T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR

MİTOKONDRİYAL APOPTOTİK YOLAKLARI KULLANAN NANOMATERYALLERİN SİTOTOKSİSİTESİNİN BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Mustafa YILDIZ

Referans no: 10098336

EDİRNE – 2016

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR

MİTOKONDRİYAL APOPTOTİK YOLAKLARI KULLANAN NANOMATERYALLERİN SİTOTOKSİSİTESİNİN BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Mustafa YILDIZ

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2016/03 ve ÖYP

Tez No:

EDİRNE – 2016

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR'ın danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Araş. Gör. Mustafa YILDIZ tarafından tez başlığı **"Mitokondriyal Apoptotik Yolakları Kullanan Nanomateryallerin Sitotoksisitesinin Biyofiziksel Yöntemlerle İncelenmesi"** olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 30/09/2016 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza
Doç. Dr. Tevfik Gülyaşar
JÜRİ BAŞKANI(Danışman)

İmza
Doç. Dr. Tammam Sipahi
JÜRİ ÜYESİ

İmza
Yrd. Doç. Dr. Suat Çakına
JÜRİ ÜYESİ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Enstitü Müdürü V.
Doç. Dr. Tammam Sipahi

TEŞEKKÜR

Tezim süresince desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi danışman hocam Doç. Dr. Tevfik Gülyaşar'a, Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Tammam Sipahi'ye Yüksek Lisans eğitimim boyunca birlikte olmaktan mutluluk duyduğum tüm değerli arkadaşlarıma, Süleyman Demirel Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu'na ve Araştırma Görevlisi Ahmi Öz'e teşekkür bir borç bilirim. Projeme maddi destek sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Komisyonu üyelerine ve Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim. Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan en büyük destekçim Vilma Rufon'a, yetişmemde ve bugünlere ulaşmamda büyük emekleri olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ ve AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

NANOMATERYALLER 3

NANOPARÇACIKLARIN SENTEZLENME YÖNTEMLERİ 7

NANOMATERYAL KARAKTERİZASYONU 17

NANOPARÇACIKLARIN SİTOTOKSİTESİ 17

APOPTOZUN DÜZENLENMESİNDE GÖREV ALAN GEN BÖLGELERİ 23

GEREÇ ve YÖNTEM 31

BULGULAR 50

TARTIŞMA 74

SONUÇLAR 80

ÖZET 82

SUMMARY 83

KAYNAKLAR 84

ŞEKİLLER LİSTESİ 97

ÖZGEÇMİŞ 100

EKLER 101

SİMGELER ve KISALTMALAR

Ag	**:** Gümüş
Apaf-1	**:** Apoptoz Aktive Edici Faktör-1
Ca^{2+}	**:** Kalsiyum İyonu
cDNA	**:** Komplementer DNA
DHR 123	**:** Dihydrorhodamine 123
DMEM	**:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	**:** Dimetil Sulfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FBS	**:** Fetal Bovine Serum
GAPDH	**:** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
IC50	**:** Half Maximal Inhibitor Concentration
kDa	**:** Kilodalton
mRNA	**:** Mesajcı Ribonükleik Asit
MTT	**:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NP	**:** Nanoparçacık
RNA	**:** Ribonükleik Asit
ROT	**:** Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	**:** Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SD	**:** Standart Sapma
SEM	**:** Taramalı Elektron Mikroskobu
SiO_2	**:** Silisyum Dioksit
TEM	**:** Geçirimli Elektron Mikroskobu
TiO_2	**:** Titanyum Dioksit
ZnO	**:** Çinko Oksit
MMD	**:** Mitokondriyal Membran Depolarizasyonu

GİRİŞ ve AMAÇ

Nanoteknoloji, materyalleri nano boyutta incelemeye yarayan, disiplinler arası oldukça yaygın olarak ilgi gösterilen bir teknolojidir. Modifiye edilen nanoparçacıkların boyutları <100 nm altında ise bu materyaller nanoparçacık olarak adlandırılır (1). Nanoteknolojinin 2015 yılında market hacminin 1 trilyon dolar olduğu tahmin edilmektedir. Bu nanoparçacıkların dünya genelinde çok fazla kullanılması, bu maddelerin üretiminde ve kullanımlarında nedeni bilinmeyen bazı sağlık sorunlarını ortaya çıkarmıştır. Son yıllarda, bu materyallerin neden olduğu sağlık sorunlarının araştırılması için çok sayıda çalışma yapılmaktadır (2). Günümüzde bu maddelerin insan sağlığı üzerinde etkilerini araştırma çalışmaları popülarite kazanmıştır. Nanoparçacıklar elektronik, tekstil, kozmetik, lastik ve ilaç taşıma sistemleri gibi birçok alanda kullanılmaktadır (3). Bu parçacıkların sentezinde birden fazla yöntem kullanılmaktadır. Mekanik aşındırma (4), alev sentezi (5), ve sol-jel metodu (6) bu yöntemler arasında bulunmaktadır. Alev sentezi yöntemi bu yöntemler arasında daha fazla ürün çıktısı olduğu için daha öne çıkan yöntemdir. Nanoparçacıklar sentezlenmesinde birden fazla materyal başlangıç maddesi olarak kullanılabilir bunlar arasında alaşımlar, metal oksitler, multi-metal oksitler ve daha fazlası. Ancak bu nanomateryaller arasında en fazla ticari değeri olan nanomateryaller oksit türevli olan nanoparçacıklardır. Çinko oksit (ZnO), alüminyum oksit (Al_2O_3), demir oksit (Fe_3O_4), titanyum dioksit (TiO_2) ve silisyum dioksit (SiO_2) bunlar arasında en fazla tercih edilen oksit türevli nanomateryallerdir (7). Bunların yanı sıra karbon nanotüplerde (KNT) bu teknolojide yaygın olarak kullanılmaktadır (8). Son yıllarda, nanomateryaller ile yapılan çalışmalara çok fazla ilgi vardır.

Bu çalışma, nanoparçacıkların sitotoksik etkilerini, bu maddelerin *in vitro* olarak uygulanması ile toksisitesi arasındaki ilişkiyi irdelemek için düşünülmüştür. Biz bu çalışmadaki planlamamızı, üç farklı tipte (ZnO, SiO_2 ve Ag) nanoparçacıkların, MCF-7 ve HT-29 hücre hatlarında biyolojik etkileşimi sonucu neden olduğu toksisite testleri, ROT'un indüklediği apoptozun nedenleri ve bu nanoparçacıklara karşı hücre hatlarında meydana gelen tepki, hasar ve sitotoksik etkileri gen ekspresyonu ve spektrofotometrik yöntemler ile araştırılması üzerine oluşturduk.

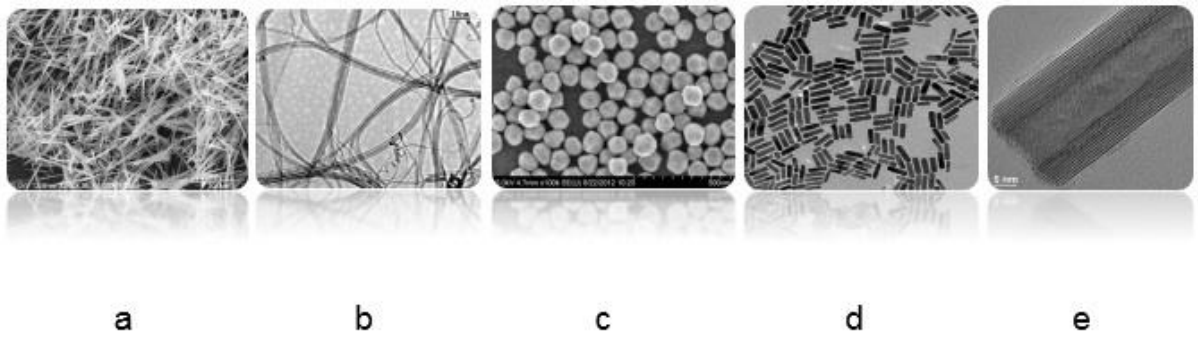
GENEL BİLGİLER

NANOMATERYALLER

Nanomateryaller, belirli bir boyuttaki malzemenin büyüklüğü ’nün 1-100 nm arasında olması durumunda bu maddeler Ulusal Nanoteknoloji İnisiyatifi (NNI) tarafından nanomateryal olarak sayılır. Son zamanlarda nanoteknolojinin gelişmesi ile birlikte eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olan nanoparçacıkların geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Nanomateryallerin bu özellikleri dolgu, opaklaştırıcı, katalizör, yarıiletken, mikro elektronik, kozmetik, terapötik, diagnostik ve ilaç taşıyıcı olarak çok yaygın bir şekilde kullanılması ortaya çıkarmıştır. Nanomateryallerin şu an hala klinik uygulanabilirliğine ve uygunluğuna yönelik birçok çalışma yapılırken, bu malzemelerin sahip oldukları fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle biyolojik çalışmalarda, başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde ve teşhisinde umut vaat eden malzeme arasında gösterilmektedir. Modifiye edilmiş nanoparçacıklar, metal oksit parçacıklar, polimer nanoparçacıklar, kuantum noktalar ve diğer türlerde olanları yaygın olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır (9). İnsan sağlığına zarar veren bu sitotoksik etkinin, maddenin kimyasal yapısı, boyutu, yüzey özellikleri ve morfolojisi gibi birçok etki eden faktörler vardır (10). NNI tarafından 2015 yılına kadar nanoteknoloji sektöründe ABD’de 2 milyon insanın çalışacağını ve trilyon dolarlarca para ülke ekonomisine katkı sağlayacağını bildirilmiştir (11). Nanoteknoloji alanında tahminlere göre endüstri devriminin neden olduğu etkinin bile çok ötesinde bir etkiye neden olacağı tahmin edilmektedir.

2015 yılında nanoteknoloji alanın dünyadaki pazar payı 1 trilyon dolardan daha fazladır. Nanoparçacıklar ne sıvı, ne gaz ne de katılar gibi davranırlar ve kuantum fiziğinde farklı bir yere konumlandırılmışlardır. Nanoparçacıklar insidental ve modifiye edilmiş olarak iki kategoride ele alınabilir. İnsidental nanoparçacıklar endüstride yakma süreçlerinin sonucu olarak ortaya çıkar. Modifiye edilmiş olan nanoparçacıklar ise mühendislik, üretim ve tüketici kullanımını için modifiye edilen spesifik nanoparçacıklardır (12,13).

Şu ana kadar kullanılan nanoparçacıkların üretimi çok fazla miktarda değildir. Öngörülen bir düşünceye göre 2004 yılında modifiye edilmiş nanoparçacıkların miktarı 2000 ton iken bu oranın 2011-2020 tarihleri arasında 58000 ton ulaşması beklenmektedir (13). Modifiye edilerek üretilen nanoparçacıkların kullanım alanları sınırsızdır. Nanomateryallerin elektrik aletleri, kozmetik, boya ve benzeri birçok alanda kullanımı giderek artmaktadır. Son yıllarda, nanomateryallerin kullanımı biyomedikal ve biyoteknolojik alanlarda ilaç/gen taşıyıcı, hastalık teşhisi, tümörlü hücrelerin takibi ve görüntüleme alanları bu materyallerin tıp alanında kullanıldığı alanlardan bazılarıdır (14). Farklı boyutlarda nano taşıyıcılar, biyouyumlu polimer miseller (15-17), lipozomlar (18), yüzey modifiyeli nanoparçacıklar (19,20), katı lipit nanoparçacıklar (21); bunların hepsi belirli amaçlar için geliştirilmiş olan nano taşıyıcılara örnek oluşturur. Şekil 1'de nanomateryallerin boyutlarına ve şekillerine göre, nanotüp, nanoparçacıklar, nanoring, nanokafes, veya nanoteller olarak gösterilmiştir.



