişeleri arttırmaktadır. Bununla birlikte, Bi_2O_3 nanopartikülleri toksik olarak en az zehir etkisine sahip metal oksit olmasına rağmen bu çalışmada neden olduğu etkilerin daha detaylı araştırılması gerektiğinden toksisite mekanizmasını tam olarak anlayabilmek için *in vivo* ve *in vitro* destekleyici çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- [1]. Koopmans, R. J., & Aggeli, A. (2010). Nanobiotechnology-quo vadis. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 327.
- [2]. TUNCA, E. Ü. (2015). Nanoteknolojinin temli Nanopartiğller ve Nanopartiküllerin fitoremediasyonu U. Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, 5(2).
- [3]. Gattoo, M. A., Naseem, S., Arfat, M. Y., Mahmood Dar, A., Qasim, K., & Zubair, S. (2014). Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed research international*, 2014.
- [4]. Aberer, S. (2012). Future medicine: nanomedicine. *JIMSA*, 25, 187-192.
- [5]. Dowling, A. P. (2004). Development of nanotechnologies. *Materials Today*, 7(12), 30-35.
- [6]. Wolfram, J., Zhu, M., Yang, Y., Shen, J., Gentile, E., Paolino, D., . & Ferrari, M. (2015). Safety of nanoparticles in medicine. *Current drug targets*, 16(14), 1671-1681.
- [7]. İnanç, A. T. İ. K., & Posta, E. Mimarlıkta Nanoteknolojinin Yeri. (2018), Kent Akademisi, Volume, 11 (33), Issue 2. Page, 232-242.
- [8]. Saltan, M., Terzi, S., SARGIN, Ş., Morova, N., & SERİN, S. (2013). YOL Agregalarında nanoteknoloji kullanımı. Süleyman Demirel Üniversitesi Uluslararası Teknolojik Bilimler Dergisi, 5(1), 12-21.
- [9]. Goodman, R. P., Schaap, I. A., Tardin, C. F., Erben, C. M., Berry, R. M., Schmidt, C. F., & Turberfield, A. J. (2005). Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication. *Science*, 310(5754), 1661-1665.
- [10]. Feynman, R.P.(1999). The pleasure of finding things out. Helix Books Perseus Publishing, ISBN: 0-7382-0349-1 Cambridge, Massachusetts.; 151-70.
- [11]. Turkan, Y. (2015). The effects of nanotechnology investments on costs. *Journal of Economics Finance and Accounting*. *Journal of Economics Finance and Accounting*, 2(4).
- [12]. Kutucu .B.(2010). Nanoteknoloji ve çift duvarlı karbon nanotüplerin incelenmesi, yüksek lisans tezi . istanbul teknik üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü .istanbul.
- [13]. CİREL, A., KUTLU, B., Nurhan, O. N. A. R., & Erkan, G. (2006). Tekstilde ileri teknolojiler. *Tekstil ve Mühendis*, 13(61).
- [14]. Toumey, C. P. (2008). Reading Feynman into nanotechnology: A text for a new science. *Techné: Research in Philosophy and Technology*, 12(3), 133-168.
- [15]. CELEP, Ş., & KOÇ, E. (2007). Nanoteknoloji ve tekstilde uygulama alanları.
- [16]. ÇETİN.E. (2010). Elektrikport. Nanoteknolojinin Tarihi. İstanbul .
- [17]. Fakruddin, M., Hossain, Z., & Afroz, H. (2012). Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *Journal of nanobiotechnology*, 10(1), 31.
- [18]. <https://ahmetakgonul.weebly.com/kullan305m-alar305.html> (Erişim Tarihi : 15.04.2018).
- [19]. Singh, S., & Singh, A. (2013). Current status of nanomedicine and nanosurgery. *Anesthesia, essays and researches*, 7(2), 237.
- [20]. Schmidt, C., & Storsberg, J. (2015). Nanomaterials—Tools, Technology and Methodology of Nanotechnology Based Biomedical Systems for Diagnostics and Therapy. *Biomedicines*, 3(3), 203-223.
- [21]. Logothetidis, S. (2006). Nanotechnology in medicine: the medicine of tomorrow and nanomedicine. *Hippokratia*, 10(1), 7-21.
- [22]. Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2010). Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano letters*, 10(9), 3223-3230.
- [23]. Sebastian, R. (2017). Nanomedicine-the Future of Cancer Treatment: A review. *J. Cancer Prev. Curr. Res*, 8, 00265.
- [24]. Karn, B., Roco, M., Masciangioli, T., & Savage, N. (2003, May). Nanotechnology and the environment. In *National Nanotechnology Initiative Workshop*.

