

**KUANTUM NOKTALARININ MEMELİ
HÜCRELERİNDEKİ SİTOTOKSİK ve GENOTOKSİK
ETKİLERİ**

**CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF QUANTUM
DOTS in MAMMALIAN CELLS**

DENİZ ÖZKAN VARDAR

PROF. DR. AYŞE NURŞEN BAŞARAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

**CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF QUANTUM
DOTS in MAMMALIAN CELLS**

**KUANTUM NOKTALARININ MEMELİ
HÜCRELERİNDEKİ SİTOTOKSİK ve GENOTOKSİK
ETKİLERİ**

DENİZ ÖZKAN VARDAR

PROF. DR. AYŞE NURŞEN BAŞARAN

Supervisor

Submitted to Institute of Sciences of Hacettepe University
as a Partial Fulfillment to the Requirements
for the Award of the Degree of Doctor of Philosophy
in Nanotechnology and Nanomedicine

2015

DENİZ ÖZKAN VARDAR' ın hazırladığı “**Kuantum Noktalarının Memeli Hücrelerindeki Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yalçın DUYDU

Başkan

.....

Prof. Dr. Ayşe Nurşen BAŞARAN

Danışman

.....

Prof. Dr. Ahmet AYDIN

Üye

.....

Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT

Üye

.....

Doç. Dr. Sevtap AYDIN

Üye

.....

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

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

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

beyan ederim.

15/07/2015

DENİZ ÖZKAN VARDAR

ÖZET

KUANTUM NOKTALARININ MEMELİ HÜCRELERİNDEKİ SİTOTOKSİK ve GENOTOKSİK ETKİLERİ

Deniz ÖZKAN VARDAR

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ayşe Nurşen BAŞARAN

Temmuz 2015, 126 sayfa

Son yıllarda nanomateryal teknolojilerinin ve kullanımlarının artması nedeniyle nanopartül (NP) toksisitesi çok araştırmanın konusu olmuştur. Bir çok avantajlarına rağmen, NP'lerin biyolojik sistemlerle istenmeyen etkileşimlere girerek zararlı etkiler oluşturabileceği iddia edilmektedir. Bu nedenle toplumda NP maruziyeti nedeniyle insan sağlığına ve çevreye olası etkileri hakkında artan bir endişe bulunmaktadır. Pek çok NP'ün bazı hastalıkların gelişmesinde rol oynayabilen inflamasyon, oksidatif stres, sitotoksikite, DNA hasarı gibi istenmeyen etkilere yol açtığı bildirilmiştir. İstenmeyen etkileri önleyebilmek için yeni nanomateryal teknolojilerinin güvenli kullanımını sağlamak oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında, biyogörüntüleme, teşhis ve mekanik gibi pek çok alanda kullanılması hedeflenen kuantum noktalarının, sitotoksik ve genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Kuantum noktalar güneş pillerinde ve kompozitlerde kullanılabilen, ayarlanabilen enerji düzeyine sahip küçük partiküller içermektedir. Bu çalışmada, gümüş sülfür merkaptopropiyonik asit (Ag_2S -(2-merkaptopropiyonik asit)) ve gümüş sülfür mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit (Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit)) kuantum noktalarının Çin hamster fibroblast hücre hattında (V79), nötral kırmızısı alım (NKA) ve 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemiyle sitotoksikitesi değerlendirilmiş ve tek hücre jel elektroforez yöntemi (COMET) ile genotoksikitesi çalışılmıştır. Epigenetik

değişiklikler de gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) tekniği ile incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kuantum Noktalar, Nanotoksikoloji, Sitoksisite, Genoksisite, Nanopartikül, Gümüş sülfür merkaptopropiyonik asit, Gümüş sülfür mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit

Destekleyen Kuruluş: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK),
Proje Numarası: 114S861

ABSTRACT

CYTOTOXIC and GENOTOXIC EFFECTS OF QUANTUM DOTS in MAMMALIAN CELLS

Deniz ÖZKAN VARDAR

Doctor of Philosophy

Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor : Prof. Dr. Ayşe Nurşen BAŞARAN

July 2015, 126 pages

In recent years, because of the increase in the technologies and the uses of the nanomaterials, toxicology has been the subject of many researches. Despite the potential advantages of the nanoparticles (NPs), it has been suggested to trigger undesirable hazardous interactions with biological systems generating harmful effects. Therefore, in the society, there is an increasing concern about the potential effects on human health and environmental effects due to the exposure of NPs. Many of the NPs have been reported to induce adverse effect such as oxidative stress, cytotoxicity, DNA damage, inflammation, which are known to be crucial for the development of many diseases. Thus it is crucial to ensure safety use of new nanomaterial technologies to avoid undesirable effects. In this thesis, it was aimed to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects of quantum dots which have been aimed to be used in many areas such as bioimaging, diagnosis and mechanics. Quantum dots have been used in solar batteries and composites that consist of small particles with arrangeable energy levels. In this study, the cytotoxicity of silver sulfides of 2-mercaptopropionic acid (2-MPA) and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) quantum dots were evaluated by neutral red uptake (NRU) in Chinese hamster fibroblast cell lines (V79). The genotoxicity of these quantum dots were assessed by single cell electrophoresis method (COMET). Epigenetic changes were also examined by real time protein chain reaction (RT-PCR) technique.

Keywords: Cytotoxicity, Genotoxicity, Nanotoxicology, Nanoparticles, Quantum dots, Silver sulfides of 2-mercapto propionic acid, Silver sulfides of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid

Supported by: The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK), Project Number: 114S861

TEŞEKKÜRLER

Doktora tez çalışmalarım sırasında desteğini ve güvenini her zaman hissettiğim değerli tez danışmanım, çalışmalarımın her aşamasında, konunun seçiminden araştırmanın yürütülmesi ve yazımına kadar her konuda beni destekleyen, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile yönlendiren, bana yeni ufuklar açan, en zor zamanlarımda beni yeniden cesaretlendiren, hepsinden önemlisi hayatımın her alanında, her anlamda örnek aldığım, en büyük şansım çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Nurşen BAŞARAN'a; çalışmalarımın malzeme temini, bilgi ve yardımlarından dolayı değerli hocam Doç. Dr. Havva Funda YAĞCI ACAR ve Dr. İbrahim HOCAOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarımın bilgi ve görüşlerinden yararlandığım, benden yardımlarını ve dostluğunu hiç esirgemeyen Doç. Dr. Sevtap AYDIN'a, Dr. Gökçe TANER'e ve Dr. Zehra SARIGÖL'e; Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma en içten sevgi ve saygılarımla teşekkür ederim.

Uzun soluklu bir süreç olan doktora eğitimim boyunca, bu süreci benimle birlikte yaşayan ve tüm başarılarımda büyük emekleri olan, maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Beni her konuda destekleyip sabır ve anlayışla bana yardım eden eşim Dr. Necati VARDAR'a kalbimle sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜRLER	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nanoteknoloji.....	3
2.2. Tarihçe	4
2.3. Nanoyapıların Özellikleri ve Etkileri.....	6
2.3.1. Özgül Yüzey Alanı	6
2.3.2. Manyetik Özellikler	8
2.3.3. Optik Özellikler	8
2.3.4. Kimyasal Özellikler	8
2.3.5. Mekanik Özellikler	8
2.4. Nanoparçacıkların Üretimi.....	9
2.4.1. Yukarıdan Aşağı Üretim Tekniği (Top Down).....	9
2.4.2. Aşağıdan Yukarı Üretim Tekniği (Bottom Up).....	9
2.5. Nanomalzemeler	10
2.6. Nanomalzemelerin Uygulama Alanları	13
2.7. Nanopartiküllerin İstenmeyen Etkileri.....	15
2.7.1. Nanopartiküllerin Maruziyet Yolları	15
2.7.2. Nanopartiküllerin Organizma İçinde Dağılımı	18
2.7.3. Nanopartiküllerin Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri.....	19
2.8. Kuantum Noktaları.....	26
2.8.1. Kuantum Noktaların Fizikokimyasal Yapısı	27
2.8.2. Kuantum Noktalarının Sentezi.....	28
2.8.3. Kuantum Noktalarının Uygulama Alanları.....	29
2.8.4. Kuantum Noktalarının Toksisitesi	30
2.9. Çalışmada Kullanılan Yöntemler.....	32
2.9.1. Sitotoksisite Tayini	32

2.9.2. Genotoksisite Tayini	34
2.9.3. Gen Ekspresyon Ölçümü	35
3. MATERYAL VE METOT	38
3.1. Çalışmada Kullanılan Kuantum Noktaları.....	38
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	38
3.3. Kullanılan Araç Gereçler	39
3.4. Kullanılan Çözeltiler.....	41
3.4.1. DeneYlerde Kullanılan Nanomateryallerin Çözeltileri	41
3.4.2. NKA Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	41
3.4.3. MTT Yönteminde Kullanılan Çözeltiler.....	42
3.4.4. Comet Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	42
3.4.5. Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler.....	44
3.5. Yöntemler	46
3.5.1. Sitotoksisite Değerlendirmesinde Kullanılan Yöntemler.....	46
3.5.2. Comet Yöntemi ile Genotoksik Etkilerin Belirlenmesi.....	49
3.5.3. Gen Ekspresyonu Çalışmasında Kullanılan Yöntemler.....	51
3.6. İstatistiksel Yöntemler	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. Ag ₂ S-(2-merkaptopropiyonik asit) Kuantum Noktası ile Elde Edilen Bulgular	54
4.1.1. Ag ₂ S-(2-merkaptopropiyonik asit) Kuantum Noktasının Sitotoksisitesine İlişkin Bulgular.....	54
4.1.2. Ag ₂ S-(2-merkaptopropiyonik asit) Kuantum Noktasının Comet Yöntemi ile Genotoksisitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	57
4.2. Ag ₂ S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) Kuantum Noktası ile Elde Edilen Bulgular	64
4.2.1. Ag ₂ S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) Kuantum Noktasının Sitotoksisitesine İlişkin Bulgular	64
4.2.2. Ag ₂ S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) Kuantum Noktasının Comet Yöntemi Genotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular	67
4.3. 2-merkaptopropiyonik Asit ile Elde Edilen Bulgular	74
4.3.1. 2-merkaptopropiyonik Asit Sitotoksisitesine İlişkin Bulgular	74
4.4. Mezo-2,3-dimerkaptosüksinik Asit ile Elde Edilen Bulgular.....	77
4.4.1. Mezo-2,3-dimerkaptosüksinik Asit Sitotoksisitesine İlişkin Bulgular	77
5. TARTIŞMA	80

6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	89
KAYNAKLAR.....	89
ÖZGEÇMİŞ.....	106

ÇİZELGELER

Çizelge 2. 1. Çeşitli nanomalzemelerin özellikleri ve kullanım alanları	13
Çizelge 2. 2. Nanomalzemelerin en çok kullanılan alanları	14
Çizelge 4. 1. NKA yöntemine göre Ag_2S -(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerindeki sitotoksik etkisi.....	54
Çizelge 4. 2. MTT yöntemine göre Ag_2S -(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi	56
Çizelge 4. 3. Ag_2S -(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular	57
Çizelge 4. 4. Ag_2S -(2-merkaptopropionik asit) KN'larının ortalama ΔCT değerleri	59
Çizelge 4. 5. Ag_2S -(2-merkaptopropionik asit) KN'larının ortalama $\Delta\Delta CT$ değerleri.....	59
Çizelge 4. 6. Ag_2S -(2-merkaptopropionik asit) KN'larının kontrol grubuna kıyasla kat değişimi-fold change değerleri	60
Çizelge 4. 7. Ag_2S -(2-merkaptopropionik asit) KN'larının kat regülasyonu-fold regulation değerleri ve biyolojik anlamlılık çizelgesi.....	61
Çizelge 4. 8. NKA yöntemine göre Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi.....	64
Çizelge 4. 9. MTT yöntemine göre Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi.....	66
Çizelge 4. 10. Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular	67
Çizelge 4. 11. Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının ortalama ΔCT değerleri	69
Çizelge 4. 12. Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının ortalama $\Delta\Delta CT$ değerleri	70
Çizelge 4. 13. Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının kontrol grubuna kıyasla kat değişimi-fold change değerleri	70
Çizelge 4. 14. Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının kat regülasyonu-fold regulation değerleri ve biyolojik anlamlılık çizelgesi.....	71
Çizelge 4. 15. NKA yöntemine göre 2-merkaptopropiyonik asit V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi	74

Çizelge 4. 16. MTT yöntemine göre 2-merkaptopropiyonik asit V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi	76
Çizelge 4. 17. NKA yöntemine göre mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asitin V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi	77
Çizelge 4. 18. MTT yöntemine göre mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asitin V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi	79

ŞEKİLLER

Şekil 2. 1. Bazı nano ölçek karşılaştırma örnekleri	4
Şekil 2. 2. Aynı malzeme miktarı için yüzey alanın artışı	7
Şekil 2. 3. Yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya üretim tekniği	10
Şekil 2. 4. Tek duvarlı karbon nanotüp (a), Çok duvarlı karbon nanotüp (b).....	11
Şekil 2. 5. 2006 – 2011 yılları arasında nanomalzemelerin üretim miktarları.....	15
Şekil 2. 6. Nanoparçacıklara maruziyet yolları.....	16
Şekil 2. 7. NP'lerin hücre içine alınışı ve DNA'yı etkileme mekanizması	20
Şekil 2. 8. Fonksiyonel kuantum noktası	27
Şekil 2. 9. Kuantum noktalarının büyüklüğü ve renk değişimleri	28
Şekil 4. 1. NKA yöntemine göre Ag ₂ S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi	55
Şekil 4. 2. MTT yöntemine göre Ag ₂ S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi	56
Şekil 4. 3. Ag ₂ S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına etkisi.....	58
Şekil 4. 4. Ag ₂ S-(2-merkaptopropionik asit) KN'larının ortalama ΔCT değerleri	62
Şekil 4. 5. Ag ₂ S-(2-merkaptopropionik asit) KN'larının ortalama ΔΔCT değerleri	62
Şekil 4. 6. Ag ₂ S-(2-merkaptopropionik asit) KN'larının kontrol grubuna kıyasla kat değişimi-fold change değerleri	63
Şekil 4. 7. NKA yöntemine göre Ag ₂ S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi.....	65
Şekil 4. 8. MTT yöntemine göre Ag ₂ S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi.....	66
Şekil 4. 9. Ag ₂ S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) noktasının V79 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına etkisi.....	68
Şekil 4. 10. Ag ₂ S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının ortalama ΔCT değerleri	72
Şekil 4. 11. Ag ₂ S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının ortalama ΔΔCT değerleri	72

Şekil 4. 12. Ag ₂ S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının kontrol grubuna kıyasla kat değişimi-fold change değerleri.....	73
Şekil 4. 13. NKA yöntemine göre 2-merkaptopropiyonik asit V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi.....	75
Şekil 4. 14. MTT yöntemine göre 2-merkaptopropiyonik asit V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi.....	77
Şekil 4. 15. NKA yöntemine göre mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asitin V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi	78
Şekil 4. 16. MTT yöntemine göre mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asitin V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Açıklamalar

μM	Mikromolar
g	Gram
Gy	Gray, iyonize radyasyon birimi
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar

Kısaltmalar

Açıklamalar

ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
Buckyball	C_{60} atomundan oluşan molekül
COMET	Tek hücre jel elektroforez
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Vasatı
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit disodyum
FCS	Fetal calf serum
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HPRT	Hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz (Gen mutasyon yöntemi)
LD50	Populasyonun %50'sinde ölüm meydana getiren doz
LMPA	Düşük erime noktalı agar
MN	Mikroçekirdek
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyltetrazolium bromide (Hücre proliferasyonu testi)
NP	Nanoparçacık, Nanopartikül

NR	Neutral red (Nötral kırmızı)
NMPA	Normal erime noktalı agar
NO ₂	Azot dioksit
NOAEL	No observed adverse effect level (Hiç yan etki gözlenmeyen düzey)
-OH	Hidroksil anyonu
PBS	Phosphate buffered saline (Fosfat tamponlu serum fizyolojik)
PLGA	Poli (D,L laktik ko-glikolik asit)
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reactive oxygen species (Reaktif oksijen türleri)
SCEs	Sister chromatid exchange (Kardeş kromatit değişimi)
SEM	Scanning electron microscope (Taramalı elektron mikroskop)
TEM	Tunelling electron microscope (Tünellemeli elektron mikroskop)
TiO ₂	Titanyum dioksit
UV	Ultaviyole
ZnO	Çinko oksit

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, materyalleri nanometre (nm) düzeyinde ölçülebilecek şekilde işleyen, pek çok araştırma alanını ve bölümü içeren bir alandır. Metal, yarı iletken, seramik, organik molekül, polimerik ya da kompozit gibi malzemelerden oluşabilen nanomateryaller; öncelikle eczacılık, tıp olmak üzere sağlık, iletişim, elektronik, endüstri ve askeri alanlarda, tüketici ürünlerinde ve çevrede yaygın şekilde kullanılmaktadır. Nanoboyut terimi, maddenin temel yapı taşları ve moleküllerin sahip olduğu büyüklükleri ifade etmektedir ve herhangi bir birimin milyarda biri anlamına gelmektedir. Biyolojik bilgiyi taşıyan ve çeşitli görevleri olan protein, DNA gibi biyolojik yapılar da fiziksel boyut açısından nanoteknolojinin içinde yer almaktadır [1].

Nanoboyuttaki malzemeler, makro ve mikro boyuttaki malzemelerden farklı yapısal özellikler göstermektedir. İletkenlik, optik, elektronik ve manyetik özellikler gibi fiziksel özellikler, atom yapısı ve sayısı nanopartiküllerde (NP) farklı olabilmektedir. Farklı özellikleri nedeniyle nanoboyutlu bileşiklerin teknolojilerinin gelişmesine ve pek çok alanda kullanımlarının artmasına neden olmuştur [1].

Son yıllarda nanoteknolojinin gelişimine paralel olarak ortaya çıkan riskler, tüm dünyada gittikçe artan bir şekilde tartışılmaya başlanmıştır. Yaşantımızda, çevremizde etki mekanizmaları tam olarak bilinmeyen nanomateryal kullanımının hızla artması, bu malzemelerin insan sağlığında olası istenmeyen etkilerinin incelenmesi gereğini ortaya çıkarmıştır. Önceleri sadece avantajları göz önünde bulundurulurken nanoteknoloji uygulamalarının hızla yayılması üzerine NP'lerde, tehlike ve risk değerlendirme kavramları ortaya atılmaya başlanmıştır. Ancak nanoteknolojinin gelecekte sunacağı yararlar konusunda önemli çalışmalar yapılırken, riskleri hakkında yapılan araştırmalar yetersizdir [2].

Nanoyapıların toksisitesi henüz tam olarak anlaşılmasına rağmen yapılan bazı araştırmalar, toksisitenin NP'lerin çeşidi, şekli, yüzey kimyası, büyüklüğü (tek başına veya toplanmış halleride), konsantrasyonu ve sentezlenmesinde kullanılan bazı maddeler gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğunu göstermiştir [3].

Organizma, NP'lere bir çok yolla maruz kalmaktadır. İnsanlarda nano yapıların solunum, oral ve deri yoluyla vücuda alındığı ve dolaşıma geçebildiği bildirilmektedir. Değişik

yollarla alınan ve dolaşıma geçen NP'lerin, pek çok organı etkileyerek bazı hastalıkların ortaya çıkmasına yol açarak, insan sağlığına zararlı olabileceği iddia edilmektedir.

Diğer taraftan, NP'lerin hücreleri ve genetik materyali nasıl etkilediğini belirlemeye yönelik çalışmalar nanotoksikolojinin yeni ve kapsamlı bir alanıdır. Bireylerin NP'lere maruziyetleri giderek arttığından bu partiküllerin olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin ortaya çıkarılmasını sağlayan çalışmaların yapılması önem kazanmaktadır.

Bu tez çalışmamızda, nanotıp alanında kullanılması hedeflenen gümüş sülfür merkaptopropiyonik asit (Ag_2S -(2-merkaptopropiyonik asit)) ve gümüş sülfür mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit (Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit)) kuantum noktalarının Çin hamsteri fibroblast hücre hattında (V79) sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması hedeflenmektedir.

Araştırmamızda nötral kırmızısı alım (NKA) ve 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemiyle maddelerin sitotoksik etkileri incelenmiş daha sonra tek hücre jel elektroforez yöntemi (Comet) ile genetik hasar oluşturma kapasiteleri belirlenmiştir. Gen ekspresyon değişikliklerini belirlemek için de gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılmış olup, apoptoz yoluyla hücre ölümüne sebep olup olmadığını belirleyebilmek için RT-PCR yöntemi ile bax, bcl-2, kaspaz 9 genlerinin hücrelerdeki ifade miktarlarındaki değişimlerine bakılmıştır.

Tez çalışmamız, TÜBİTAK 114S861 No'lu "Kuantum Nokta Nanopartiküllerin V79 Fibroblast Hücrelerinde Sitotoksikite ve Apoptoz Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi" projesi ile desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoteknoloji

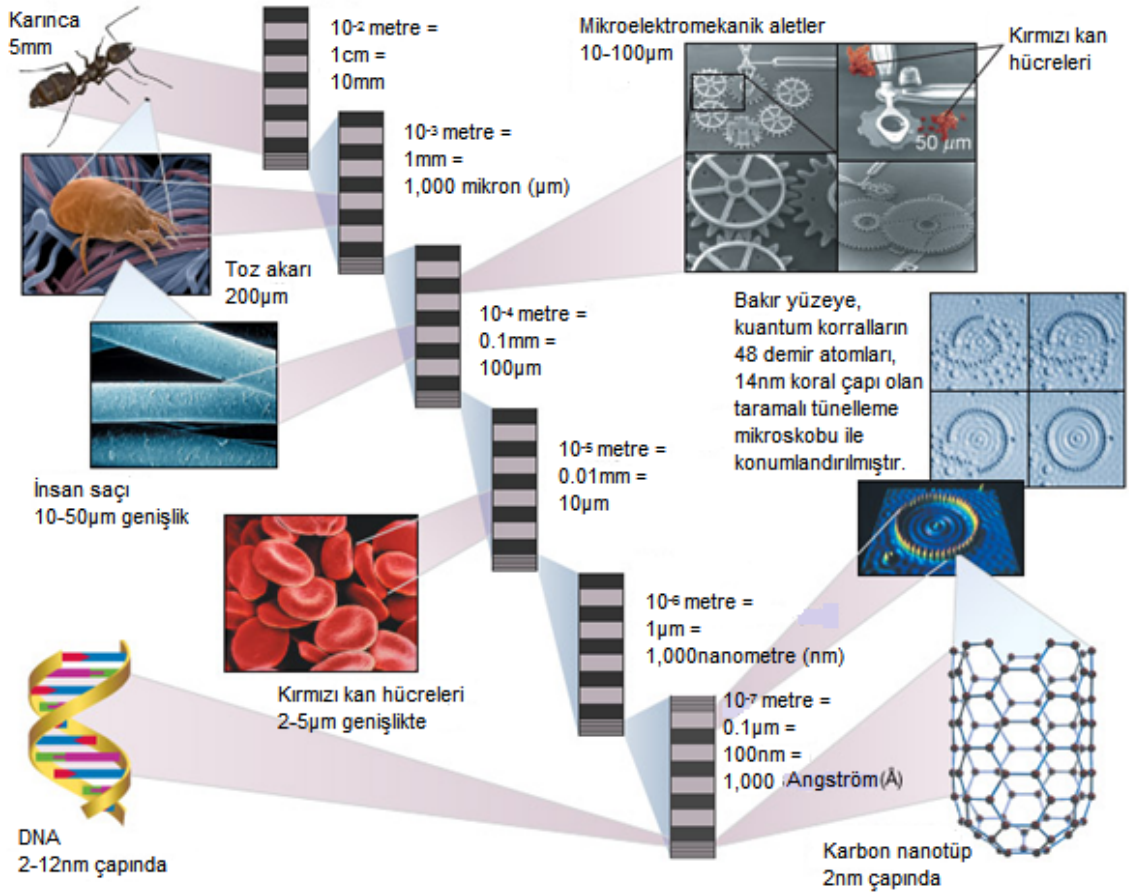
Nanoteknoloji, maddenin atom ve moleküler düzeyde düzenlenmesi ve kontrol edilmesi yoluyla gerçekleştirilen işlemlere verilen genel addır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) “Ulusal Nanoteknoloji Girişimi”, nanoteknolojiyi, yaklaşık 1-100 nm aralığında boyutlardaki maddenin incelenmesi ve işlenmesi şeklinde tanımlamaktadır. Nano kelimesi Yunanca “nannos” (küçük yaşlı adam veya cüce), Latince “nanus” kelimelerinden türetilmiştir. Türkçede sözcük olarak, bir fiziksel büyüklüğün milyarda biri anlamına gelmektedir [3]. İnsan tırnağının her saniyede bir nanometre (nm) uzadığı, insan saç teli çapının yaklaşık 30.000 nm olduğu bilinmektedir. Başka bir deyişle, nm yanyana dizilmiş 3-5 atomun uzunluğuna denk gelmektedir. Nano ölçü birimini gösteren örnekler Şekil 2.1.’de verilmiştir. Nanoteknoloji, nanoboyutta uygulamaları olan tüm teknolojileri kapsamakla birlikte işlevi fazla, daha az ham madde ve enerji tüketen, daha küçük, ucuz, hafif ve hızlı cihazların üretiminin önünü açmayı amaçlanmaktadır [4].

Atom çapının örnek olarak ele alınması, nano boyutun daha iyi anlaşılabilmesine olanak sağlamaktadır. Hidrojen atomuna bakıldığında, çapının yaklaşık 0.1 nm boyutunda olduğu bilinmektedir. Kendi aralarında bağlar oluşturan atomlar, kimyasal bileşiklerin en küçüğü olan molekülleri oluşturmaktadır. Moleküller ise yaşamın temel yapı taşı olan hücreleri meydana getirmektedir. Yaklaşık olarak 30 atomun bir araya gelmesiyle oluşan bir molekül, 1 nm çapında büyüklüğe sahip olup, insan hücrelerinin büyüklüğü 3000 ile 200.000 nm arasında değişmektedir. 100 nm’den daha küçük boyuttaki malzemelerin oluşturulmasıyla doğada bulunan temel yapı taşlarının boyutunda malzemeler ve araçlar geliştirilmektedir [5].

“Nanobilim” nm ölçeğinde madde ve enerjiyi inceleyen bir bilimdir. Nano ölçekte fizik kuralları farklı işleyerek, madde farklı özellikler taşımaktadır. Nano boyuttaki maddelerde geleneksel fizik kurallarının yerini “kuantum fiziği kuralları” alır. Nano düzeyde malzemelerin özellikleri makro boyutlardan tamamen farklı olup, nano boyutlara yaklaştıkça optik, fiziksel, elektriksel ve kimyasal yeni özellik ortaya çıkmaktadır [4].

Nanobilim ve nanoteknoloji, moleküler biyoloji, gen mühendisliği, bilişim ve haberleşme, savunma, uzay ve uçak teknolojilerine kadar uzanan çok çeşitli alanlarda etkinlik göstermektedir. Bu alanındaki araştırma ve geliştirme (Ar-Ge) çalışmaları, bu yeni

özelliklere sahip malzeme, aygıt ve sistemlerin gelişmesine ve oluşturulmasına yönelmiştir[5].



Şekil 2. 1. Bazı nano ölçek karşılaştırma örnekleri

Nanoteknoloji ile farklı yöntemlerle nano boyutta malzemeler üretilmektedir. Bu yöntemler yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı yaklaşımı olarak özetlenebilir. Yukarıdan aşağı yaklaşımıyla en küçük yapıların bile boyutunu nano-boyuta indirgeme sağlarken, aşağıdan yukarı doğru yöntemle tek tek atom ve moleküller nano yapıları oluşturacak şekilde işlenir [6,7].

2.2. Tarihçe

Nano ölçeğin ilk kabul edilişi, 29 Aralık 1959'da, Amerikan Fizik Topluluğu'nun Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nde (Caltech) gerçekleştirilen yıllık toplantısında Nobel ödüllü fizikçi Richard Feynman'ın verdiği konuşmaya dayanır. "Aşağıda Daha Çok Şey Var: Fiziğin Yeni Bir Sahasına Davet" başlıklı tarihsel konuşmasında Feynman, ilk kez malzeme ve aygıtların nm boyutlarındaki özelliklerinin gelecekte pek çok kullanıma

olanak tanıyacağını ve hatta “Britanica Ansiklopedisi” nin 24 cildinin, bir iğnenin ucu kadar küçültülebileceğini ileri sürmüştür. Feynman ayrıca atom ve moleküler boyutta üretim olduğunda yeni buluşların yapılabileceğini ve bu kapsamda öncelikle nano boyutta ölçme ve üretim yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiğini belirtmiştir. Feynman, maddeleri işleyerek ve kontrol ederek pek çok olayın gerçekleşebileceğini vurgulayarak, geleceğin bilim insanlarının ve mühendislerinin, atom ve moleküllerden, karmaşık yapılar inşa edebileceklerini öngörmüştür [8]. Nanoteknoloji kelimesini ilk defa kullanan Tokyo Bilim Üniversitesi’nden Norio Taniguchi, 1974’de yayınlanan bir makalesinde “Nanoteknoloji’yi genel olarak malzemelerin atom-atom ya da molekül-molekül işlenmesi, ayrılması, birleştirilmesi ve bozulması” şeklinde tanımlamıştır [9]. 1980’lerde, K. Eric Drexler’in, “Moleküler İmalata Yönelik Protein Tasarımı” adlı makalesinde, nano boyutlarda moleküler düşünceler ve tasarımlar ortaya atılmıştır. Drexler daha sonraki çalışmalarında, kendi kendini kopyalayan bir “derleyicinin” yaratılmasıyla, aygıtları ve yapıları karmaşık atomik özellikler şeklinde üretmenin olası yöntemlerini tanımlamıştır [10].

Bu gelişmeler ışığında, nanoteknoloji alanındaki asıl gelişme, IBM’deki 1986 Nobel ödüllü Gerd Binnig ve Heinrich Röhrer’in malzemeleri atomik düzlemde incelemeye ve atomik ölçekte işlemeye yarayan ilk aygıtı “Taramalı Tünelleme Mikroskobu (TTM) (Scanning Tunneling Microscope)” icat etmeleriyle olmuştur. 1981’de TTM’nin icat edilmesiyle, nano boyutlu malzemelerin işlenmesine ve görüntülerinin alınmasına olanak sağlanmıştır. Curl Kroto ve Smalley’in 1985’teki çalışmalarının sonucu ürettikleri, yeni nano yapıları karbon modifikasyonu olan, “Buckyball” olarak da adlandırılan, futbol topu biçimindeki “fullerenlerin” keşfi ve 1986’da “Atomik Kuvvet Mikroskobunun (Atomic Force Microscope) (AKM)” icat edilmesi, nanoteknoloji tarihindeki diğer dönüm noktalarıdır [3]. 1991’de, fullerenlerle ilgili çalışmaların sonucunda; temelde kenarları silindirik oluşturacak şekilde yuvarlanmış grafit tabakalardan oluşan ve özellikleri nedeniyle hem elektrik-elektronik hem de malzeme mühendisliğinde çok fazla uygulama potansiyeli olduğu öngörülen karbon nanotüplerin (KNT) keşfi gerçekleşmiştir.

1990’larda, ABD, Avrupa ve Japonya’ da ki hükümetler, gelişen bu teknolojiye paralel olarak, nanotıp, nano elektronik, nanomalzeme gibi nanoteknolojinin yeni çalışma alanlarına yönelmişlerdir [9].

2000 yılı, ABD’de nanoteknolojinin geleceği açısından önemli bir yıl olmuş, nanoteknoloji konusunda önemli bir adım olarak nitelendirilen Ulusal Nanoteknoloji

İnisiyatifi, dönemin başkanı Bill Clinton'un direktifleriyle oluşturulmuştur. Bu tarihten itibaren dünyada birçok ülke kendi araştırma ve geliştirme birimlerini oluşturmaya başlamıştır.

2006 yılında, kansere karşı ilaç dağıtımını için nanoparçacıklar kullanılarak vücudun belirli bölgelerine ilaç ulaşımını yeteneği geliştirilmiştir. Bu konuda Harvard Tıp Fakültesi, Massachusetts Teknoloji Enstitüsü, Harvard Kanser Nanoteknoloji Merkezi ve Gwangju Bilim ve Teknoloji Enstitüsü (Kore)'nden bilim insanları, nanoparçacıkların kanser tedavisinde başarıyla kullanılabileceğini açıklamışlardır [11].

2.3. Nanoyapıların Özellikleri ve Etkileri

Nanoteknolojinin temel araştırma konusu, nanoyapıların yüzeylerinin incelenmesi ve uygulanmasıyla, hassas boyutlu yapıların ve moleküler birimlerin üretim olanaklarının değerlendirilmesidir. Nano boyutlarda, malzemenin fiziksel özelliklerinde önemli değişikliklerin meydana gelmesi ve bunun sonucunda elde edilen NP'lerin kullanım alanlarının değerlendirilmesi nanoteknolojinin önemli bir uğraş alanıdır. Büyük parçacıklarla kıyaslandığında, NP'ler boyut, dağılım, morfoloji gibi farklı özellikler içeren geliştirilmiş yeni maddelerdir. Nano yapıların özgül yüzey alanı, manyetik, optik ve mekanik özellikleri makro yapılardan farklılık göstermektedir.

Fizikokimyasal özellikler bir çok biyolojik ve yan etkiyle ilişkilendirilebilmektedir. Hansen [12] ve Stone [13] arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalara göre bu özelliklerin önem sıralaması; kimyasal yapı, büyüklük, şekil, kristal yapı, yüzey alanı ve çözünürlüğüdür. NP'lerin boyutları azaldıkça her bir birime düşen partikül seviyesi artmaktadır. Yapı küçüldükçe yüzeydeki atomların sayısında katlanarak artmasından dolayı biyolojik sistemleri etkilemektedir. Bu sebeple makro yapıda toksik olmayan materyal, nano yapıya geçince toksik etki gösterebilmektedir [14].

2.3.1. Özgül Yüzey Alanı (m²/g)

NP'lerin yüzey alanı özelliği, genel olarak partikül boyutuna bağlı olarak değişim göstermektedir. Küçük partiküller büyük partiküllere göre daha fazla yüzey alanı oluşturmaktadır. Nanoparçacıkların boyutları azaldıkça, yüzey hacimleri artmaktadır (Şekil 2.2.). Bu yüzden NP'lerin atom sayısı ve kimyasal reaktifliğinde de artış olmaktadır. Yüzey alanındaki artış serbest radikal ve geçiş metal iyonlarının salınımında artmasına neden olarak hücreyi etkilemektedir. Yüzey alanı ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunun doğru orantılı olarak arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [15]. Reaktif

oksijen türlerinin ve DNA hasarının artması partikül boyutuna bağlı olarak yüzey alanının artmasıyla da ilişkilendirilebilmektedir [16]. Metal parçacıkların yüzey alanı arttıkça, yüzeydeki enerjinin artması sonucu belirli uygulamalardaki biyolojik aktiviteleri artabilir. Gümüş nanoparçacıkların, antimikrobiyel alandaki uygulamaları örnek verilebilir.

NP'lerin, polimer dolgusu olarak kullanımı, büyük yüzey alanı ve güçlü polimer-dolgu etkileşimine neden olur. Düşük katkılarda malzemenin daha dayanıklı (güçlü) olmasını sağlar. Bu durum, gelişmiş malzeme performansını sağlayarak ve daha az malzeme kullanımına olanak tanıyarak, maliyetin düşmesine yardımcı olur. Silikat NP'lerin tabaka halinde yapılara sahip olmaları ve polimerik malzemeye göre düşük miktarda silikat eklenmesine rağmen oldukça büyük özgül alan elde edilmesini sağlayabilmeleri, camlar için engel (düşük cam geçirgenliği) görevi gören fiziksel bir yapı oluşturabilir. Bu özellik, molekülün metale nüfuz etmesi için gereken ortalama yolu büyük miktarda uzatarak, düşük molekül ağırlığı olan maddelerin oluşturulmasını sağlayabilir. Bu özellik, otomotiv yakıt sistemlerinde, ince filmlerde, gıda ve kimyasal ambalajlama gibi çeşitli uygulamalarda kullanılabilir [17].



Şekil 2. 2. Aynı malzeme miktarı için yüzey alanının artışı

2.3.2. Manyetik Özellikler

Parçacık boyutunun nano boyuta düşmesi, hacimli malzemeye (bulk) oranla manyetik davranışta değişmeye neden olur. Bu değişme sonucu, bazı transformatör ve sensör gibi uygulamalarda, yumuşak kıvrımlı manyetik malzemeler elde edilebileceği gibi bunun aksine sert manyetik malzemelerde yapılabilir. Bu özelliklerden medikal uygulamalarda fazlaca yararlanılmaktadır. Tek başlarına metalik manyetik nanoparçacıklar (genellikle çekirdek/kabuk yapısında), süper-manyetik davranış sergileyebilir ve ilaç taşıyıcı sistemlerde (örneğin Ni ve Fe), hipertermi ve MRI kontrast reaktifleri gibi çeşitli medikal uygulamalarda kullanılabilirler. Ayrıca, ZnO, TiO, CdS, CdSe, ZnSe ve PbSe gibi NP içeren polimer kompozitler de medikal görüntüleme de kullanabilir [18].