Şekil 1. Nanomateryal çeşitleri A- Nanoteller B- Tek duvarlı nanotüp C- Nanoparçacıklar D- Nanoçubuklar E- Çok duvarlı nanotüp (22)

Nanomateryal olarak kullanılan element ve moleküllerin sayısı şu an da sınırlı olup; bunlar arasında sırasıyla gümüş, karbon nanotüpler, fullerenler, titanyum, titanyum dioksit, silisyum, silisyum dioksit, çinko ve çinko oksit (23) en sıklıkla kullanılanlardır. Organik lipitleri içeren, polimerler, inorganik silisyum, kuantum noktalar, seramik, diğer metaller ve bakır oksit demir oksit alüminyum oksit gibi metal oksit türleri ve hibritlerde nanomateryal olarak kullanılmaktadır (16,24,25).

Uygulama alanlarının sayısı her geçen gün artması ile nanoparçacıkların biyolojik canlılar için oluşturduğu riskler dolayısıyla "Nanotoksikoloji" adında yeni bir disiplin ortaya çıkmıştır (26). Nanomateryallerin boyutu, yapısı, çözünebilirliği, agrede olması, bu materyallerin çok farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olması ile bağlantılıdır. Bu eşsiz olan özelliklerinden dolayı biyolojik etkileri tam olarak tanımlanamamıştır. Bu özelliklere sahip olması bu materyallerin biyolojik canlılar ile olan etkileşimi açısından iki taraflı bir araştırma olanağı sağlamaktadır. Bunlardan ilki bu maddelerin toksik etkilerinin, ikinci olarak ta bu materyallerin teşhis ve tedavide kullanılabilme olasılıklarının araştırılmasıdır (1,27-30).

Kanser ve Kanser Hücrelerinin Diğer Hücrelerden Farkları

Hücreler programlı hücre ölümü ya da nekroz ile yok olurken, bir yandan da büyüme faktörleri aracılığıyla çoğalmaktadır. Kanser, hücrelerinin kontrolsüzce bölünüp çoğalması sonucu ortaya çıkmış bir hastalıktır. Kanser hücrelerinin %85 epitel hücrelerinden türevlenirken ve karsinoma sınıfına girerken, mezoderm hücrelerinden türevlenenlere sarkoma ve bezsel dokulardan türevlenirse bunlara adenokarsinoma adı verilir (31,32). Kanser hücreleri pek çok karakteristiğe sahiptirler aşağıdaki Tablo 1'de normal hücreler ile kanserli hücreler arasındaki farklar konulmuştur.

Tablo 1. Normal hücreler ile kanser hücrelerinin bazı özelliklerinin karşılaştırılması (31,33)

	KANSER HÜCRELERİ	NORMAL HÜCRELER
Büyüme sinyal otonomisi	Kanser hücreleri büyüme faktör sinyallerine ihtiyaç duymazlar.	Normal hücreler bölünmek için büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar.
Metastaz	Kanser hücrelerinin vücudun bir yerinden diğer yerine hareket ederek metastaz yaparlar. Buda kanser ölümlerinin en önemli nedenidir.	Normal hücreler vücutta yerlerine bağlıdırlar ve genelde göç etmezler.
Anjiyogenez	Kanser hücreleri, yeni kan damarları oluşturarak tümörün yayılması için anjiyogenezi tetiklerler.	Normal hücreler oksijen ve besin sağlamak için kan damarlarına bağlıdırlar. Fakat damar yapısı yetişkinlerde sabittir.
Limitsiz replikasyon potansiyelleri (İmmortalite)	Kanser hücreleri sınırsız sayıda bölünürler. Kanser hücrelerindeki telomerler telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler. Sonuç olarak, telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda bölünür.	Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçlarında bulunan telomerlerdir. Hücreler bölünürken çoğu normal hücre tiplerinden telomerler gittikçe kısalır.
Apoptozisin etkisiz hale gelmesi	Kanser hücreleri apoptotik sinyallerden kaçarlar.	Normal hücreler DNA hasarına yanıt olarak apoptozise giderler.
Büyüme inhibitör sinyallerinin etkisiz hale gelmesi	Kanser hücreleri bölünmeyi inhibe edici faktörlere cevap vermezler.	Normal hücreler homeostaziyi sağlamak için inhibitör sinyallere cevap verirler.

NANOPARÇACIKLARIN SENTEZLENME YÖNTEMLERİ

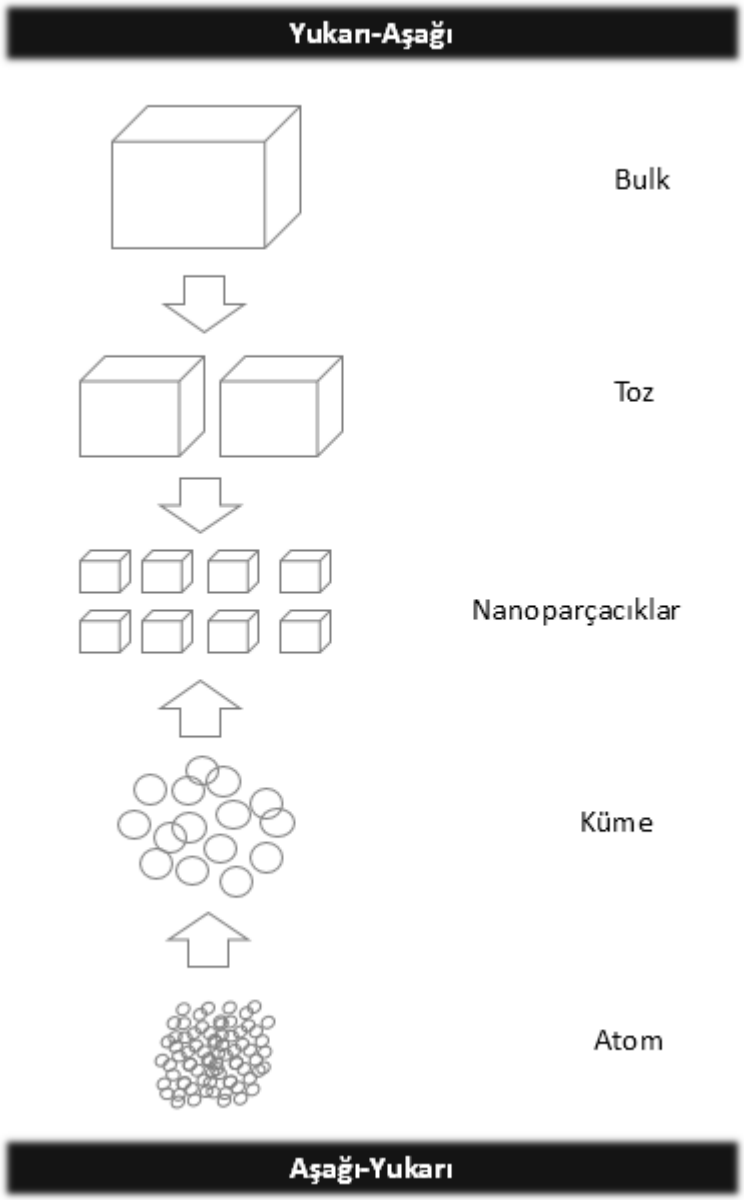
Metal türevi olan np'lere ilgi her geçen gün kullanıldıkları alanların fazlalaşması ile birlikte, bu parçacıklarında sentezlenmeleri için yeni yöntemler geliştirilmektedir. Nanoparçacıklar katı, sıvı ve gaz fazdan oluşan proseslerle sentezlenebilirler. Hangi fazdan hangi yöntemlerle nanoparçacık üretildiği Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2. Nanomateryallerin üretim ve sentez yöntemleri (34)

Başlangıç Fazı	Üretim Tekniği
Gaz	• Alev Sentezi Yöntemi • Asal Gaz Yoğunlaştırma Yöntemi • Fiziksel Buharlaştırma Yöntemi • Kimyasal Buharlaştırma Yöntemi
Sıvı	• Hızlı Katılaştırma Yöntemi • Sol-Jel • Elektrodepolama • Püskürtmeli Dönüşüm Prosesi
Katı	• Mekanik Aşındırma Yöntemi • Devitrifikasyon Yöntemi

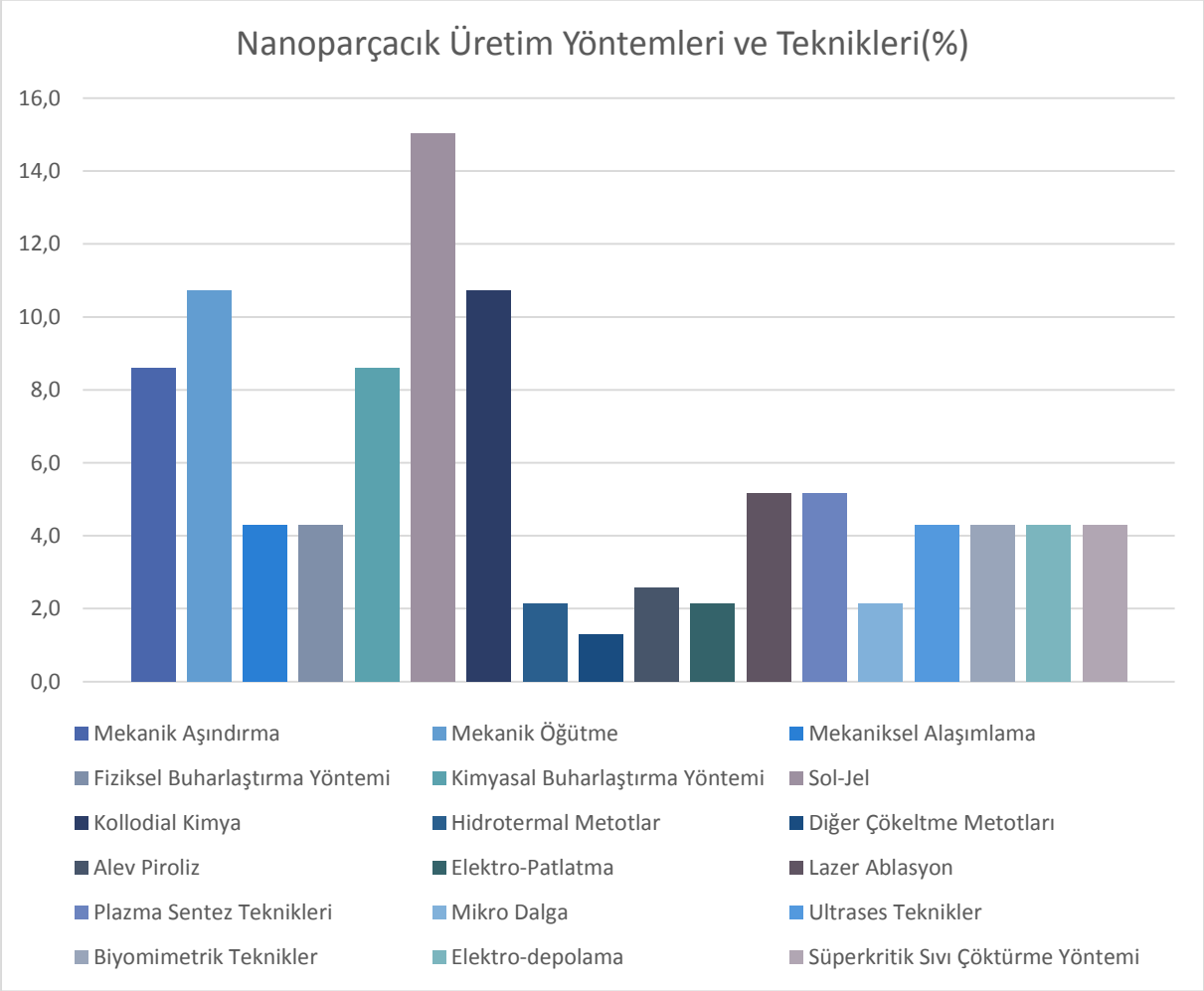
Nanoteknolojideki en önemli adımlardan biri nano-yapılı malzemelerin hayatımıza girmesiyle bu malzemelerin üretiminin daha rahat ve ucuz yapılabilmesi için, nanopartikül üretimi ve sentezlenmesi konusu önemli araştırma konuları arasındadır. Nanoteknolojik maddelerin üretiminin en önemli altyapısı olan nanopartiküllerin üretimi, çok geniş ve farklı kimyasal yapıda ve morfolojide sentezi sağlanabilir. Günümüzde, metal, metal alaşımı, seramik ve polimer esaslı kimyasal bir formasyona sahip küresel, boşluklu, çubuk, katkılı ve çekirdek-kabuk morfolojisinde birçok nanopartikül hazırlanabilmektedir. Nanoparçacıkların üretiminde kullanılan iki çeşit yöntem vardır; aşağıdan yukarı 'Bottom-Up' ve yukarıdan aşağıya ''Top-Down'' olarak adlandırılan yöntemler Şekil 2'de gösterilmiştir.