- [25]. Wang, J., & Gu, H. (2015). Novel metal nanomaterials and their catalytic applications. *Molecules*, 20(9), 17070-17092.
- [26]. Tarhan, Ö., Gökmen, V., & Harsa, Ş. (2010). Nanoteknolojinin gıda bilim ve teknolojisi alanındaki uygulamaları. *Gıda Dergisi*, 35(3).
- [27]. Prameela, K. L. (2017). Nanomaterial's applications in agriculture. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. V:10 Issue 1.
- [28]. Parisi, C., Vigani, M., & Cerezo, E. R. (2014). Proceedings of a Workshop on "Nanotechnology for the agricultural sector: from research to the field" (No. JRC89736). Joint Research Centre (Seville site).
- [29]. Wong, Y. W. H., Yuen, C. W. M., Leung, M. Y. S., Ku, S. K. A., & Lam, H. L. I. (2006). Selected applications of nanotechnology in textiles. *AUTEX Research Journal*, 6(1), 1-8.
- [30]. Russell Sawhney, A. P. S., Condon, B., Singh, K. V., Pang, S. S., Li, G., & Hui, D. (2008). Modern applications of nanotechnology in textiles. *Textile Research Journal*, 78(8), 731-739.
- [31]. Gergely, A., & Coroyannakis, L. (2009). Nanotechnology in the EU cosmetics regulation. *Household and Personal Care Today*, 3, 28-30.
- [32]. Yapar, E. A., YAPAR, Ö. İ. E. A., & İNAL, Ö. (2012). Nanomaterials and cosmetics. *Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University*, 1(42 (1)), 43-70.
- [33]. Ajazzuddin, M., Jeswani, G., & Kumar Jha, A. (2015). Nanocosmetics: Past, present and future trends. *Recent Patents on Nanomedicine*, 5(1), 3-11.
- [34]. Sundar, S., Kundu, J., & Kundu, S. C. (2010). Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*, 11(1), 014104.
- [35]. ÖZKAL.B.(2012)Nanopartiküller: Uygulamalar, Fırsatlar ve Riskler – Mikron Dünyasından Genel bir Bakış,, Sainte Pulcherie Fransız Lisesi ., İstanbul Teknik Üniversitesi.
- [36]. Ateş, H. (2015).NANO PARÇACIKLAR VE NANO TELLER. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi Part C: Tasarım ve Teknoloji, 3(1), 437-442.
- [37]. Baer, D. R., Engelhard, M. H., Johnson, G. E., Laskin, J., Lai, J., Mueller, K., ... & Elder, A. (2013). Surface characterization of nanomaterials and nanoparticles: Important needs and challenging opportunities. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 31(5), 050820.
- [38]. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*.
- [39]. Köroğlu, M. (2012). Ultrasonik Sprey Piroliz Ve Hidrojen Redüksiyonu Yöntemi İle (usp-hr) Nano Yapılı Gümüş-Bakır Alaşım Partiküllerinin Üretimi (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [40]. Willems, V. D. W. (2005). Roadmap report on nanoparticles. *W&W Espana sl, Barcelona, Spain*, 157.
- [41]. DAĞLIOĞLU, Y.(2018).Nanopartikül Karakterizasyon Yöntemleri ve Ekotoksisite Deneylerindeki Önemi. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 30(1), 1-17.
- [42]. Capek, I. (2017). Noble Metal Nanoparticles: Preparation, Composite Nanostructures, Biodecoration and Collective Properties. Springer.
- [43]. Liman, R. (2013). Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by Allium and Comet assay. *Chemosphere*, 93(2), 269-273.
- [44].Murthy, S. K. (2007). Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *International journal of nanomedicine*, 2(2), 129.
- [45]. Gök Metin, Z., & Özdemir, L. (2015). Nanoteknolojinin sağlık alanında kullanımı ve hemşirenin sorumlulukları. *Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi*, 18(3), 235-243.
- [46]. Khan, A. (2015). Ethical and social implications of nanotechnology. *QScience Proceedings*, 57.
- [47]. Yildirimer, L., Thanh, N. T., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2011). Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano today*, 6(6), 585-607.
- [48]. Chu, K. S., Schorzman, A. N., Finniss, M. C., Bowerman, C. J., Peng, L., Luft, J. C., ... & DeSimone, J. M. (2013). Nanoparticle drug loading as a design parameter to improve docetaxel pharmacokinetics and efficacy. *Biomaterials*, 34(33), 8424-8429.