2.3.3. Optik Özellikler

NP boyutunun ışığın kritik dalga-boyundan daha küçük olmasıyla saydamlık elde edilebilir. Bu da nanomalzemeleri; saydamlık ve UV, IR-soğurma, iletkenlik, mekaniksel güç gibi diğer özelliklerini birleştirerek kaplama uygulamaları için oldukça uygun hale getirmektedir. Nanomalzemelerin, ışık soğurma ve süzme gibi optik özellikleri kozmetik uygulamalarda da kullanılmasına olanak sağlar. Optik özellikler özellikle yüzey plazmon rezonans için de uygundur. Metal NP'ler yüksek duyarlılıktaki sensörler ve gelişmiş görüntüleme mikroskopisi için kullanılmaktadır [19].

2.3.4. Kimyasal Özellikler

Bir maddenin kimyasal değişikliklere ya da kimyasal tepkilemelere girme eğilimi olarak da adlandırabileceğimiz kimyasal reaktivite, nanomalzemelerin kataliz ve sensör gibi uygulamaları için önemli bir özelliktir. Kataliz, büyük yüzey alanı/hacim oranı ve olası homojen NP dağılımıyla gelişmektedir. Bu da yakıt pilleri ve katalitik dönüştürücülerde fazlasıyla kullanılmakta olan platin grubu değerli metallerin ihtiyaç duyulan miktarlarının azaltılmasına yardımcı olur. Yalnızca NP halindeyken etkili bir katalizör olabilen Au ve bunun gibi daha az kullanılan diğer metallerin de kullanımının önünü açmaktadır [20].

2.3.5. Mekanik Özellikler

Nano boyutlu malzemelerin sentezlenmesiyle birlikte, bu yapıların ne kadar farklı davranabilecekleri ve bu davranışlarından doğan çok farklı işlevlerin elde edilebileceği anlaşılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, malzemelerin boyutunun küçüldüğünde malzemeye özgü yeni özelliklerin ortaya çıktığını desteklemektedir. Boyutlar nm ölçeklerine yaklaşırken malzemenin özellikleri kuantum mekaniğinin kontrollüne girmektedir. Atom yapı, geometri sayısının fiziksel özelliklerin belirlenmesinde etkin rol

oyunmaktadır. Örneğin, nano yapının iletkenliği, o yapıya tek bir atomun eklenmesiyle bile değişebilmekte, nano ölçeklerde atomlar arası bağ yapısı da değişikliğe uğrayarak malzemenin mekanik özelliklerinde değişikliklere yol açmaktadır. Benzer şekilde, yapıyı oluşturan NP'lerin kimyasına, en/boy oranına, polimer matrisle etkileşimlerine bağlı olarak farklı mekanik özelliklerde kompozit malzemelerin üretilebileceği gösterilmiştir. Metal oksit seramik NP'lerinin, bazı durumlarda mekanik gücünün arttığı, bunun da düşük ağırlıkta (daha hafif) malzemelerin elde edilmesine olanak sağladığı görülmüştür. Ayrıca, metal oksidin kimyasal yapısına bağlı olarak matris materyal arasındaki fazla arası etkileşimlerle, üretilecek kompozit malzemenin yüksek ya düşük oranda katılık, güç, sertlik gibi mekanik özelliklerinde değişimlerin öngörülebilir olduğu gösterilmiştir [20].

2.4. Nanoparçacıkların Üretimi

Üretim aşağıdaki iki ana yöntem izlenerek yapılmaktadır [21] (Şekil 2.3.):

- Yukardan Aşağıya Üretim Yöntemi (Top Down)
- Aşağıdan Yukarıya Üretim Yöntemi (Bottom Up)

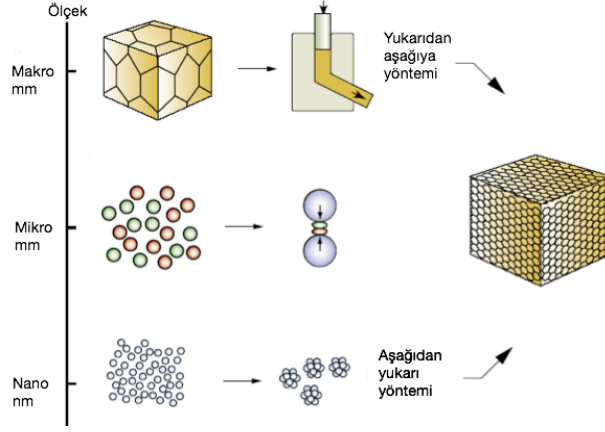
2.4.1. Yukarıdan Aşağı Üretim Tekniği (Top Down)

Yukarıdan aşağıya yöntemi katı bir malzemeyi, mekanik ve kimyasal yöntemler kullanarak parçalayıp nano boyuta indirme esasına dayanmaktadır. Kaba malzemenin daha küçük parçalara bölünme işlemidir. Bu yöntem en iyi örnek olarak yarı iletken teknolojisi gösterilebilir. Mikro elektronikte çok önemli bir yere sahip olan fotolitografi yönteminde silisyumun kristal düzlemlerinin aşındırılmasıyla 3-boyutlu yapılar elde edilebilir. Fotolitografi yöntemiyle 100 nm üzeri bilgisayar çipleri ve diğer mikro elektronik cihazlar, elektron ışın litografisiyle de 20 nm ye kadar olan yapılar üretilebilmektedir [22]. Bunun yanısıra lazer buharlaştırma ve mekanik öğütme de yukarıdan aşağıya üretim tekniklerindedir [23].

2.4.2. Aşağıdan Yukarı Üretim Tekniği (Bottom Up)

Aşağıdan yukarıya yöntemi; atom veya moleküller ile organik veya inorganik yapıları üretme prensibine dayanır. Bu yöntem de tek tek atom ve moleküller, NP oluşturacak şekilde işlenir. Nanokristallerin metal ve alaşımlarının üretiminde kullanılan gaz yoğunlaştırma tekniği aşağıdan yukarıya üretim tekniğine örnek verilebilir. Ayrıca kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma, sol-jel yöntemleri de bu üretim yönteminin diğer teknikleridir [24]. Karbon nanotüp (KNT) ve fullerenler de aşağıdan yukarıya üretim tekniğiyle oluşturulmuştur. KNT; karbon atomlarının tüm oluşturmak

amacıyla yan yana getirilmesiyle yapılmaktadır. KNT'lerle, yüksek ısı iletimi sağlayan, kompozit malzemeler, yüksek enerji ve verim sağlayan, güvenliği yüksek çift katmanlı devre elemanları üretilmektedir [25] (Şekil 2.3.).



Şekil 2. 3. Yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya üretim tekniği [26]

2.5. Nanomalzemeler

Çok çeşitli atom dizilimleriyle oluşabildiğinden çok farklı özelliklerde nanomateryal bulunmaktadır. Nanomalzemeleri ticari kullanımları ya da çevresel yayılımları açısından farklı şekillerde sınıflandırmak mümkündür. Nanomalzemeler, üretim yöntemlerine, kimyasal yapılarına ve boyutlarına göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir (Çizelge 2.1.).

Nanomalzemeler boyutlarına göre;

- Sıfır Boyutlu Nanomalzemeler,
- Tek Boyutlu Nanomalzemeler,
- İki Boyutlu Nanomalzemeler,
- Üç Boyutlu Nanomalzemeler

şeklinde dört sınıfta incelenebilmektedir.

Sıfır boyutlu nanomalzemelere en güzel örnek; NP'ler olup boyutları 1-100 nm aralığındadır. NP'ler solunum, sindirim ve deri yoluyla vücuda girebilirler. Tek boyutlu malzemeler; nanotüpler, nanoçubuklar ve nanotellerdir. Tek boyutlu nanomalzemeler, elektronik cihaz üretimi, kimya ve mühendislik gibi alanlar da kullanılmaktadır. İki boyutlu nanomalzemeler, nanofilmleri ve nanokatmanları içermektedir. Üç boyutlu

nanomalzemeler ise çökelti, koloit, dendrimerler ve kuantum noktalar (KN) gibi parçacıklardır [27].

Nanomalzemeler kimyasal içeriklerine göre de; karbon temelli nanoyapılar, metalik temelli nanoyapılar, organik temelli nanoyapılar ve kil temelli nanoyapılar şeklinde de sınıflandırılabilir [28].

a) Karbon temelli nanoyapılar

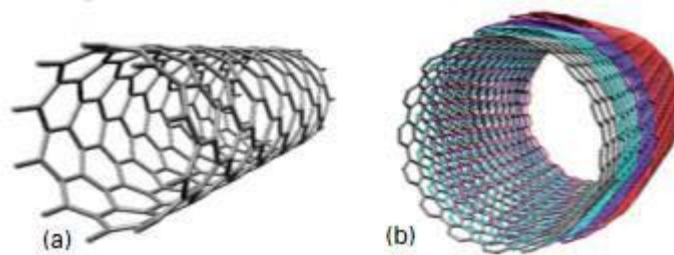
Temel yapıtaşı karbon olan ve C-C bağlarıyla oluşturulan nanoyapılar olup karbon atomlarının bağlanma şekillerine göre farklı yapılar da elde edilmektedir.

Iijima [29] tarafından 1991 yılında bulunan karbon nanotüpler (KNT), silindir şeklindeki bir karbon allotropu olup, sadece karbon atomu içerirler. KNT'ler basit bir yapıya sahip olmalarına rağmen, boy ve çap değerine göre fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişebilmesi, kendilerine has elektriksel özelliklere sahip olmaları ve ısıyı iyi iletmeleri nedeniyle bir çok araştırmanın kaynağı olmaktadır.

Grafen levhanın bir silindir etrafında sarılmış hali olarak düşünebileceğimiz karbon nanotüpler, farklı boy ve çaplara sahip olabilecekleri gibi, tek ve eş merkezli iç içe geçmiş birden fazla katmandan da oluşabilir (Şekil 2.4.). Buna göre karbon nanotüpler;

- i. Tek Duvarlı Karbon Nanotüpler (TDKNT)
- ii. Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler (ÇDKNT)

olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar [30].



Şekil 2. 4. Tek duvarlı karbon nanotüp (a), Çok duvarlı karbon nanotüp (b)

TDKNT'ler, 1-10 nm çapına ve bu çapa kıyasla daha uzun bir boya (mikrometreden santimetreye kadar) sahip, karbondan üretilen içi boş silindir şeklindeki yapılardır. ÇDKNT'lerde TDKNT'lere benzer bir yapıya sahiptir ancak birden çok iç içe geçmiş veya eş merkezli silindirik duvarlar mevcuttur. Silindirik duvarlar arasındaki boşluk grafit katmanları arasındaki boşlukla (~0.0334 nm) kıyaslanabilir ölçüdedir [30].

b) Metalik temelli nanoyapılar

Metalik temelli nanoyapılar, yığın haldeki metal bileşiklerinin nano yapıdaki eşdeğeridir. Nano demir (Fe) ve nano gümüş (Ag) örnek olarak verilir. Metalik nanoparçacıkların oksitleri de nanoyapılar olarakta kullanılmaktadır. Örneğin; titanyum dioksit (TiO_2) ve çinko oksit (ZnO) gibi. TiO_2 ve ZnO türü NP içeren malzemeler, nanoölçek düzeyde şeffaf bir yapıya sahip olup, morötesi (UV) ışınları emme ve yansıtma özelliklerine sahiptir. Bu NP'ler, günlük hayatta güneş kremleri ve boya gibi ürünlerle yerini almaya başlamıştır. Bununla birlikte, metalik temelli nanomalzemeler, başta biyoteknoloji ve tıp alanında görüntüleme, ilaç ve gıda katkı maddelerinde, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde, elektronik eşya üretiminde ve cam ve boya sanayi gibi farklı alanlarda kullanım alanına sahiptir. Bilgisayar, gözlük ve fotoğraf makinesi ekranlarının yüzeyleri üzerinde bulunan nano boyutlu ince film malzeme, su geçirmez, kendi kendini temizleyen, ultraviyole veya kızıl ötesi ışığa dayanıklı, anti mikrobik ve darbelere karşı dirençli olma gibi farklı özelliklere sahip olurlar [31]. Nano boyutta gümüş ve titanyum parçacıklarıyla hazırlanan boyalar antibakteriyel ve kendi kendini temizleyebilme özelliği kazanırken, uçak yüzeylerinde kullanılan ince boya kaplamalarıyla, uçağın mevcut ağırlığını azaltması, aynı zamanda klasik boya kaplamalarının çözücü içeriğini düşürerek, çevreye verilen zararın en aza indirgenmesi hedeflenmektedir [32].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, nanoparçacıkların, uzun dönemde vücutta hasta bölgeye doğrudan ilaç uygulanmasına yönelik kullanılması hedeflenmektedir [33].

c) Organik nanoyapılar

Nanolif ve nanoparçacık olarak elde edilen bu yapılar, klasik polimerlerin nano boyuttaki eşdeğerleri olup, dendrimerler ve nanopolimerler örnek olarak verilebilir.



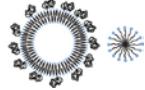




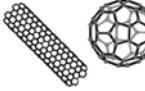
Dendrimer, bir çekirdek, çekirdek etrafındaki dallanma birimleri ve dallanmış fonksiyonel bir grup olarak da isimlendirilebilen yüzey gruplarından oluşur. Günümüzde kaplama ve mürekkep gibi geleneksel uygulamalarda kullanılan bu NP'lerin, ilaç dağılımı gibi uygulamalarda, nano boyutlu molekül taşıyıcı olarak görev alması, çevre temizliği ve suyun süzülmesi gibi farklı alanlarda kullanılabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [34].

d) Kil temelli nanoyapılar

Kil, doğada bulunan, inşaat malzemeleri için önemli ve sürekli bir gelişim içerisinde olan nanoparçacıktır. Doğada nano boyutta ve yığın halde bulunan kil nimeralinin nanoteknolojik uygulamalarda kullanabilmesi için birkaç ön işlemden geçirilmesi

gerekmektedir (Bentonit bazlı NP'ler, SiO₂, Al₂O₃). Kompozit tabanlı plastik ve nanoölçekli parçalarını kapsayan killer, araba tamponu gibi uygulamalarda, otomotiv sektöründe kullanılan parçalara uygulanmaktadır [35].

Çizelge 2. 1. Çeşitli nanomalzemelerin özellikleri ve kullanım alanları [36]

	Parçacık Tipi	Bileşim/Yapı	Özellikleri	Uygulamaları
	Polimer	PLGA Gliserol Kitosan DNA	Biyolojik olarak parçalanır	İlaç Taşınımı Pasif Salınım Kontrollü Salınım
	Dendrimer	PAMAM vs.	Düşük Dağılım Taşıma Biyoyumlu	İlaç Taşınımı
	Lipid	Lipozom Misel	Biyoyumlu (genellikle 50-500nm) Hidrofobik	İlaç Taşınımı
	Kuantum Noktası	CdSe CuInSe CdTe	Geniş Uyarım (Broad Excitation) Ayarlanabilir Yayılım (Tunable Emission) (genellikle 5-100 nm)	Optik Görüntüleme
	Altın	Küresel (Spheres) Çubuk (Rods) Kabuk (Shells)	Biyoyumluluk (genellikle 5-100nm)	Hipertermi İlaç Salınımı
	Silica	Küresel (Spheres) Kabuk (Shells) Mesoporous	Biyoyumluluk	Kontrast Madde İlaç Salınımı
	Magnetik	Fe ₂ O ₃ veya Kobalt temelli	Süper paramagnetik Süper ferromagnetik Paramagnetik Ferromagnetik	Kontrast Madde (MRI) Hipertermi
	Karbon Tabanlı	Karbon Nanotüp C ₆₀ Grafen	Biyoyumlu	İlaç Taşınımı

2.6. Nanomalzemelerin Uygulama Alanları

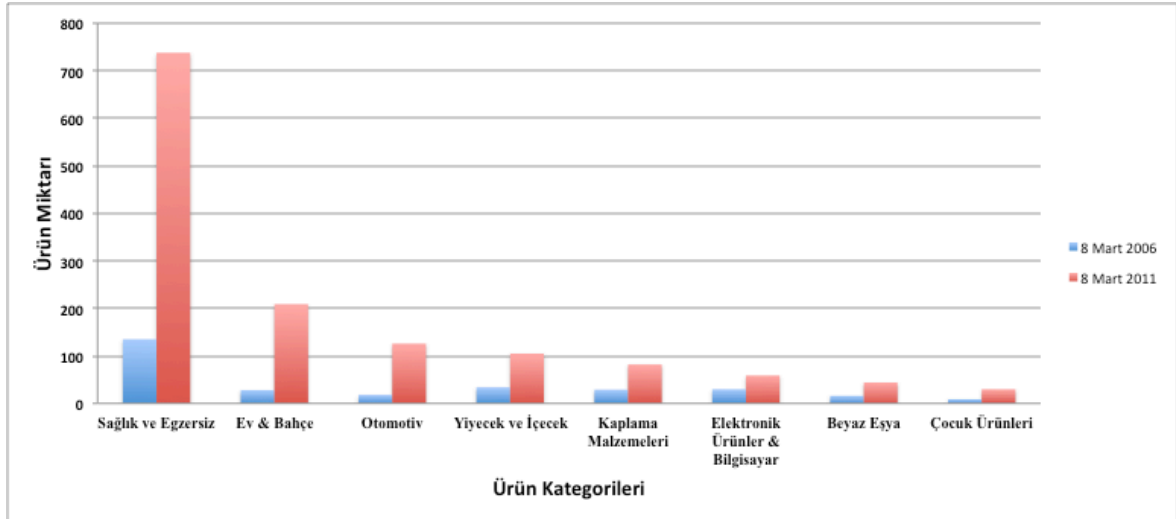
Nano ölçekli malzemeler makroskobik özelliklerinden çok daha farklı bir yapıya sahip olmaları nedeniyle biyoloji, fizik, kimya, tıp ve mühendislik gibi çok çeşitli alanlarda

geniş uygulama alanlarına sahiptir (Çizelge 2.2.).

NP'ler, 100 nm'den daha küçük bir boyuta sahip mikroskobik parçacıklar olup, başta biyomedikal alanı olmak üzere optik ve elektronik gibi alanlarda çok çeşitli uygulamalarda kendisine yer bulmaktadır. Ayrıca, 2006-2011 yılları arasında nanomalzemelerin üretim miktarlarının değişimi Şekil 2.5.'de verilmiştir [37]. Bu büyük ilginin en önemli nedeni bu parçacıkların atomik yapılarla, büyük kümelenmiş yapılar arasında bir köprü oluşturmalarıdır. Büyük kümelenmiş, hacimli yapılar, boyutlara bağlı kalmaksızın belli fiziksel özelliklere sahipken nano boyuttaki taneciklerde böyle bir durum söz konusu değildir. Nano boyutuna bağlı olarak özellikleri değişebilmektedir, maddelerin yüzeylerindeki atomların yüzdesi büyük önem kazanmaktadır. Büyük kümelenmiş yapılarda, maddelerin yüzeylerindeki atomların yüzdesi çok daha azdır [38].

Çizelge 2. 2. Nanomalzemelerin en çok kullanılan alanları [39]

Enerji depolama, üretim ve dönüştürme	<ul style="list-style-type: none"> ○ Karbon nanotüpler ve hafif nanomateryallere dayalı hidrojen depolama sistemleri ○ Kuantum noktalara dayalı fotovoltaiik hücre ve organik ışık yayan cihazlar ○ Güneş pili için kompozit film kaplamalarda karbon nanotüpler ○ Hidrojen üretimi için nanokatalizleyiciler ○ Hibrid protein-polimer membranlar
Hastalık tanı ve görüntüleme	<ul style="list-style-type: none"> ○ Nanoliter sistemleri (<i>Lab-on-a-chip</i>) ○ Karbon nanotüplere dayalı nanosensör dizileri ○ Hastalık tanısı için kuantum noktalar ○ Nanosensörler olarak manyetik nanopartiküller ○ HIV ve kanser tanısı için antikor-dendrimer konjugatları ○ Hastalığın teşhisi için nanotel ve nanobelt nanosensörler ○ Tıbbi görüntü arttırıcılar
İlaç taşıyıcı sistemler	<ul style="list-style-type: none"> ○ Yavaş ve uzun süreli ilaç salım sistemleri için nanokapsüller, lipozomlar, dendrimerler, nanobiyomagnetler
Tıbbi izleme	<ul style="list-style-type: none"> ○ Glikoz, CO₂, ve kolesterol sensörleri ve <i>in situ</i> homeostasisi izlenmesi için nanotüp ve nanopartiküller
Hava kirliliği ve iyileştirme	<ul style="list-style-type: none"> ○ Kendi kendini temizleme sistemleri ile hava kirliliğinin TiO₂ nanopartikül bazlı fotokatalitik degradasyonu ○ Etkili, ucuz ve kontrollü katalitik dönüştürücüler için nanokatalistler ○ Toksik madde ve sızıntıların tespiti için nanosensörler ○ Gaz ayırma için nanocihazlar



Şekil 2. 5. 2006 – 2011 yılları arasında nanomalzemelerin üretim miktarları [37]

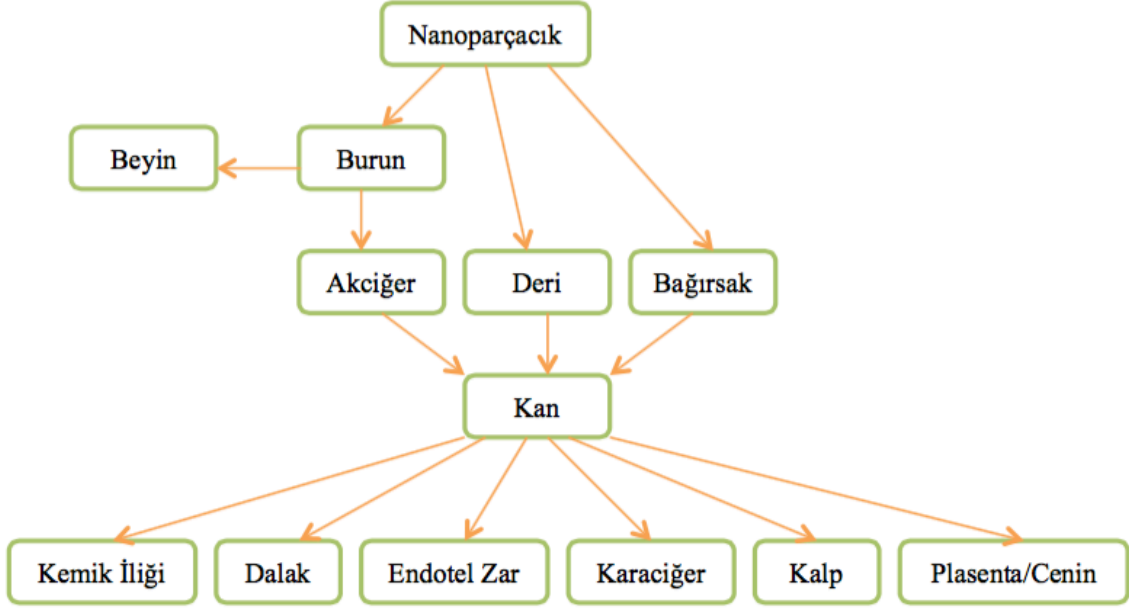
Bu açıdan katalizör sentezinde nano boyutlu taneciklerin kullanılması daha avantajlı gözükmektedir. Çünkü nano boyuttaki taneciklerle oluşturulacak katalizörlerin yüzey aktif alanı, kümelenmiş daha büyük taneciklere göre çok daha geniştir. Bu amaçla büyük kümelenmiş yapılar yerine daha küçük boyutta (nano boyutta) tanecikler sentezlenmiş ve kullanılmaya başlanmıştır [40].

2.7. Nanopartiküllerin İstenmeyen Etkileri

NP'lerin, boyut, şekil, saflık, kristal, elektronik yük, yüzey yapısı, çözünürlükleri, dağılım gibi farklı fizikokimyasal ve optik özellikleri nedeniyle istenmeyen etkileri meydana gelebilmektedir. Nanoteknoloji açısından üstün olabilen özellikler, farklı biyolojik etkilerin oluşmasına neden olabilmektedir. Nanotoksikoloji, toksikolojinin yeni alt dallarından biri olarak, nanomateryallerin neden olduğu istenmeyen yan etkileri incelemektedir. “Nanotoksikoloji” alanındaki gelişmelerin; güvenilir, duyarlı test protokolleriyle nanomateryallerin insan ve çevre için risk değerlendirmesini de sağlayarak güvenli nanoteknoloji geliştirilmesinde önemli katkıları olacağı belirtilmektedir [41].

2.7.1. Nanopartiküllerin Maruziyet Yolları

NP'ler organizmaya deri, akciğer ve oral yol ile girebilirler. NP'lerin insan vücudundaki maruziyet yolları Şekil 2.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 2. 6. Nanoparçacıklara maruziyet yolları [42]

2.7.1.1. NP'lerin Deriden Geçişleri

Deri, vücudumuzun dış kaynaklı kimyasal maddelere karşı birincil korunmasını sağlayan bir organdır. Derideki keratin tabakasının zengin “stratum korneum”, epidermiste yer alarak birincil koruma tabakası olarak görev yapar ve mikron boyuttaki partiküllerin ve toksik maddelerin vücuda girişini sınırlar. NP maruziyeti, deride topikal kremler, bazı diğer ilaç tedavileri ile gerçekleşebilir. Ancak NP'lerin deri yolu ile sistemik dolaşıma geçişleri ile ilgili çelişkiler veriler bulunmaktadır. Van der Merwe ve ark. [43] bir çalışmasına göre, insan derisine 8 saat boyunca kuru toz, sulu süspansiyon ve su/süfaktan süspansiyon şeklinde nanokristal MgO ve Ti₂O uygulaması sonucunda stratum korneumdan herhangi bir absorpsiyon gözlenmemiştir. Başka bir çalışmada ise Ti₂O NP'leri (20-100 nm) sağlıklı ve hasarlı, insan ve domuz derisi üzerine topikal olarak uygulanmış, Ti₂O'in, stratum korneumun üst 3-5 korneosit tabakasına geçebildiği bulunmuştur. Nanopartiküllerin daha derinlere ulaştığını gösteren başka çalışmalar da bulunmaktadır [44]. Lademann ve ark. [45], Ti₂O NP'lerinin insan stratum korneum tabakasını aşarak epidermis ve hatta dermis kadar ulaştığını göstermişlerdir. NP'lerin dermise geçerek lenfatik sistem aracılığıyla sistemik dolaşıma geçtiği de bildirilmektedir. Farklı fizikokimyasal özellikteki KN'larının stratum korneum tabakasını geçerek epidermis ve dermis tabakalarda birikebildiği gösterilmiştir. Klinik bir çalışmada, nanogümüş kaplı sargı bezleriyle tedavi edilen yanık olgularında, kan gümüş düzeylerinde artma ve argria (deride gümüş birikimi sonucu mavi veya gri renk oluşumu) gözlenmiştir.

Nanogümüş bazlı sargı bezleri; cerrahi iplikler klinikte uygulanarak bakteriyel enfeksiyonların kontrolünü sağlamakta ise de dermal toksisiteleri tartışılmaktadır. Nanogümüş bazlı sargı bezlerinin dermal biyouyumluluğunu gösteren laboratuvar ve klinik çalışmalara rağmen, bu materyallerin sitotoksik olduğunu da düşünülmektedirler. Paddle-Ledinek ve ark. [46] kültür keratinositlerini farklı tipte gümüş kaplı sargı bezlerine maruz bırakmışlar ve nanokristal gümüş kaplı olanların sitotoksik olduklarını bildirmişleridir. Benzer başka bir çalışmada, Lam ve ark. [47] tarafından yapılmıştır. Fulleren bazlı peptidlerin de deriden geçebildiği ve mekanik stres oluşturarak dermise kadar ilerleyebildikleri gösterilmiştir. İntradermal kullanılan KN'lar, deri altındaki lenflere ve lenfatik nodlara ulaşabilmektedir. Topikal olarak uygulanan berilyum partiküllerinin immün sistem cevabı olarak, makrofajlar ve Langerhans hücreleri ve epidermal keratinositlerin tarafından fagosite edilebildiği, ayrıca tek/çok duvarlı karbon nanotüpler, KN'lar ve nanoboyutlu Ti_2O gibi bazı nanoyapıların epidermal keratinositler ve fibroblastlar üzerine toksik etkilerinin olduğu ve gen/protein etkileşmelerini değiştirdikleri gösterilmiştir [48].

2.7.1.2. NP'lerin Akciğerlerden Geçişleri

Solunum sistemi, partiküle materyallerin girebildiği ana bölgedir. Havada bulunan quartz, asbest, karbon gibi partikül yapıdaki nanomateryaller; işyeri ve çevre maruziyeti kapsamında uzun yıllardır çalışılmaktadır. Mikron boyutlu partiküllerden farklı olarak, 2.5 μm 'dan küçük partiküller alveollere geçebilmektedir. Solunabilen çok ufak (ultrafine) partiküller (<100 nm) çoğunlukla alveolar bölgede bulunur. Akciğer epitelinden absorpsiyon sonrasında, nanomateryaller kan ve lenf dolaşımına geçerek, lenf nodları, kemik iliği, dalak ve kalp hücrelerine ulaşabilir. İnhalasyonla alınan ultrafine partiküllerin pıhtılaşma ve ritim bozuklukları gibi kardiyovasküler sorunlar oluşturabileceği bildirilmiştir. Solunum ile vücuda giren NP'lerin ganglio, akson ve sinir uçlarını hedef alarak merkezi sinir sistemini (MSS) etkileyebilecekleri de belirtilmektedir [49]. Biriken Ag NP'lerin ve diğer bazı nanomateryallerin alveolar makrofaj ve akciğer epitel hücreleri için sitotoksik olduğu bildirilmektedir [50].

2.7.1.3. NP'lerin Mide, Barsak Sisteminden Geçişleri

Nanomateryaller, gastrointestinal sisteme (GIS), solunum sisteminden nazal bölge aracılığıyla geçebilir veya doğrudan yiyecek, su, kozmetik, ilaç ve ilaç taşıyıcı sistemler aracılığıyla ulaşabilirler. Ancak oral alım nedeniyle oluşabilecek nanomateryal toksisitesi hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Oral aşıların dağılımında kullanılan biyoçözünür NP'lerin,

proteolize neden olan antijenler gibi hareket ettiği düşünülmektedir. Chen ve ark. [51] bakır ve nanobakırın, farede akut toksisitesini incelemişler ve nanobakırın bakırdan, çok daha toksik olduğunu, nanobakırın karaciğer, böbrek ve dalakta patolojik hasarlara neden olduğunu bildirmişlerdir [51].

2.7.2. Nanopartiküllerin Organizma İçinde Dağılımı

Bazı NP'ler GIS'i doğrudan geçerek feçes ve idrarla hızlıca atılır. Ancak bazı NP'ler ilk geçiş metabolizması sırasında karaciğerde birikebilir. İntravenöz uygulamadan sonra, NP'ler kolon, akciğer, kemik iliği, karaciğer, dalak ve lenflere dağılılabılır ve özellikle karaciğer ve dalak makrofajları aracılığıyla sistemik dolaşıma girebilir. NP'lerin klerensi ve opsonizasyonu, boyut ve yüzey özelliklerine göre değişmektedir. Örneğin hidrofobik partiküller, polietilen glikolle (PEG) kaplandığında hidrofilik özellik artar ve sistemik dolaşım zamanı da uzayabilir, ancak PEG kaplı 10-30 nm boyutlu Au NP'lerin plasentaya geçemediği ve fetal dolaşımda bulunmadığı gösterilmiştir [51].

Takenaka ve ark. [52] yaptığı bir çalışmada, inhalasyonla ultrafine Ag NP'leri verilen sıçanların karaciğer, akciğer ve beyinlerinde oldukça fazla miktarda Ag NP'lere rastlanmıştır. Farklı çalışmalarla da solunan NP'lerin akciğer, karaciğer, kalp, böbrek, dalak ve beyinde bulunduğu ve alveolar makrofajlar ile fagosite edildikleri gösterilmiştir [53].

Jong ve ark. [54] Au NP'lerinin en küçük boyutlu (10 nm) olanın en fazla dağıldığını (kan, karaciğer, dalak, böbrek, testis, timus, kalp, akciğer ve beyin), daha büyük partiküllerin ise (50, 100 ve 250 nm) sadece kan, karaciğer ve dalakta bulunduğunu göstermiştir.

İnorganik ve polimerik NP'lerin farklı sistemik dağılımları, bu maddelerin görüntüleme, ilaçların sistemik taşınımında ve kanser hücrelerinin özel olarak hedeflendirilmesinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Fizikokimyasal özelliklerle absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılımları arası ilişkilerin anlaşılması, demir oksit NP'leri (Fe_2O_3), dendrimerler, silika partikülleri, altın NP'leri ve karbon nanotüpleri gibi şu anda çalışılan nanomateryallerin uyumluluk, dağılım, birikimleri ve toksisite gibi etkilerinin öngörülmesini sağlayacaktır. Fizikokimyasal özelliklerin immunolojik reaksiyonlarla da ilişkili olduğu düşünülmektedir [51].

Organizma ışık veya geçiş elementlerine maruz kaldığında, oksidan ve antioksidan denge bozularak prooksidanlar aktif hale getirilebilir. Boyut, şekil ve birikim gibi nanomateryal

özellikleri, ROS üretimine neden olabilir. ROS; süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi hücrenin normal aerobik solunumu esnasında ortaya çıkan moleküllerdir. Hücre herhangi bir kimyasal/ fiziksel sataşma ile karşılaştığında ROS üretimi artar. Ancak hücrelerde, oluşan ROS'lara karşı savunma sistemi olarak süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz ve tiyoredoksin redüktaz gibi güçlü bir antioksidan sistemleri bulunmaktadır. NP'lerin indüklediği oksidatif stresin; NF-kappa B (NF-κB, Nuclear Faktör Kappa B), aktivatör protein 1, hücre dışı sinyal regüle kinaz (ERK), c-Jun, N-terminal kinaz (JNK) ve p38 mitojen aktive protein kinaz yolları ile inflamasyonu tetiklediği iddia edilmektedir. Biyolojik sistemler inflamasyon, apoptoz, nekroz, fibroz, hipertrofi, metaplazi ve kanserojeniz gibi bir çok etki ile hasar görebilir. Nanomateryallerin toksik etkilerini farklı mekanizmalarla hasar yaparak oluşturduğu bildirilmektedir [55].

2.7.3. Nanopartiküllerin Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri

Son yıllarda üretimi yapılan NP'lerin toksik etkilerinin bulunabileceğini iddia eden fazla sayıda in vitro ve in vivo çalışma bulunmaktadır [56-59].

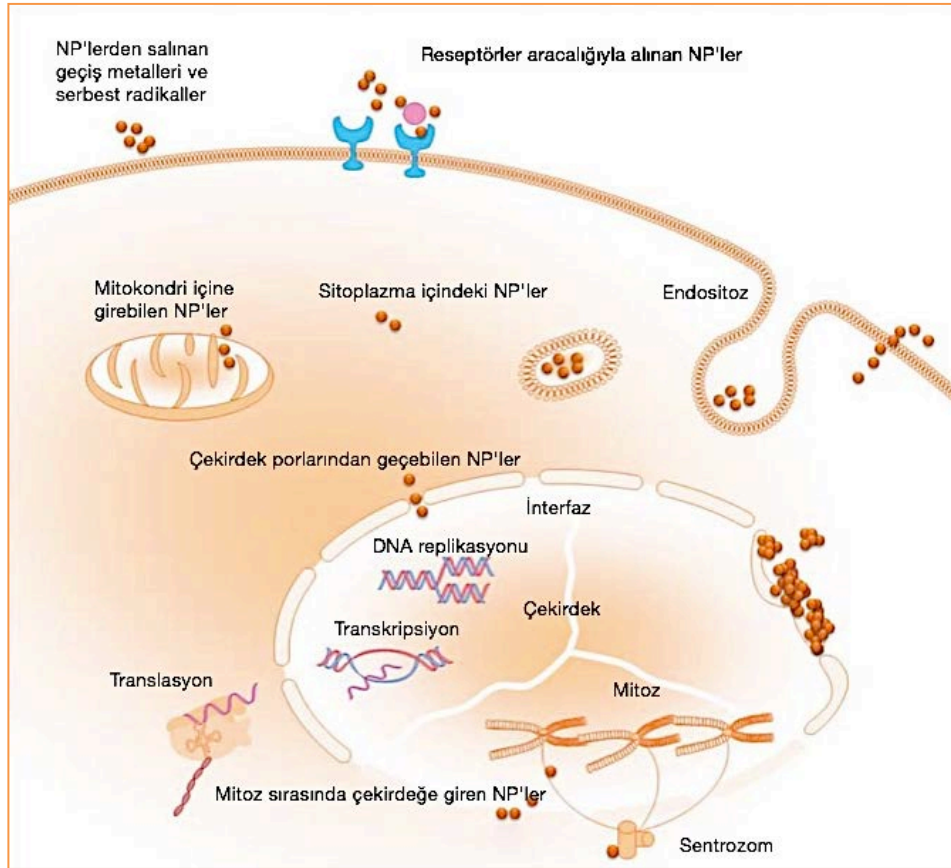
NP'lerin vücut içine çeşitli yollar ile girerek, vücut içindeki çeşitli bariyerlerden geçebilmekte, hücrenin içine girebilmekte ve hücredeki biyomolekülleri etkileyebilmektedir [60,61]. NP'lerin hücre içine girişi ve hücre içinde çekirdek zarından geçişi ve DNA'yı doğrudan etkileyerek hasara neden olabilmesi Şekil 2.7'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

NP'lerin genotoksitesisi ve sitotoksitesisi üzerine yapılan çalışmalarda maddenin boyutu, türü ve kullanılan yöntem gibi faktörlere bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir.