Yukarıdan aşağıya yönteminde hacimsel materyale kimyasal ve/veya mekanik işlemler ile malzemeye enerji aktarılarak nano boyuta kadar indirgenilen yöntemdir. Yukarıdan aşağıya çalışma yöntemine örnek olarak mekanik aşındırma ve öğütme verilebilir. Aşağıdan yukarıya olan yöntemde ise atomik veya moleküler boyutta yapıları kimyasal yöntemlerle parçacık hale getirilmesi yöntemidir (35).



Şekil 2. Nanoparçacık sentezleme metodu

Metalik ve oksit türünde nanopartikül imal edilmesinde en fazla kullanılan yöntemler ise alev sentezi, mekanik aşındırma, hidrojen redüksiyonu, mikroheterojen sistemlerden üretim, ultrasonik sprey piroliz, asal gaz yoğunlaştırma ve kimyasal buhar yoğunlaştırma vs. yöntemler nanopartikül üretiminde kullanılan bazı yöntemlerdir. Aşağıdaki Şekil 3'de nanoparçacık üretim yöntemleri ve teknikleri yüzde olarak verilmiştir.



Şekil 3. Nanoparçacık sentezleme yöntemleri yüzde olarak göstergesi

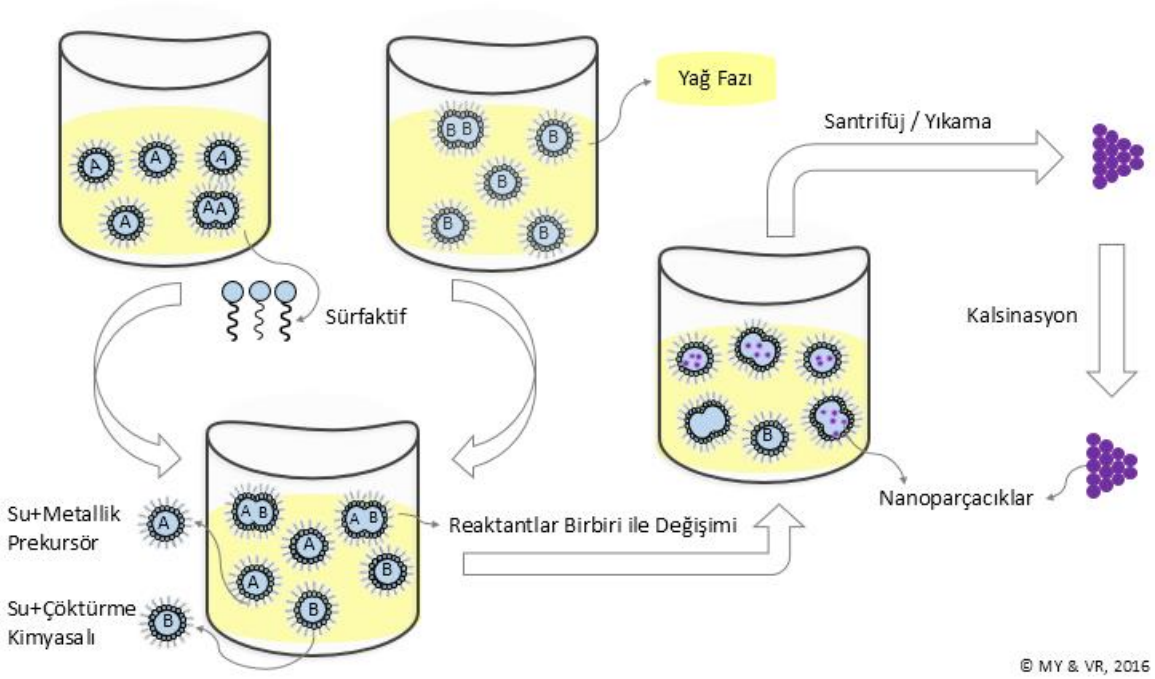
Mikroheterojen sistemlerden nanopartikül üretimi

Mikroemülsiyon makro ölçekte homojenizasyon ve mikroheterojen sistem ise nano ölçekte iki birbiri ile karışmayan sıvıyı ya bir sıvıyı diğerinde heterojenize ederek ya da ikisini bir arada karıştırarak, aktif moleküller ve filmler sayesinde stabilize hale

getirilen sistemin adına mikroheterojen sistem adı verilir. Normal emülsiyon ve mikroemülsiyon arasındaki fark parçacık boyutu ve stabilize edilme farklılıklarından gelmektedir. Mikroemülsiyonlarda çok düşük yüzey gerilimi, daha geniş yüzey alanı, ya her iki sıvının birbirinde çözülmesi ya da bu maddelerden birinin sıvı-yağ yapılarından birinde çözülmesi sistemidir. Mikroheterojen sistemler oluşturan formlar; jeller, sıvı kristaller, misel çözeltileri ve mikroemülsiyonların farklı formlarında olabilir. Bu teknik nanoparçacıkların üretiminde, hızlı senteze olanak sağlaması ve düşük maliyetli olması nedeni ile metaller, oksitler, sülfatlar ve suda çözünmeyen inorganik ve organik moleküllerin nanopartikül olarak sentezlenmesinde kullanılan yaygın bir metottur. Mikroheterojen sistemlerle üretilen nanopartiküllerin birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Bunlar elektrik, medikal ve otomotiv sanayisinde çok sıklıkla kullanılmaktadır (36). Mikroheterojen sistemlerle Şekil 4'te gösterildiği gibi nanopartikül üretimi ve aşağıdaki sırayla takip edilen bir dizi sentez aşamasından oluşmaktadır.

1) Sentezlenmek istenen nanoparçacık için uygun olan mikroheterojen sistemin seçilmesi
2) Reaktantların çözümlenmesinden sonra yapılarının karakterizasyonu ve incelenmesi
3) Karıştırma ve zamana bağımlılığından ortaya çıkan sistemin özeliklerinin karakterizasyonları

Bu yöntem ile elde edilen malzemelerin endüstride birçok uygulaması vardır; fotoğrafik görüntüleme ve yarıiletkenler için gümüşlü bileşimler, kataliz için TiO_2, Rh, Pt vs. uygulama alanlarından bazılarıdır. Poröz, çekirdek-kabuk, sandviç veya katkılı nanopartiküllerin üretiminde kolaylıkla kullanılabilmektedir. Mikroemülsiyon yöntem ile birçok nanoparçacık hazırlanabilir. Bunlardan bazıları şunlardır; metal içeren nanoparçacıklar (Cu, Ir, Pt, Ag, Pd, Au, , Rh) (37), silisyum ve diğer oksit türevliler (38,39), polimer tipte (40), yarıiletkenler (41), çekirdek kabuk şeklinde ya da kaplama yöntemi ile elde iki-metalli nanoparçacıklar (Ag/Cu, Pt/Pd, Pt/Ir, Pt/Ru, Ag/Au, Pt/Rh) (42,43) bu yöntem ile çok daha düşük boyutlarda sıvı solüsyonlar içinde nanoparçacıklar elde etmemizi olanak veren bir yöntemdir (44).



Şekil 4. Mikroheterojen sistemlerden nanopartikül üretimi

Mekanik Aşındırma Yöntemi

Mekanik aşındırma (MA) 1970'li yıllarda endüstri için toz partiküller üretmek için geliştirilmiş olan, ilerleyen zamanlarda faz karışımların ve yeni alaşımların üretimi de bu yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Mekanik öğütücülerle boyut küçültme işleminin temelinde, numune ile öğütücü ortam arasındaki çarpışmalar sonucu enerji aktarım sistemine dayanır. Bu yöntem yukarıdan aşağıya üretim yöntemini kullanmaktadır. Mekanik aşındırma yönteminde intermetalik, seramik, alaşım ve kompozit gibi amorf veya nano-yapılı materyallerin geniş bir bileşim aralığında sentezi gerçekleştirilebilmektedir. Bu teknikte kullanılmakta olan öğütücü türleri aşağıda listelenmiştir (35).

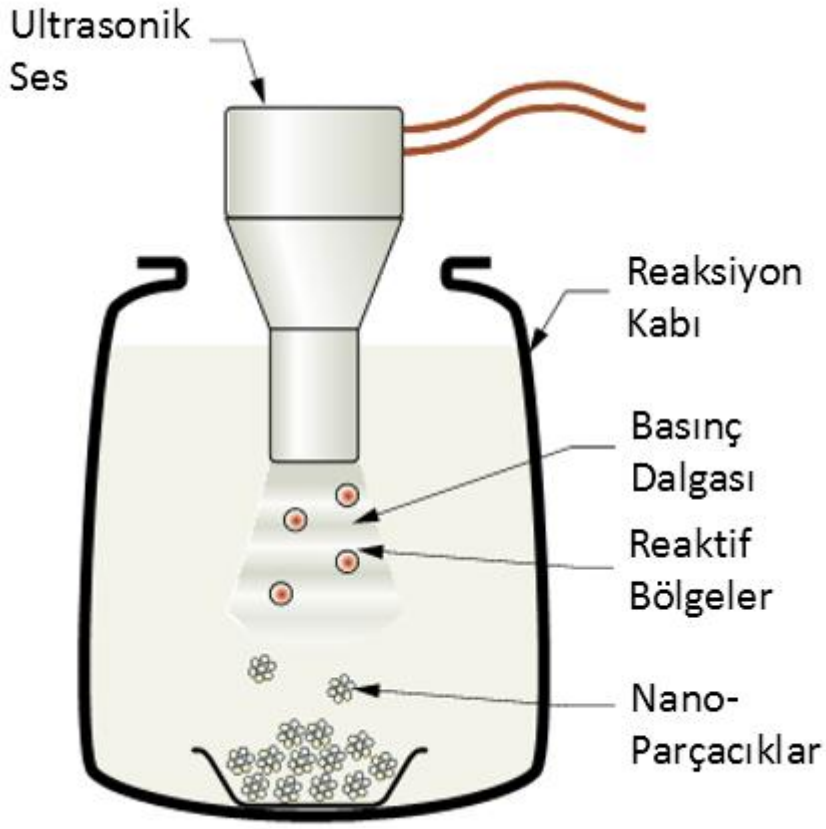
1) Aşındırmalı Öğütücüler
2) Titreşimli Öğütücüler
3) Gezegen Öğütücüler
4) Yüksek Enerjili Bilyeli Değirmenler

Tozların nanopartikül hale getirilirken, gerekli enerji öğütücülerin yüksek frekansta ve düşük genlikte titreşimler oluşturmasıyla elde edilir. Bu sentez işlemin en büyük dezavantajlarından biri öğütücü içerisindeki bilyelerden dolayı sentezlenmek istenen nanopartikülün saflığını etkilemektedir. Diğer bir dezavantaj ise öğütücüdeki

nanopartiküllerin havadaki oksijen ve azotla tepkimeye girerek yüzeyleri üzerinde azotlu yapıların oluşmasına ve oksitlenmesine neden olmaktadır (45).