- [49]. Ai, J., Biazar, E., Jafarpour, M., Montazeri, M., Majdi, A., Aminifard, S., ... & Rad, H. G. (2011). Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *International journal of nanomedicine*, 6, 1117.
- [50]. Luo, Y. H., Chang, L. W., & Lin, P. (2015). Metal-based nanoparticles and the immune system: activation, inflammation, and potential applications. *BioMed research international*, 2015.
- [51]. Forbe, T., García, M., & Gonzalez, E. (2011). Potencial risks of nanoparticles. *Food Science and Technology*, 31(4), 835-842..
- [52]. HijyenHijyen, T. Nanoteknolojiden nanogenotoksikolojiye: kobalt-krom nanopartiküllerinin genotoksik etkisi. TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ.
- [53]. Oberdörster, G., Kane, A.B., Klaper, D. ve Hurt, R.H. (2013) Nanotoxicology. İçinde C.D. Klaassen (Ed.), Casarettand Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons. 135.,New york: Mc Graw Hill; 1189-1229.
- [54]. Badireddy, A. R., Hernandez-Delgadillo, R., Sánchez-Nájera, R. I., Chellam, S., & Cabral-Romero, C. (2014). Synthesis and characterization of lipophilic bismuth dimercaptopropanol nanoparticles and their effects on oral microorganisms growth and biofilm formation. *Journal of nanoparticle research*, 16(6), 2456.
- [55]. Carlin Jr, J. F. (2010).Bismuth (Bi). Metal Prices in the United States Through, 17.
- [56]. Karaboduk.k.,(2008),Bakır ve bizmutun kare dalga voltametri ile aynı anda tayini.yüksek lisans tezi.,gazi Üniversitesi, Ankara.
- [57]. Kauffman, S. (1996). At home in the universe: The search for the laws of self-organization and complexity. Oxford university press. <http://www.chemtube3d.com/gallery/inorganicsjpps/Bi2O3-poly.jpg>
- [58]. Ojebuoboh, F. K. (1992). Bismuth—Production, properties, and applications. *JOM*, 44(4), 46-49.
- [59]. Eskier.U.(2017).BizmutNedir(Özellikleri,Kullanımı), <https://www.makaleler.com/> .
- [60]. Anthony, J. W., Bideaux, R. A., Bladh, K. W., & Nichols, M. C. (1990). Handbook of mineralogy (Vol. 1, p. 558). Tucson: Mineral Data Publ.
- [61]. Nordberg, G. F., Fowler, B. A., & Nordberg, M. (Eds.). (2014). Handbook on the Toxicology of Metals. Academic press.
- [62]. Claudio, C. R., & Chellam, S. (2014). Bismuth nanoparticles: antimicrobials of broad-spectrum, low cost and safety. *Nanomedicine; Seifalian, A., de Mel, A., Kalaskar, DM, Eds*, 430-437.
- [63]. Ramachandran, M. S. (2014). Heart and toxins. Elsevier.
- [64]. Fan, H. T., Teng, X. M., Pan, S. S., Ye, C., Li, G. H., & Zhang, L. D. (2005). Optical properties of δ -Bi₂O₃ thin films grown by reactive sputtering. *Applied Physics Letters*, 87(23), 231916.
- [65]. Abudayyak, M., Öztaş, E., Arici, M., & Özhan, G. (2017). Investigation of the toxicity of bismuth oxide nanoparticles in various cell lines. *Chemosphere*, 169, 117-123.
- [66]. Hernandez-Delgadillo, R., Velasco-Arias, D., Martinez-Sanmiguel, J. J., Diaz, D., Zumeta-Dube, I., Arevalo-Niño, K., & Cabral-Romero, C. (2013). Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. *International journal of nanomedicine*, 8, 1645.
- [67]. Madin, S. H., & Darby Jr, N. B. (1958). Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 98(3), 574-576.
- [68]. Madin, S. H., & Darby Jr, N. B. (1958). Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 98(3), 574-576.
- [69]. Bolin, S. R., Ridpath, J. F., Black, J., Macy, M., & Roblin, R. (1994). Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *Journal of virological methods*, 48(2-3),