NP'lerin büyüklüklerindeki çok küçük farklar dahi sitotoksitesilerini değiştirebilmektedir. Ag NP'ler (15 nm, 30 nm ve 55 nm) ile alveolar makrofaj hücrelerinin 24 saat süreyle maruz bırakılması sonunda, 15 nm ve 30nm Ag NP'lerin hücre canlılığını doza bağlı (10–75 µg/mL) olarak azalttığı bulunmuştur. Ayrıca 15 nm boyutundaki Ag NP'ler, 50 nm boyutundaki NP'lere göre daha fazla ROS üretilmesine neden olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre NP boyutunun azalmasına ve artan oksidatif strese bağlı olarak toksitesinin arttığı belirtilmiştir [62].

Yapılan bir başka çalışmada ise farklı boyutlardaki (20, 80 ve 113 nm) Ag NP'lerinin sitotoksitesileri incelenmiş olup, 20 nm boyutundaki Ag NP'lerin diğer NP'lere göre daha fazla toksik olduğu belirlenmiştir [63]. Pan ve ark. [64] yaptığı bir çalışma da L929, HeLa

ve melanom hücreleri, 12 saat süreyle farklı büyüklüklerdeki Au NP'leri ile muamele edilmiş ve toksisitelerini incelenmiştir. Sonuç olarak 15 nm Au NP'ün sitotoksik olmadığını; 1,4 nm Au NP'ün nekrozla hücre ölümüne; 1,2 nm Au NP'ün ise apoptoz ile programlı hücre ölümüne neden olduğunu bildirilmiştir [64].



Şekil 2. 7. NP'lerin hücre içine alınışı ve DNA'yı etkileme mekanizması [65]

İnsan dermal fibroblast hücrelerinin (HDF) ve insan karaciğer hücrelerinin (HepG2), 48 saat süreyle C60 NP'leri ile 30 saat maruziyeti sonucu, sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir [66]. Rouse ve ark. [67] insan dermal keratosit hücrelerini C60 NP'leri ile 1, 4, 8, 12, 24 ve 48 saat süreyle maruz bıraktığı bir çalışmada 0,04 ve 0,4 µg/ml dozlarının, bu hücrelerde 24 ve 48'lik sürelerde doza bağlı sitotoksik etki oluşturduğunu gözlemlemişlerdir.

Wick ve ark. [68] ise mezotel (MSTO-211H) hücrelerinde KNT'lerinin doza bağlı olarak sitotoksik etkilerini bildirmişlerdir. MTT ve WST test yöntemlerinin kullanıldığı başka bir sitotoksiste çalışmasında ise A549 (akciğer adenokarsinomu) hücre hattında tek duvarlı KNT'lerinin sitotoksik etkisinin doza bağlı olduğu belirtilmiştir [69]. Saw ve ark. [70] T

lenfositleri ve Jurkat hücrelerinde de KNT'lerin doza bağılı olarak sitotoksik etkiye neden olduklarını gözlemlemişlerdir.

Manna ve ark. [71] KNT'lerin neden olduğu sitotoksik etkinin, oksidatif stres oluşumu ve hücre polifirasyonun durdurulmasına bağılı olduğunu iddia etmişlerdir [72]. Çok duvarlı KNT'lerin hücre membranından sitoplazmaya geçerek ve çekirdeğe ulaşarak hücre canlılığını etkilediğini bu sebeple hücrenin apoptoza neden olduğunu belirtilmiştir.

NP'lerin sitotoksik etkilerinde metal oksitlerin sorumlu olduğuna dair çalışmalar da bulunmaktadır. Au NP'lerin insan dermal fibroblastlarında 2-6 günlük maruziyeti sonrasında, Au NP'lerinin hücre içine girebildikleri ve hücre içinde birikebildikleri, doza ve zamana bağılı olarak sitotoksik etki gösterebildikleri belirtilmiştir [73]. Shukla ve ark. [74] yapmış oldukları çalışmada ise Au NP'lerin makrofaj hücreleri ile 72 saat maruz bırakılması sonrasında, doza bağılı olarak sitotoksik etki oluşturduğu ve Au NP'lerinin reaktif oksijen türlerini oluşturduğu iddia edilmiştir.

Sharma ve ark. [75], insan epidermal hücrelerinde (A431) ZnO NP'lerinin 0.008- 20 µg/ml konsantrasyon aralığında 3, 6, 24 ve 48 saat maruziyeti sonucu sitotoksik etkilerini, MTT, LDH ve NKA test yöntemleri ile incelemişlerdir ve elde edilen sonuçlara göre doza ve zamana bağılı olarak ZnO NP'lerinin sitotoksik etkilerini gözlemlemişlerdir. MTT test yöntemi yapılan bir başka çalışmada ise, insan epidermal keratosonit hücrelerinde (HEK) ZnO NP'lerinin 8–20 µg/ml konsantrasyon aralığında 6–24 saat maruziyeti sonucu sitotoksik etkileri ile bulunmuştur.

Gupta ve ark. [76] insan fibroblast hücrelerinde Fe₃O₄ ve PEG kaplı Fe₃O₄ NP'leri ile yaptıkları çalışma sonucunda, Fe₃O₄ NP'lerin doza bağılı olarak sitotoksik etki gösterdiğini ancak PEG kaplı Fe₃O₄ NP'lerin sitotoksik etki oluşturmadığını belirtmiştir. Elde edilen bu sonuca göre NP'lerin dış yüzey özelliğinin toksisitenin belirlenmesi açısından oldukça önemli olduğu iddia edilmiştir [76].

Park ve ark.[77] tarafından yapılan çalışmada, değişik konsantrasyonlarda 21 nm TiO₂'in insan bronşial epitelyal (BEAS-2B) hücrelerinde, oksidatif stres oluşturduğunu ve ROT üretimini arttırdığını, sitoplazmik kaspazları aktifleştirdiğini ve böylece apoptotik hücre ölümünü başlattığını bildirmişlerdir. Ayrıca MTT testi ile TiO₂ NP'lerinin zamana ve doza bağılı olarak hücre canlılığını azalttığını da belirtmişlerdir. Dolayısıyla bu durum NP toksisitesinde, NP'lerin hücre içerisinde tutulma süresinin ve konsantrasyonun önemini açığa çıkarmıştır.

TiO₂ NP'lerin makro ve nano boyutta olan formlarının sitotoksik etkileri V79 hücrelerinde MTT test yöntemi ile araştırılmış ve konsantrasyona ve farklı formlarına bağlı olarak toksik etki gözlemlendiği bildirilmiştir [78].

A549 hücreleri NiFe₂O NP'lerinin (26 nm) 2, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonları ile 24 saat süreyle maruz bırakılmış ve sitotoksik etkileri incelenmiştir. MTT, NRU ve LDH yöntemlerinden elde edilen sonuçlara göre NiFe₂O NP'lerinin doza bağlı olarak sitotoksik etki oluşturduğu belirtilmiştir [79].

Çeşitli NP'lerin (Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO) toksisitelerinin karşılaştırmalı olarak A549 ve L-132 normal hücrelerinde incelendiği çalışmada elde edilen verilere göre ZnO'nin toksik etkisinin tüm hücre gruplarında oldukça yüksek olduğu, Al₂O₃, CeO₂ ve TiO₂ NP'lerinin ise sitotoksik etkilerininin oldukça düşük olduğu belirtilmiştir. Ayrıca TiO₂ oksidatif strese bağlı olarak, CeO₂ ise membranda hasara neden olarak hücresel yapılarda bozulmaya neden olduğu iddia edilmiştir [80].

SiO₂ NP'leri gıdalarda, kozmetiklerde ve teşhis amaçlı ilaç taşınımında kullanılmaktadır. Ye ve ark. [81] SiO₂ NP'lerinin toksik etkilerinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada insan hepatik hücre hattında (L-02), 21, 48 ve 86 nm boyutlarında, 0.2, 0.4 ve 0.6 mg/ml konsantrasyonları 12, 24, 36 ve 48 saat süreyle uygulanmış olup MTT ve LDH test yöntemleri ile sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. MTT test sonuçlarına göre doza, boyuta ve zamana bağlı olarak hücre canlılığında azalma gözlenirken, LDH sonuçlarına göre ise sadece 21 nm boyutunda doza ve zamana bağlı sitotoksik etkinin gözlemlendiği belirtilmiştir.

Ahmad ve ark. [82] MTT ve NKA sitotoksikite yöntemi kullanarak sitotoksik etkileri belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada silika NP'lerin (14 nm) HepG2 hücrelerinde doza bağlı olarak sitotoksik etki oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan bu çok sayıda sitotoksikite çalışmalarında farklı NP'ler farklı hücre hatlarında incelenmiştir. Nanopartikül büyüklüğünün değişmesinin, yüzey alanını da etkilemesi göz önüne alınırsa, sitotoksikitede yüzey alanının da önemli değişikliklere neden olabileceği görülebilmektedir. Sitotoksik etkilerin sonuçları incelendiğinde hücrelerde NP'lerin kısa süreli ve düşük dozlarında genelde sitotoksik etki gözlenmez iken yüksek dozları ve uzun süreli maruziyetleri sonrasında reaktif oksijen türlerini oluşturabileceklerinden dolayı sitotoksik etkiye yol açtığı düşünülmektedir [83]. Ayrıca kullanımı artan bir çok

biyoyumlu malzeme ile kaplanması toksik etkilerinin azaltılması açısından oldukça önemlidir.

NP'lerin sitotoksik etkilerinin yanı sıra genotoksik etkileri çok fazla çalışılan konulardandır. NP'ler potansiyel olarak DNA'yı etkileyebildikleri gibi DNA replikasyonunda, transkripsiyonunda ya da onarımında etkili olan protein ya da enzimleri de etkileyebilmektedir. C₆₀ moleküllerinin, DNA Topoizomeraz II enzimi ve PMS2, RFC3, PCNA proteinlerine bağlanarak DNA onarımının yanlış gerçekleşmesine neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [84,85]. Proteinlerin yapısal bozulmalarından dolayı NP'lerin dolaylı yoldan genotoksik hasara sebep olmasının nedenlerinden birinin reaktif oksijen türlerinin olduğu düşünülmektedir [86]. NP'lerin hücre içinde oluşturduğu reaktif oksijen türleri DNA'da oksidatif hasara neden olmaktadır. Serbest radikaller, hücrelerdeki biyomoleküllere bağlanarak hücre içinde ciddi sorunlara neden olmaktadır. Örneğin, DNA'ya bağlanarak pürin ve pürimidin bazlarında hasar ve DNA çift zincirinde kırıklara neden olmaktadır. Ayrıca, DNA'da baz kaybına neden olarak replikasyon hatalarını ve kanser oluşumunu başlatabilmektedir [87]. NP'lerin çözünebilir özelliklerinden dolayı hücre içine toksik iyonlarının salınımı ile de DNA hasarına neden olmaktadır. Örneğin, geçiş metal iyonları Fe⁺², Ag⁺, Cu⁺, Mn⁺², Cr⁺⁵ ve Ni⁺² hücre içinde reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olarak Fenton tipi reaksiyonları başlatabilmektedir [88]. Ayrıca bu elementler doğrudan DNA'ya bağlanarak da DNA hasarına neden olabilmektedir [89].

ROS'lar yüksek kimyasal reaktiviteleri nedeniyle DNA, protein, karbonhidrat ve lipitlerle etkileşerek apoptoz veya nekroz sonucu hücre ölümüne neden olabilmektedir. Araştırmacıların NP'ler ile yapmış oldukları çalışmalar sonucunda genotoksisite mekanizmasının birincil ve ikincil genotoksik etkilerin oluşumu adı altında iki yol ile olabileceğini belirtmişlerdir. Maddenin doğrudan DNA'yı etkilemesi birincil genotoksisite; hücre veya dokularla etkileşimi sonucu inflamasyon veya oksidatif stres oluşumuna neden olması ikincil genotoksisite olarak adlandırılmıştır [90].

TiO₂ NP'lerinin mikro ve nano yapılarının DNA hasarı üzerine etkilerini belirleyebilmek amacıyla yapılan çalışmada, mikro ve nano yapıdaki TiO₂ 24 saat boyunca V79 hücreleri ile maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonunda V79 hücrelerinde Comet tekniği ile DNA hasarı üzerine etkileri belirlenmiş olup, nanoboyuttaki TiO₂'lerin mikro boyuttaki TiO₂'lere göre üç kat daha fazla DNA neden olduğu belirtilmiştir [78].

Guri ve ark. [91] TiO_2 'nin farklı boyutlarının, DNA hasarına etkisini araştırmış, daha küçük boyuttaki NP'lerin (10-20 nm) makro boyuttaki (200 ve 200 nm'den büyük) partiküllere oranla daha fazla oksidatif stres oluşturarak, DNA hasarına neden olduğunu gözlemlemiştir.

Xu ve ark. [92] yapmış oldukları bir başka çalışmada da MEF hücrelerinde nanoboyuttaki TiO_2 NP'ün, makro boyuttaki TiO_2 NP'egöre daha fazla DNA mutasyonlarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Tek duvarlı KNT'lerin primer fare fibroblast hücrelerinde Comet yöntemiyle DNA hasarına olan etkisini incelenmiş, 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarının zamana bağlı olarak DNA kuyruk hasarına neden olduğu belirtilmiştir [93]. Wimitzer ve ark. [94], ise V79 hücrelerinde çok duvarlı KNT'lerinin DNA hasarına neden olduğunu belirtmişlerdir.

Bir başka çalışmada A549 hücreleri CuO , TiO_2 ve KNT'lerin 1.20 ve 40 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarının DNA hasarına olan etkileri araştırılmış, bu NP'lerin kontrole göre önemli derece hasarlara neden oldukları belirtilmiştir [95].

Bhattacharya ve ark. [96]'nın TiO_2 ve Fe_2O_3 NP'lerinin insan karaciğer ve bronşial hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada, 24 saatlik maruziyet sonucunda, Fe_2O_3 NP'lerinin DNA hasarına neden olduğunu, TiO_2 NP'lerinin ise hasara neden olmadığını gözlemlemişlerdir.

TiO_2 NP'lerinin çeşitli konsantrasyonlarını insan dermal hücrelerinde Comet yöntemiyle DNA hasarını belirlemek için yapılan bir başka çalışmada, 0.008, 0.08, 0.8, 8, 80 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarının 6, 12 ve 24 saat boyunca maruziyet bırakılması sonucu, TiO_2 NP'lerin 8 ve 80 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında önemli derecede DNA hasarına neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Sitokinez Blok Mikro ekirdek yöntemi ile yapılan deney sonucunda 6 saatlik maruziyet sonrasında, mikroçekirdek sıklığının 8 ve 80 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında kontrole göre arttığı belirtilmiştir [97].

İnsan epidermal hücrelerinde (A431) ZnO NP'lerinin genotoksisitesini belirlemek amacıyla, 6 saat süreyle farklı konsantrasyonlar (0.001, 0.008, 0.08, 0.8, 5 $\mu\text{g/ml}$) maruz bırakılmıştır. Elde dilen sonuçlara göre 0.8 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda, DNA hasarında artış gözlenmiştir [98]. Yapılan bir başka çalışma da ise insan epidermal keratosonit hücrelerinde (HEK), 6 saat süreyle 8 ve 14 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında ZnO NP maruziyetini, kontrole göre DNA hasarında artışa neden olduğu gözlenmiştir [99].

İnsan akciğer fibroblastları ve insan glioblastoma hücrelerinde 25-400 µg/ml konsantrasyonlarında Ag NP DNA hasarına neden olduğu gözlenmiştir.

Ahamad ve ark. [79] tarafından yapılan çalışmada, A549 hücrelerinden NiFe₂O NP'lerinin (26 nm) apoptoz indüksiyonu araştırılmıştır. Araştırmada RT-PCR yöntemi kullanılmış olup, p53, apoptoz (bax, kaspaz-3 ve kaspaz-9) anti-apoptotik (survivin and bcl-2) genlerinin mRNA ekspresyon değerleri incelenmiştir. Elde edilen verilere göre bax, kaspaz-3 ve kaspaz-9 gen ifadelerinde artış gözlenirken, antiapoptotik genlerden olan survivin ve bcl-2 gen ifadelerinde azalma gözlemlendiği ve NiFe₂O NP'lerinin apoptozu indüklediği belirtilmiştir.

SiO₂ ve ZnO NP'lerinin, interleukin-8 (IL-8) geni ifadesinde artışa yol açtığı gözlenmiştir ve NP'lerin inflamasyona neden olabileceği ileri sürülmüştür [100]

Silika NP'lerin (14 nm) HepG2 hücrelerinde 25–200 µg/ml konsantrasyonlarında p53, apoptotik (bax ve kaspaz-3) ve anti-apoptotik gen (bcl-2) ekspresyon değerlerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen verilere göre bax ve kaspaz-3 gen ifadelerinde artışa neden olduğu, bcl-2 gen ifadesinde azalmaya bulunmuştur [82]. Elde edilen bu sonuçlara göre silika NP'lerinin HepG2 hücrelerinde apoptozu indükleyerek hücre ölümüne yol açabileceği belirtilmiştir [82].

SiO₂ NP'lerinin toksik etkilerinin belirlenmesi için yapılan başka bir çalışmada da insan hepatik hücre hattında (L-02), 21, 48 ve 86 nm boyutlarında, 0.2, 0.4 ve 0.6 mg/ml konsantrasyonlarında 12, 24, 36 saat maruziyeti sonucu p53, bcl-2 ve bax gen ifade değişikliklerin incelenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre 21 nm boyutta SiO₂ NP'lerinin p53 ve bax genin ifadelerini zamana ve doza bağlı olarak arttırdığı ancak Bcl-2 genin ifadesini önemli düzeyde arttırmadığı belirlenmiştir [101].

NP'lerin genotoksik özellikleri tam olarak aydınlatılamamıştır. NP'lerin genotoksisiteye neden olması için ya doğrudan genomik yapı ile etkileşmeye girerek ya da dolaylı yollardan DNA'ya hasar vererek genotoksisiteye neden olabileceği iddia edilmiştir [102,103]. NP'ler hücrel membrandan geçtikten sonra çekirdek zarındaki porlardan geçerek DNA'ya doğrudan etki edebilirler.

Barillet ve ark. [104] yapmış oldukları çalışmada, 8-10 nm arasındaki NP'lerin çekirdek zarından geçerek, doğrudan DNA'yı etkilediğini ve 15-60 nm boyutundaki NP'lerin ise hücre bölünmesi sırasında çekirdek zarının parçalanması sonucu dolaylı DNA'yı etkilediğini gözlemlemiştir. Yapılan diğer çalışmalarda hücrelerde maruziyet sonrası TiO₂

NP [105], Ag NP [106] ve ZnO NP'lerin [107] çekirdeğe geçebildikleri gösterilmiştir. Çekirdek içine geçebilen NP'ler DNA ile doğrudan etkileşime girebilmekte ve DNA hasarına neden olabilmektedirler. NP'ler ile maruz bırakılan hücreler, hücre bölünmesinin interfaz aşamasında DNA replike olurken DNA'yı ya da protein sentezi aşamasında iken RNA'yı etkileyebilmektedirler. KNT'lerin tek zincir halindeki DNA'ya bağlanabildiği ve bunun sonucunda DNA'nın tekrar çift zincir haline geçebilmesini engellediği gösterilmiştir [108]. Mitoz sırasında ise NP'lerin kromozomlarda klastojenik ya da anöjenik etkilere neden olabildiği ve kromozomlarda kırık ya da mitoz süresince bozulmalara yol açabildiği bildirilmiştir [109].

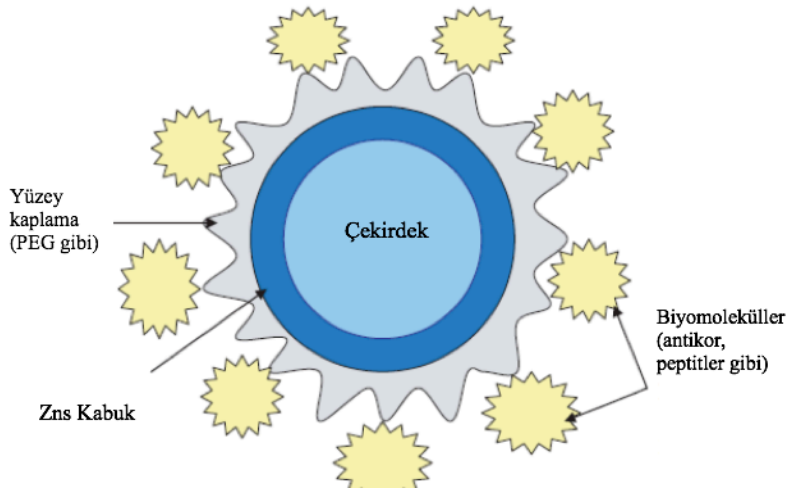
2.8. Kuantum Noktaları

Kuantum noktaları (KN) (quantum dots), adını ilk kez fizik profesörü Mark Reed [110] kullanmakla beraber, bu maddeler öncelikle Louis E. Brus [111] tarafından keşfedilmiştir. KN yarı iletken olarak bilinen malzeme sınıfının çok özel bir alt sınıfını oluşturur. Boyutlarının atomik düzeyde olması nedeniyle (2 -10 nm ya da 10-50 atom çapı) KN'ları bilim ve teknolojiye önemli katkılar sağlamıştır. Atomik yapıları bilinen klasik hacimli yarı iletkenler ve klasik atom veya moleküller arasındadır. Yarı iletken NP'lerin sahip oldukları yüksek absorpsiyon katsayılarının yanı sıra boyutlarının ayarlanabilirliği, kullanım alanlarının artmasını sağlamıştır [112].

Kuantum noktaları, yeni optik özellikleri olan, inorganik yarı-iletken nano-boyutlu kristallerdir. Yarı iletken NP'ler, farklı parçacık büyüklüklerine bağlı olarak gösterdikleri farklı optik ve enerji özelliklerden dolayı biyoteknoloji, nm boyutundaki elektronikler, lazer sistemleri, optik devreler ve işaretleme gibi çok geniş uygulama alanlarına sahiptirler. Yarı iletkenleri önemli yapan özelliklerin başında, üretim sonrasında bazı dış uyarılarla (voltaj ve ısı farkı, foton bombardımanı), kullanım esnasında değiştirilebilir elektriksel iletkenlikleri gelmektedir. Bu özellikleri görüntüleme endüstrisinde ışık yayan diyotlarda (LED) kuantum noktalarının, kullanılabilirliğini gündeme getirmiş ve flüoresans ışınımaları geniş bir dalga boyu aralığında ayarlanabildiğinden LED teknolojisinde kullanımını arttırmıştır. Güneşten gelen ışınların dalga boylarına uyum sağlayacak şekilde enerji bant aralığına sahip olan KN'lerin güneş pili çalışmalarında kullanılması, çalışmalara yeni bir boyut kazandırıp, bilim adamlarının bu konu üzerindeki çalışmalarını artırmıştır. KN'larının biyoteknolojik uygulamalarda kullanılması nanoteknolojideki hızlı gelişmelere paralel artarak tıp ve biyoloji alanında biyogörüntüleme, hastalıkların teşhis ve takibinde önemli bir adım atılmıştır [112].

2.8.1. Kuantum Noktaların Fizikokimyasal Yapısı

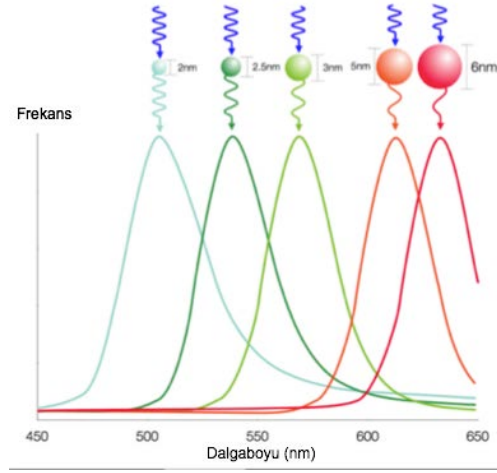
KN'ları genel olarak inorganik çekirdek ve organik kabuk olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.8.) [113]. En içteki çekirdek kısmı, KN'larının yarı iletken olmasını sağlamaktadır. Organik kabuk kısmı ise iç inorganik çekirdek bölgesinin oksidasyona uğramasını engeller. Genelde periyodik tablodaki CdSe ve CdTe gibi grup II ve VI elementlerinden ya da InP ve InAs gibi grup III ve V elementlerinden oluşurlar. En sık kullanılan KN'ları yarı iletken CdSe çekirdeğin, ZnS kabuğuyla kaplanması ile elde edilir. ZnS kabuk, CdSe çekirdeğin, kimyasal ve optik kararlılığı için gereklidir. KN'ların fiziksel büyüklükleri Bohr çapından küçüktür, bu nedenle kuantum sınırlama etkisi görülür. Kuantum sınırlama etkisi, optik ve elektronik özellikleri de belirlemektedir. CdSe KN'ları büyüdükçe flüoresans ışınımı kırmızı bölgeye kaymaktadır. Bu kayma, değerlik bandı ile iletkenlik bandı arasında kalan ve bant boşluğu olarak adlandırılan aralığın daralması nedeni ile olmaktadır. Bu daralmanın nedeni parçacığın büyümesi ile daha fazla enerji bandının iç içe girmesidir. Ancak bu daralma belli bir parçacık büyüklüğüne kadar devam eder ve sonrasında parçacık büyüklüğüne bağlı olarak değişmez. Bu noktadan sonra enerji bantları artık tamamen iç içe girdiğinden bu noktadan sonra optik özellikte bir değişim olmaz. Bu olaya kuantum sınırlaması denir [113]. Kabuk yüzeyi biyoyoumluk açısından da oldukça önemlidir ve genellikle suda çözünür şekilleri tercih edilmektedir. KN'ların biyolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için ilaç, gen, ligandlar ve antikor gibi moleküller, kabuk kısmına bağlanabilmektedir [114].



Şekil 2. 8. Fonksiyonel kuantum noktası [113]

KN, morötesi ışınlarla aydınlatıldığında, boyutlarına bağlı olarak farklı renklerde ışımaya yaparlar. KN'ların optik özellikleri kristal büyüklüğüne bağlı olarak değişim gösterir.

Örneğin 2,4 nm çapındaki KN kırmızı renkte ışığa yaparken, 0,9 nm çapındaki KN mavi renkte ışığa yapar (Şekil 2.9) [115].



Şekil 2. 9. Kuantum noktalarının büyüklüğü ve renk değişimleri [115]

2.8.2. Kuantum Noktalarının Sentezi

Inorganik kristal malzemeler genel olarak yalıtkan, iletken ve yarı iletken olmak üzere üç ayrı sınıfta incelenmektedir. İletken sınıfına giren kristal malzemelerin iletkenlik bandında elektronlar bulunmasına karşın, yarı iletken sınıfına giren malzemelerde elektronlar değerlik bandı ile iletkenlik bandı arasında bulunurlar. Yalıtkanlarda ise elektronlar değerlik bandının olduğu bölgede yer almaktadırlar. Bu tanımlamaları değerlik bandı ile iletkenlik bandı arasında kalan ve bant boşluğu olarak adlandırılan bir terim ile açıklamak gerekirse; İletkenlerde bant boşluğu; yaklaşık 0.1 eV civarında iken, yarı iletkenlerde 0.5-3.5 eV ve yalıtkanlarda 4 eV'dan daha büyük değerlerdedir [116].

Yarı iletken malzemelerin ışık veya ısı ile uyarılması sonucu iletken hale geldikleri bilinmektedir. Yarı iletken inorganik kristallerde parçacık büyüklüğü 10 nm'ye kadar olan malzemeler KN olarak bilinirler. Özellikle II-VI grubu yarı iletkenler, parçacık boyutuna bağlı olarak çok farklı optik ve enerji özellikleri gösterirler. KN'larının sentez yöntemleri iki kısımda incelenebilir. Birincisi, 1-10 nm büyüklüğündeki parçacıkların bir yarı iletken yüzeyinden elektrokimyasal veya litografik yöntemlerle elde edilmesidir. Bu yöntemin, özel sistem ve laboratuvar altyapısı gerektirdiğinden maliyeti oldukça yüksektir. İkinci sentez yöntemi ise, iyonik bir başlatıcı ile NP'lerin bir çözelti içerisinde kolloidal oluşumunu sağlamak ve büyümesini kontrol etmek esasına dayanır. Teknik olarak çok

özel sistemler gerektirmediğinden birinci yönteme oranla çok daha düşük maliyetlidir. Dolayısıyla NP sentezinde çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır [117-121].

2.8.3. Kuantum Noktalarının Uygulama Alanları

KN'larının biyoteknoloji, elektronik devre uygulamaları gibi bir çok kullanım alanı bulunmaktadır. Nanobilimdeki hızlı gelişmeler, kontrol edilebilen ve farklı optik özelliklere sahip nano materyaller geliştirmelerine olanak sağlamıştır. Son yıllarda nanomateryaller, hastalıkların teşhisi, gen tedavisi gibi farklı uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır. Yarı iletken KN'larının sentezi, biyoloji ve tıp alanındaki biyofotoniklerin ve biyogörüntülemenin önemini artırmıştır [122].

KN'ları özellikle görüntüleme optik özelliklerinden dolayı işaretleyici olarak kullanılırlar. Fakat biyolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için KN'larının suda çözünebilir olmaları gerekmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda amaç, suda çözünebilir KN'ları sentezlemek, ve bu nedenle optik özelliklerini hücrelerde biyogörüntüleme uygulamalarında kullanmaktır. KN'ları suda çözünebilir hale getirmek için bir çok yöntem vardır. Bunlardan en çok kullanılanı ligand değişimi yöntemidir. Temel olarak asıl amaç yüksek kuantum verimli, yağda çözünebilir kuantum nanoparçacıklar sentezlemek ve bu maddelerin yüzey aktif maddelerini suda çözünebilir, yüzey aktif maddelerle yer değiştirmektir. Bütün KN'larının yüzey kimyası, amin ($-NH_2$), karboksil ($-COOH$) ya da merkaptol ($-SH$) gibi reaktif grupların biyomoleküllere bağlanmasını sağlayacak şekilde sentezlenmiştir. Ancak bu yüzey değişikliği kuantum veriminin düşmesi gibi kristal yapıda bazı eksikliklere neden olur. Sulu ortamdaki KN'larının yüksek kuantum verimini korumak için bazı çalışmalar yapılmaktadır. Dış organik kaplama tabakasında; misel oluşturma, SiO_2 kullanılarak inorganik kaplama ve polimer kaplama bunlara örnek verilebilir. Ancak bu yöntemler KN'larının çaplarını artırarak floresans boyalara karşı üstünlüklerini kaybetmelerine neden olabilmektedir. Bu olumsuz etkiyi kaldırmak için ligand değişiminde tiol grupları içeren uzun zincirli alkil gruplarıyla çalışmıştır. KN'larının alkil zinciri tarafından iyi bir şekilde sarıldığı, yüksek kuantum veriminin sağlandığı ve eksikliklerin oldukça düşük miktarlarda olduğu görülmüştür. Suda çözünebilir KN'ları hücre zarından geçebilecek uygun ligandlara bağlanarak hücreye girmesi sağlanmaktadır. Hücreye girdikten sonra ligandlar ayrılır ve kuantum nanokristal işaretlenecek bölgeye gidip bağlanır. Bu olay canlı hücre görüntüleme çalışmalarına büyük kolaylık sağlamaktadır [123].

KN'ları boyutlarına bağlı olarak infrared'den ultraviyoleye değişen spektrumda floresan

ışık yayabilir. KN floresansının dalgaboyu enerji farklılığına bağlıdır. KN'larının dar bir spektrum bandı vardır, parlaklıkları fazladır, geniş bir spektrum aralığındaki ışığı absorbe edebilir, fotostabilitesi yüksektir ve çoklu teşhis özellikleri vardır. Karmaşık ortamlarda bile oldukça parlak ve stabildirler. Bu nedenle gelişmiş moleküler ve hücresel görüntüleme, tanı ve ilaç taşınımı ve duyarlı bir biyoanaliz için uygundur. KN konjugatlarıyla çözünürlüğü fazla, yüksek duyarlı gerçek zamanlı görüntüleme mümkün olabilmektedir [124].

Çeşitli antikör ve reseptör ligandlar bağlanarak hücreye gönderilen KN'ları, hastalıkların teşhisi ve tedavisinde kullanılmaktadır. KN'ları, spesifik gen bölgelerini taşıma ya da ilaç hedeflendirme de kullanılmaktadır. Çalışmalar CdSe KN'larının vücutta kanserli dokulara geçebildiği gösterilmiştir bu sayede teşhis ve tedavi amaçlı kullanılabilecekleri bildirilmektedir [124].

2.8.4. Kuantum Noktalarının Toksikitesi

KN'lar, 1998 yıllarından önce öncelikle fotonik ya da elektronik uygulamalarda, daha sonra ışığa özellikleri nedeniyle medikal alanlarda görüntüleme amaçlı kullanılmaya başlanmıştır [125-127]. KN'ların medikal uygulamalarda kullanılmasının yaygınlaştırılması ve daha fonksiyonel yapıya sahip olmaları amacıyla, KN'ların biyoyumluğunu artırma çalışmaları devam etmektedir [128,129]. Bu çalışmalar sayesinde KN'ları medikal uygulamalarda kullanımlarının artması hedeflenmektedir. Biyoyumluklarını artırmak amacıyla, KN'larının temel bileşiminde kullanılan ağır metallerin olası toksik etkileri, çeşitli hücre kültür çalışmalarında olası toksik etkileri de araştırılmıştır [130-131]. Örneğin kadmiyum bazlı KN'larına maruz kalan nöronlarda hücre ölümüne neden olduğu böylece nörotoksositeye neden olduğu belirtilmiştir [132].

KN'ların yapısında bulunan CdTe ile yapılan çalışmalarda kadmiyumun biyolojik sınırlara geçebildiği gözlenmiştir [133]. Bu nedenle farklı kimyasal yapılardan oluşan KN'larının sentezlenmesi hedeflenmiştir. Örneğin InP, InAs/InP/ZnSe, CuInS₂/ZnS, CuInSe₂ ve PbS den oluşan KN'ları sentez edilmiştir [134-135].

Silika yapısında KN'ların Cd yapıdaki KN'larından daha az toksik özellikte olduğu belirtilmiş ancak absorpsiyonları daha düşük olduğundan medikal alanda biyogörüntüleme yeterli olmadığı gözlenmiştir [136].

KN'larının toksik etkilerini azaltmak amacıyla uygulanan diğer yöntemler, KN'larının dış yüzeyinin biyoyumlu malzemelerle kaplanması ya da ligant bağlanmasıdır. Yapılan bazı

çalışmalar da hidrofobik dış yüzeye sahip olan KN'larının biyouyumlu bir polimer olan polietilenglikol (PEG) ile kaplanarak biyouyumlu hale getirilmiştir. Ancak KN'ların kaplamalarında kullanılan PEG polimerinin karaciğer, dalak ve kemik iliğindeki hücrelerini etkilediği ve PEG-KN'larının dalak, kemik iliği ve lenf düğümlerinde biriktiği bildirilmiştir [137].

KN'larının çekirdek ya da yüzey kaplamalarının parçalanmasıyla oluşan oksidatif stres sonucunda sitotoksik etki oluşturabildikleri gözlenmiştir. KN'ları, hücre bileşenleriyle etkileşime girerek, hücrenin oksidatif dengesini bozduğu ve oksidatif strese neden olabildiği iddia edilmektedir [138].

Derfus ve ark. [139] yapmış oldukları çalışmada CdSe yapısındaki KN'ları ile hepatosit hücrelerini çeşitli konsantrasyonlarda 24 saat boyunca maruz bırakmışlar ve sitotoksik etki gözlemlemişlerdir. Çalışmada aynı KN'ları sığır serum albümin (BSA) ile kaplanmış ve daha sonra yine hepatosit hücreleri ile 24 saat boyunca maruz bırakılmış herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir. KN'larının toksik etkisinin Cd^{+2} iyonlarının hücrelere geçerek zararlı etkiler oluşturabilmekte olduğunu iddia edilmiştir.