Sonokimyasal Proses Yöntemi

Sonokimyada, yüksek yoğunluğa sahip ultrasonik dalgaların üretilmesi ile sıvı içerisinde istenilen bölgelerde sıcaklık ve basıncın aşırı derecede artmasına yol açan enerji üretilerek kimyasal reaksiyon oluşturulma yöntemidir. Ultrases kap içerisinde kavitasyona neden olarak akustik bir ortam oluşturur. Sıvı, ultrasonik dalgaya maruz kaldığında, sıvı içerisinde daha geniş ve basıncı yüksek akustik dalgalar meydana gelir. Negatif basınç uygulandığında, sıvı içerisinde “zayıf noktalar” adında bazı aralık formları oluşur. Bu zayıf noktalar sıvı içerisinde bazı bölgelerde gaz birikimlerinin oluşmasına neden olur. Bu gaz birikimleri eğer sıvı içerisinde çözülmezse, Ultrasonik ses dalgaları herhangi bir kimyasal etki gösterememektedir (46). Sonokimyasal proseste nanopartikül üretmek için ultrasonik dalgalarla, kimyasal reaksiyonunun tetiklenmesi sağlanan sentez yöntemidir. Ultrasonik dalganın frekans aralığı 15 kHz ile 1 GHz arasındadır. Şekil 5’de görülen piezoelektrik kristalleri aracılığıyla 1-10000 mikron arasındaki dalga boylarında ses dalgası üreterek, sıvı dolu reaksiyon kabında titreşimlere neden olur.

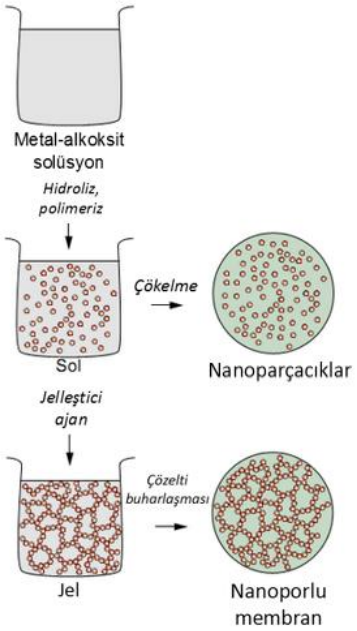


Şekil 5. Sonokimyasal proses yöntemi şematik gösterimi (47)

Oluşturulan dalga sayesinde bazı reaktantlar içeride buhar haline gelir. Ultrasonik dalgalar, başlangıçta oluşan parçacık çözeltisinin durdurulması ve aglomera ve kolonyal kütlelerinin kırılmasına neden olur. Bunun sonucunda sonokimyasal metot ile parçacıkların boyutlarında büyük oranda bir küçülme meydana gelir. Ultrasonik dalgalar iki temel etkiye neden olmaktadır. Bunlardan birincisi çözelti içinde dispersiyon ile birlikte var olan aglomera malzemenin kırılmasının sağlanmasıdır (48). Laboratuvar ortamında kullanılan ultrasonik banyolarda veya ultrasonik homojenizatörlerle de gerçekleştirilebilen bu işlem genel olarak temizleme ve maddeyi dispers etmek amaçlıdır. Dispersiyon etkisi aglomera kütleler arasındaki bağlanma kuvvetinin ortadan kaldırılması ile meydana gelir. Deaglomerasyon ve dispersiyon, ultrasonik kavitasyonun bir sonucudur. Ultrasonik kavitasyon sonucu oluşan basınç etkisi ile partiküller arasındaki bağlayıcı kuvvetlerde mekanik stres oluşumuna, buna bağlı olarakta mikron altı seviyeye parçalanma ve dispersiyon gerçekleşir (49).

Sol-Jel Yöntemi

Sol-Jel metodu daha düşük sıcaklıkta oksit türevli nanomateryallerin üretilmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Örneğin; üzerinde bulunan gözenekler sayesinde, daha kompleks oksit türevli nanoteller yapılmak içinde kullanılır. Bu yöntem diğerlerine göre dahi iyi homojenize olmuş parçacıkların elde edilmesine olanak sağlarken diğer yöntemlerden daha pahalı ve verimi daha düşüktür (50). Sol-Jel yöntemi ile nanoboyutta ince filmler, ultrasaf nanoparçacıklar ve nanoporlara sahip membranların elde edilmesinde kullanılan en iyi sentez yöntemlerden biridir. Başlangıç malzemesi olarak metal alkoksitler, organik ve inorganik tuzlar kullanılır. Sol adı verilen polimerizasyon reaksiyonun oluşması için, Şekil 6'da gösterilen basamaklar takip edilerek reaksiyonu daha iyi bir şekilde öğütmek için yüzeye aktif madde eklenir ve kolloidal süspansiyonun bir formunu elde edildikten sonra, derişik hale gelen çözeltinin jel olarak yoğunlaştırılmasıdır.

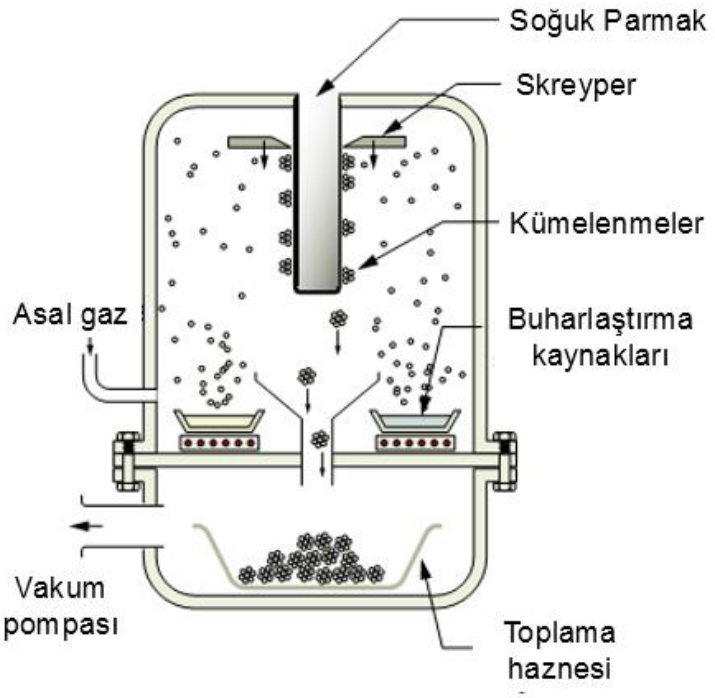


Şekil 6. Sol-Jel yöntemi (47)

Bu çözeltiden elde edilecek çökelti, yıkama ve kurutma işlemleri ile yapının son formunun verileceği kalsinasyon aşamasına hazırlanır. Yüksek sıcaklıkta meydan gelen kalsinasyon işlemi ile yapı son haline ulaştırılır. Sol-jel tekniğinde elde edilen son ürünü etkileyen en önemli faktörler, hidroliz ve yoğunlaşma hızıdır.

Asal Gaz Yoğunlaştırma (AGY) Yöntemi

İlk defa 1984 yılında Birringer ve arkadaşları (51) tarafından nanopartikül üretimi için kullanılan asal gaz yoğunlaştırma (AGY) yöntemi, inorganik materyal, nanokristalin alaşımlarının ve metallerinin direkt olarak aşırı doygun buhar fazından üretildiği en eski tekniklerden biridir. Buharlaştırma botu ve hedefe yönelik lazer ablasyonu buharlaştırma kaynakları arasındadır. Şekil 7'de bulunan düzenekte AGY yönteminin parçaları gösterilmektedir. Buhar oluşumuna başlamadan önce sistem 1-50 mbar arasında vakuma alındıktan sonra asal gaz ile doldurulur. Elektron tabancası ya da lazer gibi enerji kaynakları ile başlangıç malzemesi buharlaştırılır. Buharlaşan atomlar veya moleküller kaynağın etrafında kümelenir. Buharlaşan atomlar sistem içinde bulunan gaz molekülleri ile çarpışarak enerjilerini kaybetmeleri ile parçacık oluşumu, soğuk parmak etrafında meydana gelir. Yüksek gaz basıncı olması durumunda daha fazla çarpışma meydana gelip soğuma gerçekleştiğinde çok daha küçük partiküllerin sentezlenmesine olanak sağlar.

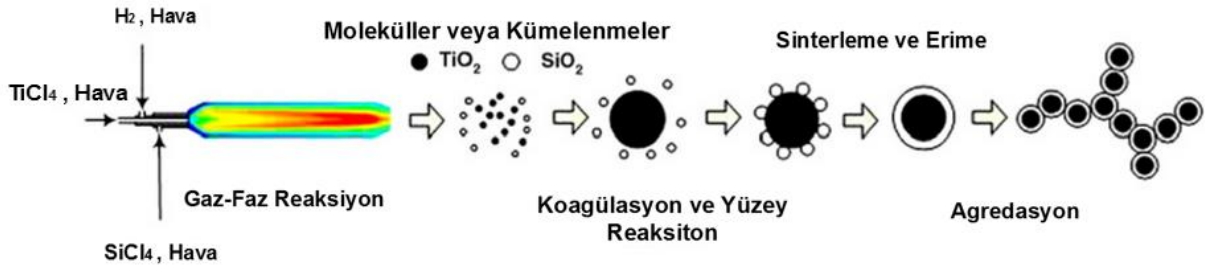


Şekil 7. Asal gaz yoğunlaştırma (AGY) yöntemi şematik gösterimi (47)

Bu yöntemde dikkat edilmesi gereken bazı şeyler gazın adyabatik genişlemesinden dolayı, buharlaşan bazı atomlar ani soğumaya neden olur. Bu soğuma nedeniyle birkaç nanometre mertebesinde olsa nanoparçacıkların kümelenmesine neden olur. AGY dikkat edilmesi gereken asal gaz akışı olduğundan dolayı, istenilen parçacık dağılımı ve boyutu oluştuğunda sistemin çalışmasını durdurmak gerekmektedir. Aksi halde istenilen parçacık yerine farklı özelliklere sahip parçacıklar sentezlenebilir.