- [70]. NIKON INSTRUMENTS INC.(2018)<https://www.microscopyu.com/gallery-images/madin-darby-bovine-kidney-epithelial-cells-mdbk-line>.
- [71]. ŞEKEROĞLU, Z. A., & Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. TÜBAV Bilim Dergisi, 4(3), 221-229.
- [72]. DİNÇER, Y., & Kankaya, S. (2010). DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 30(4), 1365-1373.
- [73]. MacGregor, J. T., Casciano, D., & Müller, L. (2000). Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455(1-2), 3-20.
- [74]. McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H. L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Meo, M. P., & Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 288(1), 47-63.
- [75]. Ostling, G., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123(1), 291-298.
- [76]. Ertürk, Ş. (2001). Sevofoloranın DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin Bening Ve Maling Olgularda Comet Assay Yöntemi İle Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi.
- [77]. Brad Larson.(2016). BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT USA; Asha Sinha and Sachin Katyal, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada.
- [78]. DİKİLİTAŞ, M., & KOÇYİĞİT, A. (2010). Canlılarda “tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. HARRAN TARIM VE GIDA BİLİMLERİ DERGİSİ, 14(2), 77-89.
- [79]. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.
- [80]. Cole, L. A., & Kramer, P. R. (2015). Human physiology, biochemistry and basic medicine. Academic Press.
- [81]. Yıldırım, İ. H., Koçak, N., & Yıldırım, S. C. (2012). Programlı hücre ölümü; literatür bilgilerinin Türkçe derlemesi. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, (2), 58-66.
- [82]. Ulukaya, E., Acilan, C., Ari, F., İkitimur, E., & Yılmaz, Y. (2011). A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*, 36(3).
- [83]. Kanev, M., & Muranlı, F. G. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya University Journal of Science*, 20(1), 33-38.
- [84]. Karaboz, İ., Kayar, E., & Akar, S. (2008). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6(2), 1-18.
- [85]. Pozarowski, P., Grabarek, J., & Darzynkiewicz, Z. (2003). Flow cytometry of apoptosis. *Current protocols in cell biology*, 21(1), 18-8.
- [86]. Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., & Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3).
- [87]. Eke, D., Celik, A., Yılmaz, M. B., Aras, N., Sel, S. K., & Alptekin, D. (2017). Apoptotic gene expression profiles and DNA damage levels in rat liver treated with perfluorooctane sulfonate and protective role of curcumin. *International journal of biological macromolecules*, 104, 515-520.
- [88]. Hao, H., Nancai, Y., Wen, S., & Xiaojuan, Q. (2009). The single-cell gel electrophoresis assay to determine apoptosis induced by siRNA in Colo 320 cells. *African Journal of Biotechnology*, 8(16).

- [89]. Ahamed, M., Akhtar, M. J., Khan, M. M., Alrokayan, S. A., & Alhadlaq, H. A. (2019). Oxidative stress mediated cytotoxicity and apoptosis response of bismuth oxide (Bi₂O₃) nanoparticles in human breast cancer (MCF-7) cells. *Chemosphere*, 216, 823-831.
- [90]. Akbarzadeh, F., Khoshgard, K., Hosseinzadeh, L., Arkan, E., & Rezazadeh, D. (2018). Investigating the Cytotoxicity of Folate-Conjugated Bismuth Oxide Nanoparticles on KB and A549 Cell Lines. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 8(4), 627.
- [91]. Liu, Y., Zhuang, J., Zhang, X., Yue, C., Zhu, N., Yang, L., ... & Zhang, L. W. (2017). Autophagy associated cytotoxicity and cellular uptake mechanisms of bismuth nanoparticles in human kidney cells. *Toxicology letters*, 275, 39-48.
- [92]. Shakibaie, M., Amiri-Moghadam, P., Ghazanfari, M., Adeli-Sardou, M., Jafari, M., & Forootanfar, H. (2018). Cytotoxic and antioxidant activity of the biogenic bismuth nanoparticles produced by *Delftia* sp. SFG. *Materials Research Bulletin*, 104, 155-163.
- [93]. Reus, T. L., Machado, T. N., Bezerra Jr, A. G., Marcon, B. H., Paschoal, A. C. C., Kuligovski, C., & Dallagiovanna, B. (2018). Dose-dependent cytotoxicity of bismuth nanoparticles produced by LASiS in a reference mammalian cell line BALB/c 3T3. *Toxicology in Vitro*, 53, 99-106.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :ASAWIR ESAMALDEEN EBRAHIM MOHAMED

Doğum Tarihi :14.09.1992

E-mail :asawiresam7@gmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Hayvan üretimi - genetik ve hayvan yetiştiriciliği	Hartum Üniversitesi - sudan	2010-2015
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji	Mersin Üniversitesi	2016-2019

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Öğretim Asistanı	Hartoum Üniversitesi - SUDAN	2015 -