KN'larının sitotoksik etkilerinin doza bağlı olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Hoshino ve ark. [140] yapmış oldukları çalışmalarda B CdSe/ZnS-SSA KN'larının, 0.1, 0.2, ve 0.4 mg/mL konsantrasyonları, EL-4 hücreleriyle 24 saat boyunca maruz bırakılmış, ve doza bağlı bir sitotoksik etki gözlemlendiği belirtilmiştir. Hoshino ve ark. [141] devamındaki bir başka çalışma da ise WTK1 hücrelerinde ise 12 saatlik uygulama sonucunda ise KN'larının DNA hasarına neden olduğu belirtilmiştir.

Lovric ve ark. [142] yapmış oldukları bir başka çalışmada ise sıçan polikromotik hücrelerde ve (PC12) ve murine mikrogilia (N9) hücrelerinde, CdTe KN'larının yaptığı sitotoksik etkinin nedeninin CdTe KN'larınca salınan Cd^{+2} iyonlarının reaktif oksijen türlerinin oluşmasına, bunun da, hücre içindeki biyolojik yapılarda bozulmaya neden olduğunu belirtilmiştir.

Shiohara ve ark. [143] mercapto-undekanik acid (MUA) kaplı CdSe/ZnS KN'larının HeLa hücrelerinde ve primer insan hepatosit hücrelerinde 100 µg/mL konsantrasyonun toksik olduğunu belirtmiştir.

Choi ve ark. [144] CdTe ve CdSe/ZnS (çekirdek/kabuk) yapıda olan merkaptopropiyonik asit (MPA), sistein (Cys), or N-asetilsistein (NAC) ile kaplanmış KN'larını insan göğüs

kanser hücrelerinde (MCF-7) MTT test yöntemiyle sitotoksik etkilerine bakılmış ve Cys-kaplı CdSe/ZnSKN'ları hariç diğerlerinde hücre ölümüne sebep olduğu gözlenmiştir.

PEG kaplı KN'larını, insan göğüs kanser hücreleriyle (SK-BR-3) maruz bırakılmış ve elde edilen sonuçlara göre, kaplamasız olan KN'larının daha toksik olduğu belirtilmiştir. Bu da KN'larının toksik etkilerinin, fizikokimyasal etkilere bağlı olduğunu belirtmişlerdir [145].

Bir başka çalışmada ise insan deri fibroblast hücrelerinde (HDF) CdSe/ZnS KN'larının (30–60 nM) çeşitli gen ve proteinlerdeki değişimleri incelenmiştir. Ede edilen verilere göre CdSe/ZnS KN'larının apoptoza, inflamasyona ve oksidatif strese ve çeşitli immün cevapların oluşumuna neden olmuştur [146].

2.9. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

2.9.1. Sitotoksisite Tayini

Sitotoksisite çalışmaları kimyasal maddelerin hücre ve dokular üzerindeki etki mekanizmalarını aydınlatmak için önemlidir. Ayrıca sitotoksisite, kanser ve inflamasyon gibi bir çok patolojik durumun gelişmesinde de rol oynamaktadır. Son yıllarda, hücre kültüründe hücre canlılığı ve çoğalmasını araştırmak amacıyla pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı, 96 kuyucuklu plaklarda yapılan sitotoksisite değerlendirmeleridir. Bu yöntemlerle hızlı ve kolay şekilde bir çok örneğin sitotoksik analizi yapılabilmektedir [147,148].

Uygun sitotoksisite yöntemini seçmek için hücre ölümüne neden olan mekanizmaların bilinmesi önemlidir. Laktazdehidrogenaz (LDH) yöntemi, hücre membran hasarı oluşuktan sonra kültür ortamına salınan enzimin ölçülmesine dayanır. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi mitokondride enzimatik reaksiyona dayanır. Nötral kırmızı alım (NKA) yöntemi ise lizozomlara boyanın alınma derecesini ölçen bir yöntemdir [147]. Erken sitotoksik etkiyi belirlemek için NKA ve MTT yöntemleri en hassas sitotoksisite yöntemleridir [149]. MTT ve NKA sitotoksisite tayin yöntemleri canlı hücre sayısı, mitokondriyal ve lizozomal fonksiyonları değerlendirmek için uygun biyogöstergelerdir [150].

LDH yöntemi, pirüvatın laktata indirgenmesini sağlayan LDH enziminin aktivitesinin ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. Bu indirgenme NADH'ın NAD⁺'ya oksidasyonu eşliğinde 340 nm'de spektrofotometrik olarak izlenir. LDH, tüm hücrelerde bulunan sabit

bir sitoplazmik enzimdir. Plazma membranının hasarı sonucunda hızlı bir şekilde salınır. LDH yöntemi hücreler arası oluşan toksisiteyi ölçmez ancak hücre membranının hasarına yol açan kimyasal maddelerinin toksisitesini ölçer [147].

- **Nötral Kırmızı Alım (NKA) Yöntemi**

NKA yöntemi, biyomedikal ve çevresel pek çok uygulamada yaygın olarak kullanılan, hücre canlılığı ve hücre hasarını değerlendiren bir sitotoksikite testidir [151,152]. NKA yöntemi ucuz ve kolay olması nedeniyle tercih edilen yöntemlerdendir.

Borenfreund ve Puerner'in geliştirdiği yöntem, nötral kırmızı (NK) (3-amino- m-dimetilamino-2-metil-fenazin hidroklorür) boyasının kültür hücrelerinin lizozomlarına alınması esasına dayanmaktadır. Boyanın lizozomlarda birikmesi hücre sayısı ile doğru orantılıdır [153]. NK, zayıf katyonik yapıda bir boyadır ve hücre membranından hücre içine non-iyonik difüzyonla geçer. Hücre içine alınan boya, canlı hücrelerin lizozomlarında birikim göstermektedir [154]. Canlı hücrelerden asidik hale getirilmiş etanol çözeltisiyle boya tüketilmekte ve çözünmüş boya miktarı spektrofotometre yardımıyla belirlenmektedir [147].

Plazma ve/veya lizozomlara hasar veren veya enerji gerektiren endositoz olaylarıyla etkileşen kimyasal maddeler hücrenin NK boya alma kapasitesini azaltabilir. NKA yöntemi orta süreli (3-6 saat) maruziyetlerde hücre canlılığını ölçen diğer yöntemlere göre oldukça duyarlıdır [148].

- **3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Yöntemi**

MTT ölçümü in vitro koşullarda metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksisiteyi ölçmek için uygulanan kolorimetrik bir yöntemdir [155]. Hedef Krebs döngüsü enzimlerinden biri olan ve mitokondrielerin matriksinde bulunan süksinat dehidrogenaz'dır. Bir tetrazolyum tuzu olan sarı renkli MTT, süksinat dehidrogenaz enzimine özgül olarak bağlanır. Canlı hücrelerin süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimleri tetrazolyum halkasını açar. MTT suda çözünmeyen mor formazan kristallerini oluşturur. Organik çözücülerde kolayca çözünen formazan kristalleri, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans verir. Absorbans değerlendirilerek, dolaylı yoldan hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülür. Ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir [156].

Tetrazolyum tuzları, sadece metabolik olarak aktif hücreler tarafından indirgenebilir.

Kolay bir yöntemdir. Mitokondrinin metabolik aktivitesi değerlendirilebilirken hücreler arası aktivitelerin değerlendirilmesine olanak vermez. MTT, hücrelerde mitokondri dışında NADH ve NADPH ile kontrol edilen redüksiyona uğrayabilir [157].

2.9.2. Genotoksisite Tayini

Tek Hücre Jel Elektrophorez (Comet) Yöntemi

COMET yöntemi in vitro, in vivo ve ex vivo sistemlere uygulanabilen, DNA kırıklarını belirleyebilen yöntemdir [158]. DNA hasarının belirlenmesi için ilk kez Ostling ve Johanson [159], mikro jel elektrophorez tekniğini kullanmış, bu yöntem Singh ve ark. [160] tarafından geliştirilerek günümüzde yararlanılan tek hücre jel elektrophorez (COMET) yöntemi oluşturulmuştur. Bu yöntemde; DNA zincirindeki tek ve çift iplik kırıkları, alkali oynak bölgeler ve oksidatif DNA baz hasarı belirlenebilmektedir [160].

Az miktarda hücre ince agar jel yardımıyla mikroskop lamına tutturulur. Hücreler lize edilir ve DNA'nın farklı pH'larda açılması sağlanır. Elektrophorez için farklı pH'ların seçilmesi farklı derecede hasarın ölçülmesine olanak verir. DNA göçünün derecesi, hücrede DNA hasarı hakkında bilgi verir [160].

Elektrik akımı, kırılmış ve hafiflemiş DNA fragmanlarının çekirdekten hızlı göçünü sağlar. Hasarsız DNA büyük olduğundan, elektrophorezde akım uygulaması ile kuyruk bırakmadan göç ederken, hasar nedeniyle parçalanmış DNA, küçük parçalar halinde geride kalıp kuyruk oluşturur [161]. Daha sonra DNA bağlayıcı floresans bir boya ile boyama işlemi yapılır, görünüşleri itibarıyla kuyruklu yıldıza benzediklerinden "COMET" diye adlandırılan bu görüntüler ölçülüp değerlendirilir [161-165].

Comet yönteminde sonuçların değerlendirilmesinde genel olarak kuyruktaki % DNA, baş kısmındaki % DNA, kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu vb. değerler kullanılır [164]. Kuyruk uzunluğu, başın merkezinden ya da uç kısmında kuyruğun sonuna kadar olan uzunluk ve kuyruk yoğunluğu tüm Comet yoğunluğuna kıyasla kuyruktaki yoğunluktur. Kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki DNA yoğunluğunun bir sonucu olan bir göstergedir [165].

Tek hücre jel elektrophorez yöntemi, tek bir hücrede DNA hasarının doğrudan tayininin yanı sıra bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının da tayinine olanak sağlar. Herhangi bir tedavi sırasında hücrelerin heterojen cevabının ve radyoterapi ve kemoterapi tedavi protokollerinde tümör cevabının öngörülmesine

yardımcı olabilir [164]. Comet yöntemi, DNA hasar ve onarımını ve mekanizmalarını pek çok deneysel şartlarda inceleyen tek hücre süspansiyonu şeklinde elde edilebilen her ökaryotik hücrede DNA hasar ve onarımını tespit edebilen bir yöntemdir [166-169]. Comet yöntemin avantajları; düşük düzeydeki DNA hasarlarını belirleyebilir, uygulaması rahat ve ucuzdur, düşük miktarda örnekle çalışılabilir, deneyin tamamlanması için kısa süreye ihtiyaç duyulur [170].

Çeşitli enzimlerle yapılan Comet yöntemi de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler; özel glikozilaz aktivitesi gösterir, hasarlı bazı uzaklaştırır, apürinik/apirimidinik bölgeler oluşturur ve apürinik/apirimidinik bölgeleri zincir kırıklarına götürebilir [171]. DNA tamirinin belirlenmesi için lizis sonrasında nükleotitler tamir enzimleriyle inkübe edilir [172,173]. Enzimle inkübasyondan sonra inkübasyondan önceki değerlerle karşılaştırıldığında, Comet parametrelerinde artış olması okside bazların varlığını gösterir. İnsanlarda hücrelerdeki DNA hasarının tipini belirlemek için kullanılacak bu enzimler farklıdır. Örneğin Endonükleaz III okside pirimidinlerini belirler [174]. Formamidopirimidin glikozilaz (FPG) enzimi, Escherichia coli'den elde edilen bir DNA onarım enzimidir. Bu enzim, oksidatif DNA baz hasarını, özellikle pürin oksidasyon ürünü olan 8-OHdG tayin eden bir endonükleazdır. Fpg protein; 8-OHdG ve diğer hasarlı pürinleri yüksek hassasiyetle tayin etmesinin yanında, abazik bölgeleri ve açık zincir N-7 guanin katım ürünlerini de tayin edebilmektedir [175].

2.9.3. Gen Ekspresyon Ölçümü

Gen ekspresyonu ya da gen ifadesi, DNA dizisi olan genlerin, fonksiyonel protein yapılarına dönüşmesi süreci için kullanılan bir terimdir. Gen ifadesi (ekspresyonu) DNA'da bulunan genetik bilgilerin bir RNA molekülü (mRNA) sentezi suretiyle kopyalanması (transkripsiyon) ve kopyalanan genetik bilgilerin bir protein molekülü haline çevrilmesi (translasyon) işlemlerinin tamamı olarak tanımlanır. Basitçe, bu durum genlerin açık (aktif) olup olmadıkları olarak da belirtilmektedir. DNA'nın farklı genlere karşılık gelen bölgelerindeki baz dizilimleri, o gen tarafından şifrelenen proteinin aminoasit dizisini belirler. DNA'daki baz dizilimlerinin proteinin amino asit dizisini nasıl şifrelediği, genetik ve biyokimyasal yöntemlerin birlikte kullanılması ile ortaya konmuştur [176].

Gen ekspresyonunun en genel ölçüm amacı karşılaştırmadır. Farklı hücrelerdeki genlerin mRNA düzeylerini karşılaştırma, bir organdaki tümör hücresiyle normal bir hücrenin karşılaştırılması, farklı sürelerle ilaç uygulaması yapılan veya toksik maddelere maruz

kalan canlıların genlerindeki ekspresyon değişimlerinin karşılaştırılması gibi amaçlarla yapılmaktadır [177].

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), nükleik asitlerin incelenmesinde ve nükleik asitlerle ilgili çalışmalarda kullanılan oldukça duyarlı ve özgül bir moleküler tekniktir [178]. Özgül DNA ve RNA bölgelerinin tespiti, DNA sekanslanması, parmak izi tabanlı amplifikasyon yöntemleri, kültür edilemeyen mikroorganizmaların gösterilmesi ve mutasyonların tespiti gibi bir çok amaçlarla kullanılmaktadır [179].

DNA veya RNA dizilerinin sayısal olarak artırılması esasına dayanan PCR'ın en önemli yönü, özel bir DNA dizisinin seçilip çoğaltılarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasının önlenmesidir. Bu özellik, incelenen örnekler içerisinde aranan bölgenin olup olmadığının görülmesini kolaylaştırmakla kalmayıp, aynı zamanda bölgenin çok miktarda kopyası elde edileceğinden, daha ileri tekniklerle DNA'nın analiz edilmesini de sağlamasıdır [180-182]. Hedef genetik materyaller çok az sayıda ve hatta bir-çok ilgisiz DNA'lar arasında olsa bile PCR'la homojen bir DNA materyali haline getirilip çoğaltılabilir ve böylece kolayca tanımlanabilir [183-186].

Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR), 1980 yılında Karry Mullis tarafından geliştirilen, araştırmacılara istenilen spesifik gen bölgesinin 1 milyondan fazla kez çoğaltılmasını sağlayan PCR'ın, çok önemli bir uygulamasıdır [187,188]. RT-PCR sistemleri, amplifikasyonunu ve amplifiye olmuş ürünün (amplikon) kontrolünü aynı kapalı sistemlerde gerçekleştiren ve amplikonun görüntülenmesine izin veren, gıdalardan, memeli genomundan, genetik olarak geliştirilmiş organizmalardan, insan ve veteriner mikrobiyoloji alanların çok farklılık gösterebilen örneklerden, nükleik asitlerin aranmasında kullanılmaktadır [189-190].

RT-PCR, geleneksel PCR'ın uygulama alanlarını genişletirken, PCR ile ilgili pek çok laboratuvar sorununa da çözüm getirmiştir. Bu yöntem sayesinde, DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilmekte, çok sayıda örnek son derece az kontaminasyon riskiyle, güvenle çalışılabilmektedir. RT-PCR'da, PCR reaksiyonu sırasında oluşan ürünleri görünür hale getirip ve izleyebilen floresan işaretli prob ve etidyum bromür (EtBr) gibi boyalar kullanılarak ve oluşan DNA ile doğru orantılı olarak artan floresan, tek bir tüpte ve tek bir işlemle belirlenebilmektedir [191-192].

Günümüzde floresan sinyali ölçmek için kanserojen EtBr yerine PCR için geliştirilmiş çözeltiler kullanılmaktadır. SYBR Green veya SYTO9 gibi özel boyalar DNA sarmalına

bağlanarak floresan ışımaya yapıp, amplifikasyon miktarının saptanmasını sağlamaktadır. Bu yöntem aracılığıyla her PCR döngüsü sonunda, tüp içinde oluşan çift zincirli DNA miktarını ölçülerek kantitatif analizlerin yapılması sağlanır [193].

Nükleaz analizleri de dahil olmak üzere tüm çalışmalarda TaqMan problemleri [194], 5-(2'-aminoetil) aminonaftalen-1-sülfonik asit, 4-(4'-dimetilaminofenilazo) benzoik asit gibi moleküler işaretleyiciler [195] ve SYBR Green boyası [196] yaygın olarak kullanılmaktadır. TaqMan problemleri, Taq DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesinden yararlanarak, hibridizasyon sonrası oluşan tamamlayıcı dizi floresan DNA'yı kullanmaktadır. Ortaya çıkan floresan sinyal ise sinyal tespit edici sistemler tarafından sayısal bir değere dönüştürülmektedir [197].

SYBR Green boyası, gen ifadesinin ölçümünde sıklıkla kullanılan bir boyadır ve çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan ışımaya yapar. SYBR Green boyasının çift zincirli PCR ürününe bağlanması, ürün miktarı ile orantılı olarak floresan ışımaya sağlar. Bu yöntemde, uygun primer seçimi önemli aşamadır ve başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece spesifik cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya spesifik olmayan amplifikasyon ürünü oluşturmaması gerekmektedir [198].

Bununla birlikte eş zamanlı PCR cihazlarında özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin oluşumunu ve primer dimerleri saptamak için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılabilmektedir. Her çift zincirli DNA kendine özgül bir erime ısısına (melting temperature, T_m) değerine sahiptir. Amplifikasyondan sonra sıcaklık yavaş yavaş yükselttilerek belirli aralıklarla floresan miktarı gözlenir. Çift zincirli DNA denatüre olmaya başlayınca, bağlı olan floresan boya serbest kaldığı için ölçülen ışımaya miktarı azalmaya başlar. Bu yöntemle elde edilen erime eğrisinden yararlanılıp amplifikasyonun özgüllüğü saptanabilir. T_m değerinin tam olarak tespit edilebilmesi için erime eğrisinin zamana karşı türevi çizilir ve bu türev analizi sıklıkla yapılan bir yöntemdir [198].

Eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct) eş zamanlı PCR yönteminde önemli bir değişkendir. Ct, amplifikasyon sırasında saptanan floresan ışımaya miktarı eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir deyimle üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı gösterir. Farklı PCR reaksiyonlarında yeralan kalıp örneklerin miktarı Ct değerleri karşılaştırılarak öngörülebilir. Florimetrik PCR tekniğiyle yapılan kantitatif çalışmalarda, kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile incelenen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak yapılmaktadır [199].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Kuantum Noktaları

Tez çalışmasında kullanılan Ag_2S kuantum noktaları; Koç Üniversitesi, Kimya Bölümü, Polimer ve Nanomateryal Araştırma Grubu laboratuvarında sulu sentetik yoldan tek aşamada tiyol bağlı kaplamalar kullanılarak sentezlenmiştir. Ag_2S -(2-merkaptopropiyonik asit) KN'sının hidrodinamik büyüklüğü 3,5 nm olup, zeta potansiyel değeri -38mV'dur. Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'sının hidrodinamik büyüklüğü 4 nm olup, zeta potansiyel değeri -40,16 mV'dur.

Yakın Kızılötesi I. Bölgede (YKB-I) ışıyan, koloidal açıdan kararlı ve son derece ışımaya verimi yüksek olan Ag_2S kuantum noktaları 2-merkaptopropiyonik asit kaplaması ile hazırlanmıştır. Parçacıklar yakın bant-kenar emisyonu göstermiştir. Bu 2-merkaptopropiyonik asit YKB-I 780-950 nm aralığında dalgaboyu ayarlanabilir emisyon maksimumuna sahiptirler. Ag_2S kuantum noktalarının ikincisi ise, suda mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit ayrışması ile sentezlenmiştir. Su içinde mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asitin yavaş ayrışması, yaklaşık %7 civarında olan parçacıkların emisyonununun 730-920 nm dalgaboyu aralığında daha iyi ayarlanmasını sağlamıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik asit	Sigma
Beta merkaptto etanol	Amresco
Dimetil sülfoksit	Sigma-Aldrich
DiSodyum hidrojen fosfat di hidrür ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	Merck
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma
Dulbecco's fosfat tamponlu serum fizyolojik	Biological Industries
Düşük erime noktalı agar	Sigma
EDTA-disodyum tuzu	Sigma
Etidyum bromür	Sigma-Aldrich
Etil alkol	Sigma-Aldrich
Hidrojen peroksit (%35)	Merck
Hidroklorik asit (%37)	Merck
L-Glutamin	Sigma
Metil alkol	Sigma-Aldrich

Nitrik asit	Sigma-Aldrich
N-Lauroil sarkosinat sodyum tuzu	Sigma-Aldrich
Normal erime noktalı agar	Sigma
Nötral Kırmızı	Sigma
Orta erime noktalı agar	Sigma
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Potasyum klorür	Horasan Kimya
RNeasy Plus Mini Kit	QIAGEN
RPMI 1640	Sigma
RT ² First Strand Kit	QIAGEN
RT ² qPCR Primer Assay	QIAGEN
RT ² SYBR Green qPCR Mastermix	QIAGEN
Sığır serum albümini (FCS)	Biological Industries
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür	Merck
Tripan mavisi	Sigma
Tripsin	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trizma base (TrisHCl)	Sigma

3.3. Kullanılan Araç Gereçler

6 ve 96 kuyucuklu plaklar	Greiner
Buzdolabı	Hotpoint
Cam pastör pipeti	Interlab
Cam pastör pipeti kauçuk başlığı	Interlab
Comet Bilgisayar yazılımı 3.0	Perceptive Software
De iyonize su cihazı	Easypure UV
Derin dondurucu (-80°C)	Revco
Elektroforez	Biometra Analitik
Elektroforez güç kaynağı	Power Pack P25
Etüv	Dedeoğlu
Filtreli uç 0.5-10 µl'lik steril	HTL

Filtreli uç 0.5-20 µl'lik steril	HTL
Filtreli uç 100-1000 µl'lik steril	HTL
Filtreli uç 1-200 µl'lik steril	HTL
Floresan mikroskop	Leica
Isıtıcı	Multi-blok, Lab-Line
İnkübatör	Haraeus Instruments
Karıştırıcı-Isıtıcı	Jankel&Kunkel,Ikamag
Kırık buz makinası	Scotsman AF100
Lam (25x75)-Bir kenarı traşlı	Marienfeld
Lamel (24x60)	Marienfeld
Laminar flow	Kojair KR 105
Manyetik karıştırıcı	Stuart Scientific
Mavi mikropipet ucu 100-1000mL	Eppendorf
Mikrodalga fırın	Vestel
Mikropipetler (0,5-20, 1-10, 10-100, 20-200, 100-1000 µl)	Finnpipette, Gilson
Mikrosantrifüj	Hettich Micro 12-24
Mikrosantrifüj tüpü, kapaklı (1,5 ml)	Eppendorf
Nanodrop	Maestrogen
Otoklav	Spectrophotometer
PCR Tubes, 0,2 ml	Rodwell Monarch MP 24
PCR veri analiz programı 3.5-online	QIAGEN
pHmetre	SABIOSCIENCE
Plastik pastör pipeti 3 ml	Cyberscan
Real Time PCR Cihazı	Interlab
Real Time PCR Yazılımı	Corbett
Santrifüj	QIAGEN
Sarı micropipet ucu 1-200 ml	Haraeus, Hettich
Sayım lamı (Neubauer)	Eppendorf
Sekiz kanallı mikropipet (5-300 µl)	Marienfeld
Spektrofotometre	Eppendorf
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml	SpektraMax M2
	QIAGEN

Su banyosu	Termal Laboratuvar Aletleri
Terazi	Schimadzu Libror
Ultrasonik banyo	Transsonic 460/H
Vakum pompası	Welch Vacuum
Vorteks	Heidolph Reax 2000
Yatay çalkalayıcı	Edmund Bühler
Yatay hücre kültür şişesi	TPP

3.4. Kullanılan Çözeltiler

3.4.1. Deneylerde Kullanılan Nanomateryallerin Çözeltileri

Bu çalışmada; Ag_2S -(2-merkaptopropiyonik asit) ve Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'ları hücre kültürü ortamında 5-2000 $\mu g/ml$ konsantrasyon aralığında olacak şekilde doğrudan kullanılmıştır. Ayrıca kaplama maddesi olan 2-merkaptopropiyonik asit ve mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit de yine aynı konsantrasyon aralığında deney ortamına doğrudan eklenmiştir.

3.4.2. NKA Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Besi ortamı

500 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) üzerine 50 ml % 10 FBS ve 5 ml % 1 penisilin/streptomisin eklendi. $+4^{\circ}C$ 'de saklandı.

Fiksasyon (sabitleme) çözeltisi

100 ml etil alkol, 2 ml asetik asit ve 98 ml distile su karıştırılarak hazırlandı. $+4^{\circ}C$ 'de saklandı.

Nötral kırmızı (NK) stok çözeltisi

20 mg NK boyası 5 ml FBS içermeyen besi yeri içerisinde çözüldü. Su banyosunda çalkalanarak çözünmesi sağlandı. Hazırlanan çözelti alüminyum folyoya sarılarak $+4^{\circ}C$ 'de saklandı.

Nötral kırmızı (NK) standart çözeltisi

Deney gününden bir gün önce 625 µl NK stok çözeltisi 50 ml FBS içermeyen besi yeri ile karıştırılarak hazırlandı. Membran filtreden süzüldü. 37°C'de 18 saat süreyle inkübe edildi.

3.4.3. MTT Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Besi Ortamı

500 ml MEM üzerine 50 ml (%10) FBS ve 5 ml (%1) penisilin/streptomisin eklendi. +4°C'de saklandı.

Çözme Çözeltisi

DMF çözeltisi (%40 h/h), glasiyel asetik asit (%2 h/h) içinde hazırlandı. 16 g SDS 100 ml DMF çözeltisine eklendi. pH 4.7'ye ayarlandı. Oda sıcaklığında SDS'in çözünmesi beklendi (çökelek çözünmezse 37°C'ye ısıtılır ve karıştırılır).

3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Çözeltisi

50 mg MTT, 10 ml Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS) içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti membran filtreden steril, ışık geçirmeyen bir tüpe süzüldü. Hazırlanan MTT çözeltisi ışıktan korunarak, 4°C'de saklandı (uzun süre saklanacaksa -20°C'de saklanılabilir).

3.4.4. Comet Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Disodyum etilendiamin tetraasetik asit (Na₂EDTA) çözeltisi (200 mM)

14,89 g Na₂EDTA 200 ml distile suda çözüldü. pH 10'a ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Düşük erime noktalı agar (LMPA) çözeltisi

125 mg LMPA sıcak su banyosu kullanılarak 25 ml PBS içerisinde çözüldü. Küçük hacimler halinde buzdolabında saklandı.

Elektroforez tampon çözeltisi

1705 ml soğuk distile su, 52,8 ml 10 N NaOH ve 8,8 ml 200 mM EDTA çözeltisi karıştırıldı. Deney günü taze hazırlandı.

Etanol çözeltisi (% 50)

% 99,8'lik mutlak etanol çözeltisinden 150,3 ml alındı, son hacim distile suyla 300 ml'ye tamamlandı.

Etanol çözeltisi (% 75)

% 99,8'lik mutlak etanol çözeltisinden 225,5 ml alındı, son hacim distile suyla 300 ml'ye tamamlandı.

Etidiyum bromür (EtBr) çözeltisi

10 mg EtBr, 50 ml distile suda çözülerek 200 µg/ml'lik stok EtBr çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden boyama sırasında 1 ml alınıp distile suyla 10 ml'ye tamamlanarak 20 µg/ml'lik EtBr çözeltisi hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Fosfat tamponlu serum fizyolojik çözeltisi (PBS)

1 PBS tableti 200 ml distile suda çözüldü. 4°C'de saklandı.

Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi

% 35'lik H₂O₂ çözeltisinden 9,7 µl alındı, 990,3 µl distile su ile 1 ml'ye tamamlanarak 0,1M H₂O₂ çözeltisi hazırlandı. 1 hafta süresince 4°C'de saklanabilen çözeltiden deney günü 20 µl alınıp 1980 µl PBS ilave edilerek, 1 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlandı.

Normal erime noktalı agar (NMPA) çözeltisi

500 mg NMPA sıcak su banyosu kullanılarak, 50 ml PBS içerisinde çözüldü. Küçük hacimler halinde 4°C'de saklandı.

Nötralizasyon tampon çözeltisi

48,5 mg Tris 750 ml distile suda çözülüp çözelti pH'sı 7,5'a ayarlandı. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Stok lizis çözeltisi

146,1 NaCl, 37,2 g Na₂EDTA, 1,2 g Tris 500 ml distile suda çözüldü. 10 g NaOH eklenip çözelti pH'sı 10'a ayarlandı. 10 g N-Lauril sarkosinat sodyum tuzu eklendi.

Çözeltinin son hacmi distile su ile 890 ml'ye tamamlanıp maddeler çözününceye kadar karıştırılarak stok lizis çözeltisi hazırlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Lizis çözeltisi

178 ml stok lizis çözeltisi, 2 ml Triton X-100 ve 20 ml DMSO karıştırıldı. Çözelti deney günü taze hazırlandı, kullanılacağı zamana kadar 4°C'de bekletildi ve deney sırasında soğuk çözelti kullanıldı.

3.4.5. Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

- RNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

Hücre vasatı

100 ml DMEM içerisine 10 ml FCS ve 1 ml Penisilin-streptomisin eklendi. +4 °C'de saklandı.

RLT tampon çözeltisi

İzolasyon kiti içerisinde hazır olarak gelmektedir.

İzolasyon Çözeltisi

20 ml RLT tampon çözeltisine 2 ml steril β-merkapto etanol eklendi. 4 °C de saklandı.

Etanol Çözeltisi (% 70)

% 99.8'lik mutlak etanol çözeltisinden 70.14 ml alındı, 100 ml'ye DNaz RNaz içermeyen suyla tamamlandı.

RW1 Yıkama Çözeltisi

İzolasyon kiti içerisinde hazır olarak gelmektedir.

RPE Tampon Çözeltisi

İzolasyon kiti içerisinde hazır olarak gelmektedir. 44 ml %70'lik etanolle seyreltildi.

- cDNA Çevrilmesi İşleminde Kullanılan Çözeltiler

Buffer GE gDNA Eliminasyon Çözeltisi Tamponu

İzolasyon kiti içerisinde hazır olarak gelmektedir.

BC3 Çözeltisi

İzolasyon kiti içerisinde hazır olarak gelmektedir.

Control P2 Çözeltisi

İzolasyon kiti içerisinde hazır olarak gelmektedir.

RE3 Çözeltisi

İzolasyon kiti içerisinde hazır olarak gelmektedir.

Ters transkripsiyon Karışım Çözeltisi

İzole edilen her bir RNA örneği için 4 µl BC3, 1 µl kontrol P2, 2 µl RE3, 3 µl RNaz DNaz içermeyen su eklenerek 10 µl'lik karışım taze olarak hazırlandı.

- Gen Ekspresyonunda Kullanılan Çözeltiler

SYBR Green Master Mix Çözeltisi

İzolasyon kiti içerisinde hazır olarak gelmektedir.

bax, kaspaz 9 ve bcl2 Primer Çözeltileri

İzolasyon kiti içerisinde hazır olarak gelmektedir.

Gen Ekspresyon Karışım Çözeltisi

RNA'dan cDNA'ya çevrilen her bir örnek için 12.5 µl SYBR Green Master Mix, 1 µl çalışılacak primer, 5 µl örnek cDNA, 6.5 µl DNaz RNaz içermeyen su eklenerek 25 µl karışım taze olarak hazırlandı.

3.5. Yöntemler

3.5.1. Sitotoksisite Değerlendirmesinde Kullanılan Yöntemler

3.5.1.1. NKA Yöntemi ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

- Hücreler 37°C'lik su banyosunda 1-2 dakika bekletilerek oda sıcaklığına getirildi. Daha sonra her işlem steril şartlarda ve streil kabin içerisinde yapıldı.
- Steril bir tüp içerisinde 1 ml hücre ve 9 ml besiyeri karıştırıldıktan sonra 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjleme yapılarak süpernatant kısmı atıldı, ortamındaki DMSO uzaklaştırıldı.
- Kalan hücre pelleti hacimce % 90 DMEM, % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren besiyeri ile karıştırılarak yatay kültür kapları içerisine aktarıldı.
- Kültür ortamındaki hücrelerin 37°C'ye ayarlanmış % 5 CO₂'li ve nemli etüv içerisinde büyümeleri sağlandı.
- 2-3 günlük süre içerisinde hücreler ve besiyeri mikroskopta kontaminasyon durumu ve doyunluğu açısından kontrol edildi.
- Büyümeye bırakılan hücreler, zemine tutunarak tüm kültür ortamını kapladıkları büyüklüğe ulaştıklarında ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücreler 2 kez 10 ml ılık PBS ile yıkandı.
- Hücrelerin üzerine 5 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 5 dakika bekletildi, hücreler yapıştıkları yerden kalkana kadar kültür kabının tabanına hafif hafif vuruldu.
- Steril bir tüpe 10 ml besiyeri konularak, tripsin sayesinde zeminden ayrılarak süspansiyon haline getirilen hücreler eklendi.
- Hücre süspansiyonu 1000 devir/dakika hızda 25°C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı çalışma kabini altında uzaklaştırıldı ve dipte toplanan hücre pelleti 10 ml besiyeri ile dikkatlice karıştırıldı.
- Bu aşamada elde edilen hücre süspansiyonundan 100 µL alınarak bir ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 900 µL tripan mavisi çözeltisi (% 0,4) eklenerek iyice karıştırıldı.

- Neubauer tipi hücre sayım lamı (hemasitometre) üzerine lamel yerleştirildi ve yaklaşık 10 µL hücre süspansiyonu kapiler etkiyle dolduruldu.
- Işık mikroskobu altında, hücre sayıcı lamı oluşturan dört karenin kenar çizgileri hariç üzerlerindeki parlak ve renksiz görüntülü yaşayan hücreler sayıldı. Yaşayan hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Yaşayan Hücre Konsantrasyonu (hücre/ml)} = A \times B$$

A: Sayılan yaşayan hücre sayısının ortalaması (4 karede sayım yapıldığından toplam sayı dörde bölünerek ortalama sayı tespit edilmiştir)

B: Seyreltme faktörü = 1/10 (Hücre süspansiyonu ve tripan mavisi çözeltisi karışımı)

- Yaşayan hücre konsantrasyonu hesaplandıktan (sayılan hücre sayısı x 10⁵ hücre/ml) sonra hücre süspansiyonu besiyeri kullanılarak hücre kültürü çalışmalarında istenilen konsantrasyonlara seyreltildi.
- 96 kuyucuklu plakalara çoklu pipetler kullanılarak her bir kuyucukta 200 µl 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 1-12. sıralara ekildi.
- Plaka etüve kaldırılarak 24 saat inkübasyona bırakıldı, hücrelerin kuyucuklar içinde tutunarak çoğalmaları beklendi.
- 24 saat sonra yine steril şartlarda besiyeri uzaklaştırıldı.
- Bu esnada steril tüplerde besiyeri içerisinde çalışılması planlanan test çözeltileri hazırlandı. Ana stoktan seyreltmeler yapılarak her biri 5 ml 8 farklı doz hazırlandı ve 200 µl/ kuyucuk olacak şekilde hücreler üzerine eklendi.
- 12 sıradan oluşan tabaka üzerinde ilk iki sıra kontrol 1.ve 2. sıra kontrol olarak eklendikten sonra 3-12. sıralara artan dozlarda (5, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000 µg/ml) olacak şekilde incelenecek bileşiklerden 10 doz eklendi.
- Uygulama konsantrasyonları ile muamele edilen hücreler 24 saat daha inkübasyona bırakıldı.
- Bir sonraki gün çalışma sırasında kullanılmak üzere NR çözeltisi (100 ml besiyeri+ 1250 µl NR stok çözeltisi) hazırlanarak inkübasyona bırakıldı.
- 24 saat sonunda plak içindeki test maddesini içeren besiyeri boşaltıldı. Bir gün önceden hazırlanan NR çözeltisinden her bir kuyucuğa 200 µl eklenerek 3 saat daha inkübasyon yapıldı.