Alev Sentezi Yöntemi

Alev sentezi yöntemi diğer nanopartikül üretim yöntemlerine göre daha az enerji gerektiren ve daha az maliyetli bir üretim yöntemidir. Enerji kaynağı olarak kullanılan ısıtıcı aynı zamanda reaktant olarakta kullanılır. Her yıl milyonlarca ton karbon siyahı ve metal oksit üretimiyle bu yöntem dünyada en fazla nanopartikül üretilen sistemdir. Flame'le üretildiği için oksit türevli olan nanopartiküllerin sentezinde en başarılı yöntemlerden biridir. Şekil 8'de görüldüğü gibi metal halojenürler kolay uçuculuğa sahip olduğu için başlangıç malzemesi olarak kullanılır. Bu malzemeyle ilk önce sistem beslenir ve oksijen ile atomize olarak ince sprey bir yapı oluşmasını sağlar. Sprey nozulünün merkezinde olan buharlaşma ve tutuşma, spreyin ucundaki küçük alev halka ile gerçekleştirilir. Oluşan buhar fazının oksijen ya da hidrojen gibi bir gazla ile alev ortamına taşınması ile reaksiyonlar gaz fazında gerçekleşir. Yanma işleminden sonra sıvı fazdan gaz fazına geçilir. Buhar yoğunlaşması ile nanopartiküller oda içinde toplanır (35).



Şekil 8. Alev sentezi ile sentezlenen nanoparçacıkların şematik sentez aşamaları (52)

NANOMATERYAL KARAKTERİZASYONU

Nanomateryaller ve nanoyapıların karakterizasyonu, daha büyük ölçekli materyallerin karakterizasyonunda kullandığımız geleneksel metotlar, nanoyapılar içinde geçerlidir. Nanomateryallerin karakterize edilmesi bu parçacıkların neden olduğu toksisiteyi de anlamamızı sağlar. Bu maddelerin sentezinden sonra karakterize edilmesi ile materyalin uygun sıvı çözeltilerde dispers hale getirilmesiyle *in vitro* ve *in vivo* olarak doğru dozların uygulanmasına olanak sağlar. Bu maddelerin karakterizasyonunda belli bazı teknikler kullanılır. Bunlar arasında kompozisyonların karakterize edilmesinde kullanılan yöntemler ve cihazlar sırasıyla, Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDS), Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi (AAS) veya İndüklenebilir Plasma Spektroskopisi (ICPS) kullanılır. Ters Gaz Kromatografisi Ve Brunauer, Emmett Ve Teller (BET) teknikleri ise bu maddelerin büyüklük oranları ve yüzey alanları hakkında karakterizasyonda kullanılan tekniklerden bazılarıdır. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)'de bu maddelerin boyu ve morfolojileri hakkında bilgi sahibi olmamıza yarayan yöntemler arasındadır (53). SEM tekniği çoğunlukla maddelerin yüzeylerini incelemek için kullanılır. 1x1x1 cm boyutlarında olan bütün materyaller bu yöntemle rahatlıkla incelenebilir. Bu teknikte eğer madde iletken değilse, altın veya karbon kaplama sayesinde elektron yüklenmesi ve görüntü oluşacak bazı bozulmalar engellenmiş olur. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) yüzey üzerinde atomik kuvvet uygulayarak yüzey üzerinde hareket ederek tarama yapar. Bunlara ek olarak, AFM ile iletken olmayan materyaller üzerinde de çalışılabilir. EDS sistemi ise TEM ve SEM sistemlerine entegre olan bir sistemdir.

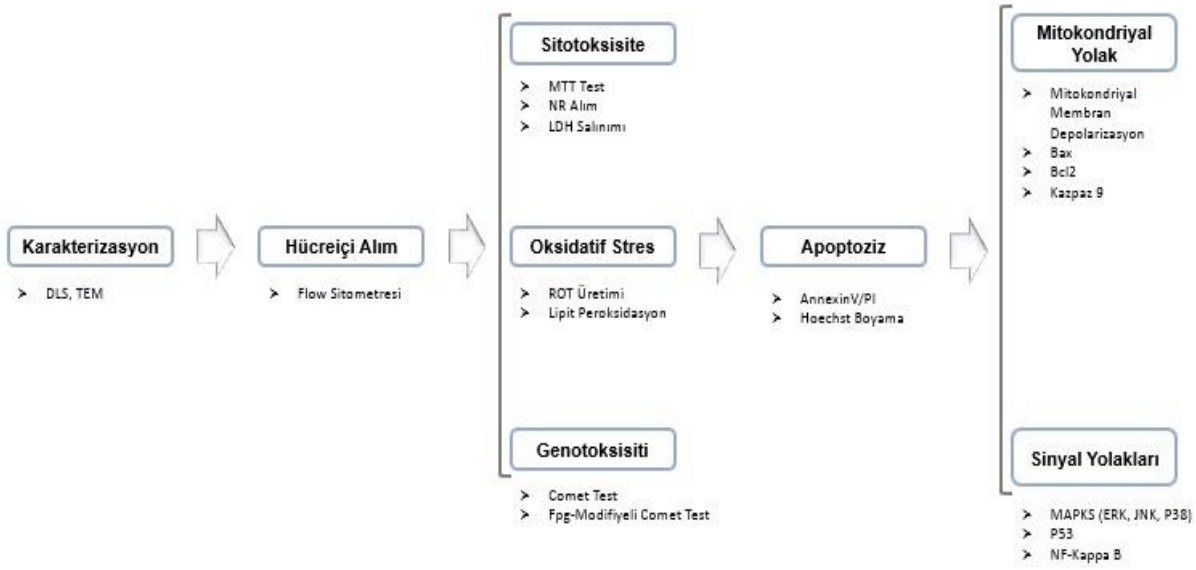
NANOPARÇACIKLARIN SİTOTOKSİTESİ

Nanoparçacıkların farklı alanlarda kullanımı ile birlikte bu maddelere maruz kalan insan veya diğer memeli türlerini de içine alan bazı tanımlanamamış sağlık problemlerine yol açabilmektedir. Bu materyallerin ortaya çıkardığı toksisiteleri üzerine birçok *in vitro* ve *in vivo* çalış yapılmaktadır (54). Bu materyallerden bazılarının makro boyuttakileri inert veya toksik olmamasına rağmen, bu materyaller nano boyutlara indirildiğinde insanlar veya memeli türlerinde oluşturduğu etkiler tam olarak izah edilememiştir (55,56). İlk yapılan *in vivo* çalışmalarda sıçan beyinlerinde mikro ve nano boyuttaki SiO_2 parçacıklar uygulandığında nöronların zarar görmesi ile sonuçlanmış ve

beyin astrositlerinde inflamasyon oluşumunu indüklemiştir (57). Nanomateryallerin boyutları çok küçük olduğu için kolaylıkla kan beyin bariyerini geçerek, nöronlara rahatlıkla ulaşabilirler. Nanomateryallerin neden olduğu bazı toksikolojik bildiriler vardır (58-60). ZnO nanoparçacıkların, inhalasyon yoluyla alınması ile ilgili birçok çalışma vardır. Bu çalışmalardan, hamsterlarda yapılanlar da çok ciddi pulmoner inflamasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (61,62). Kaynak işiyle ve diğer benzer işlerle uğraşan insanlar için belirlenen ZnO tozlarına çalışma alanlarında maruz kalma limiti (Eşik Değer Limiti-TLV) 5 mg/m^3 olarak belirlenmiştir (63). Son zamanlar da yapılan bazı çalışmalar da yüzey alanı ile reaktif oksijen türleri (ROT)'un üretimi ve akciğer 'de olan nanoparçacıkların pro-inflamasyon etkisi arasında doğrudan bir ilişki belirlenmiştir. İnhalasyon yoluyla alınan nanoparçacıkların toksik etkilerini açıklamak için oksidatif stress ve ROT en iyi geliştirilmiş paradigmadır. ROT üretiminin hücrenin antioksidan defans kapasitesini bastırmasıyla bir redoks dengesizliğinin neden olduğu durum oksidatif stress olarak açıklanır. Dolayısıyla bazı biyolojik etkiler ortaya çıkar. Hücre içinde glutatyon (GSH)'ın glutatyon disülfit (GSSG)'ye göre oranı sadece bizim hücre içi redoks dengesi hakkında bilgi almamızın değil, aynı zamanda hücre içinde bu oranın azalması doğal bir koruyucu mekanizma olarak çalışabilen hücresel sensör fonksiyon görevini de yapar (64). Bazı çalışmalar göstermiştir ki bazı nanomateryaller doğal olarak benign değildir ve bunların protein seviyesi dahil hücresel ve hücre altı bütün mekanizmaların biyolojik davranışlarını etkilemektedir. Dahası, bazı nanoparçacıklar vücudun içinde dolaşarak organlarda birikir ve hücre membranına nüfuz eder ya da mitokondriye yerleşip dokulara zarar verici yanıtları da tetikleyebilir. Ag nanoparçacıkların sitotoksik etkisi olup olmadığı konusunda tam bir uzlaşma yoktur. Ancak, Ag nanoparçacıklarda yapılan çalışmalarda hücre canlılığında azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur. Sitotoksisite 'ye neden olup olmadığına karar verebilmek için birçok etken vardır. Bunlar; saflığı, sentezlenme metodu, Ag nanoparçacığından salınan Ag iyonlarının konsantrasyonu, nanomateryalin fizikokimyasal özellikleri; boyut, yapı, yüzey fonksiyonu gibi özelliklerine göre sitotoksik etkinin değişmesine neden olan faktörlerdendir. Hücre içinde, Ag nanoparçacık iyonları ROT ve Reaktif Nitrojen Türlerinin (RNS) üretilmesine hızlı bir redaksiyon ile neden olabilir. ROT ve RNS protein oksidasyonuna katıldığı, lipit peroksidasyonu degrede olmaları, DNA hasarına ya da apoptoza gidilmesine neden olduğu bilinmektedir (65).

Nanoparçacıklar Apoptoz ve Hücre Ölümünü Nasıl İndükler?

Nanoparçacıkların hücrelerle etkileşimi yüzey etkileşimi, endositoz ve membran penetrasyonu olmak üzere üç yolla olmaktadır. Bu türden olan etkileşimler hücre türü nanoparçacığın boyutu, şekli, çözücü içinde dağılmasına, yüzeylerinin yük durumu ve türüne göre farklılık göstermektedir (1). Nanoparçacıkların apoptozu indüklemesinin çalışma mekanizması Şekil 9'da gösterilmiştir (66).