- Süre sonunda boya ortamdan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 3-4 kez ılık PBS ile yıkandı. Süzgeç kağıdına vurarak plakalar kurutuldu.
- Tüm hücrelere 200 µl % 50 metil alkol, % 1 glasiyel asetik asit ve % 49 distile su karışımından oluşan sabitleyici çözelti eklendi.
- Plaka çalkalayıcı üzerine yerleştirilerek 20 dakika süre ile çalkalandı.
- Hücrelerin absorbansları spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçüldü.
- Boya ışıkta bozulduğu için, deneyin her aşaması mümkün olduğunca karanlıkta yapıldı.
- Çalışma farklı zamanlarda en az 3 kez tekrarlandı ve sonuçlar 3 çalışmanın ortalaması olarak hesaplandı.
- Her madde konsantrasyonu için ölçülen absorbans değerinin, kontrol değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı ve hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitor konsantrasyonu (IC₅₀) hesaplandı.

3.5.1.2. MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

- NKA yöntemi başlığı altında anlatıldığı şekilde V79 hücrelerinin kültürü yapıldı, madde çözeltileri kuyucuklara eklendi.
- Hücreler 37°C'de, 24 saat süreyle % 5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda madde çözeltileri atıldı. Her bir kuyucuğa 100 µl besi ortamı ve hazırlanan MTT çözeltisinden 10 µl eklenerek hücreler 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren etüvde 4 saat daha inkübasyona bırakıldı.
- 4 saatlik inkübasyon süresinin sonunda MTT çözeltisi atıldı. Kuyucuklarda oluşan formazan kristallerini çözmek amacıyla her kuyucuğa 100 µl çözme çözeltisi eklendi. Plak yatay çalkalayıcıda 10 dakika süreyle çalkaladı.
- Çalkalama işlemi sonrasında kuyucuklarda oluşan renk şiddeti spektrofotometrede 570 nm'de ölçüldü.
- Her bir maddenin konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin kontrol absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı ve IC₅₀ değerleri hesaplandı.
- Çalışmalar üçer kez tekrarlandı.
-

3.5.2. Comet Yöntemi ile Genotoksik Etkilerin Belirlenmesi

- Bölüm 3.4.1.1 de NKA yöntemi başlığı altında anlatıldığı şekilde V79 hücreleri çoğaltıldıktan ve Neubauer lamında yaşayan hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra, hücre süspansiyonu, besi yeri kullanılarak hücre kültürü çalışmalarında istenilen konsantrasyonlara seyreltildi.
- Neubauer lamında sayılan hücreler besi yeri içerisinde süspande edilerek her bir kuyucuğa 2 ml (20000 hücre/kuyucuk) olacak şekilde 6 kuyucuklu plağa ekim yapıldı.
- Kuyucuklara ekilen hücreler 37°C’de, % 5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde 1 gün süre ile inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresinin sonunda her bir kuyucuğa Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının ve Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının çözeltilerinden 5-2000 µg/ml aralığında 10 farklı konsantrasyonu eklenerek son hacim besi yeri ile 2 ml’ye tamamlandı.
- Negatif kontrol olarak %1 distile su ve pozitif kontrol olarak 100 µM H₂O₂ kullanıldı.
- Hücre süspansiyonları incelenen bileşiklerin çözeltileriyle 37°C’de, % 5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat süreyle inkübe edildi.
- İnkübasyonu takiben hücreler 2 ml soğuk PBS ile iki defa yıkandı. Her bir kuyucuğa 400 µl tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildi.
- 6 kuyucuklu plaklar inkübatörde 3-5 dakika süreyle bekletilerek hücrelerin kuyucuk tabanından ayrılması sağlandı. 600 µl besi yeri kuyucuklara ilave edildi ve tripsininin etkisi durduruldu.
- 1000 µl hücre süspansiyonu eppendorf tüplere alındı. Hücre süspansiyonları mikrosantrifüjde 2000 rpm’de 5 dakika süreyle santrifüj edildi, üst faz atıldı.
- Pozitif kontrol olarak 100 µM H₂O₂ uygulandı.
- Hücreler 5 dakika buz banyosunda bekletildi. 4°C’de 2500 rpm’de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve santrifüj sonunda süpernatant atıldı. 4°C’de 1 ml PBS eklenip 2500 rpm’de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek hücreler yıkandı. Santrifüjün ardından süpernatant atıldı.

- Elde edilen hücre süspansiyonundan 100 µL bir ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 900 µL tripan mavisi çözeltisi (% 0,4 a/h) eklenerek iyice karıştırıldı.
- Neubauer sayım lamı üzerine lamel kapatıldı. Yaklaşık 10 µl hücre süspansiyonu-tripran mavisi karışımı sayım lamına uygulandı.
- Işık mikroskobu altında, Neubauer lamında dört karede parlak mavi ve renksiz olan yaşayan hücreler soldan sağa ve yukarıdan aşağıya gidilerek sayıldı. Hücre sayımının doğru ve kesin bir şekilde yapılabilmesi için ideal olarak her işlemde 200 ve üzeri hücre sayıldı. Yaşayan hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{ml'deki Yaşayan Hücre Sayısı} = \frac{\text{Toplam Hücre Sayısı}}{4} \times 10.000 \times 10$$

- Sayılan V79 hücreleri her bir lamda 10.000 hücre olacak şekilde hesaplanarak, 37°C ± 0.5°C'de eritilmiş 100 µl % 0,5'lik LMPA, 50 µl hücre süspansiyonu ile karıştırıldıktan sonra önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılarak agar kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldı.
- Lamlar buz üzerinde bekletilerek agarın katılaşması sağlanıp, agar üzerindeki lamel agar tabakası bozulmadan dikkatlice alındı.
- Lamlar daha önceden hazırlanarak buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltisi içine daldırılarak en az 3 saat süreyle buzdolabında bekletildi.
- Lizis işlemi sonrası lamlar elektroforez tankında soğuk elektroforez tamponu içinde 20 dakika bekletildi, takiben 25 V 300 mA akım verilerek 20 dakika elektroforez işlemi uygulandı.
- Elektroforezden sonra lamlar 15 dakika süreyle nötralizasyon tampon çözeltisinde bekletildi.
- Bu işlemler ek bir DNA hasarını önlemek üzere karanlıkta yapıldı.
- Lamlar üzerine EtBr çözeltisi ilave edilip lamel kapatıldıktan sonra floresan mikroskop altında incelendi.
- Her deneyde örnekler çift olarak çalışıldı ve ayrıca tüm deneyler birbirinden bağımsız olarak ayrı zamanlarda 3 kez tekrarlandı.

- Her lamda 100 hücre floresan mikroskopta Comet bilgisayar analiz programı (Comet Analysis Software, version 3.0, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK) ile değerlendirilerek, DNA hasar derecesi kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti olarak belirlendi.

3.5.3. Gen Ekspresyonu Çalışmasında Kullanılan Yöntemler

- 3.4.1.1 de NKA yönteminde anlatıldığı şekilde çoğaltılan V79 hücreleri, Neubauer lamında hücre canlılığı için değerlendirildi.
- Hücreler, besi yerinde seyreltildi, her bir kuyucukta 30.000 hücre/ 2 ml olacak şekilde, 6 kuyucuklu plaklara ekim yapıldı.
- %5 CO₂ ve 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra vasat atıldı, negatif kontrol olarak distile su ve 10, 40, 125 ve 500 µl/ml olarak 4 doz eklendi. Son hacimleri 2 ml'ye tamamlandı.
- %5 CO₂ ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresi bitiminde, hücreler 2 ml PBS ile iki kez yıkandı. Hücreleri tutundukları yüzeyden kaldırmak için her bir kuyucuğa 500 µl tripsin eklendi. 3-5 dakika inkübasyon ortamında bekletildi.
- Hücreler tutundukları yüzeyden ayrılınca reaksiyonu durdurmak için FCS içeren besi yerinden 1000 µl eklendi.
- Toplamda 1500 µl olan hücre süspansiyonları, santrifüj tüplerine alındı. 1000 devir/dakika hızda 5 dakika santrifüjlendikten sonra üst faz atıldı.
- Hücre süspansiyonlarından 100 µl alınarak eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 900 µl tripan mavisi çözeltisi eklendi ve karıştırıldı.
- Ardından karışımdan 10 µl alındı Neubauer lamına aktarıldı ve ışık mikroskopunda hücreler sayıldı. Yaşayan hücrelerin konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{ml'de yaşayan hücre sayısı} = \frac{\text{Toplam hücre sayısı}}{4} \times 10.000 \times 10$$

- Daha önceden 1 ml RLT tamponuna 100 µl β-merkapt etanol şeklinde hazırlanmış olan RLT karışımından her örneğe 350µl eklendi. Hafifçe vurarak karıştırıldı.
- Üzerlerine 350 µl %70'lik steril etanol çözeltisi eklendi ve karıştırıldı.

- Hazırlanan hücre çözeltisi, pipetle alınarak silisyum oksit filtre içeren RNeasy spin kolona eklendi.
- 10.000 devir/dakika hızda 15 saniye santrifüjlendi.
- Kolonun üst kısmı ayrılıp temiz alt tüpe alındı ve 700 µl RW1 yıkama çözeltisi eklendi.
- 10.000 devir/dakika hızda 15 saniye santrifüjlendi. Santrifüjden sonra elüat atıldı, spin kolona geri takıldı. RNA'lar kolona tutturulmuş oldu.
- RPE tamponuna 44 ml %70'lik etanol çözeltisi eklendi.
- Spin kolona 500 µl RPE çözeltisi eklendi. 10.000 devir/dakika hızda 15 saniye santrifüjlendi.
- Elüat atıldı. Tekrar 500 µl RPE çözeltisi eklendi. 10.000 devir/dakika hızda 2 dakika santrifüjlendi.
- Spin kolonun üst kısmı alınıp eppendorfa kondu. Alt kısmı atıldı.
- 45 µl RNaz DNaz içermeyen su eklendi. 10.000 devir/dakika hızda 1 dakika santrifüjlendi. Spin kolon atıldı. RNA hücreden toplanarak -80 °C'de saklandı.
- 0.2 ml'lik boş eppendorflar soğuk metal kalıp üzerine dizildi, içlerine 2 µl GE tamponu eklendi.
- Her tüpe 8 µl RNA izolatından eklendi ve yavaşça pipetleme yapıldı.
- Tüpler 36'lık kırmızı rotora dizildi. Boş kalan yerlere boş tüp dizildi. Üzerine metal kelepçe oturtuldu ve kapatıldı.
- Denatürasyon işlemi için rotor RT-PCR cihazına oturtuldu. 42 °C'de 5 dakika denatürasyona bırakıldı.
- Denatürasyondan sonra linearitenin bozulmaması için eppendorflar soğuk metal blok üzerine alındı.
- Her bir örneğe 10 µl ters transkripsiyon karışımından eklendi.
- Eppendorflar tekrar kırmızı rotora dizildi.
- RT-PCR cihazında 42 °C'de 15 dakika, 90°C'de 5 dakika işleme bırakıldı.
- İşlemden sonra eppendorflar soğuk kalıp üzerine dizildi. Her birine DNaz RNaz içermeyen su eklendi ve vorteksle karıştırıldı.
- Sonuçta her örnek için 111 µl cDNA elde edildi.
- cDNA'lar -20 °C'de saklandı.
- cDNA'lar üzerinden gen ekspresyonunu ölçmek için her bir örnek ve primerler (bax, kaspaz 9 ve bcl2) için mastermix karışımları ayrı ayrı hazırlandı.

- 5 µl cDNA üzerine master mix karışımından 20 µl eklendi ve toplamda 25 µl karışım elde edildi.
- Tüpler mavi 72'lik rotora dizildi. Boş kalan yerlere boş tüp yerleştirildi. Üzerine mavi kelepçe yerleştirildi ve RT-PCR cihazına oturtuldu.
- Hold 95 °C 15 dakika, cycle 95 °C 15 saniye ve 60 °C 30 saniye olacak şekilde koşullar ayarlandı. 40 döngü olacak şekilde cihaz çalıştırıldı.
- Okuma sıcaklığı 60 °C'ye ayarlandı.
- Sonuçlar değerlendirilirken log fazının başlangıç değeri- threshold limit 0.05 olarak ayarlandı.
- Örneklerin CT değerleri hesaplandı.
- CT değerleri online yazılım programında değerlendirildi.
- Çalışmalar 2 kez tekrarlandı.

3.6. İstatistiksel Yöntemler

NKA testi sonuçları değerlendirilirken, elde edilen absorbans değerlerinin kontrol değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı ve hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) hesaplandı.

Comet yönteminde sonuçlar negatif kontrol ve pozitif kontrol grupları ile karşılaştırıldı. Her lamda 100 hücrenin DNA hasarı yönünden kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerleri Comet Bilgisayar Yazılımı (Comet Analysis Software, ver.3.0, Kinetic Imaging Ltd. Liverpool, UK) yardımıyla ölçüldü. Ölçülen değerler SPSS for Windows 15.0 bilgisayar yazılımı ile tek tönü varyans analizi (ANOVA) LSD testi ile hesaplandı.

Gen ekspresyon analizinde örneklerin CT değerleri negatif kontrol grubu ile Sabioscience RT² Data Analysis ver. 3.5 Online Yazılım Programında değerlendirildi. Ortalama CT, ΔCT, ΔΔCT ve kat değişimi-*fold change* değerleri hesaplanarak karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) Kuantum Noktası ile Elde Edilen Bulgular

4.1.1. Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) Kuantum Noktasının Sitotoksitesine İlişkin Bulgular

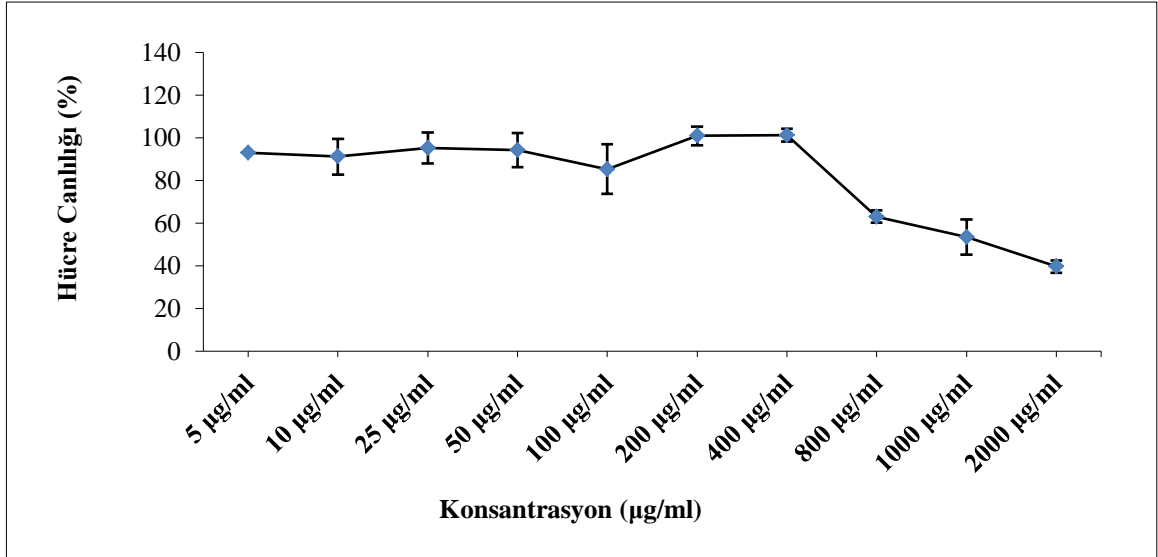
4.1.1.1. Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) Kuantum Noktasının NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

5-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde yapılan NKA deneyi sonucunda negatif kontrolle kıyaslandığında 5-400 µg/ml konsantrasyon aralığında V79 hücrelerine önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı ancak 800-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında hücre canlılığında azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücreleri için IC₅₀ değeri 1260 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1.) (Şekil 4.1.).

Çizelge 4. 1. NKA yöntemine göre Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerindeki sitotoksik etkisi*

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%) (±standart sapma)
1	(-) Kontrol (PBS)	0,636±0,066	100,0±0,0
2	5 µg/ml	0,593±0,103	93,0±8,4
3	10 µg/ml	0,576±0,022	91,2±7,3
4	25 µg/ml	0,604±0,063	95,3±7,9
5	50 µg/ml	0,597±0,082	94,3±11,7
6	100 µg/ml	0,543±0,070	85,3±4,4
7	200 µg/ml	0,641±0,058	100,9±3,0
8	400 µg/ml	0,644±0,057	101,4±2,9
9	800 µg/ml	0,403±0,078	63,1±8,2
10	1000 µg/ml	0,342±0,052	53,6±2,9
11	2000 µg/ml	0,251±0,041	39,7±6,9

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4. 1. NKA yöntemine göre Ag_2S -(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırılmıştır.

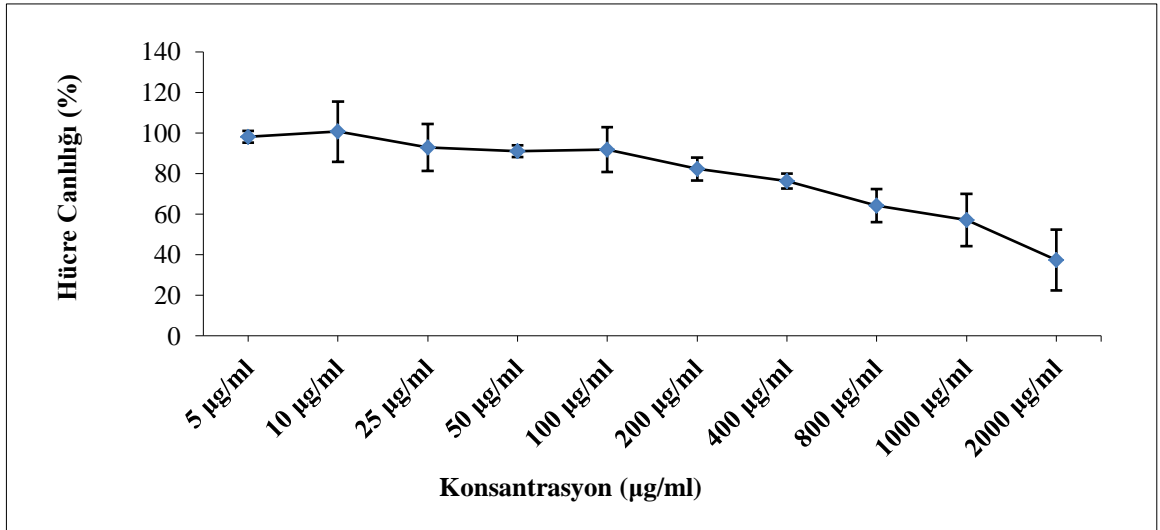
4.1.1.2. Ag_2S -(2-merkaptopropiyonik asit) Kuantum Noktasının MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

5- 2000 µg/ml konsantrasyon aralığında Ag_2S -(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde yapılan MTT deneyi sonucunda negatif kontrol (PBS) ile kıyaslandığında 5-100 µg/ml konsantrasyon aralığında V79 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı ancak 200-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında hücre canlılığı azalmaya başladığı gözlenmiştir. Ag_2S -(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücreleri için IC_{50} değeri 1361,52 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2) (Şekil 4.2.).

Çizelge 4. 2. MTT yöntemine göre Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%) (±standart sapma)
1	(-) Kontrol (PBS)	1,531±0,201	100±0,0
2	5 µg/ml	1,483±0,104	98,1±14,8
3	10 µg/ml	1,529±0,143	100,7±11,5
4	25 µg/ml	1,418±0,144	92,9±3,0
5	50 µg/ml	1,379±0,068	91,0±11,0
6	100 µg/ml	1,396±0,102	91,7±5,7
7	200 µg/ml	1,259±0,176	82,3±3,7
8	400 µg/ml	1,177±0,271	76,3±8,1
9	800 µg/ml	1,000±0,318	64,2±12,8
10	1000 µg/ml	0,894±0,332	57,1±15,0
11	2000 µg/ml	0,573±0,110	37,3±2,6

*Sonnular üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırılmıştır.



şekil 4. 2. MTT yöntemine göre Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

*Sonnular üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir. Negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırılmıştır.

4.1.2. Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) Kuantum Noktasının COMET Yöntemi ile Genotoksisitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

5-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına ilişkin üç ayrı deneyin sonuçları Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Çizelgede toplam hücre sayısı üzerinden değerlendirilen ortalama kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti, ve kuyruk yoğunluğu ve bunların standart sapmaları verilmiştir (Çizelge 4.3.) (Şekil 4.3.).

DNA hasarı kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirildiğinde, Ag₂S-(2merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde uygulaması sonucunda 5-2000 µl/mg konsantrasyonlarının negatif kontrole kıyaslandığında sadece 2000 µl/mg dozunda DNA hasarının olduğu gözlenmiştir (p<0.05) (Çizelge 4.3.) (Şekil 4.3.).

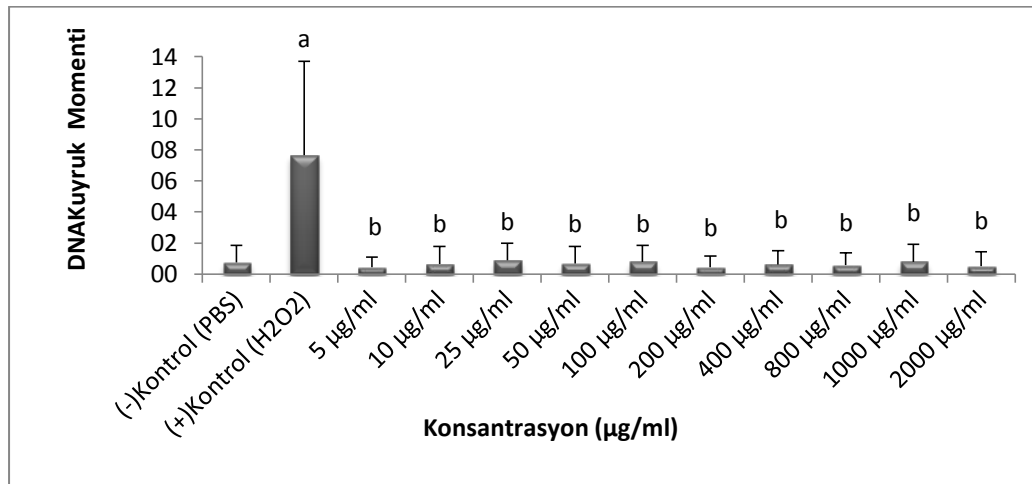
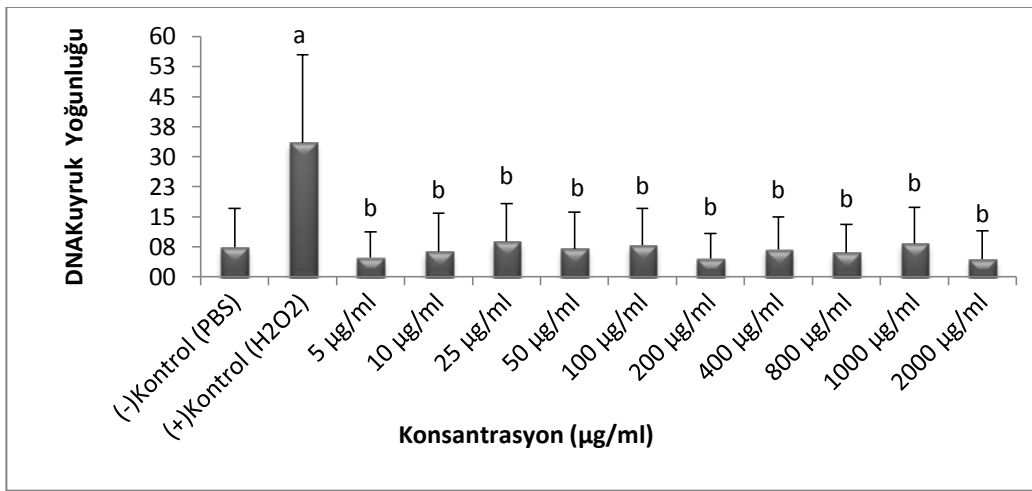
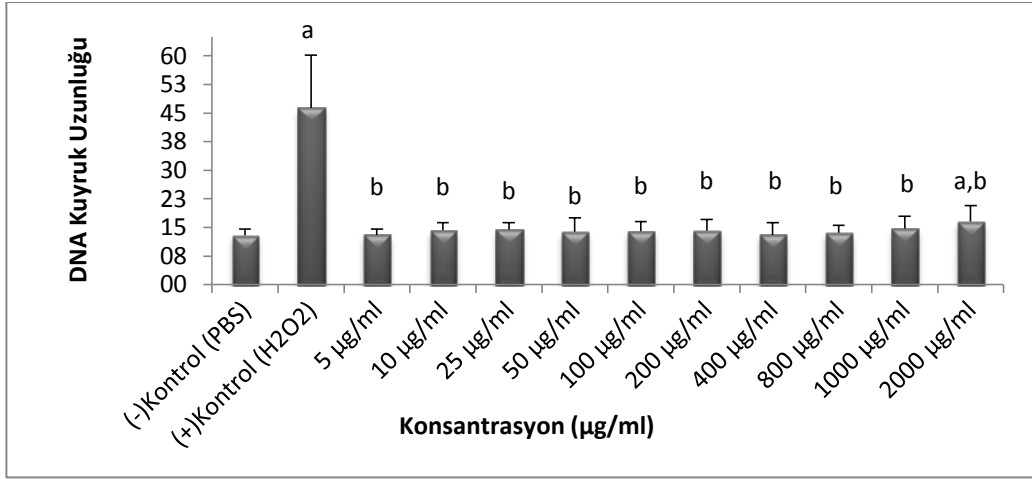
DNA hasarı kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının negatif kontrol ile kıyaslandığında 5-2000 µl/mg konsantrasyonlarda V79 hücrelerinde önemli bir DNA hasarı oluşturmadığı gözlenmiştir (p<0.05) (Çizelge 4.3.) (Şekil 4.3.).

Çizelge 4. 3. Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular *

	Kuyruk Uzunluğu ±standart sapma	Kuyruk Yoğunluğu ±standart sapma	Kuyruk Momenti ±standart sapma
(-)Kontrol (PBS)	12,89±1,70 ^b	7,42±9,71 ^b	0,74±1,10 ^b
(+)Kontrol (H₂O₂)	46,28±13,87 ^a	33,47±21,95 ^a	7,64±6,06 ^a
5 µg/ml	13,05±1,48 ^b	4,81±6,40 ^b	0,45±0,66 ^b
10 µg/ml	14,27±1,92 ^b	6,29±9,58 ^b	0,65±1,15 ^b
25 µg/ml	14,45±1,73 ^b	8,89±9,42 ^b	0,91±1,09 ^b
50 µg/ml	13,90±3,57 ^b	7,04±9,11 ^b	0,70±1,09 ^b
100 µg/ml	13,99±2,50 ^b	7,93±9,22 ^b	0,78±1,07 ^b
200 µg/ml	14,18±2,96 ^b	4,59±6,27 ^b	0,44±0,71 ^b
400 µg/ml	13,09±3,10 ^b	6,80±8,22 ^b	0,62±0,89 ^b
800 µg/ml	13,54±1,95 ^b	5,99±7,16 ^b	0,58±0,80 ^b
1000 µg/ml	14,65±3,28 ^b	8,33±9,05 ^b	0,78±1,13 ^b
2000 µg/ml	16,59±4,09 ^{a,b}	4,44±7,10 ^b	0,51±0,93 ^b

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart hata olarak verilmiştir.

^a Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı, ^b Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4. 3. Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına etkisi*

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart hata olarak verilmiştir.

^a Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı, ^b Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı

4.1.3. Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) Kuantum Noktasının Gen Ekspresyon Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

V79 hücrelerinde Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) KN'sının farklı dozlarında (10, 40, 125 ve 500 µg/ml) apoptoz genleri (bax, bcl2 ve kaspaz 9) üzerine etkileri incelendi. Gen ekspresyon değerlendirme yazılım programında CT değerleri kullanılarak sonuçlar değerlendirildi.

Kontrol grubuyla kıyaslanan Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) örneklerine ait bulgular Çizelge 4.4.te verilmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken üst sınır CT değeri 35 olarak alınmıştır. 35'ten daha yüksek değerler de 35 olarak değerlendirilmiştir. Gapdh geni kontrol geni olarak kullanılmıştır (Çizelge 4.4.) (Şekil 4.4.).

Çizelge 4. 4. Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) KN'larının ortalama Δ CT değerleri *

Gen	Kontrol (PBS)	10 µg/ml	40µg/ml	125µg/ml	500 µg/ml
gaph	0	0	0	0	0
kaspaz 9	-0,21	1,1	0,97	1,09	-0,17
bax	11,15	12,97	11,91	12,48	10,49
bcl2	9,17	9,96	9,46	9,44	8,44

*Sonuçlar ortalama Δ ct değerleri olarak verilmiştir.

Kontrol geni gapdh değeri 0 olarak alınmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

$\Delta\Delta$ CT değerleri incelendiğinde, Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) KN'sı kaspaz 9 ve bax ekspresyon düzeylerinde kontrole göre azalmaya neden olmuştur (Çizelge 4.5.) (Şekil 4.5.).

Çizelge 4. 5. Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) KN'larının ortalama $\Delta\Delta$ CT değerleri*

Gen	Kontrol (PBS)	10 µg/ml	40µg/ml	125µg/ml	500 µg/ml
gapdh	1	1	1	1	1
kaspaz 9	1,156688	0,466516	0,510506	0,469761	1,125058
bax	0,00044	0,000125	0,00026	0,000175	0,000295
bcl2	0,001736	0,001004	0,00142	0,00144	0,001879

*Sonuçlar ortalama $\Delta\Delta$ ct değerleri olarak verilmiştir.

Kontrol geni gapdh değeri 1 olarak alınmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) KN'sının kat değişimi (fold exchange) ve kat regülasyon (fold regulation) değerleri incelendiğinde, kaspaz 9 ekspresyonu 10, 40 ve 125 µg/ml konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı, 500 µg/ml konsantrasyonunda ise değişiklik göstermediği bulunmuştur. Bcl2 ekspresyonu çalışılan tüm konsantrasyonlarında (10-500 µg/ml) kontrol grubuna kıyasla anlamlı değişiklik göstermemiştir. Bax ekspresyonunu 10 ve 125 µg/ml konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır (izelge 4. 6. ve izelge 4. 7.) (şekil 4.6.).

Çizelge 4. 6. Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) KN'larının kontrol grubuna kıyasla kat değişimi-fold change değerleri *

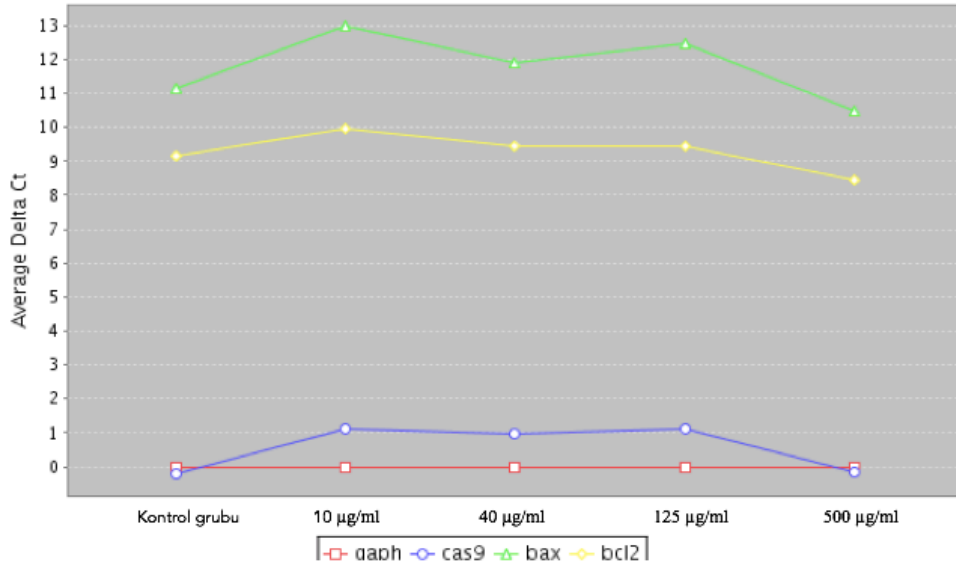
Gen	10 µg/ml	40µg/ml	125µg/ml	500 µg/ml
gapdh	1	1	1	1
kaspaz 9	0,4033	0,4414	0,4061	0,9727
bax	0,2832	0,5905	0,3978	1,5801
bcl2	0,5783	0,8179	0,8293	1,6586

Çizelge 4. 7. Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) KN'larının kat regülasyonu-fold regulation değerleri ve biyolojik anlamlılık çizelgesi*

Gen	10 µg/ml	Ekspresyon	40 µg/ml	Ekspresyon	125 µg/ml	Ekspresyon	500 µg/ml	Ekspresyon
gapdh	1		1		1		1	
kaspaz 9	-2,4794 ^a	Azalan	-2,2658 ^a	Azalan	-2,4623 ^a		-1,0281	
bax	-3,5308 ^a	Azalan	-1,6935		-2,514 ^a	Azalan	1,5801	
bcl2	-1,7291		-1,2226		-,1058		1,6586	

*Sonuçlar negatif kontrol grubuna karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni gapdh değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

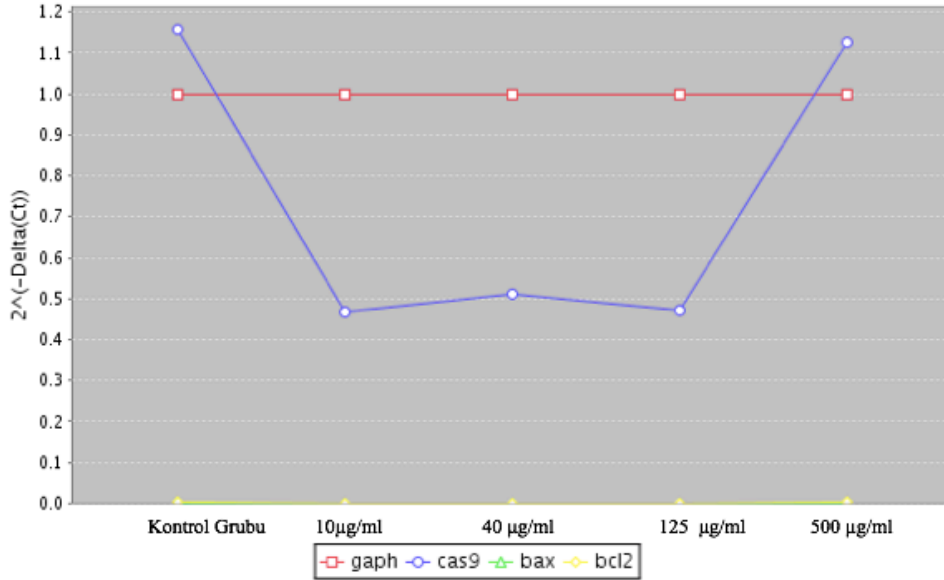
^a Ekspresyonda anlamlı azalmayı temsil etmektedir ve anlamlılık p<0,05'e göre hesaplanmıştır.



Şekil 4. 4. Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) KN'larının ortalama ΔCT değeri *

*Sonnular ortalama Δct olarak verilmiştir.

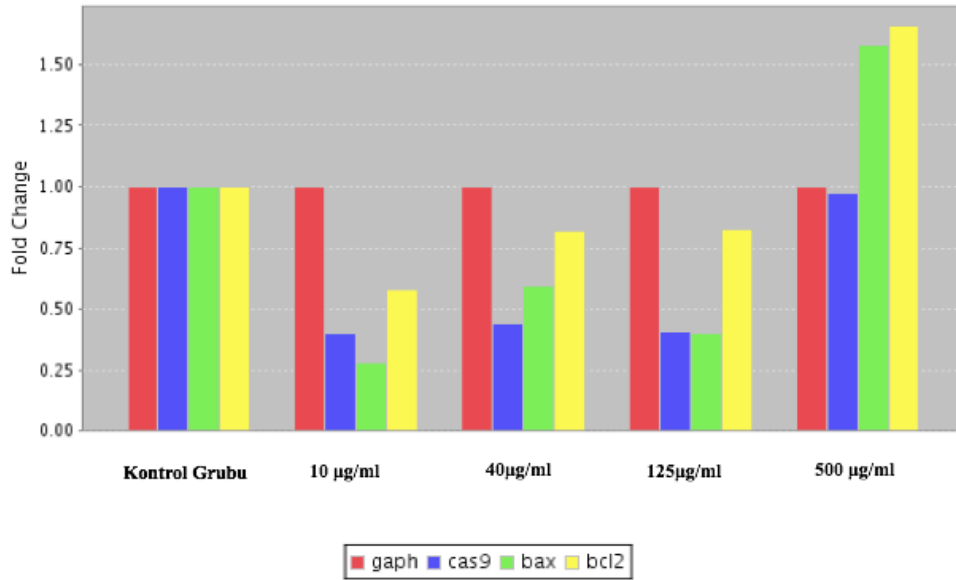
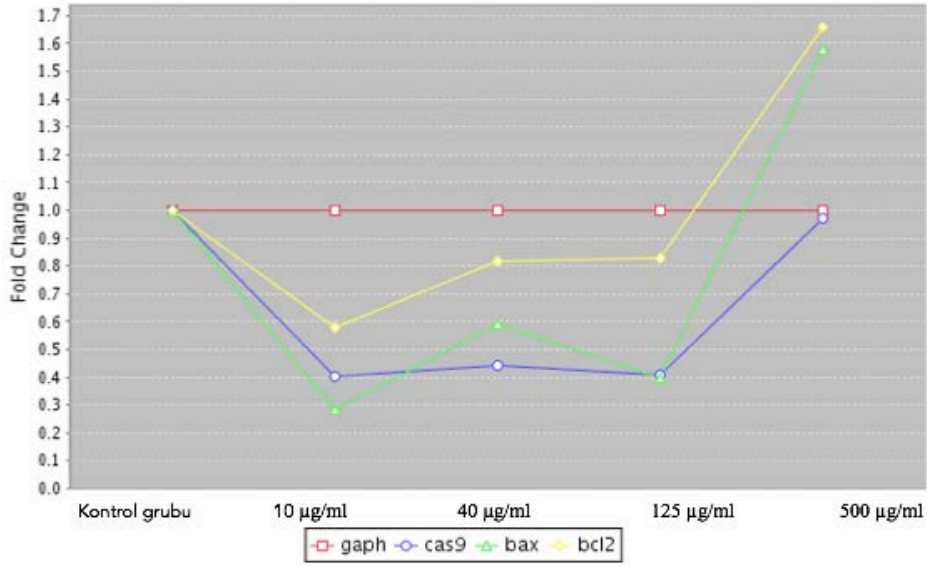
Kontrol geni gapdh değeri 0 olarak alınmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.



Şekil 4. 5. Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) KN'larının ortalama ΔΔCT değeri**

*Sonnular ΔΔct olarak verilmiştir. Kontrol geni gapdh değeri 1 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.



Şekil 4.6. Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) KN'larının kontrol grubuna kıyasla kat değişimi-fold change değerleri*

*Sonuslar negatif kontrol grubuna karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni gapdh değeri 1 olarak hesaplanmıştir.

4.2. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) Kuantum Noktası ile Elde Edilen Bulgular

4.2.1. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) Kuantum Noktasının Sitotoksitesine İlişkin Bulgular

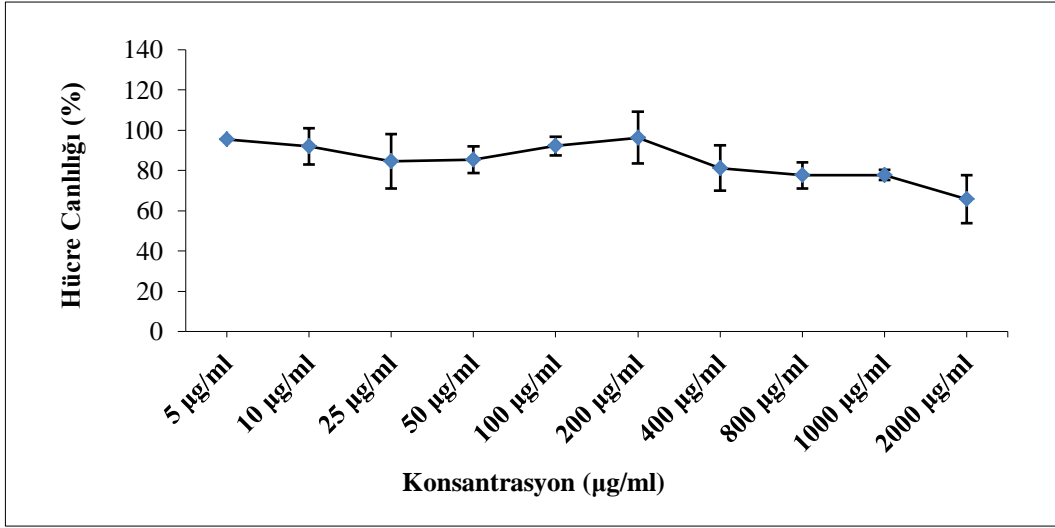
4.2.1.1. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) Kuantum Noktasının NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

5-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde yapılan NKA deneyi sonucunda negatif kontrolle (PBS) kıyaslandığında 5-200 µg/ml konsantrasyon aralığında V79 hücrelerine önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı ancak 400-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında ise hücre canlılığı azalamaya başladığı gözlenmiştir. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücreleri için IC₅₀ değeri 3316,5 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8.) (Şekil 4.7.).

Çizelge 4. 8. NKA yöntemine göre Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%) (±standart sapma)
1	(-) Kontrol (PBS)	0,588±0,092	100,0±0,0
2	5 µg/ml	0,557±0,061	95,4±9,0
3	10 µg/ml	0,540±0,112	91,9±13,6
4	25 µg/ml	0,494±0,051	84,6±6,5
5	50 µg/ml	0,499±0,054	85,4±4,7
6	100 µg/ml	0,538±0,084	92,2±12,9
7	200 µg/ml	0,572±0,143	96,3±11,3
8	400 µg/ml	0,476±0,071	81,2±6,5
9	800 µg/ml	0,456±0,072	77,6±2,5
10	1000 µg/ml	0,453±0,069	77,8±11,8
11	2000 µg/ml	0,384±0,042	65,7±4,1

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4. 7. NKA yöntemine göre Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir.
Negatif kontrol ile karşılaştırılmıştır.

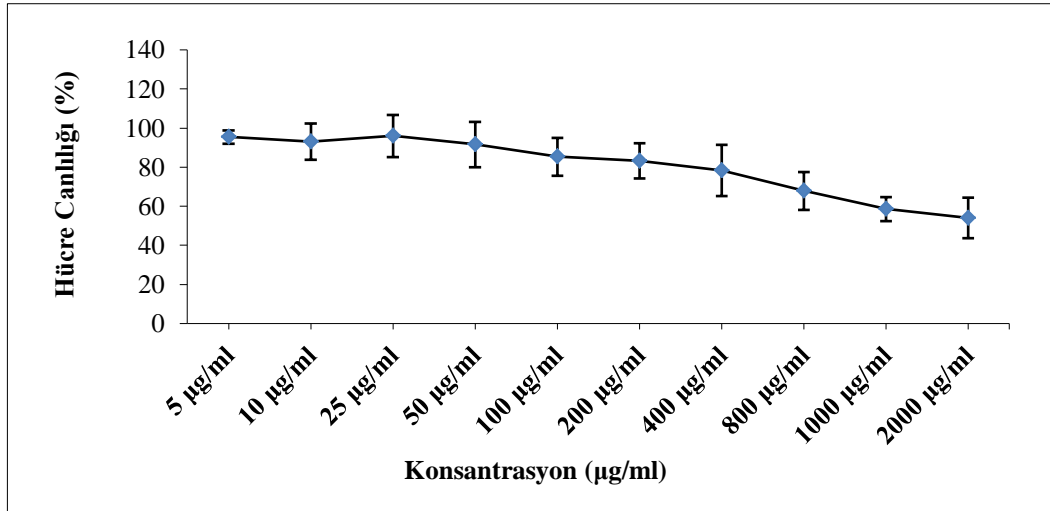
4.2.1.2. Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) Kuantum Noktasının MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

5- 2000 µg/ml konsantrasyon aralığında Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde yapılan MTT deneyi sonucunda negatif kontrol ile kıyaslandığında 5-50 µg/ml konsantrasyon aralığında V79 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı ancak 100-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında ise hücre canlılığı azalmaya başladığı gözlenmiştir. gözlenmiştir. Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücreleri için IC_{50} değeri 2906 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9.) (Şekil 4.8.).

Çizelge 4. 9. MTT yöntemine göre Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%) (±standart sapma)
1	(-) Kontrol (PBS)	1,711±0,059	100,0±0,0
2	5 µg/ml	1,632±0,152	95,4±9,3
3	10 µg/ml	1,591±0,163	93,1±10,9
4	25 µg/ml	1,639±0,162	96,0±11,6
5	50 µg/ml	1,564±0,124	91,6±9,7
6	100 µg/ml	1,460±0,155	85,3±9,0
7	200 µg/ml	1,420±0,181	83,3±13,0
8	400 µg/ml	1,335±0,120	78,3±9,7
9	800 µg/ml	1,159±0,067	67,8±6,2
10	1000 µg/ml	0,998±0,149	58,6±10,4
11	2000 µg/ml	0,923±0,058	54,0±4,8

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4. 8. MTT yöntemine göre Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırılmıştır.

4.2.2. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) Kuantum Noktasının Comet Yöntemi Genotoksisitesinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

5- 2000 µg/ml konsantrasyon aralığında Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına ilişkin üç ayrı deneyin sonuçları Çizelge 4.10'te gösterilmiştir. Çizelgede toplam hücre sayısı üzerinden değerlendirilen ortalama Kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti, ve kuyruk yoğunluğu ve bunların standart hataları verilmiştir. (Çizelge 4.10.) (Şekil 4.9.).

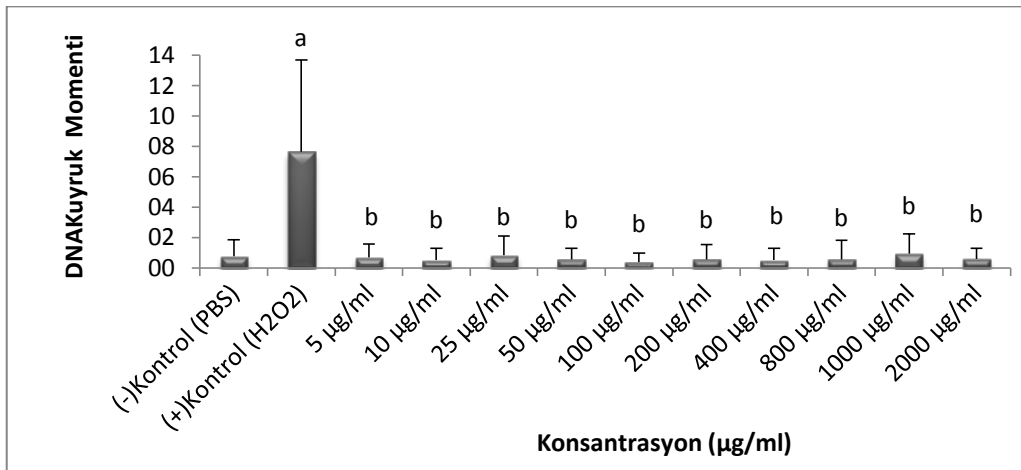
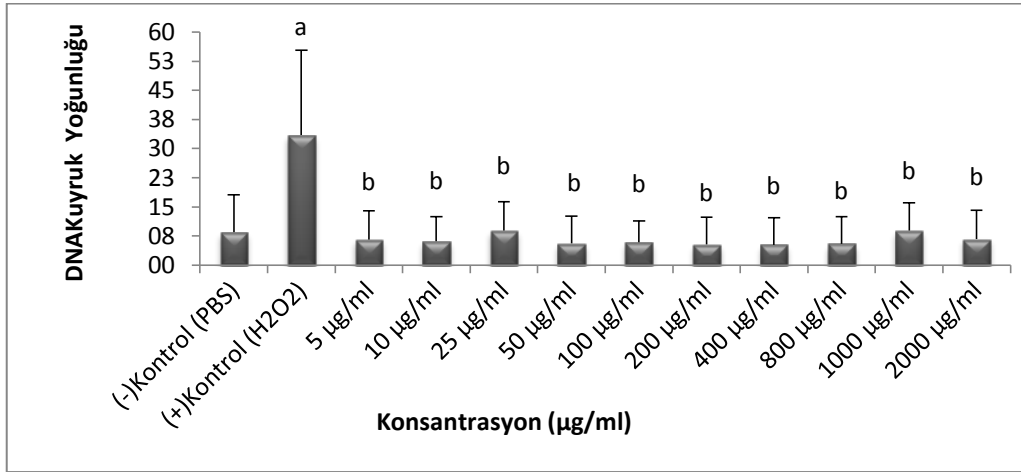
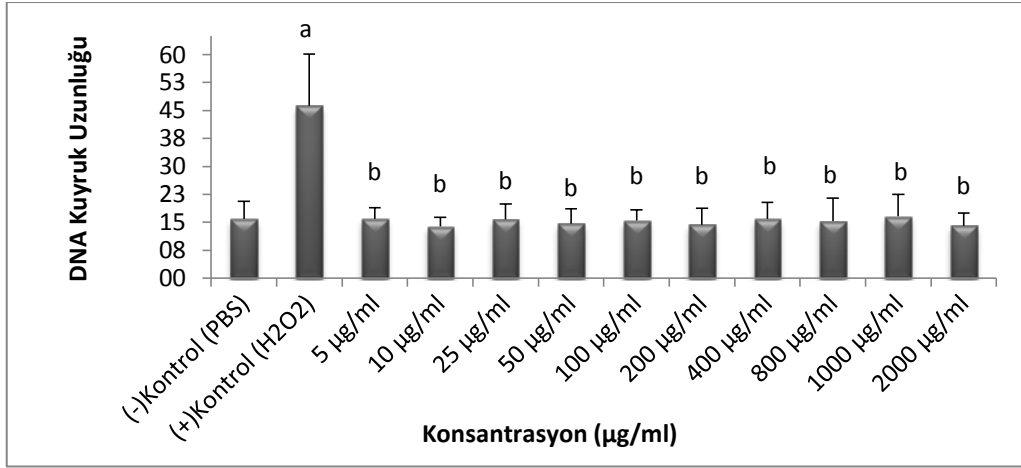
Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının negatif kontrol ile kıyaslandığında çalışılan tüm konsantrasyonlarda kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde DNA hasarını anlamlı şekilde arttırmağı bulunmuştur (p<0.05) (Çizelge 4.10.) (Şekil 4.9.).

Çizelge 4. 10. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) kuantum noktasının V79 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına karşı etkilerine ilişkin bulgular *

	Kuyruk Uzunluğu ±standart sapma	Kuyruk Yoğunluğu ±standart sapma	Kuyruk Momenti ±standart sapma
(-)Kontrol (PBS)	15,89±4,70	8,42±9,71	0,74±1,10
(+)Kontrol (H₂O₂)	46,28±13,87	33,47±21,95 ^b	7,64±6,06
5 µg/ml	15,93±2,98 ^b	6,59±7,39 ^b	0,68±0,90 ^b
10 µg/ml	13,91±2,36 ^b	6,08±6,32 ^b	0,52±0,76 ^b
25 µg/ml	15,80±4,10 ^b	8,95±7,29 ^b	0,84±1,24 ^b
50 µg/ml	14,67±4,01 ^b	5,63±6,97 ^b	0,53±0,74 ^b
100 µg/ml	15,52±2,82 ^b	5,88±5,54 ^b	0,36±0,62 ^b
200 µg/ml	14,34±4,44 ^b	5,31±7,05 ^b	0,56±0,98 ^b
400 µg/ml	15,87±4,43 ^b	5,19±7,00 ^b	0,51±0,79 ^b
800 µg/ml	15,26±6,22 ^b	5,41±7,00 ^b	0,54±1,26 ^b
1000 µg/ml	16,58±5,84 ^b	8,91±7,10 ^b	0,93±1,30 ^b
2000 µg/ml	14,07±3,45 ^b	6,74±7,35	0,58±0,72 ^b

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart hata olarak verilmiştir.

^a Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı, ^b Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı



Şekil 4. 9. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) noktasının V79 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarına etkisi*

* Üç çalışmanın ortalama değerleri ± standart hata olarak verilmiştir.

^a Kontrolle göre p<0,05 düzeyinde anlamlı, ^b Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı

4.2.3. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) Kuantum Noktasının Gen Ekspresyon Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

V79 hücrelerinde Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'sının farklı dozlarında (10, 40, 125 ve 500 µg/ml) apoptoz genleri (bax, bcl2 ve kaspaz 9) üzerine etkileri incelendi. Gen ekspresyon değerlendirme yazılım programında CT değerleri kullanılarak sonuçlar değerlendirildi.

Kontrol grubuyla kıyaslanan Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) örneklerine ait bulgular Çizelge 4.11. ve Şekil 4.10.'da verilmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken üst sınır CT değeri 35 olarak alınmıştır. 35'ten daha yüksek değerler de 35 olarak değerlendirilmiştir. Gapdh geni kontrol geni olarak kullanılmıştır.

Çizelge 4. 11. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının ortalama Δ CT değerleri *

Gen	Kontrol (PBS)	10 µg/ml	40µg/ml	125µg/ml	500 µg/ml
gapdh	0	0	0	0	0
kaspaz 9	-0,21	0,69	0,13	-0,14	-0,18
bax	11,15	12,1	11,01	11,11	9,17
bcl2	9,17	10,33	9,74	9,63	10

*Sonuçlar ortalama Δ ct değerleri olarak verilmiştir.

Kontrol geni gapdh değeri 0 olarak alınmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

$\Delta\Delta CT$ değerleri incelendiğinde, Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'sı kaspaz 9 ve bcl2 ekspresyon düzeylerinde kontrole göre azalmaya neden olmuştur (Çizelge 4.12.) (Şekil 4.11.).

Çizelge 4. 12. Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının ortalama $\Delta\Delta CT$ değerleri*

Gen	Kontrol (PBS)	10 $\mu g/ml$	40 $\mu g/ml$	125 $\mu g/ml$	500 $\mu g/ml$
gaph	1	1	1	1	1
kaspaz 9	1,156688	0,619854	0,913831	1,101905	1,132884
bax	0,00044	0,000228	0,000485	0,000452	0,001736
bcl2	0,001736	0,000777	0,001169	0,001262	0,000977

*Sonnular ortalama $\Delta\Delta ct$ değerleri olarak verilmiştirt.

Kontrol geni gapdh değeri 1 olarak alınmiştirt. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştirt.

Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'sının kat değişimi (fold exchange) ve kat regülasyon (fold regulation) değerleri incelendiğinde, çalışılan tüm konsantrasyonlarında (10-500 $\mu g/ml$) kaspaz 9 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla anlamlı değişiklik göstermemiştirt. 500 $\mu g/ml$ konsantrasyonunda ise bax ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 4 kat artmiştirt. Çalışılan 40, 125, 500 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarında Bcl2 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla anlamlı değişiklik gözlenmemiştirt, ancak 10 $\mu g/ml$ konsantrasyonunda Bcl2 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2 kat azalmiştirt (Çizelge 4. 13. ve Çizelge 4. 14.) (Şekil 4. 12.).

Çizelge 4. 13. Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının kontrol grubuna kıyasla kat değişimi-fold change değerleri *

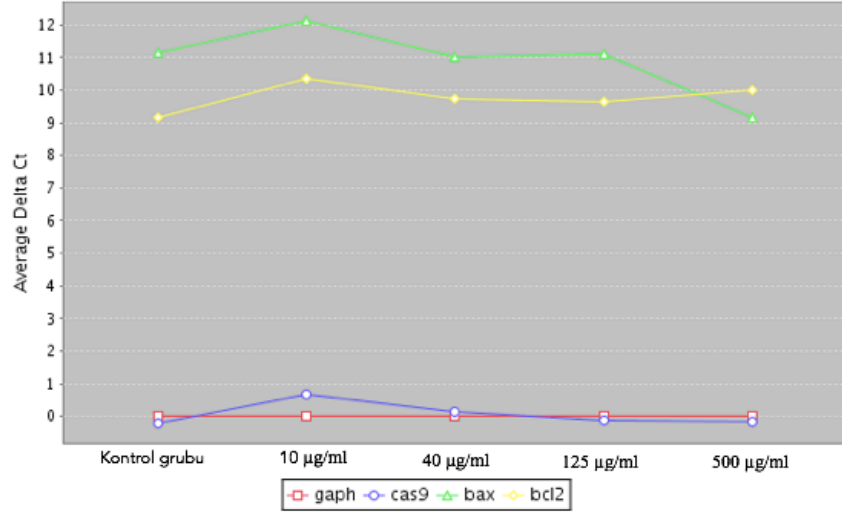
Gen	10 $\mu g/ml$	40 $\mu g/ml$	125 $\mu g/ml$	500 $\mu g/ml$
gaph	1	1	1	1
kaspaz 9	0,5359	0,79	0,9526	0,9794
bax	0,5176	1,1019	1,0281	3,9449
bcl2	0,4475	0,6736	0,727	0,5625

Çizelge 4. 14. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının kat regülasyonu-fold regulation değerleri ve biyolojik anlamlılık Çizelgesi*

Gen	10 µg/ml	Ekspresyon	40 µg/ml	Ekspresyon	125 µg/ml	Ekspresyon	500 µg/ml	Ekspresyon
gapdh	1		1		1		1	
kaspaz 9	-1,8661		-1,2658		-1,0497		-1,021	
bax	-1,9319		1,1019		1,0281		3,9449 ^b	Artan
bcl2	-2,2346 ^a	Azalan	-1,4845		-1,3755		-1,7777	

*Sonuçlar negatif kontrol grubuna karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni gapdh değeri 1 olarak hesaplanmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.

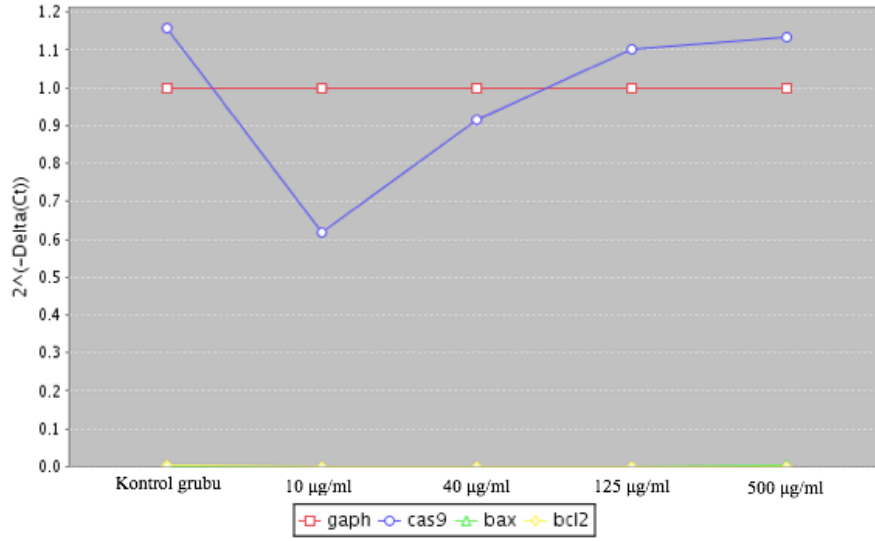
a gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı azalmayı, b ile gösterilen sonuçlar ekspresyonda anlamlı artmayı, temsil etmektedir. Anlamlılık $p < 0,05$ 'e göre hesaplanmıştır.



Şekil 4. 10. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının ortalama Δ CT değerleri

*Sonuçlar ortalama Δ ct olarak verilmiştir.

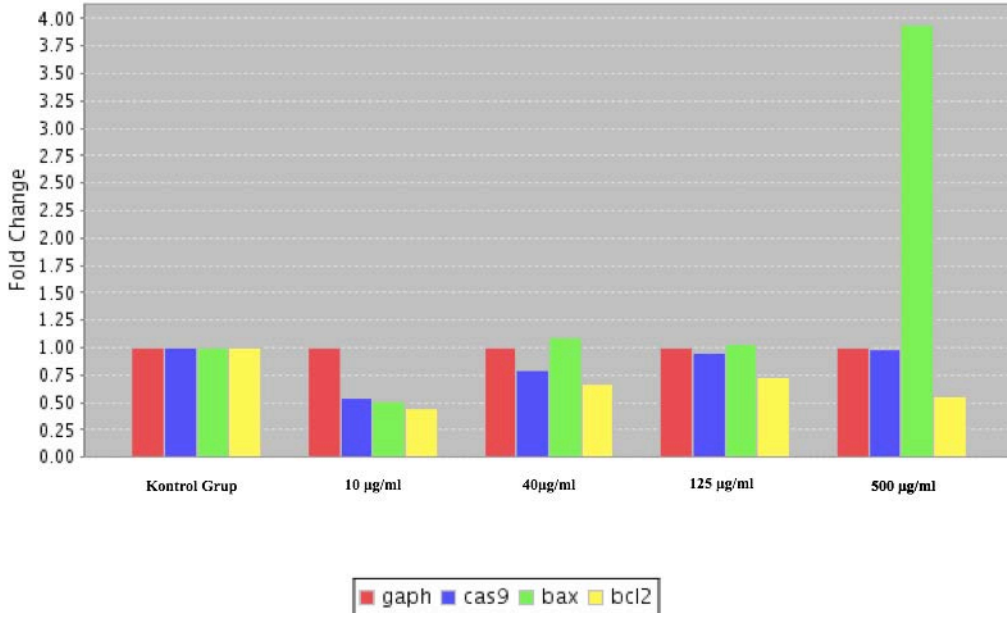
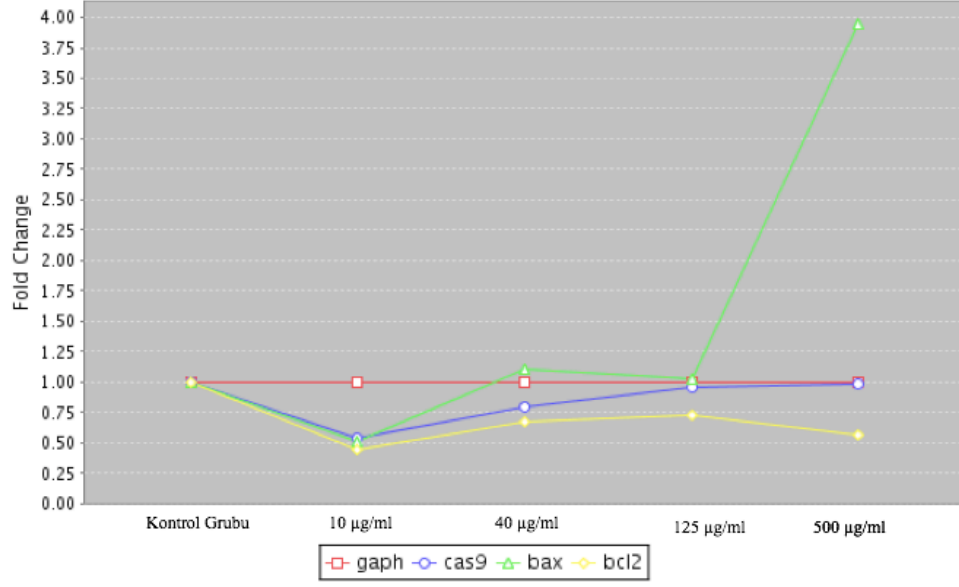
Kontrol geni gapdh değeri 0 olarak alınmıştır. Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.



Şekil 4. 11. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının ortalama $\Delta\Delta$ CT değerleri **

**Sonuçlar $\Delta\Delta$ CT olarak verilmiştir. Kontrol geni gapdh değeri 1 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmalar iki kez tekrar edilmiştir.



Şekil 4.12. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının kontrol grubuna kıyasla kat değişimi-fold change değerleri *

*Sonuçlar negatif kontrol grubuna karşı değerlendirilmiştir. Kontrol geni gapdh değeri 1 olarak hesaplanmıştır.

4.3. 2-merkaptopropiyonik Asit ile Elde Edilen Bulgular

4.3.1. 2-merkaptopropiyonik Asit Sitotoksitesine İlişkin Bulgular

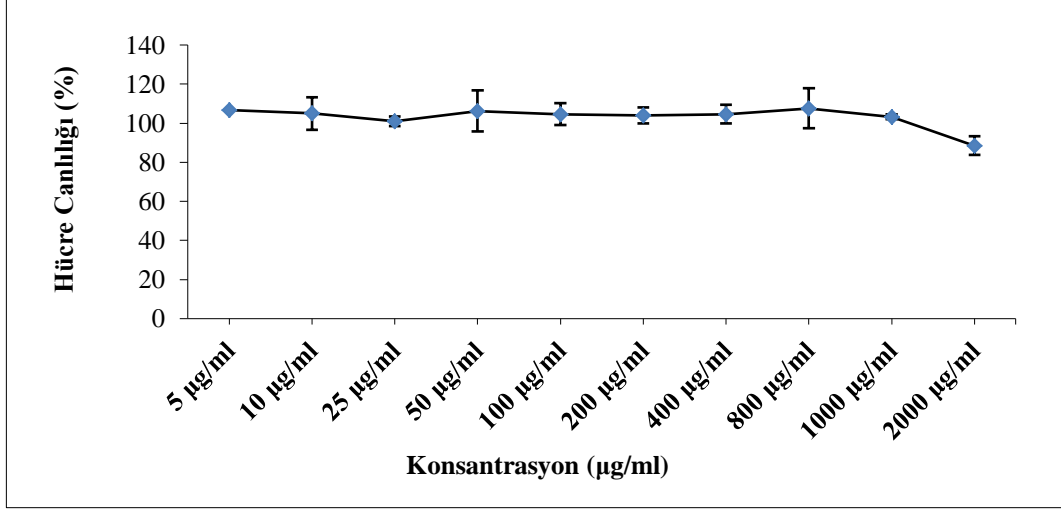
4.3.1.1. 2-merkaptopropiyonik Asitin NKA Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

5-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında 2-merkaptopropiyonik asitin V79 hücrelerinde yapılan NKA deneyi sonucunda negatif kontrolle (PBS) kıyaslandığında 5-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında V79 hücrelerine önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenmiştir. (Çizelge 4.15.) (Şekil 4.13.).

Çizelge 4. 15. NKA yöntemine göre 2-merkaptopropiyonik asit V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%) (±standart sapma)
1	(-) Kontrol (PBS)	0,869±0,383	100,0±0,0
2	5 µg/ml	0,918±0,399	106,8±8,3
3	10 µg/ml	0,909±0,389	105,1±2,5
4	25 µg/ml	0,852±0,318	101,0±10,5
5	50 µg/ml	0,912±0,374	106,3±5,6
6	100 µg/ml	0,910±0,402	104,6±4,2
7	200 µg/ml	0,916±0,430	104,0±4,8
8	400 µg/ml	0,897±0,390	104,6±10,3
9	800 µg/ml	0,935±0,414	107,7±1,2
10	1000 µg/ml	0,909±0,425	103,2±4,8
11	2000 µg/ml	0,808±0,452	88,5±15,7

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.13. NKA yöntemine göre 2-merkaptopropiyonik asit V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir.
Negatif kontrol (%1 DMSO) ile karşılaştırılmıştır.

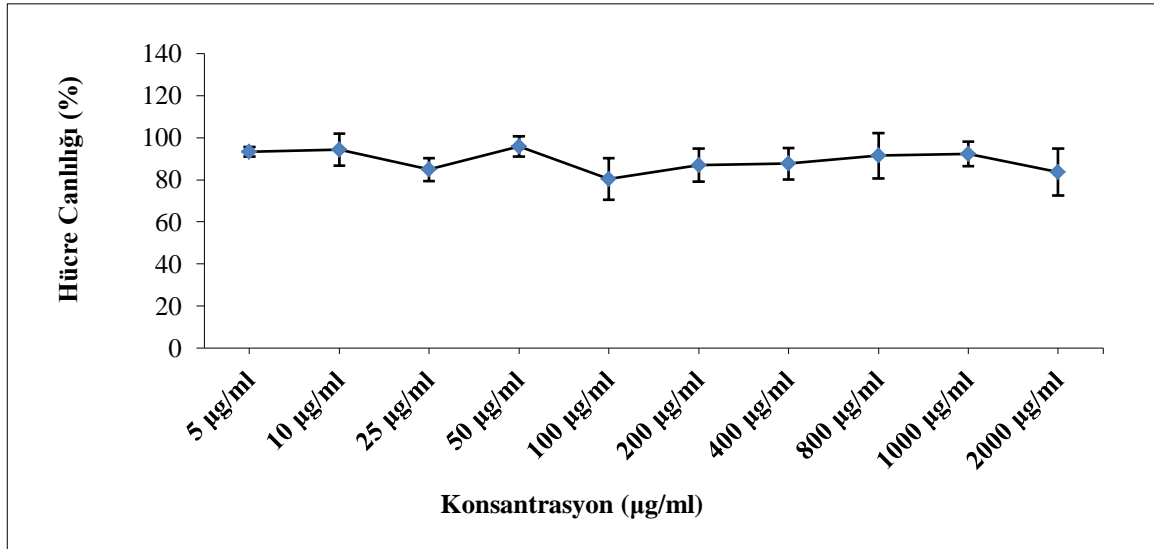
4.3.1.2. 2-merkaptopropiyonik Asitin MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

5-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında 2-merkaptopropiyonik asitin V79 hücrelerinde yapılan MTT deneyi sonucunda negatif kontrol ile kıyaslandığında 5-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında V79 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenmiştir. (Çizelge 4.16.) (Şekil 4.14.).

Çizelge 4. 16. MTT yöntemine göre 2-merkaptopropiyonik asit V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%) (±standart sapma)
1	(-) Kontrol (PBS)	1,460±0,263	100,0±0,0
2	5 µg/ml	1,375±0,340	93,3±7,6
3	10 µg/ml	1,367±0,191	94,2±5,5
4	25 µg/ml	1,239±0,240	84,9±4,9
5	50 µg/ml	1,404±0,325	95,8±9,8
6	100 µg/ml	1,172±0,243	80,4±7,8
7	200 µg/ml	1,284±0,327	87,1±7,5
8	400 µg/ml	1,262±0,126	87,7±10,7
9	800 µg/ml	1,326±0,170	91,5±5,8
10	1000 µg/ml	1,357±0,346	92,4±11,2
11	2000 µg/ml	1,225±0,311	83,8±12,4

*Sonnuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.14. MTT yöntemine göre 2-merkaptopropiyonik asit V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

*Sonnuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırılmıştır.

4.4. Mezo-2,3-dimerkaptosüksinik Asit ile Elde Edilen Bulgular

4.4.1. Mezo-2,3-dimerkaptosüksinik Asit Sitotoksitesine İlişkin Bulgular

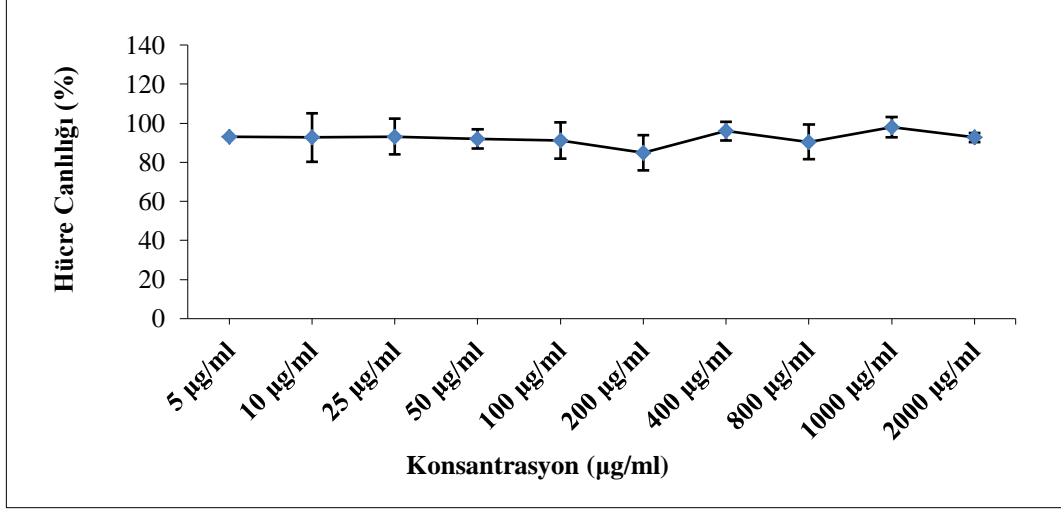
4.4.1.1. Mezo-2,3-dimerkaptosüksinik Asitin NKA Yöntemi İle Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

5-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asitin V79 hücrelerinde yapılan NKA deneyi sonucunda negatif kontrolle kıyaslandığında 5-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında V79 hücrelerine önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenmiştir. (Çizelge 4.17.) (Şekil 4.15.).

Çizelge 4. 17. NKA yöntemine göre mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asitin V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%) (±standart sapma)
1	(-) Kontrol (PBS)	0,997±0,614	100,0±0,0
2	5 µg/ml	0,918±0,518	93,2±12,3
3	10 µg/ml	0,936±0,588	92,7±9,0
4	25 µg/ml	0,944±0,608	93,2±4,9
5	50 µg/ml	0,884±0,453	92,1±9,3
6	100 µg/ml	0,920±0,578	91,1±9,1
7	200 µg/ml	0,861±0,576	84,9±4,8
8	400 µg/ml	0,924±0,479	96,1±8,9
9	800 µg/ml	0,886±0,498	90,4±5,3
10	1000 µg/ml	0,969±0,574	98,0±2,2
11	2000 µg/ml	0,907±0,507	92,7±6,0

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4. 15. NKA yöntemine göre mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asitin V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırılmıştır.