Şekil 9. Nanoparçacıkların apoptozisi indükleme aşamaları

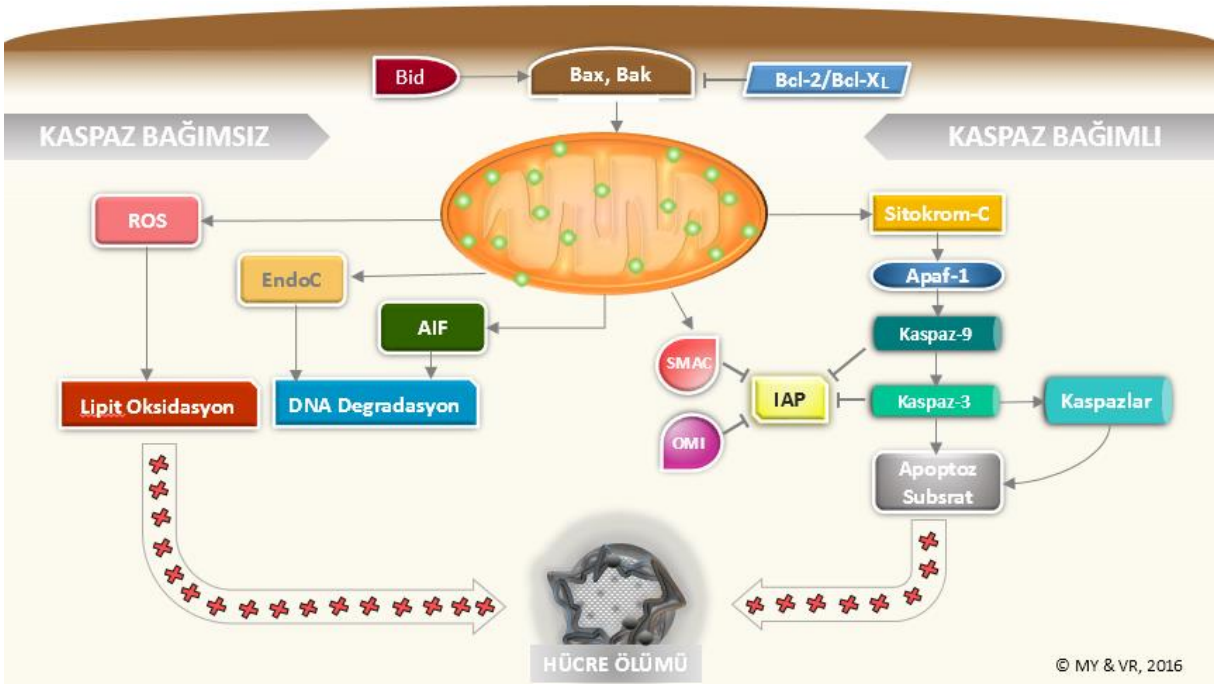
Nanoparçacıkların hepsinin yükü birbirinden farklı olması nedeniyle hücre ile olan etkileşimleri de farklılık gösterebilir. Hücre dışında bulunan fosfolipit tabakaları negatif yüke sahiptir. Nanoparçacıkların yüklerinin farklı olması nedeniyle hücre membran etkileşimleri farklılık gösterirken, bunun yanı sıra kullanılan nanoparçacığın hidrofobik ve hidrofilik olmasının ayrıca etkileşimlerde bir etkisi vardır. Nanoparçacıkların yüzey yükü, boyut ve kimyasal kompozisyonları gibi fizikokimyasal özellikleri nedeniyle ROT'ni oluşturma nedenleri arasındadır ve np intrinsik özellikleri nedeniyle ya ROT'u ortaya çıkarır ya da bu ROT'ları tutarak etkilerini azaltır (67). Bazı nanoparçacıklar ROT'un üretiminin artması sonucunda, makrofajlar ve nötrofili gibi bazı hücrelerde inflamasyon

oluşumunu aktive etmiştir. Titanyum dioksit, seryum oksit, gümüş ve çinko oksit gibi diğer np ise hücre yüzeyinde veya içinde toplanarak, hücrenin oksidatif strese neden olacak artarda sinyaller almasıyla hücreyi apoptoz sürüklerler (68,69). Bütün np'ın neden olduğu ROT'un üretilmesinde rol oynayan hücresel mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamış bir konudur. Np'lerin toksisiteye neden olması için, ROT'ları ortaya çıkarmasına gerek yoktur. Yapılan bazı çalışmalarda ROT ortaya çıkmadan hücrenin toksisite sonucu apoptoz ya da nekroza gittiği çalışmalar mevcuttur (70). Buna rağmen np uygulaması ile ROT'ların ortaya çıkması hala çok önemli bir çalışma alanıdır. Keratinosit ve bronşiyal hücrelerde yapılan bir çalışma yüksek dozda uygulanan tek-duvarlı nanotüplerin ROT, lipit peroksidasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve hücre morfolojisinde değişikliklere neden olmuştur (71).

Nanomateryaller ile Aktive Olan Apoptozis Sinyal Yolakları

Nanomateryallerin insan sağlığına etkisi tam olarak anlamak için nanomalzemelerin neden olduğu sitotoksisitenin altında yatan moleküler mekanizmaların çok iyi bir şekilde araştırılması gerekliliği gayet açıktır. Apoptozis hücrenin çeşitli streslerle uyarılması ile ortaya çıkan kompleks bir olaylar zinciridir. Mitokondriye bağlı olan apoptozis ise intrinsik yolakta meydana gelen, mitokondri membranından Bax/mitokondri, Bax/bak oligamerizasyonu, daha sonra Bcl-2 ailesinin regülasyonu ve sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması ile birlikte bu meydan gelen mitokondriyal süreçlerin sonucunda kaspazların aktive olması ile birlikte hücrenin degradasyonu ile sonuçlanan süreçler bütünüdür (72). Farklı boyutta gümüş nanoparçacıklar ile yapılan çalışma da NIH3T3 fibroblast hücrelerinde mitokondriyal apoptoz mekanizmalarının JNK ve ROT türleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymuşlardır. HCT116 kolon kanseri hücrelerinde ise anti-apoptotik protein olan Bcl-2'nin up-regülasyonu gösterilmiştir (73). İntrinsik apoptotik yolaklar mitokondriye bağlı yolaklar olarak bilinir. Mitokondriyal DNA hasarı, hücresel stres sinyalleri oluşumu ve endoplazmik stres intrinsik apoptotik yolakların tetiklenmesinin nedenlerindendir. Mitokondri bu stres faktörlerine cevap olarak, sitokrom-c (74), apoptozis indükleyici faktör (AIF) (75), Smac/DIABLO (76), endonükleazG (EndoG) (77) ve Htra2/Omi (78) gibi pro-apoptotik faktörlerinin ekspresyonu ile bir cevap verir. Sitokrom-c ortama salınması apoptozis sürecinin başladığının en önemli göstergelerinden biridir (79). Şekil 10'da ifade edildiği gibi apoptozisin gerçekleşmesi için kaspaz-3 aktivitesinin tetiklenmesi ile geri dönülemez apoptozis süreci başlar. Kaspaz aktivitesi mitokondriyal

Smac/DIABLO salınımı ile daha da fazla artar (80). Smac proteini apoptoz inhibitörü olan proteinlere bağlanarak kaspaz-9 aktivasyonunu başlatır. Apoptoz sürecinin en önemli adımlarından biri kaspazların aktivasyonudur. Canlı hücrelerde inaktif proenzim olarak bulunan kaspazlar ya otokataliz ya da klevaj olan diğer kaspazların yardımı ile apoptoz sürecinde aktif olurlar (81).



Şekil 10. Kaspaz bağımlı ve bağımsız apoptozis mekanizması

Apoptozis, Mitokondri ve ROT

Apoptozis, homeostazi dengesinin sağlanması için hücrenin "programlı" ölümü olarak açıklanır. Hücrelerin çoğalması ve ölümü arasında bir denge vardır. Canlılarda var olan hücrelerin korunması ya da yeni hücrelerin ortaya çıkması ile bu denge sabit kalmaktadır. Mevcut olan hücrelerimiz fizyolojik proseslerden geçerek ya programlanmış hücre ölümü olan apoptozis ya da patolojik ölüm olan nekrozis gibi ölüm mekanizmaları ile yok olmaktadır. Apoptozis terimi ilk defa 1972 yılında J.F.K Kerr Avustralyalı patolog (82) tarafından tanımlanmıştır. Apoptoz tanım olarak hücrelerin kendi kendilerini genlerle düzenlenen, protein sentezi RNA ve enerjiye gereksinim duyan, organizmalarda dengenin sağlanmasına neden olan hücrelerin kendilerini yok ettikleri olaydır. Hücresel fonksiyonların nanoparçacık alımıyla değiştiğini anlamak için,

apoptozis, ROT ve mitokondri arasındaki ilişki araştırılmıştır (83-85). Apoptoz tek hücreli canlılarda, apoptozun aktivasyonu iç veya dış yolaklar üzerinden meydana gelebilir (86). Apoptoz başlaması için DNA onarım mekanizmalarının durması ile apoptoz süreci başlar. Bu aşamada hücrenin apoptoza gidip gitmemesi hücrenin tipine, boyutuna ve tümör geliştirme riskine bağlıdır. Apoptoz vücudun hücre sayısının sabit tutulmasının yanı sıra immün sistem faaliyetlerini de katkı sağlar. Aktive edilmiş lenfositlerinin direkt olarak apoptoz aracılığıyla kendi antijenlerini ortadan kaldırdığı gözlenmiştir (87,88). Apoptotik hücre miktarlarındaki artış dengenin bozulmasına Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara, ülseratif kolitler, AIDS gibi kronik ve immünolojik rahatsızlıklara neden olabilir (89,90). Dışarıdan kaynaklı apoptozun nedenleri hormonlar, büyüme faktörleri, nitrik oksit ve sitokinlerdir. İç apoptoz yolaklarının aktivasyonu ise hücrede oluşan DNA hasarı, hipoksi ya da ısı nedeniyle bir stres meydana gelmesi ile ortaya çıkar (91,92). Apoptoz aynı zamanda tehlikeli organizmalara maruz kalan hücreleri elimine eder. Örneğin; viral enfeksiyonlara maruz kalan ya da DNA'ları hasara uğramış hücrelere apoptozis ile ortadan kaldırılır (93,94).

Apoptoziste hücre küçülür, yoğunlaşır ve çevreyle olan normal temasını kaybeder. Apoptozisin oluşmasında birçok gen adı geçmektedir. Ancak, Bcl-2, p53 ve Bax gibi proteinler, bu süreçte en fazla araştırılanlar ve en öne çıkan apoptoz ile ilgili genlerdir. Bu genler birbiri ile uyumlu çalıştığında apoptotik süreç normal çalışmakta eğer bu çalışma uyumu bozulduğunda ise bu genler onkogen gibi hareket etmeye başlamakta ve hücre proliferasyonunun kontrolü kaybolmaktadır (95). Birçok hücre ölümü mitokondri ile doğrudan ilgilidir. Mitokondri üzerinde bulunan Bcl-2 proteinleri mitokondride meydana gelen hasarı tespit eder (96,97). Bax proteinlerinin aktive edilmesi mitokondri membranının stabilizasyonu bozduktan sonra sitoplazmaya sitokrom-c'nin salınmasına neden olur. Normal şartlarda apoptotik herhangi bir uyarı olmadığında monomerik halde bulunan apaf-1 sitokrom-c'nin yayılması ile apoptozom forma dönüşür (98). ROT sitokinlere ve büyüme faktörlerine bir cevap olarakta üretilebilir ve hücre komponentlerinde oksidatif hasara neden olur (99). Antioksidanlar ROT'ların neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılır. Bunlar Vitamin C, Vitamin E, melatonin yaygın antioksidanlardır. SOD, CAT ve GPX gibi antioksidan enzimler ise hücre içindeki ROT türlerine karşı kendilerini okside ederek bu radikalleri inhibisyonuna neden olurlar (100,101).