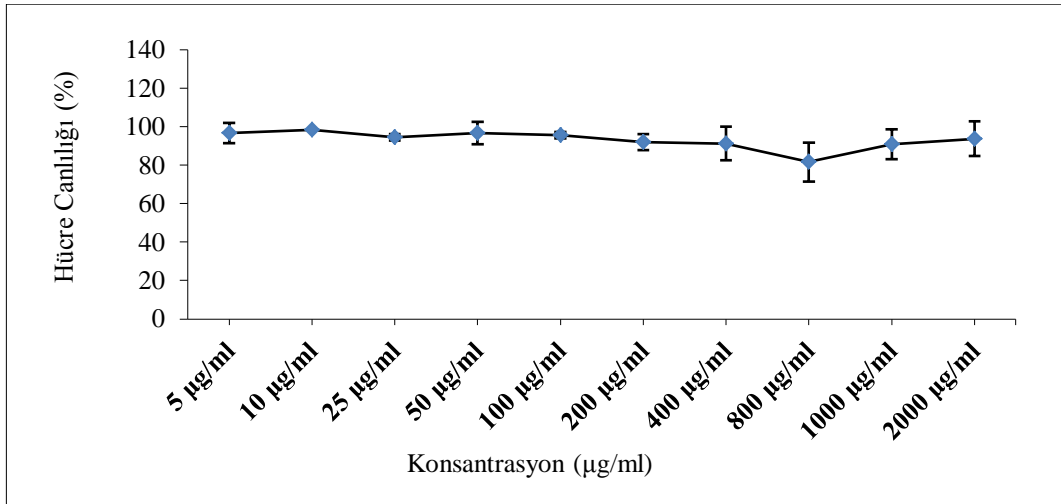
4.4.1.2. Mezo-2,3-dimerkaptosüksinik Asitin MTT Yöntemi ile Sitotoksitesinin Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

5-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında mezo-2,3-dimerkaptosüksinik V79 hücrelerinde yapılan MTT deneyi sonucunda negatif kontrol (PBS) ile kıyaslandığında 5-2000 µg/ml konsantrasyon aralığında V79 hücrelerinde önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenmiştir. (Çizelge 4.18.) (Şekil 4.16.).

Çizelge 4. 18. MTT yöntemine göre Mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asitin V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

		Yaşayan Hücre Ortalama Absorbans Değerleri (±standart sapma)	Yaşayan Hücre Yüzdeleri (%) (±standart sapma)
1	(-) Kontrol	1,778±0,253	100,0±0,0
2	5 µg/ml	1,720±0,241	96,8±0,3
3	10 µg/ml	1,749±0,225	98,5±1,6
4	25 µg/ml	1,690±0,335	94,5±5,9
5	50 µg/ml	1,722±0,272	96,7±1,6
6	100 µg/ml	1,707±0,310	95,6±4,2
7	200 µg/ml	1,650±0,373	92,0±8,7
8	400 µg/ml	1,639±0,394	91,2±10,1
9	800 µg/ml	1,457±0,295	81,6±7,9
10	1000 µg/ml	1,604±0,164	90,9±8,9
11	2000 µg/ml	1,673±0,308	93,7±4,4

Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri ± standart sapma olarak verilmiştir. Negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4. 16. MTT yöntemine göre mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asitin V79 hücrelerinde sitotoksik etkisi*

*Sonuçlar üç çalışmanın ortalama değeri olarak verilmiştir. Negatif kontrol (PBS) ile karşılaştırılmıştır.

5. TARTIŞMA

Nanoteknolojinin hızlı gelişimine bağlı olarak, artan nanomateryal üretimi ve kullanımı, insanların doğrudan ve dolaylı yollarla bu materyallere maruz kalmalarına neden olmaktadır. Nanoteknolojik yapılar, çok küçük boyutlarından dolayı makro moleküllerle kıyaslandıklarında kendine özgü farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptir. Nanomateryaller, ilaç, gıda, kozmetik, elektronik ve mühendislik gibi alanlarda kullanılmaya başlamış olup, her gün bu alanlara bir yenisi eklenmektedir. Nanomateryallerin insan sağlığı ve çevre üzerine etkilerinin incelenerek, risk analizlerinin yapılması gerekmektedir. Toksikite testlerinin amacı, kimyasal maddelerin güvenli kullanım ve risk değerlendirmelerini olanak sağlayan yeterli veri tabanını oluşturmaktır. Bu amaçla istenmeyen toksikolojik etkilerin belirlenmesi için in vitro ve in vivo çalışmalara gerek vardır. In vitro testlerin, çevresel koşulları kontrol etmeye izin vermesi, sistemik etkileşimleri ortadan kaldırması, deneyler arasındaki değişimleri azaltması, ucuz, kolay ve hızlı değerlendirme gibi olanakları bulunmaktadır.

Bugüne kadar NP'ler ile yapılan in vitro çalışmaların bir kısmı nanomateryallerin insan hücrelerinde çeşitli zararlı etkilere sahip olduklarını gösterirken, az sayıdaki bazı çalışmalar da zararsız olduklarını ileri sürmektedir [200-203]. Özellikle sitotoksikite ve genotoksikite potansiyelleriyle ilgili verilerdeki uyumsuzluk, daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır. KN'ları optik, elektronik ve katalitik özellikleri nedeniyle tıbbi ve biyolojik uygulamalarda tercih edilen, aynı zamanda güneş panelleri, fotonik ve telekomünikasyon gibi teknolojik alanlarda kullanılan yarı iletken nanokristal yapıdaki malzemelerdir [204-207]. KN'larının kimyasal bileşimi ve nanoboyutlarından dolayı potansiyel toksisitelerinin araştırılması güncel bir konu olarak ortaya çıkmıştır ancak bu konuda yeterli çalışma bulunmamaktadır [208].

Bu tez çalışmasında Ag_2S -(2-merkaptopropiyonik asit) ve Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının in vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada etkileri araştırılan KN'ları, Koç Üniversitesi, Kimya Bölümü, Polimer ve Nanomateryal Araştırma Grubu laboratuvarında farklı kaplamalar kullanılarak sentezlenmiş özel malzemelerdir.

Sitotoksik etkiler, Çin hamster fibroblast hücrelerinde (V79) NKA ve MTT testleri ile, genotoksik etkiler ise tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) yöntemi ile belirlenmiştir.

KN'larının sitotoksik olabileceğini ve gen ekspresyonunda olası değişikliklere yol açabileceğini gösteren çok az sayıda çalışmalar bulunmaktadır [209]. Çekirdek ve kaplama yapıları açısından farklı KN'larının varlığı, hem kimyasal ve fiziksel özelliklerinin farklılaşmasına neden olmakta, hem de toksisite üzerine kapsamlı çalışmalar yapılmasını gerektirmektedir [210].

Son yıllarda çeşitli alanlarda kullanılmak üzere PbSe, PbS, ve CdHgTe gibi KN'ları sentezlenmiştir. Ancak bu KN'ları oldukça yüksek toksik özelliklere sahip ağır metalleri (Pb, Cd ve Hg) ve kalkojenleri (Se ve Te) içerdikleri için, in vivo uygulamalarda endişelere neden olmaktadır [211-214]. Bu nedenle, günümüzde toksik elementleri içermeyen, yeni KN'lar üretilmeğe başlanmıştır. Bunlardan birisi Ag₂S yapıdaki KN'larıdır. Ag₂S KN'larının, Pb, Cd ve Hg gibi ağır metalleri içeren PbSe, PbS, ve CdHgTe gibi KN'larından daha az toksik etkiye neden olabileceği ileri sürülmektedir. Zang ve ark. [215] Ag₂S KN'larının yüksek floresan özelliklerinden dolayı farklı hücre hatlarında işaretleyici ve görüntüleyici olarak kullanılabilmesini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Chen ve ark. [216] biyoyumluluğu yüksek Ag₂S KN'larının in vivo insan mezenşimal kök hücrelerinde etkili bir işaretleyici ve görüntüleyici olduğunu göstermişlerdir. Ancak her iki araştırma çalışmada, Ag₂S KN'larının kimyasal kararlılığının, fotostabilitesinin ve olası toksitesinin ayrıntılı değerlendirilmesi gerektiğini öne sürmüştür.

Bu tez çalışmasında öncelikle Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) ve Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının sitotoksik etkileri V79 hücrelerinde NKA ve MTT yöntemleriyle araştırılmıştır.

'Nötral Kırmızısı Alım' testi toksisite değerlendirilmelerinde biyomedikal ve çevresel uygulamalarda sık kullanılan sitotoksik testlerinden biridir [217]. Nanotoksikoloji çalışmalarında, fototoksikite araştırmaları için düzenleyici kuruluşlarca onaylanan ilk in vitro yöntemdir [218]. Yöntem canlı hücrelerin birleşmesi ve supravital bir boya olan nötral kırmızısını bağlamasına dayanmaktadır. Hücre öldüğünde veya pH gradienti düştüğünde, boya hücre içinde tutulamaz. Bu nedenle hücrede tutulan boya miktarı, canlı hücre miktarı ile orantılıdır. Lizozom geçirgenliği ve beraberinde boyanın bağlanması, hücre canlılığının önemli bir göstergesidir. Yöntem, hücre canlılığının yanı sıra, hücre

çoğalmas, sitostatik etkiler veya hücre yoğunluğuna bağlı hücre ölümlerinin ölçülmesinde de kullanılmaktadır [147].

MTT ölçümü in vitro koşullarda metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksiteyi değerlendirmek için uygulanan kolorimetrik bir yöntemdir [155]. MTT yöntemi, mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçen, kolay bir yöntemdir. NKA ve MTT yöntemleri erken sitotoksik etkiyi belirlemek için kullanılan hassas yöntemlerdir [147-148]

NKA ve MTT deneyi sonuçlarına göre Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) KN'sının 5-1000 µg/ml konsantrasyon aralığında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı ancak 2000 µg/ml konsantrasyonda düşük bir sitotoksik etkiye yol açtığı gözlenmiştir. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'sının ise, araştırılan tüm konsantrasyonlarında önemli bir sitotoksik etki oluşturmadığı belirlenmiştir. Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) KN'sının V79 hücrelerinde yapılan NKA ve MTT sitotoksikite testlerine göre IC₅₀ değeri sırasıyla 1260 µg/ml ve 1361,52 µg/ml; Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'sı için 3316,5 µg/ml ve 2906 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Hocaoğlu'nun [218] yapmış olduğu tez çalışmasında, bu çalışmada araştırılan Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) ve Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının sitotoksik etkileri; MTT ve XTT yöntemleri ile araştırılmıştır. Sonuçlarımızla benzer şekilde Ag₂S KN'ları fare fibroblast (NIH/3T3), insan servikal kanser (HeLa) ve meme kanser (MCF-7) hücrelerinde 24 saat süreyle uygulandığında, kontrole kıyasla önemli bir sitotoksik etkiye neden olmadığı bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca KN'larının çeşitli konsantrasyonları; 24 saat boyunca uygulandığında hücrelerde endozom ve lizozomlarda biriktiği gösterilmiştir. Bu boyuttaki bir partikülden beklenebileceği şekilde hücre çekirdeğinde birikmediği de bildirilmiştir.

Zhao ve Song'un [219] yapmış oldukları çalışmada da, Ag₂S KN'ları fare fibroblast (L929) hücrelerinde, 10 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında 6, 12, 24, 48 ve 72 süreyle uygulandığında, MTT sonuçlarına göre herhangi bir sitotoksik etki gözlenmediği gösterilmiştir.

Ag₂S KN'larının, ağır metal kaplamalar içeren benzerlerinin aksine sitotoksik etkilerinin olmadığı belirtilmektedir. Murani ve ark. [210] gökkuşuğu alabalığı hücre hattında (RTG-2) 3 farklı KN'sının (CdS, Ag₂S ve PEG kaplı Ag₂S) karşılaştırmalı olarak MTT ve LDH yöntemleri ile sitotoksik etkileri incelemiştir. Sadece CdS KN'nın 24 saatlik uygulama sonucunda, 10 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında sitotoksik etkiye yol açtığını, diğer

KN'larının herhangi bir sitotoksik etki oluşturmadığı belirtilmiştir. Çalışmamız Ag₂S KN'larıyla yapılan az sayıdaki çalışmalar ile uyumludur.

Bu tez çalışmasında kaplama maddeleri olan 2-merkaptopropiyonik asit ve mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit de sitotoksik potansiyeli açısından NKA ve MTT yöntemleri ile araştırılmış ve incelenen dozlarında herhangi bir sitoksik etki gözlenmemiştir ve IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır.

Çalışmamızda Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) ve Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının genotoksik etkileri V79 hücrelerinde, tek hücre jel elektroforez (Comet) yöntemi ile araştırılmıştır. Günümüzde nanomateryallerin genotoksitesinin değerlendirilmesi, tüm diğer kimyasal maddelerin risk analizi için kullanılan in vitro toksisite metotlarına dayanmaktadır [220-223]. Ancak nano ölçekteki malzemelerin farklı özellikleri göz önüne alındığında, mevcut DNA hasar tespit yöntemleriyle risk değerlendirmesinde zorluklar yaşanmaktadır. Bu metotlar içerisinde comet tekniği, genotoksikoloji ve DNA hasarı çalışmalarında uygulanabilen ve kabul gören bir yöntemdir. Nanomateryallerin toksik etkilerinin belirlenmesinde comet testi yaygın olarak bir yöntem olarak kullanılmaktadır [224].

Çalışmamızda Comet sonuçlarına göre; Ag₂S-(2-merkaptopropiyonik asit) KN'sının V79 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarı kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirildiğinde, sadece en yüksek çalışma konsantrasyonu olan 2000 µl/mg dozunda DNA hasarının olduğu gözlenmiştir. DNA hasarı; kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirildiğinde, 5-2000 µl/mg konsantrasyonlarında önemli bir DNA hasarı gözlenmemiştir. Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'sının da çalışılan tüm konsantrasyonlarda DNA hasarında kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden kontrole göre anlamlı bir artış bulunmamıştır.

Santos ve arkadaşları [225] CdSe/ZnS KN'larının genotoksik etkilerini *Medicago sativa* (Yonca) bitkisinde comet tekniği ile araştırmışlardır. *Medicago sativa* hücreleri 10, 50, 100 nM CdSe/ZnS KN'larına maruz bırakıldığında, MPA-CdSe/ZnS KN'larının artan konsantrasyonlarıyla birlikte DNA tek ve çift zincir kırıklarında da artış olduğu bildirilmiştir. En yüksek konsantrasyonda purin bazlarının, pirimidin bazlarına göre daha fazla okside olduğu, DNA tamir enzimleri foramidoprimidin DNA glikozilaz, tyrozil-DNA fotofosfoesteraz-I ve DNA topoizomeraz I genlerinin de MPA- CdSe/ZnS KN'larının artan konsantrasyonlarıyla birlikte arttığı da belirtilmiştir [230].

Munari ve arkadaşları [210] Ag₂S ve CdS KN'larının genotoksik etkilerini, gökkuşağı alabalığı hücre hattı RTG-2'de comet yöntemiyle çalışmışlardır. Buna göre sub-toksik konsantrasyon aralığında (0.001-1 µg/ml), CdS KN'larının 24 saatlik maruziyetinin konsantrasyon bağımlı genotoksik etkiye yol açtığını, ancak Ag₂S KN'larının genotoksik etkilerinin olmadığını gösterilmiştir.

Zhang ve ark. [215] 72 saat süreyle 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL konsantrasyonlarında Ag₂S KN'ları ile muamele edilen L929 hücrelerinde kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığını göstermiştir.

Yapılan bazı araştırmalarda; KN'larının yüzeylerini çevreleyen kaplama materyallerin, KN'ların toksikolojik özelliklerini ve bunların biyolojik davranışlarını etkilediğini göstermektedir [226]. Hoshino ve ark. [227] farklı yüzey modifikasyonlarına sahip KN'larının; hidrofilik 11-merkaptoundekanoik asit sodyum tuzu kaplı karboksilik KN'ları (QD-COOH), kristalamin hidroklorit ile kaplı amino-KN'ları (QD-NH₂), tiyogliserol kaplı hidroksil KN'ları (QD-OH) ve bunların karışımlarının (QD-OH/COOH ve QD-NH₂/OH gibi); genotoksik potansiyelini, comet yöntemi ile araştırmışlar ve karboksilik KN örneklerinin, diğer örneklerle kıyaslandığında çok daha yüksek DNA hasarına yol açtığını göstermişlerdir. Sonuç olarak yüzeylerinde toksik moleküller bulunan KN'ları, doza bağlı olarak daha fazla sitotoksik ve genotoksik etki gösterirken, yüzeylerinde daha az toksik kaplama malzemeleri olan KN'larının, genotoksik olmadığı iddia edilmektedir. Bulgularımız literatürdeki az sayıdaki, toksik ağır metallerle sentezlenen KN'ları ile kıyaslandığında Ag₂S KN'larının genotoksik etki göstermediği şeklindeki bulgularla uyumludur.

Bu çalışmada sitotoksite ve genotoksisitenin mekanizmalarının açıklanması amacıyla apopitoz yolaklarında yer alan apopitotik genlerden bax ve kaspaz 9 ve antiapopitotik genlerden bcl2 ifadelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kullanılan RT-PCR, PCR ürünündeki birikmenin anında ölçümünü sağlayan, son yıllarda moleküler toksikoloji, toksikogenomik ve risk değerlendirmelerinde sıklıkla kullanılan geliştirilmiş bir yöntemdir ve ksenobiyotiklerin belirli genlerde oluşturdukları olası etkilerin belirlenmesinde oldukça yararlıdır.

Apopitoz; bir çok gen tarafından kontrol edilmektedir. Hücre genomunun gardiyanı olarak önem kazanan tümör baskılayıcı gen p53 geni, hücre döngüsü noktalarını aktive eder, DNA'yı onarır ve genomun stabilitesi için apopitozu kontrol altında tutar. Hücresel stres

sırasında p53, hücreyi hasardan korumak amacıyla onarıma çalışır ya da apoptozisi indükler [228]

Bcl-2 (B-cell lymphoma gene-2) protein ailesi üyeleri hücre ölümünün önemli düzenleyicilerindedir. Bcl-2 proteini antiapoptotik yani apoptozu baskılayan proteinlerdendir ve mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum membranlarında bulunmaktadır. Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu apoptozu baskılamaktadır [229].

Bax protein (bcl-2 ilişkili x protein) ise bcl-2 ile yüksek derecede yapısal benzerlik göstermesine rağmen proapoptotik aktivite gösterir. Bax geni, Bcl-2 gen ailesinin bir üyesidir. Bax, p53 aracılığıyla indüklenir ve bulunduğu hücrenin apoptozu hızlandırır. Hücre ölüm sinyali geldiği durumlarda, Bax sentezi artar ve Bcl-2'nin etkisini nötralize ederek apoptozu artırır [230]. İyon kanallarını açarak sitokrom-c salınımına neden olur ve apoptozu sağlar [231].

Kaspazlar apoptoz esnasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. İnaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilir. Bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler sonucunda hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücrel ve şekilsel değişimler meydana gelir. Memelilerde yaklaşık 14 kaspaz tanımlanmış olup, kaspaz ailesinin 7 üyesi (kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) apoptotik süreçte görev alır. Kaspazlar apoptotik yolda “başlatıcılar” ve “bitiriciler” olmak üzere iki grupta toplanırlar. Apoptotik yolun daha sonraki aşamalarında görev alan kaspazların diğer üyeleri ise efektör kaspazlar olarak adlandırılır. Kaspaz-2, 8, 9 ve 10 başlatıcı, kaspaz-3, 6 ve 7 ise efektör kaspazlardır. Başlatıcı kaspazların üç önemli özelliği vardır; farklı şekillerde gelen uyarıları, genel bitirici faza taşırlar, yeterli miktarda bitirici kaspazın aktifleşmesini sağlayarak apoptotik sinyalin çoğalmasını sağlayarak, ölümün en son basamağında bir kontrol noktası olarak bulunurlar. Hücre içi reaktif oksijen radikallerinde artış, DNA hasarına neden olan uyarılar, hücre içi oluşturulan sinyallerle apoptoz tetiklenebilir. Hücre içi reaktif oksijen radikallerinde artış, ATP/ADP ve NADPH'ın azalması, Bcl-2 transkripsiyon veya translasyonundaki hatalar ve hücre DNA hasarları ile uyarılan hücrelerde mitokondri membran permeabilitesi bozulur ve sitokrom-c, apaf-1 (apoptoz aktive edici faktör) ve kaspaz 9 birleşerek bir kompleks (apoptozom) oluşturur ve diğer kaspazları aktive ederek hücreyi ölüme götürürler [232-235].

Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) KN'sının kat değişimi (fold exchange) ve kat regülasyon (fold regulation) değerleri incelendiğinde, kaspaz 9 ekspresyonu 10, 40 ve 125 µg/ml konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı, 500 µg/ml

konsantrasyonunda ise değişiklik göstermediği bulunmuştur. Bcl2 ekspresyonu çalışılan tüm konsantrasyonlarında (10-500 µg/ml) kontrol grubuna kıyasla anlamlı değişiklik göstermemiştir. Bax ekspresyonunu 10 ve 125 µg/ml konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır.

Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'sının kat değişimi (fold exchange) ve kat regülasyon (fold regulation) değerleri incelendiğinde, çalışılan tüm konsantrasyonlarında (10-500 µg/ml) kaspaz 9 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla anlamlı değişiklik göstermemiştir. Çalışılan 40, 125, 500 µg/ml konsantrasyonlarında Bcl2 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla anlamlı değişiklik gözlenmemiştir, ancak 10 µg/ml konsantrasyonunda Bcl2 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2 kat azalmıştır. 500 µg/ml konsantrasyonunda ise bax ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 4 kat artmıştır.

Literatürde farklı NP'lerin indüklediği apoptoz mekanizmasını açıklayan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Silika NP'lerin neden olduğu sitotoksisite, oksadadif stres ve apoptoz, insan deri hücreleri (A431) ve akciğer hücrelerinde (A549) araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre silika, doza bağlı olarak sitotoksik etki göstermiş, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve apoptotik genler olan kaspaz 3 ve 9 da önemli seviyede artışa neden olmuştur. Bu sonuçlara göre silika NP'in sitotoksik ve apoptozu neden olduğu belirtilmiştir [79].

Ahmad ve ark. [82] yapmış oldukları çalışmaya göre ise silika NP'lerinin çeşitli konsantrasyonlardaki toksik etki değerlendirmeleri yapılmış olup doza bağlı olarak insan karaciğer hücrelerinde (HepG2) sitotoksik etki oluşturduğu ve hücre döngüsü kontrol geni p53 ve apoptotik gen olan bax ve kaspaz 3 de artış gözlenirken antiapoptotik gen olan bcl-2 de azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlara göre silika NP'leri apoptotik yol ile hücre ölümünü tetiklediği belirtilmiştir.

Kanser tedavisinde kullanılmak üzere sentezlenen CdSe/ZnS, çekirdek/kaplama KN'sının A549 hücrelerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Bu KN'ları hücreler ile maruz bırakılırken, özellikle UVA/UVB de uygulanmıştır. Hücrelerdeki oluşan sitotoksik etkileri belirlemek amacıyla MTT, LDH ve apoptoz genlerindeki gen ekspresyon değişimleri incelenmek için RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre bu KN'larının sitotoksik ve genotoksik olduğu gözlenmiş, fototerapi yöntemiyle kanser tedavisinde kullanılabilmesi için uygun olduğu belirtilmiştir [236].

Ag₂S KN'larının gen ekspresyonuna ilişkin çalışma henüz literatürde yer almamaktadır. Çalışmamızda kullandığımız Ag₂S-(2-merkaptopropionik asit) ve Ag₂S-(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının apopitotik ve antiapopitotik genlerde değişimlere neden olmuştur. Ancak bu değişim sonuçlarına göre Ag₂S KN'larının apopitotik yolu tetiklediği düşünülmemektedir. Daha fazla genler ile ayrıntılı çalışmalara gerek vardır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Nanoteknoloji günümüz de sağlık, elektronik, mekanik, gibi pek çok alanda ekonomik büyüme ve üretim teknolojilerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır.

Nanoteknolojinin geniş bir uygulama alanına sahip olmasından dolayı, nanomalzemelere maruz kalma ile ilgili ortaya çıkabilecek olası risklere karşı geliştirilebilecek önlemlerin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle NM'lerin, boyutu, şekli, yüzey alanı, kimyasal özellikleri ve çözünübilirlik derecelerini içeren fizyokimyasal özelliklerinin biyolojik sistemlerdeki etkileri ayrıntılı olarak araştırılmalıdır.

Son yıllarda nanoteknolojinin yaratacağı riskler, tüm dünyada gittikçe artan bir şekilde tartışılmaya başlanmıştır. Yararlarının yanı sıra, NM'lerin kullanımlarının hızla kullanımlarının artması, nanoteknolojinin muhtemel riskleri üzerine çeşitli araştırmalar yapılması sorunluluğu getirmiştir.

NP toksisitesi üzerine çeşitli çalışmalar bulunmasına karşın, başta sitotoksik ve genotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar yetersizdir. Olası toksik etkilerinin ve etki mekanizmalarının araştırılması ve bu bileşiklerin tehlike/risk değerlendirmelerinin yapılması, nanoteknolojik ürünlerin güvenli kullanımına olanak sağlayacaktır.

Çalışmamızda kullanılan Ag_2S -(2-merkaptopropionik asit) ve Ag_2S -(mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit) KN'larının V79 hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik etki gözlenmemiştir. Ayrıca gen ekspresyonu ile yapılan çalışmalar sonucunda da apoptozise neden olabileceği düşünülmemektedir. Ancak Ag_2S KN'larının bir çok alanda kullanımların yaygınlaşabilmesi için daha kapsamlı araştırmalara gerek duyulmaktadır.

KN'larının insan ve çevre etkilerinin in vitro ve in vivo çalışmalarla detaylı olarak irdelenmeli ve toksisite potansiyelleri değerlendirilmelidir.

KN'larının fizyokimyasal, moleküler ve fizyolojik yapılarının anlaşılması, toksisite özelliklerinin ortaya konulması, bu maddelerin başta tıp, eczacılık gibi sağlık sektöründe, elektronik, mekanik gibi pek çok alanda güvenli bir şekilde kullanılmalarını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Kim, B.Y.S., Rutka, J.T., Chan, W.C.W., Nanomedicine, *The New England Journal of Medicine*; 363:2434-2443, **2010**.
- [2] Fan, A. M., Alexeeff, G. J., Nanotechnology and nanomaterials: toxicology, risk assessment, and regulations, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Dec; 10(12):8646-57., **2010**.
- [3] Aydın, A., Sipahi, H. and Charehsaz, M., Nanoparticles Toxicity and Their Routes of Exposures. A. D. Sezer (Ed.). *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems* (s. 483-500), Rijeka: In Tech., **2012**.
- [4] Hougaard, K.S., Jackson, P., Jensen, K.A., Sloth, J.J., Loschner, K., Larsen, E.H. ve diğerleri., Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. *Particle and Fibre Toxicology*, 7, 16., **2010**.
- [5] Merkle, R.C., Biotechnology as a route to nanotechnology, *Trends in Biotechnology*,. 17(7): p. 271-274, **1999**
- [6] Arnall, A.H., Future Technologies, Today's Choices, *Greenpeace Environmental Trust Report*, London, **2003**.
- [7] Meyyapyan, M., Introduction to Nanotechnology, NATO RTO Lecture Series, RTO-EN-AVT-129bis, *Nanotechnology Aerospace Applications*, **2005**.
- [8] Feynman, R.P., "There's Plenty of Room at the Bottom", Erişim, 2015 <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>, **1974**.
- [9] Taniguchi, N. On the basic concept of 'nano-technology.' *In: Proceedings of the International Conference on Production Engineering, Tokyo: Japan Society of Precision Engineering*, **1974**
- [10] Drexler, K.E., Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA Vol. 78, No. 9, pp. 5275-5278, 1981.
- [11] Farokhzad, O.C., Cheng J., Teply, B.A., Sherifi, I., Jon, S., Kantoff, P.W., Richie, J.P., Langer, R., Nanoparticle-aptamer bioconjugates result in significant tumor reduction in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*.;103(6):6315-6320., **2006**.
- [12] Hansen, F., Larsen, S., Olsen, B.H., Baun, S.I., Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials, *Nanotoxicology*, 1 (3), 243-250, **2007**.
- [13] Stone, V., Nowack, B., Baun, A., van den Brink, N., Kammer, F., Dusinska, M. ve diğerleri., Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation, *Science of the Total Environment*, 408 (7), 1745-1754, **2010**.
- [14] Papageorgiou, I., Brown, C., Schins, R., Singh, S., Newson, R., Davis, S., Fisher, J., Ingham, E., Case, C.P., The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro, *Biomaterials*, 28 (19), 2946-2958, **2007**.

- [15] Wang, J., Deng, X., Zhang, F., ZnO nanoparticle-induced oxidative stress triggers apoptosis by activating JNK signaling pathway in cultured primary astrocytes, *Nanoscale Research Letters*; 9(1): 117, **2014**.
- [16] Li, Y., Sun, L., Jin, M., Du, Z., Liu, X., Guo, C. ve diğeri., Size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Toxicology In Vitro*, 25 (7), 1343-1352, **2011**.
- [17] Willems and van der Willenberg (W & W), NRM *Nanoroadmap Project: Roadmap Report on Nanoparticles*, November **2005**.
- [18] Hoskins, C., Cheng, W.P., Implementing Nanotechnology and Novel Drug Delivery Systems to Improve Dissolution and Solubilization, *American Pharmaceutical Review*, December 10, **2012**.
- [19] Özer Y., *Nanobilim ve Nanoteknoloji Ülke Güvenliği/Etkinliği Açısından Doğru Modelin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Kara Harp Okulu Savunma Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**.
- [20] Daniel, M.-C., Astruc, D., Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology, *Chemical Reviews*, 104 (1), 293-346, **2004**.
- [21] Valiev, R., Materials science: Nanomaterial advantage, *Nature*, 419 (6910), 887-889, **2002**.
- [22] Walt, D.R., Nanomaterials: Top-to-bottom functional design, *Nature Materials*, 1 (1), 17-18, **2002**.
- [23] Luther, W., *International Strategy and Foresight Report on Nanoscience and Nanotechnology*, March **2004**.
- [24] Daraio, C., Jin, S., Synthesis and Patterning Methods for Nanostructures Useful for Biological Applications. G. A. Silva & V. Parpura (Ed.), *Nanotechnology for Biology and Medicine* (s. 27-44): Springer New York, **2012**.
- [25] Shingo, I., Motoo, Y., Carbon Nanotubes and Fullerene in Nanotechnologies, Applications and Standardization, *ISO Focus*, Cenova, Volume.4, No:4, 11-13, April, **2007**
- [26] Suresh, S., Semiconductor Nanomaterials, Methods and Applications: A Review, *Nanoscience and Nanotechnology*, 3(3): 62-74, **2013**.
- [27] Shingo I., Motoo, Y., Carbon Nanotubes and Fullerene in Nanotechnologies, Applications and Standardization, *ISO Focus*, Cenova, Volume.4, No:4, 11-13, April, **2007**.
- [28] Anonim, Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties, *The Royal Society*, Londra, **2004**.
- [29] Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*, 354 (6348), 56-58, **1991**.
- [30] Vardar N., *Nanomalzemelerin Bilgisayar Simülasyonu*, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2012**.
- [31] Handy, R.D., Owen, R., Valsami-Jones, E., The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs, *Ecotoxicology*, 17 (5), 315-325, **2008**.

- [32] Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (Scenih), European Commission Health & Consumer Protection Directorate- General Directorate C - Public Health and Risk Assessment C7 – Risk Assessment: *The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies*, **2006**.
- [33] Liu, Y., Miyoshi, H., Nakamura, M. (2007) Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles, *International Journal of Cancer*, 120 (12), 2527-2537, **2007**.
- [34] Lal, S.R.K., Synthesis of Organic Nanoparticles and their Applications in Drug Delivery and Food Nanotechnology: A Review, *Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology*, 03 (04), **2014**.
- [35] Ochekepe, N., Olorunfemi, P., Ngwuluka N., Nanotechnology and Drug Delivery Part 1 : Background and Applications, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (3), 265-274., **2009**,
- [36] Tang, M., Russell, P.J., Khatri, A., Magnetic nanoparticles: prospects in cancer imaging and therapy, *Discovery Medicine*, 7 (38), 68-74, **2007**.
- [37] Xue, A. ve Hwang, D., Nanotechnology Funding: Corporations Grab the Reins, *Lux Research*, April **2011**.
- [38] Suttiponparnit, K., Jiang, J., Sahu, M., Suvachittanont, S., Charinpanitkul, T., Biswas, P., Role of Surface Area, Primary Particle Size, and Crystal Phase on Titanium Dioxide Nanoparticle Dispersion Properties, *Nanoscale Research Letters*, 6:27, **2011**.
- [39] Helmus, M. N., How to commercialize nanotechnology, *Nature Nanotechnology*, 1, 157 - 158, **2006**.
- [40] Rioux, R. M., Song, H., Hoefelmeyer, J. D., Yang, P., Somorjai, G. A., High-Surface-Area Catalyst Design: Synthesis, Characterization, and Reaction Studies of Platinum Nanoparticles in Mesoporous SBA-15 Silica, , *The Journal of Physical Chemistry B*, 109,2192-2202, **2005**.
- [41] Krug, H.F., Wick, P., Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge, *Angewandte Chemie International Edition*, 50 (6), 1260-1278, **2011**.
- [42] Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W, Stone V, Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure., *Particulate and Fibre Toxicology*, Oct 21; 2:10, **2005**.
- [43] Van der Merwe, D., Tawde, S., Pickrell, J.A., Erickson, L.E., Nanocrystalline titanium dioxide and magnesium oxide in vitro dermal absorption in human skin. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 28 (2), 78-82, **2009**.
- [44] Arora, S., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M., Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258 (2), 151-165, **2012**.
- [45] Lademann, J., Weigmann, H., Rickmeyer, C., Barthelmes, H., Schaefer, H., Mueller, G., Sterry, W., Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice, *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 12 (5), 247-256, **1999**.

- [46] Paddle-Ledinek, J.E., Nasa, Z., Cleland, H.J., Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117 (7 Suppl), 110S-118S; discussion 119S-120S, **2006**.
- [47] Lam, P.K., Chan, E.S., Ho, W.S., Liew, C.T., In vitro cytotoxicity testing of a nanocrystalline silver dressing (Acticoat) on cultured keratinocytes, *British Journal of Biomedical Science*, 61 (3), 125-127, **2004**.
- [48] Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Arepalli, S., Hunter, R.L., A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks, *Critical Reviews in Toxicology*, 36 (3), 189-217, **2006**.
- [49] Gontier, E., Ynsa, M.-D., Biró, T., Hunyadi, J., Kiss, B., Gáspár, K. ve diğerleri., Is there penetration of titania nanoparticles in sunscreens through skin? A comparative electron and ion microscopy study, *Nanotoxicology*, 2 (4), 218-231, **2008**.
- [50] Soto, K., Garza, K.M., Murr, L.E., Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomaterialia*, 3 (3), 351-358, **2007**.
- [51] Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G. ve diğerleri., Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo, *Toxicology Letters*, 163 (2), 109-120, **2006**.
- [52] Garnett M. C., Kallinteri, P., Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles, *Occup Med (Lond)* (August 2006) 56 (5): 307-311, **2006**.
- [53] Myllynen, P.K., Loughran, M.J., Howard, C.V., Sormunen, R., Walsh, A.A., Vahakangas, K.H., Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod Toxicol*, 26 (2), 130-137, **2008**.
- [54] Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Schulz, H., Ziesenis, A., Heinzmann, U. ve diğerleri., Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats, *Environmental Health Perspectives*, 109 (Suppl 4), 547-551, **2001**.
- [55] De Jong, W.H., Hagens, W.I., Krystek, P., Burger, M.C., Sips, A.J., Geertsma, R.E., Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration, *Biomaterials*, 29 (12), 1912-1919, **2008**.
- [56] Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A., Fadeel, B., Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810 (3), 361-373, **2011**.
- [57] Curtis, J., Greenberg, M., Kester, J., Phillips, S., Krieger, G., Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians, *Toxicological Reviews*, 25 (4), 245-260, **2006**.
- [58] Gonzalez L, Lison D, Kirsch-Volders M. Genotoxicity of engineered nanomaterials: a critical review, *Nanotoxicology*, 2:252-273, **2008**.
- [59] Donaldson, K., Poland, C.A., Schins, R.P., Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: criteria for improved test strategies, *Nanotoxicology*, 4, 414-420, **2010**.
- [60] Chan, V.S., Nanomedicine: an unresolved regulatory issue, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 46:218-224, **2006**.
- [61] McNeil, S.E., Nanotechnology for the biologist, *Journal of Leukocyte Biology*, 78 (3), 585-594, **2005**.