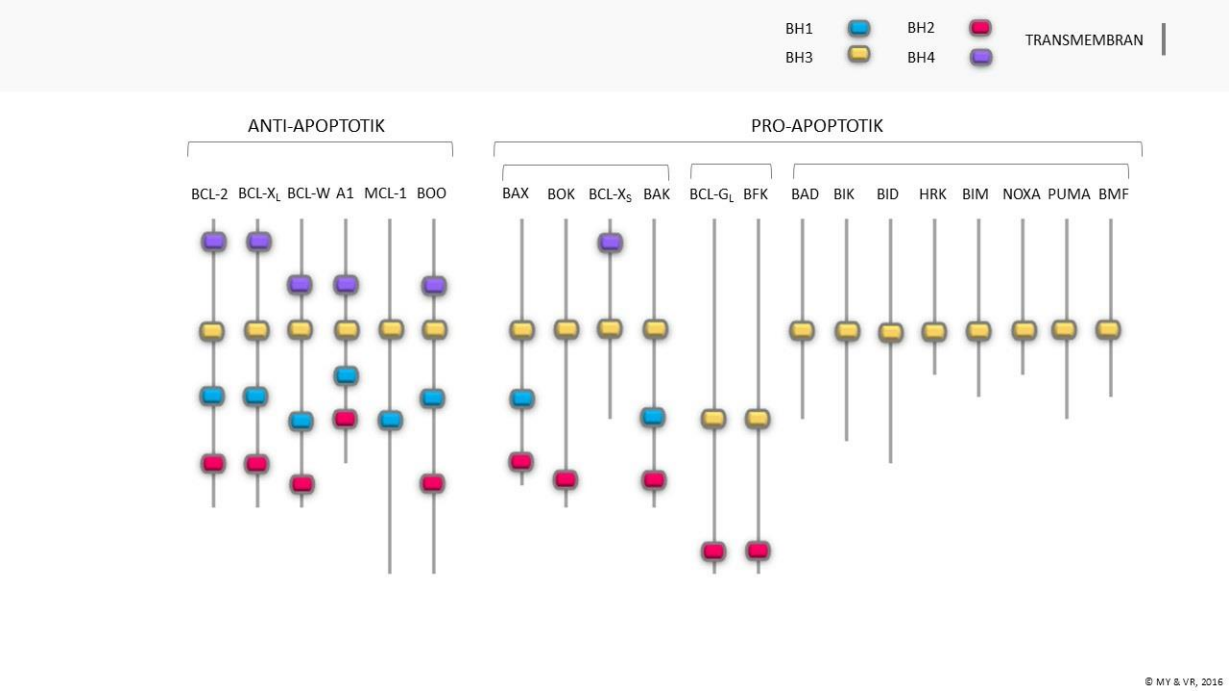
APOPTOZUN DÜZENLENMESİNDE GÖREV ALAN GEN BÖLGELERİ

Apoptoz sürecinde birçok gen görev almaktadır. Ama bu genler arasında en önemli görevlere sahip olan genler ise, Bcl-2 ailesi, Bax, kaspazlar ve p53 genidir.

Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi birbirlerinin tersine işleve sahip iki aile grubundan oluşur. Bu aile gruplarından birincisi pro-apoptotik yani apoptozu indükleyici rol oynayan grup diğeri ise, anti-apoptotik aileye giren ve apoptozu baskılayıcı rol oynayan diğer bir gruptur. Örneğin, pro-apoptotik Bcl-2 ailesinin üyeleri sitokrom-c proteini indüklerken, anti-apoptotik Bcl-2 ailesindeki proteinler ise sitokrom-c'yi baskılayarak apoptozu engellemeye çalışır. Şekil 11'de gösterildiği gibi bu aileye ait 25 adet üye vardır. Mitokondride, nükleus dışında ve endoplazmik retikulum (ER)'nin zarında bulunan Bcl-2 proteini, 25-26 kDa ağırlığında olan bir proteindir. ER'de apoptozda önemli bir rol oynamaktadır. ER kalsiyum depolarının salınımında rol oynarken, bir yandan da ölüm yolaklarını aktive ederek mitokondri için doğrudan pro-apoptotik uyarı gönderir. Fas ve p53 aracılığıyla apoptoza katkıda bulunur (87,102). Pro-apoptotik üyeler iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt gruplardan ilki yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2 ve BH3) domeynlerini içeren üyelerden (Bax ve Bak), diğerleri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad ve Bim) proteinlerden oluşur. Pro-apoptotik proteinler arasında sadece Diva BH4 domeyn bölgesine sahiptir. Anti-apoptotik üyelerin çoğunda BH4 bölgesi bulunmaktadır. Pro ve anti-apoptotik üyelerin hücre içerisinde oluşturduğu denge, yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği hücrelere sunar. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesinin üyelerinin ekspresyonlarının aşırı olması apoptozu baskılarken, pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri apoptoza sürüklediği görülmektedir.

Bcl-2 ailesinin üyeleri olan proteinlerin aktivasyonunun ana mekanizması, mitokondrinin membran geçirgenliğinde meydana gelen değişim ile sitokrom c'nin mitokondriden serbest bir şekilde salınımını da düzenlemekle görevlidirler (103,104). Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik süreçte rol oynayan Noxa ve Puma aile üyeleri arasındadır. Puma proteini p53-aracılı apoptozis sürecinde önemli bir rol oynayan proteinlerden biridir (105).



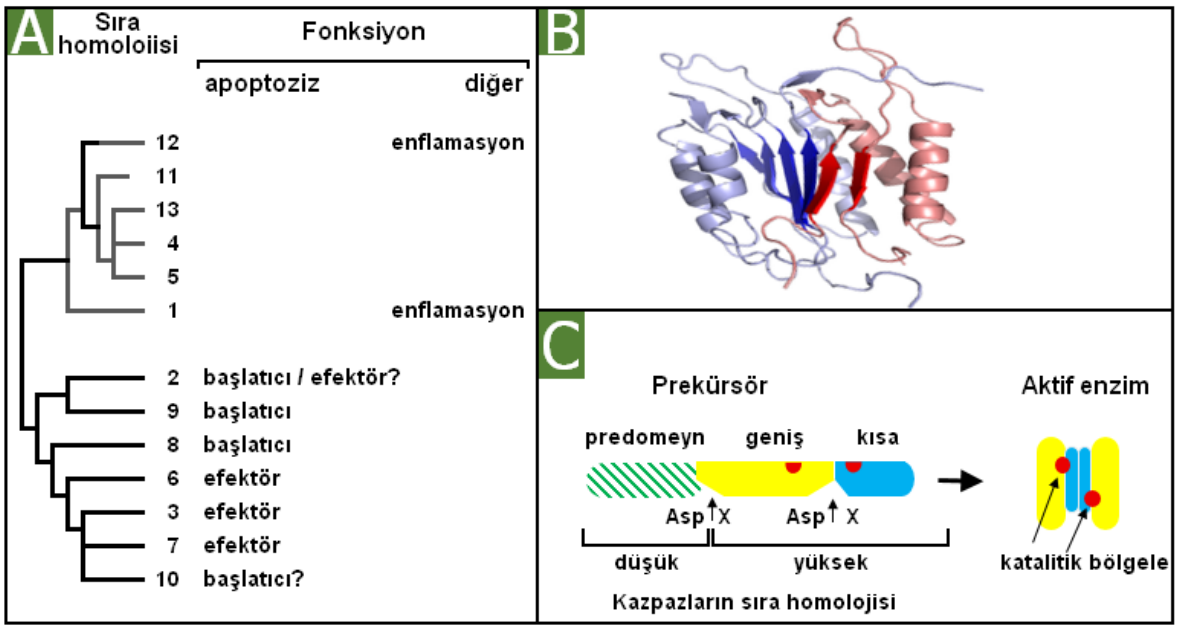
Şekil 11. Bcl-2 ailesi üyeleri

Bax Proteini

Pro-apoptotik proteinlerden olan Bax BH4 bölgesini içermeyen ama diğer üç bölgeye de sahip proteindir. Bax proteini iki farklı konformasyon yapısında bulunur. Bunlardan ilki olan inaktif Bax sitozolun içinde bulunurken diğeri ise, aktif Bax olarak adlandırılır ve mitokondriyal permeabilizasyon da görev alır. Sıvı solüsyonların içinde, diğer Bcl-2 ailesinden olan anti-apoptotik proteinlerden Bcl-xL ve Bcl-2 ve pro-apoptotik proteinlerden Bid ve p15tBid ile yapı benzerlikleri gösteren bir yuvarlak proteindir. Pro-apoptotik üyelerden olan Bax ekspresyonundaki yetersizlikler kolon kanseri ve hematolojik malignitelere neden olduğu tanımlanmıştır (106,107). Yapılan bir çalışmada manyetik 5-fluorouracil yüklü nanoparçacıkların, karaciğer kanseri modeli oluşturulmuş farelerde Bax ve kaspaz-3 ekspresyonunu artırırken Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir bu yüzden bu nanoparçacıkların kemoterapötik ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. MCF-7 ve HT-29 hücre hatlarına uygulanan ZnO np ve türevlerinde yapılan başka bir çalışmada ise Bax ve Kaspaz-3 protein seviyesinde artış olurken, Bcl-2 protein seviyesinde bir azalma olduğu gösterilmiştir (108).

Kaspazlar

Kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptid bağını kıran sistein proteazlarıdır. Üç tiptedirler bunlar başlatıcı, efektör veya inflamatuar kaspazlardır. Apoptoz sürecinde oluşan biyokimyasal olayların son işaretçisi kaspazlardır. Kaspaz ailesi üye sayısı, şu ana kadar tanımlanan 14'tür. Bunlar 7 tanesi apoptoz ile ilişkilidir. Kaspazlar, ced-3 geninin hücre ölümü ile ilgisi araştırılırken apoptoz sürecinde keşfedilmiş proteinlerdir. Kaspaz-1 hücre ölümü ilişkisine dair kesin kanıtlar olmamasına rağmen, kaspaz ailesinin ilk keşfedilen üyesidir. Kaspaz ailesi üyelerinin hepsinin birbirinden farklı apoptoz ve inflamasyon gibi fonksiyonları vardır. Farklı kaspaz türlerinin Şekil 12'de görüldüğü gibi, apoptoz sürecinde ya efektör ya da başlatıcı olarak görevleri vardır.