- [62] Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., Moller, L., Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes, *Chemical Research in Toxicology*, 21 (9), 1726-1732, **2008**.
- [63] Park MV, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJ, Verharen HW, Briedé JJ, van Loveren H, de Jong WH, The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles, *Biomaterials*, 32 (36), 9810-9817, **2011**.
- [64] Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U. ve diğerleri., Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles, *Small*, 3 (11), 1941-1949, **2007**.
- [65] Magdolenova, Z., Collins, A., Kumar, A., Dhawan, A., Stone, V., Dusinska, M., Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, 8 (3), 233-278, **2013**.
- [66] Sayes, C.M., Liang, F., Hudson, J.L., Mendez, J., Guo, W., Beach, J.M. ve diğerleri., Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro, *Toxicology Letters*, 161 (2), 135-142, **2006**.
- [67] Rouse, J.G., Yang, J., Barron, A.R., Monteiro-Riviere, N.A., Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology in Vitro*, 20 (8), 1313-1320, **2006**.
- [68] Wick, P., Manser, P., Limbach, L.K., Dettlaff-Weglikowska, U., Krumeich, F., Roth, S. ve diğerleri., The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity, *Toxicology Letters*, 168 (2), 121-131, **2007**.
- [69] Pulskamp, K., Diabate, S., Krug, H.F., Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants, *Toxicology Letters*, 168 (1), 58-74, **2007**.
- [70] Bottini, M., Bruckner, S., Nika, K., Bottini, N., Bellucci, S., Magrini, A., Bergamaschi, A., Mustelin, T., Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis, *Toxicology Letters*, 160 (2), 121-126, **2006**.
- [71] Manna, S.K., Sarkar, S., Barr, J., Wise, K., Barrera, E.V., Jejelowo, O. ve diğerleri., Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappaB in human keratinocytes, *Nano Letters*, 5 (9), 1676-1684, **2005**.
- [72] Witzmann, F.A., Monteiro-Riviere, N.A., Multi-walled carbon nanotube exposure alters protein expression in human keratinocytes, *Nanomedicine*, 2 (3), 158-168, **2006**.
- [73] Pernodet, N., Fang, X., Sun, Y., Bakhtina, A., Ramakrishnan, A., Sokolov, J. ve diğerleri., Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts, *Small*, 2 (6), 766-773, **2006**.
- [74] Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R.R., Sastry, M., Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview, *Langmuir*, 21 (23), 10644-10654, **2005**.
- [75] Sharma, V., Shukla, R.K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M., Dhawan, A., DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicology Letters*, 185 (3), 211-218, **2009**.

- [76] Gupta, A.K., Naregalkar, R.R., Vaidya, V.D., Gupta, M., Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications, *Nanomedicine*, 2 (1), 23-39, **2007**.
- [77] Park, E.-J., Yi, J., Chung, K.-H., Ryu, D.-Y., Choi, J., Park, K., Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells, *Toxicology Letters*, 180 (3), 222-229, **2008**.
- [78] Hamzeh, M., Sunahara, G.I. In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells, *Toxicology in Vitro*, 864-73, **2013**.
- [79] Ahamed, M., Akhtar Mj Fau - Siddiqui, M.A., Siddiqui Ma Fau - Ahmad, J., Ahmad J Fau - Musarrat, J., Musarrat J Fau - Al-Khedhairi, A.A., Al-Khedhairi Aa Fau - AlSalhi, M.S., Alrokayan, S.A., Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells, *Toxicology*, 283(2-3), **2011**.
- [80] Kim IS, Baek M, Choi SJ. Comparative cytotoxicity of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO nanoparticles to human lung cells., *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, May;10(5): 3453-8., **2010**.
- [81] Ye, Y., Liu J Fau - Xu, J., Xu J Fau - Sun, L., Sun L Fau - Chen, M., Chen M Fau - Lan, M., Lan, M., Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line, *Toxicology in Vitro*, 24, 751-758, **2010**.
- [82] Ahmad, J., Ahamed M Fau - Akhtar, M.J., Akhtar Mj Fau - Alrokayan, S.A., Alrokayan Sa Fau - Siddiqui, M.A., Siddiqui Ma Fau - Musarrat, J., Musarrat J Fau - Al-Khedhairi, A.A. ve diğeri., Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 259(2):160-8, **2012**.
- [83] Lewinski, N., Colvin V Fau - Drezek, R., Drezek, R., Cytotoxicity of nanoparticles., *Small*, 4(1):26-49, **2008**.
- [84] Gupta, S.K., Baweja, L., Gurbani, D., Pandey, A.K., Dhawan, A., Interaction of C60 Fullerene with the Proteins Involved in DNA Mismatch Repair Pathway, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7 (1), 179-180, **2011**.
- [85] Jugan, M.L., Barillet S Fau - Simon-Deckers, A., Simon-Deckers A Fau - Herlin-Boime, N., Herlin-Boime N Fau - Sauvaigo, S., Sauvaigo S Fau - Douki, T., Douki T Fau - Carriere, M. ve diğeri., Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells., *Nanotoxicology* 6(5):501-13, **2012**.
- [86] Monopoli, M.P., Walczyk D Fau - Campbell, A., Campbell A Fau - Elia, G., Elia G Fau - Lynch, I., Lynch I Fau - Bombelli, F.B., Bombelli Fb Fau - Dawson, K.A. ve diğeri., Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, Mar 2;133(8):2525-34, **2011**.
- [87] Cooke, M.S., Evans Md Fau - Dizdaroglu, M., Dizdaroglu M Fau - Lunec, J., Lunec, J., Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 17(10):1195-214, **2003**.

- [88] Li, Y., Sun L Fau - Jin, M., Jin M Fau - Du, Z., Du Z Fau - Liu, X., Liu X Fau - Guo, C., Guo C Fau - Li, Y. ve diğerleri. Size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells, *Toxicology in Vitro*, Oct;25(7):1343-52, **2011**.
- [89] Robertazzi, A.,Platts, J., Binding of transition metal complexes to guanine and guanine–cytosine: hydrogen bonding and covalent effects, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10 (8), 854-866, **2005**.
- [90] Barnes, C.A., Elsaesser, A., Arkusz, J., Smok, A., Palus, J., Leśniak, A. ve diğerleri., Reproducible Comet Assay of Amorphous Silica Nanoparticles Detects No Genotoxicity, *Nano Letters*, 8 (9), 3069-3074, **2008**.
- [91] Gurr, J.R., Wang As Fau - Chen, C.-H., Chen Ch Fau - Jan, K.-Y.,Jan, K.Y., Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells, *Toxicology*, 15;213(1-2):66-73, **2005**.
- [92] Xu, L., Li X Fau - Takemura, T., Takemura T Fau - Hanagata, N., Hanagata N Fau - Wu, G., Wu G Fau - Chou, L.L.,Chou, L.L., Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel, *Journal of Nanobiotechnology*, 1;10:16, **2012**.
- [93] Yang, H., Liu C Fau - Yang, D., Yang D Fau - Zhang, H., Zhang H Fau - Xi, Z.,Xi, Z., Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition, *Journal of Applied Toxicology*, 29(1):69-78, **2009**.
- [94] C. Darne, F. Terzetti, C. Coulais, C. Fontana, S. Binet, L. Gaté, and Y. Guichard, Cytotoxicity and Genotoxicity of Panel of Single- and Multiwalled Carbon Nanotubes: In Vitro Effects on Normal Syrian Hamster Embryo and Immortalized V79 Hamster Lung Cells, *Journal of Toxicology*, Volume 2014, **2014**.
- [95] Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L., Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size, *Toxicology Letters*, 24;188(2):112-8, **2009**.
- [96] Bhattacharya, K., Davoren M Fau - Boertz, J., Boertz J Fau - Schins, R.P., Schins Rp Fau - Hoffmann, E., Hoffmann E Fau - Dopp, E.,Dopp, E., Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells., *Particulate and Fibre Toxicology*, 21;6:17, **2009**.
- [97] Shukla, R.K., Kumar A Fau - Gurbani, D., Gurbani D Fau - Pandey, A.K., Pandey Ak Fau - Singh, S., Singh S Fau - Dhawan, A.,Dhawan, A, TiO(2) nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells, *Nanotoxicology*, 2013 Feb;7(1):48-60.
- [98] Sharma, V., Shukla, R.K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M.,Dhawan, A., DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicology Letters*, 185 (3), 211-218, **2009**.
- [99] Sharma, V., Singh Sk Fau - Anderson, D., Anderson D Fau - Tobin, D.J., Tobin Dj Fau - Dhawan, A.,Dhawan, A., Zinc oxide nanoparticle induced genotoxicity in primary human epidermal keratinocytes, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(5):3782-8, **2011**.

- [100] Gerloff, K., Pereira, D.I.A., Faria, N., Boots, A.W., Kolling, J., Förster, I. ve diğerleri., Influence of simulated gastro-intestinal conditions on particle-induced cytotoxicity and interleukin-8 regulation in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells, *Nanotoxicology*, 7, 353-366, **2013**.
- [101] Ye, Y., Liu, J., Xu, J., Sun, L., Chen, M., Lan, M., Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line, *Toxicology in Vitro*, 24 (3), 751-758, **2010**.
- [102] Valko, M., Rhodes Cj Fau - Moncol, J., Moncol J Fau - Izakovic, M., Izakovic M Fau - Mazur, M., Mazur, M, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 160, pp.1-40, **2006**.
- [103] Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G. ve diğerleri., NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials, *Biomaterials*, 30 (23–24), 3891-3914, **2009**.
- [104] Barillet, S., Jugan M Fau - Laye, M., Laye M Fau - Leconte, Y., Leconte Y Fau - Herlin-Boime, N., Herlin-Boime N Fau - Reynaud, C., Reynaud C Fau - Carriere, M. ve diğerleri. In vitro evaluation of SiC nanoparticles impact on A549 pulmonary cells: cyto-, genotoxicity and oxidative stress, *Toxicol Lett* 198:324-330, **2010**.
- [105] Shukla, R.K., Sharma V Fau - Pandey, A.K., Pandey Ak Fau - Singh, S., Singh S Fau - Sultana, S., Sultana S Fau - Dhawan, A., Dhawan, A, ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicology In Vitro*, 25:231-241, **2011**.
- [106] Hackenberg, S., Scherzed A Fau - Kessler, M., Kessler M Fau - Hummel, S., Hummel S Fau - Technau, A., Technau A Fau - Froelich, K., Froelich K Fau - Ginzkey, C. ve diğerleri., Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells, *Toxicology Letters* 201:27-33, **2011**.
- [107] Hackenberg, S., Scherzed, A., Technau, A., Kessler, M., Froelich, K., Ginzkey, C. ve diğerleri., Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro, *Toxicology in Vitro*, 25 (3), 657-663, **2011**.
- [108] An, H., Liu Q Fau - Ji, Q., Ji Q Fau - Jin, B., Jin, B., DNA binding and aggregation by carbon nanoparticles, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393:571-576, **2010**.
- [109] Liang, X.J., Chen C Fau - Zhao, Y., Zhao Y Fau - Jia, L., Jia L Fau - Wang, P.C., Wang, P.C., Biopharmaceutics and therapeutic potential of engineered nanomaterials, *Curr Drug Metab* 9:697-709, **2008**.
- [110] Mark A. Reed, Quantum Dots, *Scientific American*, 268, 118-123, **1993**.
- [111] Brus, L., Quantum crystallites and nonlinear optics, *Applied Physics A*, 53 (6), 465-474, **1991**.
- [112] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics, *Science*, vol 307 no 5709 pp 538-544, **2005**.
- [113] Rizvi, S.B., Ghaderi, S., Keshtgar, M., Seifalian, A.M., Semiconductor quantum dots as fluorescent probes for in vitro and in vivo bio-molecular and cellular imaging, *Nano Reviews*, 1, 10.3402/nano.v3401i3400.5161, **2010**.

- [114] Hoshino, A., Fujioka, K., Oku, T., Suga, M., Sasaki, Y.F., Ohta, T. ve diğerleri., Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification, *Nano Letters*, 4 (11), 2163-2169, **2004**.
- [115] Rizvi, S.B., Ghaderi, S., Keshtgar, M., Seifalian, A.M., Semiconductor quantum dots as fluorescent probes for in vitro and in vivo bio-molecular and cellular imaging, *Nano Reviews*, Vol 1:10.3402/nano.v1i0.5161., **2010**.
- [116] Dabbousi, B.O., Rodriguez-Viejo, J., Mikulec, F.V., Heine, J.R., Mattoussi, H., Ober, R. ve diğerleri., (CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites, *The Journal of Physical Chemistry B*, 101 (46), 9463-9475, **1997**.
- [117] Hines, M.A., Guyot-Sionnest, P., Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals, *The Journal of Physical Chemistry*, 100 (2), 468-471, **1996**.
- [118] Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R., Mattoussi, H., Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater*, 4 (6), 435-446, **2005**.
- [119] Pinaud, F., King, D., Moore, H.-P., Weiss, S., Bioactivation and Cell Targeting of Semiconductor CdSe/ZnS Nanocrystals with Phytochelatin-Related Peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 126 (19), 6115-6123, **2004**.
- [120] Bae, W.K., Char, K., Hur, H., Lee, S., Single-Step Synthesis of Quantum Dots with Chemical Composition Gradients, *Chemistry of Materials*, 20 (2), 531-539, **2008**.
- [121] Selvan, S.T., Patra, P.K., Ang, C.Y., Ying, J.Y., Synthesis of Silica-Coated Semiconductor and Magnetic Quantum Dots and Their Use in the Imaging of Live Cells, *Angewandte Chemie*, 119 (14), 2500-2504, **2007**.
- [122] Barroso, M.M., Quantum Dots in Cell Biology, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 59 (3), 237-251, **2011**.
- [123] Bera, D., Qian, L., Tseng, T., Holloway, H., Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review, *Materials* 3(4), 2260-2345, **2010**.
- [124] Zhou, M., Ghosh, I., Quantum dots and peptides: a bright future together, *Biopolymers*, 88(3):325-39, **2007**.
- [125] Frasco, M.F., Chaniotakis, N., Bioconjugated quantum dots as fluorescent probes for bioanalytical applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(1):229-40, **2010**.
- [126] Jovin, T.M., Quantum dots finally come of age, *Nature Biotechnology*, 21(1):32-3, **2003**.
- [127] Yu, W.W., Chang E Fau - Drezek, R., Drezek R Fau - Colvin, V.L., Colvin, V.L., Water-soluble quantum dots for biomedical applications, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 29;348(3):781-6, **2006**.
- [128] Yu, W.W., Semiconductor quantum dots: synthesis and water-solubilization for biomedical applications., *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(10):1571-81, **2008**.
- [129] Rosenthal, S.J., Chang, J.C., Kovtun, O., McBride, J.R., Tomlinson, I.D., Biocompatible Quantum Dots for Biological Applications, *Chemistry & Biology*, 18 (1), 10-24, **2011**.

- [130] Qu, L., Peng, Z.A., Peng, X., Alternative Routes toward High Quality CdSe Nanocrystals, *Nano Letters*, 1 (6), 333-337, **2001**.
- [131] Peng, L., He, M., Chen, B., Wu, Q., Zhang, Z., Pang, D. ve diğerleri., Cellular uptake, elimination and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells, *Biomaterials*, 34 (37), 9545-9558, **2013**.
- [132] Zhao Y, Wang X, Wu Q, Li Y, Wang D., Translocation and neurotoxicity of CdTe quantum dots in RMEs motor neurons in nematode *Caenorhabditis elegans*, *Journal of Hazardous Materials*, 11;283:480-9, **2015**.
- [133] Li, K.G., Chen, J.T., Bai, S.S., Wen, X., Song, S.Y., Yu, Q. ve diğerleri., Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots, *Toxicology in Vitro*, 23 (6), 1007-1013, **2009**.
- [134] Xie, R., Battaglia, D., Peng, X., Colloidal InP Nanocrystals as Efficient Emitters Covering Blue to Near-Infrared. *Journal of the American Chemical Society*, 129 (50), 15432-15433, **2007**.
- [135] Battaglia, D. and X. Peng, Formation of High Quality InP an In As Nanocrystals in a Noncoordinating Solvent, *Nano Letters*, 2(9): p 1027-1030, **2002**.
- [136] Rogach, A.L., Nagesha, D., Ostrander, J.W., Giersig, M., Kotov, N.A. "Raisin Bun"-Type Composite Spheres of Silica and Semiconductor Nanocrystals, *Chemistry of Materials*, 12 (9), 2676-2685, **2000**.
- [137] Gao, X., Yang, L., Petros, J.A., Marshall, F.F., Simons, J.W., Nie, S., In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (1), 63-72, **2005**.
- [138] Ipe, B.I., Lehnig M Fau - Niemeyer, C.M., Niemeyer, C.M., On the generation of free radical species from quantum dots, *Small* 1(7):706-9, **2005**.
- [139] Derfus, A.M., Chan, W.C.W., Bhatia, S.N., Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots, *Nano Letters*, 4 (1), 11-18, 2004.
- [140] Amane S., Akiyoshi H., Ken-ichi H., Kazuo S., and Kenji Y., On the cyto-toxicity caused by quantum dots, *Microbiology and Immunology*, 48(9), 669-675, 2004.
- [141] Hoshino, A., Hanaki, K.-i., Suzuki, K., Yamamoto, K., Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314 (1), 46-53, 2004.
- [142] Lovric, J., Bazzi Hs Fau - Cuie, Y., Cuie Y Fau - Fortin, G.R.A., Fortin Gr Fau - Winnik, F.M., Winnik Fm Fau - Maysinger, D., Maysinger, D., Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots, *Journal of Molecular Medicine*, 83(5):377-85, 2005.
- [143] Shiohara A1, Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, Yamamoto K., On the cyto-toxicity caused by quantum dots., *Microbiology and Immunology*. 2004;48(9):669-75.
- [144] Choi, H.S., Liu, W., Liu, F., Nasr, K., Misra, P., Bawendi, M.G. ve diğerleri., Design considerations for tumour-targeted nanoparticles, *Nature Nanotechnology*, 5 (1), 42-47, 2010.

- [145] Chang, E., Thekkek, N., Yu, W.W., Colvin, V.L., Drezek, R., Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake, *Small*, 2 (12), 1412-1417, 2006.
- [146] Romoser, A.A., Chen, P.L., Berg, J.M., Seabury, C., Ivanov, I., Criscitiello, M.F. ve diğerleri., Quantum dots trigger immunomodulation of the NFκB pathway in human skin cells, *Molecular immunology*, 48 (12-13), 1349-1359, **2011**.
- [147] Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A., A practical note on the use of cytotoxicity assays, *International Journal of Pharmaceutics*, 288 (2), 369-376, **2005**.
- [148] Melo, P.S., de Medeiros Cavalcante Hm Fau - Barbosa-Filho, J.M., Barbosa-Filho Jm Fau - de Fatima Formiga Melo Diniz, M., de Fatima Formiga Melo Diniz M Fau - de Medeiros, I.A., de Medeiros Ia Fau - Haun, M., Haun, M., Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells, *Toxicology Letters*, 142 (1-2), 143-151, **2003**.
- [149] Fotakis, G., Timbrell, J.A., In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, 160 (2), 171-177., **2006**.
- [150] Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nature Protocols*, 3 (7), 1125-1131, **2008**.
- [151] Yano, C.L., Marcondes, M.C.C.G., Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro, *Free Radical Biology and Medicine*, 39 (10), 1378-1384, **2005**.
- [152] Lasarow, R.M., Isseroff, R.R., Gomez, E.C., Quantitative In Vitro Assessment of Phototoxicity by a Fibroblast-Neutral Red Assay, *Journal of Investigative Dermatology*, 98 (5), 725-729, **1992**.
- [153] Borenfreund, E., Puerner, J.A., Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters*, 24 (2-3), 119-124, **1985**.
- [154] Andreoli, C., Gigante, D., Nunziata, A., A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke, *Toxicology in Vitro*, 17 (5-6), 587-594, **2003**.
- [155] Holst-Hansen, C., Brüner, N., *MTT-cell proliferation assay*, *Cell Biology: a Laboratory Handbook*, 2nd Ed. Academic Press, San Diego, **1998**.
- [156] Barile, F. A., *Introduction to In Vitro Cytotoxicology Mechanisms and Methods*, Florida : CRC Press, **1994**.
- [157] Smith, F., Tetrazolium Salt, *Science* 113, (2948), 751-754, **1951**.
- [158] Cemeli, E., Baumgartner A Fau - Anderson, D., Anderson, D., Antioxidants and the comet assay, *Mutation Research*, 681, (1), 51-67, **2009**.
- [159] Ostling, O., Johanson, K.J., Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123 (1), 291-298, **1984**.
- [160] Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H. ve diğerleri., Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic

- toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35 (3), 206-221, **2000**.
- [161] Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G., The comet assay: mechanisms and technical considerations., *Mutatation Research*, 12;363(2):89-96., **1996**.
- [162] Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., The comet assay: a comprehensive review, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339 (1), 37-59, **1995**.
- [163] Olive, P.L., Wlodek, D., Durand, R.E., Banáth, J.P., Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis, *Experimental Cell Research*, 198 (2), 259-267, **1992**.
- [164] Vijayalaxmi, Tice, R.R., Strauss, G.H.S., Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 271 (3), 243-252, **1992**.
- [165] Olive, P. L., Banath, J. P., Durand, R. E., Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay, *Radiation Research*, 122 (1), 86-94, **1990**.
- [166] Collins, A.R., Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1840 (2), 794-800, **2014**.
- [167] Dusinska, M., Collins, A. R., Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the Comet Assay, *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 24 (3): 405-411, **1996**.
- [168] Collins, A.R., Duthie S, Fau - Dobson, V.L., Dobson, V.L., Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA, *Carcinogenesis*, 14 (9), 1733-1735, **1993**.
- [169] Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F. ve diğerleri., IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463 (2), 111-172, **2000**.
- [170] Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V. and Tice, R. R., Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, 4th International Comet Assay Workshop, *Mutagenesis*, 18, 45-51, **2003**.
- [171] Speit, G., Schütz, P., Bonzheim, I., Trenz, K., Hoffmann, H., Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay, *Toxicology Letters*, 146 (2), 151-158, **2004**.
- [172] Ramos, AA, Lima, CF, Pereira-Wilson, C., DNA damage protection and induction of repair by dietary phytochemicals and cancer prevention: what do we know? (chapter 11). In: *Selected Topics in DNA Repair*, Clark C Chen (Ed.) (Vol. 1, p.237-270), San Diego, USA: InTech. ISBN: 978-953-307-606-5, 2011.
- [173] Domijan, A.-M., Želježić, D., Kopjar, N., Peraica, M., Standard and Fpg-modified comet assay in kidney cells of ochratoxin A- and fumonisin B1-treated rats, *Toxicology*, 222 (1-2), 53-59, **2006**.

- [174] Boiteux, S (Boiteux, S); Gajewski, E (Gajewski, E); Laval, J (Laval, J); Dizdaroglu, M (Dizdaroglu, M), Substrate-Specificity Of The Escherichia-Coli Fpg Protein (Formamidopyrimidine Dna Glycosylase) - Excision Of Purine Lesions In Dna Produced By Ionizing-Radiation Or Photosensitization, *Biochemistry*, Vol 31, Issue: 1, 106-110, **1992**.
- [175] T. R. O'Conner, R. J. Graves, G. de Murcia, B. Castaing and J Laval, Fpg protein of Escherichia coli is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role, *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 9063-9070, **1993**.
- [176] Kubista, M.A., Stalberg, A. ve Bar, T., Light-Up Probe Based Real-Time Q-PCR. In: Raghavachari, R., Tan, W., eds., *Genomics and Proteomics Technologies*. 1st ed. *Proceedings of SPIE*, 53-58, **2001**.
- [177] DeRisi, J.L., Iyer Vr Fau - Brown, P.O., Brown, P.O., Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale, *Science*, 278 (5338), 680-686, **1997**.
- [178] Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders K., Eisen, M. B. ve diğerleri., Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization, *Molecular Biology of the Cell*, 9(12), 3273-3297, **1998**.
- [179] Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K. ve diğerleri., The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (2-3), 95-125., 2006.
- [180] Raymaekers M., Smets R., Maes B., Cartuyvels R., Checklist for optimization and validation of Real-Time PCR assays, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23, 1445-151, **2009**.
- [181] Valasek, M.A., Repa, J.J., The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29 (3), 151-159, **2005**.
- [182] Klein, D., Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations, *Trends in Molecular Medicine*, 8 (6), 257-260, **2002**.
- [183] Cho, R.J., Campbell Mj Fau - Winzeler, E.A., Winzeler Ea Fau - Steinmetz, L., Steinmetz L Fau - Conway, A., Conway A Fau - Wodicka, L., Wodicka L Fau - Wolfsberg, T.G. ve diğerleri. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle, *Molecular Cell*, 2(1), 65-73, **1998**.
- [184] van der Velden, V.H.J., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., van Dongen, J.J., Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects, *Leukemia*, 17 (6), 1013-1034., **2003**.
- [185] Çetinkaya E, Ayhan K., Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Fen Ve Mühendislik Dergisi / Karaelmas Science And Engineering Journal* 2 (1), 53-62., **2012**.
- [186] McPherson M. J. , Moller S. G. , *The Basics*, New York: Cromwell Press; 1-45, **2000**.
- [187] Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology (N Y)*, 11 (9), 1026-1030, **1993**.

- [188] Bridge P. D., Arora D. K., Interpretation of PCR methods for Species Definition, 63-84, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, p.357, **1998**.
- [189] Edel V., *Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview*, 1-20, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, p. 357, **1998**.
- [190] Louie R. F., Tang Z., Albertson T. E., Cohen S., Tran N. K., Kost G. J., Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia, *Critical Care Medicine*, 36(5): 1487-1492, **2008**.
- [191] Haukur Gudnason, Martin Dufva, D. D. Bang, and Anders Wolff, Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature, *Nucleic Acids Research*, 35(19): e127, **2007**.
- [192] U. E. Gibson, C. A. Heid, and P. M. Williams, A novel method for real time quantitative RT-PCR, *Genome Research*, 6: 995-1001, **1996**.
- [193] Mangalathu S. Rajeevan¹, Daya G. Ranamukhaarachchi, Suzanne D. Vernon, Elizabeth R. Unger, Use of Real-Time Quantitative PCR to Validate the Results of cDNA Array and Differential Display PCR Technologies, *Methods*, 25(4): 443-451, **2001**.
- [194] Lekanne Deprez, R.H., Fijnvandraat, A.C., Ruijter, J.M., Moorman, A.F., Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions, *Analytical Biochemistry*, 307 (1): 63-69, **2002**.
- [196] Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., Real time quantitative PCR., *Genome Research*, Oct;6(10):986-94, **1996**.
- [196] Tyagi, S., Kramer, F.R., Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization, *Nature Biotechnology*, 14 (3), 303-308, **1996**.
- [197] Yin, J.L., Shackel, N.A., Zekry, A., McGuinness, P.H., Richards, C., Putten, K.V. ve diğeri., Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I, *Immunology & Cell Biology*, 79 (3), 213-221, **2001**.
- [198] Ginzinger, D. G., Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream, *Experimental Hematology*, 30 (6), 503-512, **2002**.
- [199] Schefe, J., Lehmann, K., Buschmann, I., Unger, T., Funke-Kaiser, H, Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C T difference" formula, *Journal of Molecular Medicine*, 84 (11), 901-910, **2006**.
- [200] Arora, S., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M., Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258 (2), 151-165, **2012**.
- [201] Wahrheit, D.B., Borm Pj Fau - Hennes, C., Hennes C Fau - Lademann, J., Lademann, J., Testing strategies to establish the safety of nanomaterials: conclusions of an ECETOC workshop, *Inhalation Toxicology*, Jun;19(8):631-43, **2007**.
- [202] Becker, H., Herzberg, F., Schulte A., Kolossa-Gehring, M., The carcinogenic potential of nanomaterials, their release from products and options for regulating them, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Jun;214(3):231-8., **2011**.

- [203] Warheit, D.B., Reed, K.L., Sayes, C.M., A role for nanoparticle surface reactivity in facilitating pulmonary toxicity and development of a base set of hazard assays as a component of nanoparticle risk management, *Inhalation Toxicology*, Suppl 1:61-7, **2009**.
- [204] Rozenzhak, S.M., Kadakia, M.P., Caserta, T.M., Westbrook, T.R., Stone, M.O., Naik, R.R., Cellular internalization and targeting of semiconductor quantum dots, *Chemical Communications*, 17:2217–2219, **2005**.
- [205] Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R., H., Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing, *Nature Materials*, 4, 435 - 446, **2005**.
- [206] Jaiswal, J.K., Simon, S.M., Imaging Live Cells Using Quantum Dots, *Cold Spring Harbor Protocols*, **2015**.
- [207] Zhou, D., Quantum dot-nucleic acid/aptamer bioconjugate-based fluorimetric biosensors, *Biochemical Society Transactions*, 40(4) 635-639, **2012**.
- [208] Hardman, R., A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors, *Environmental Health Perspectives*, 114(2): 165-172, **2006**.
- [209] Okkyoung, C., Clevengera, T. E., Denga, B., Surampallib, R. Y., Ross, L. Jr.c, Z. Hua, L., Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity, *Water Research*, 43(7): 1879-1886, **2009**.
- [210] Munari, M., Sturve, J., Frenzilli, G., Sanders, M.B., Brunelli A., Marcomini, A., Nigro, M., Lyons, B.P., Genotoxic effects of CdS quantum dots and Ag₂S nanoparticles in fish cell lines (RTG-2), *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 775-776, 89-93, **2014**.
- [211] Wehrenberg, B. L., Wang, C., Guyot-Sionnest, P., Interband and Intraband Optical Studies of PbSe Colloidal Quantum Dots, *J. Phys. Chem. B*, 106(41): 10634-10640, **2002**.
- [212] Bakueva, L., Gorelikovi, I., Musikhin, S., Zhao, X. S., Sargent, E.H., Kumacheva, E., PbS Quantum Dots with Stable Efficient Luminescence in the Near-IR Spectral Range, *Advanced Materials*, 16(11) : 926-929, **2004**.
- [213] Harrisona, M.T., Kershawa, S.V., Burta, M.G., Eychmüllerb, A., Wellerb, H., Rogach, A.L., Wet chemical synthesis and spectroscopic study of CdHgTe nanocrystals with strong near-infrared luminescence, *Materials Science and Engineering: B*, Volumes 69–70, 14, Pages 355–360, January **2000**.
- [214] Zrazhevskiy, P., Sena, M., Gao, X., Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery, *Chemical Society Reviews*, 39, 4326-4354, **2010**.
- [215] Zhang, Y., Hong, G., Zhang, Y., Chen, G., Li, F., Dai, H., Wang, Q., Ag₂S quantum dot: a bright and biocompatible fluorescent nanoprobe in the second near-infrared window, *ACS Nano*;6(5):3695-3702, **2012**.
- [216] Chen, G., Tian, F., Zhang, Y., Zhang, Y., Li C., Wang, Q., Tracking of Transplanted Human Mesenchymal Stem Cells in Living Mice using Near-Infrared Ag₂S Quantum Dots, *Advanced Functional Materials*, Volume 24, Issue 17, pages 2481–2488, May 2, **2014**.
- [217] Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., Neutral red uptake assay for the

- estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nature Protocols*, 3 (7), 1125- 1131, **2008**.
- [218] Hocoğlu, İ., *Development of Near Infrared Emitting Ag₂X (X: S and Te) Quantum Dots and Hybrid Nanoparticles*, Material Science and Engineering, Koç University September **2014**.
- [219] Zhang, Y., Hong, G., Zhang, Y., Chen, G., Li, F., Dai, H., & Wang, Q., Ag₂S quantum dot: a bright and biocompatible fluorescent nanoprobe in the second near-infrared window, *ACS Nano*, 6(5), 3695-3702, **2012**.
- [220] Donner, M., Tran, L., Muller, J., Vrijhof, H., Genotoxicity of engineered nanomaterials, *Nanotoxicology*, 4345-6, **2010**.
- [221] Fubini, B., Ghiazza, M., Fenoglio, I., Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity, *Nanotoxicology*, 4347-63, **2010**.
- [222] Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Van Ravenzwaay, B., Schulz, M., Wiench, K., Champ, S., Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UVprotection in cosmetic formulations, *Nanotoxicology*, 4364-81, **2010**.
- [223] Warheit, D.B., Donner, E.M., Rationale of genotoxicity testing of nanomaterials: regulatory requirements and appropriateness of available OECD test guidelines, *Nanotoxicology*, 4409-13, **2010**.
- [224] Vandghanooni, S., Eskandani, M., Comet Assay: A Method to Evaluate Genotoxicity of Nano-Drug Delivery System, *Bio Impacts*, 1(2), 87-97, **2011**.
- [225] Santos, A. R., Miguel, A. S., Macovei, A., Maycock, C., Balestrazzi, A., Oliva, A., Fevereiro, P., CdSe/ZnS Quantum Dots trigger DNA repair and antioxidant enzyme systems in Medicago sativa cells in suspension culture, *BMC Biotechnology*, 13(1), 111, **2013**.
- [226] Shiohara, A., Hanada, S., Prabakar, S., Fujioka, K., Lim, T.H., Yamamoto, K., Northcote, P.T., Tilley, R.D., Chemical reactions on surface molecules attached to silicon quantum dots., *Journal of the American Chemical Society*, 132(1): 248–253, **2010**.
- [227] Hoshino, A., Hanada, S., Yamamoto, K., Toxicity of nanocrystal quantum dots: the relevance of surface modifications, *Archives of Toxicology*, 85(7), 707-720, **2011**.
- [228] Farnebo, M., Bykov, V. J., Wiman, K. G., The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, May 21;396(1):85-9. **2010**.
- [229] Goping, I.S., Barry, M., Liston, P., Sawchuk, T., Constantinescu, G., Michalak, K.M., Shostak, I., Roberts, D.L., Hunter, A.M., Korneluk, R., Bleackley, R.C., Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition, *Immunity*, Mar;18(3):355-65. **2003**.
- [230] Oltvai, Z.N., Korsmeyer, S. J., Checkpoints of dueling dimers foil death wishes, *Cell*, Volume 79, Issue 2, 21 October, Pages 189–192, **1994**.
- [231] Jürgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., Reed, J.C., Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.;95(9):4997-5002., **1998**.
- [232] Chipuk, J.E., Green, D.R., How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?, *Trends in Cell Biology*, Apr;18(4):157-64, **2008**.

- [233] Mirkes, P.E., Little, S.A., Umpierre, C.C., Co-localization of active caspase-3 and DNA fragmentation (TUNEL) in normal and hyperthermia-induced abnormal mouse development, *Teratology*;63:134–143. **2001**.
- [234] Mirkes, P.E., Lecture: To Die or Not to Die, the Role of Apoptosis in Normal and Abnormal Mammalian Development, *Teratology*, 65:228 –239, **2002**.
- [235] Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green D.R., The BCL-2 Family Reunion, *Mol Cell*. 2010 Feb 12; 37(3): 299–310. **2010**.
- [236] Choi, Y.J., Kim, Y.J., Lee, J.W., Lee Y., Lim, Y.B., Chung, H.W., Cytotoxic/Genotoxic Effect of CdSe/ZnS Quantum Dots in Human Lung Adenocarcinoma Cells for Potential Photodynamic UV Therapy Applications, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Volume 12, Number 3, March, pp. 2160-2168(9), **2012**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Deniz ÖZKAN VARDAR

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Evli

E-posta : denizozkan@hitit.edu.tr
denizozkantr@gmail.com

Adresi : Hitit Üniversitesi, Sunguroğlu Mah. Cerit Sok. No: 1
Sungurlu / Çorum/Turkey

Eğitim

Lisans : Gazi Üniversitesi – Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Gazi Üniversitesi – Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Doktora : Hacettepe Üniversitesi – Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Yabancı Dil Düzeyi

ÜDS 73,75 Puan / Sağlık Bilimleri

İş Deneyimi

Hitit Üniversitesi – Sungurlu Meslek Yüksekokulu – Öğretim Görevlisi (2008 -)

Deneyim Alanları

Genetik Toksikoloji ve Sitogenetik

- Nötral Kırmızı Alımı ve MTT Sitotoksosite Testi
- Comet Assay (Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği)
- Kromozom Aberasyon Testi
- Kardeş Kromatid Değişim Testi
- Mikroçekirdek Testi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

1. TÜBİTAK 3001 Başlangıç Ar-Ge Destekleme Programı

Proje Başlığı : Kuantum Nokta Nanopartiküllerin V79 Fibroblast Hücrelerinde Sitotoksikite ve Apoptoz Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Proje No : 114S861

Proje Bütçesi : 60.000 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- 1. Özkan-Vardar, D.,** Hocaoglu, I., Yağcı Acar, H. F., Başaran, N., Effects of Silver Sulfide Quantum Dot Coated with 2-mercaptopropionic acid and Meso-2,3-Dimercapto Succinic acid Induced Cytotoxicity by Neutral Red Uptake Assay, European Society of Toxicology In Vitro 2014 International Conference, June 10-13, 2014 - Egmond aan Zee, The Netherlands.
- 2. Özkan-Vardar, D.,** Gökteş, H. G., Hocaoglu, I., Yağcı Acar, H. F., Başaran, N. Effects of Silver Sulfide Quantum Dot Coated with Ag₂S-(2-mercaptopropionic acid) and Ag₂S-(Meso-2,3-Dimercapto Succinic acid) Induced Cytotoxicity by Neutral Red Uptake Assay, "NANOTOX 2014, 7th International Nanotoxicology Congress, April 23rd-26th, 2014, Antalya.