Şekil 12. Kaspaz ailesinin genel gösterimi A- Kaspazların görevleri B- Kaspaz moleküler modellenmiş yapısı C- Kaspaz proteinin homolojisi

Kaspazların amino asit dizileri, yapıları ve subsrat spesifiteleri birbiriyle benzerlikler gösterir. NH2 terminal birim, geniş alt birim ve küçük alt birimlerden meydana gelen 30 kDa ile 50 kDa arasında atom ağırlığına sahip proenzimler olarak ifade edilirler. Apoptozis olayını açıklamak için çalışmalarda *Caenorhabditis elegans* nematodu kullanılmıştır. Basit bir yapıya sahip olan bu çok hücreli nematodlarda apoptozu açıklamak için 3 genin; ced-3, ced-4 ve ced-9 (109) adlı genlerin, nematodun

apoptozise gidiş sürecini kontrol ettiği bulunmuştur. Bu sonucunda varılmasında deney çalışması aşamaları şunlardır. Mutasyon ile ced-3 ve ced-4 genlerini bulunduran nematodların bu genlerinin inaktif hale getirilmesine rağmen, apoptozun meydana gelmediği ve normalde ölmesi beklenen nematodlarında yaşamaya devam ettiği gözlenmiştir. Buradan çıkarılan sonuçlar ise, ced-3 ve ced-4 apoptozu indüklediği, ced-9 ise apoptozu inhibe ettiği ortaya konmuştur. Günümüzde, bu genlerin insan genomundaki karşılıklarına gelecek olunursa ced-3 için bazı kaspaz türleri, ced-4 için apaf-1 ve ced-9 içinde Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik proteinleri karşılık gelecek şekilde tanımlanmıştır (85).

p53 Proteini

p53 proteini ilk defa 25 yıl önce heksamerik DNA helikaz ve Simian Virus büyük-T antijenine bağlanan 53 kDa molekül ağırlığına sahip bir protein olarak keşfedilmiştir. Yaban tipte olan p53 proteinin daha sonra tümör baskılayıcı bir gen olduğu ortaya konmuştur (110). Daha sonraki çalışmalarda birçok kanser türünde mutasyona uğradığı bildirilmiştir. Hücre siklusunun durması halinde hücrenin zarar gören DNA'sını tamir eder, eğer tamir edemezse p53 hücreyi apoptozis sürecine sokarak hücre ölümünü gerçekleştirir. p53 aynı zamanda apoptoz sürecinde ana belirleyici olarak rol oynar. p53'ün apoptozisi indüklemesi olayı Bax'ın ekspresyonun artması ve Bcl-2/Bax oranının değişmesi ile başlayan bir apoptozu indükleme sürecidir. Bazı virüsler (İnsan papillom virüsü, Epstein-Barr virüsü ve Adenovirüs tip 12) ya Bax'a bağlanarak apoptozu bloke eder ya da p53'ü inaktive ederler, bunun bir sonucu olarak bu virüsler tarafından enfekte edilen hücreler, doğal hücre ölüm mekanizmasının devreden çıkması ile virüs enfeksiyonu yoluyla karsinogenezise katkıda bulunurlar (111). Yapılan bir çalışma uygulanan ZnO nanoparçacıkları BJ cilt hücrelerinde p53 ekspresyonunu artırdığı, fakat yine aynı hücre tipinin bu maddeye karşı dirençli hale gelerek hücre sayısını artırdığını gözlemişlerdir (112). 50x140 nm boyutlarında ZnO nano çubuklar A549 akciğer kanseri hücrelerine uygulandığında p53, survivin, kaspaz yolağından apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (113). 23,5 nm boyutundaki ZnO np'nin cilt fibroblastlarında yapılan bir çalışmada apoptozu indüklediği ve p53 ve p38'lerin up-regülasyonuna neden olduğu da bulunmuştur (114). HEK 293 böbrek hücrelerinde yapılan bir çalışmada TiO_2 (20 nm) anataz formunda olan, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml dozlarında uygulanan np'lerin, ROT kaynaklı oksidatif stresin yanı sıra, kaspaz-3, p53 ve Bax aktivasyonun artırarak DNA zararına neden olmuştur (115). Ag np'nin uygulandığı sıçanların akciğerlerinde elde

edilen DNA'ların çift iplikli markör ile boyandığında DNA hasarını indüklediği ortaya konarken, p53 ilgili pro-apoptotik proteinlerden olan p21, Noxa ve Bax up-regüle olduğu sonuçlarda gösterilmiştir (116).

Hücreye Giriş: Endositoz

Endositoz hücre zarından geçemeyecek olan moleküllerin hücre içine alınımı aktif taşımadır. Endositoz yoluyla alınan moleküller ya plazma membranında ya da hücre içinde çok hayati fonksiyonları olan moleküllerdir (117). Endositik veziküller, çeşitli mekanizmalar tarafından oluşmaktadır. Klatrin-bağımsız endositoz türleri olmasına rağmen, klatrin-aracılı endositoz (CME) en iyi tanımlanmış endositoz türüdür. Klatrin-aracılı endositoz (CME) sinyal iletimi, sinaptik iletim, hücre içi besin alımı ve membran dengesi gibi birçok önemli hücresel faaliyette görev alır. CME endositoz türleri arasında en hızlı ve dengeyi çabuk sağlayan hücreye alım mekanizmasıdır (118). İri molekülerin ve partiküllerin içeri alınması için üç çeşit endositoz çeşidi vardır. Bunlar;

1) Fagositoz
2) Pinositoz
3) Reseptörlü endositoz

Klatrin kaplı çukurların derinleşmesi ile madde vezikül halinde hücre içine alınır. Veziküllerin dışı da klatrin ile kaplıdır. Hücre içinde veziküllerin klatrin örtüsü kaybolur ve veziküllerin birleşmesi ile daha büyük endozomlar oluşur.

Fagositoz

Katı haldeki 0.75 μm daha büyük molekülerin hücre içine hücre zarı ile birlikte alınması olayına denir. Sırasıyla hücreye tutunma, hücre içine alınma fagositik koful ve sindirim aşamalarından oluşur.

Pinositoz

Hayvansal hücrelerin sıvı halde bulunan maddeleri, vezikül oluşturarak hücre sitoplazmasına alma olayına denir. Hücre zarının içeri doğru çökmesi ile birlikte ufak ufak cepler oluşur ve sonrasında zarın kapanması ile birlikte içi sıvı dolu pinositotik vakuollere dönüşürken, hücre bu yolla iyonları ve küçük molekülleri hücre içine bir miktar sıvı ile birlikte alması olayına denir. Bu beslenme sırasında ATP harcanır.

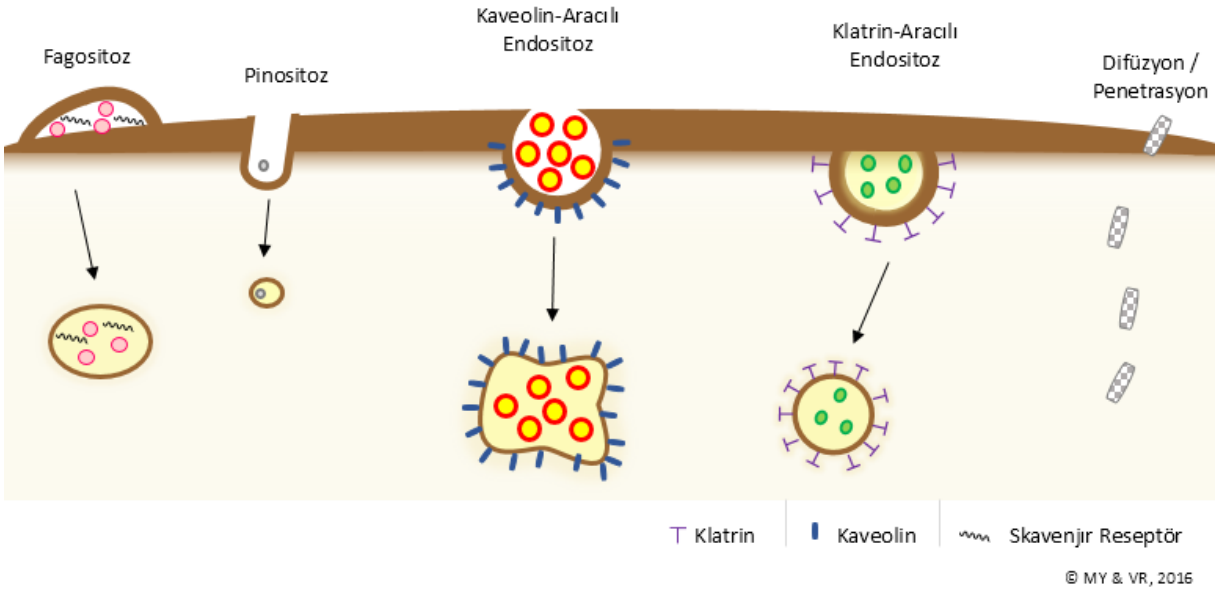
Reseptörlü Endositoz

Makromoleküllerin seçici olarak klatrin kaplı veziküller aracılığıyla alınması olayıdır. Reseptörler ve ligandlar hücre içine alınmasında en iyi yöntemlerden biri klatrin-aracılı endositozdur. Klatrin aracılı endositoz ligand ve reseptör aktivasyonu ile başlar. Bir adaptör proteine bağlı olan reseptör ve ligand, ilk önce plazma membranına difüze olur ve klatrin kaplı çukur tarafından yakalanması beklenir. Yakalandıktan sonra onun formunu almaya başlar. Sonrasında, içeri alınan molekül lizozomal, geri dönüşüm veya diğer şekilde sınıflandırılır (119).

Nanoparçacıkların Biyouyumluluğu ve Hücre İçine Alınması

Nanoparçacıklar, hidrofilik ve amfilik moleküller, peptidler, proteinler ve antibadiler gibi basit moleküller yardımı ile biyouyumlulukları kolayca sağlanmaktadır. Bazı kaplama materyaller, antibadiler veya protein gibi nanoparcacığa bağlanmış olan yapılar hücre yüzeyi üzerinde kolaylıkla tutunabilir ve hücre içine girişi de sağlanabilmektedir. Geliştirilen ve modifiye edilen birçok nanomateryal tıbbi görüntüleme, terapötiklerle anlık görüntüleme, terapötik malzemenin istenilen noktaya taşınması ve teşhis koyma gibi alanlarda çok fazla miktarda medikal sektörde kullanılmaktadır. Fakat bu materyallerin biyolojik cevabı toksik ya da daha farklı olacağı gibi materyallerin klinik olarak kullanılmadan önce çok iyi bir şekilde biyouyumluluğu ve insan sağlığına etkisi çok iyi değerlendirilmelidir (120-122). Yabancı maddelere karşı vücudun ilk tepkisi immün sistem tarafından verilir. Antijen taşıyan dendrit hücrelerimiz, makrofajlar ve diğer fagositik hücrelerimiz bu tarz olan yabancı istilalara karşı, çeşitli yollarla bu maddelerin etkilerini eliminize edecek sistemlerle donatılmıştır. Bu yüzden bu nanomateryallerin *in vivo* olarak uygulaması düşünüldüğünde, ilk önce göz önünde bulundurulması gereken durum nano-immün sisteminin tepkisi olmalıdır. Nanomateryallerin hücre içine alınımı materyallerin yüzey, yapısı, boyutu ve büyüklüğü gibi birçok faktörü içine alan özellikleri nedeniyle farklılık gösterebilir. Bu nedenle üretilen ve geliştirilen nanomateryallerin hücre tiplerine ve bunların materyale verdikleri tepkiye göre değişmesi, bu materyallerin daha farklı kompozisyonlarda geliştirilmesi gerektiği fikrini ortaya konmuştur. Süpermanyetik demir (SPION) nanoparçacıkların (123) genel olarak *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda biyouyumlu olduğu ve çok fazla toksik etki göstermediği rapor edilmiştir (124). 30 nm boyutunda dekstran-kaplı SPION nanoparçacıkların insan makrofajlarında, maruz bırakılması sonucunda herhangi bir immünmodülatör bir etkiye neden olmadığı gözlenmiştir (125). Fakat sıçanda ve farede

yapılan bir başka çalışma da 20-60 nm boyutlarında dekstran-kaplı SPION'lara maruz bırakılan primer peritonel makrofajları, anti-inflamatuar sitokinlerin salgısının arttığı, pro-inflamatuar sitokinlerin azaldığı gözlenmiştir (126). 100 nm civarında olan dekstran-kaplı SPION'ların hücre içine alınımları endositoz yoluyla olurken, 20 nm daha küçük SPION'lar ise pinositoz yoluyla hücre içine girmektedir (127). Dendrimerler ise nanopartiküller arasında en toksik olan tiplerindendir. Sitotoksik etkileri, yüzey enerjilerine göre dendrimerler arasında farklılık gösterir. Örneğin; yüzey enerjilerinden dolayı katyonik dendrimerler anyonik dendrimerlerden daha toksik olduğu ortaya konmuştur. Eğer bu dendrimerlere polietilen glikol (PEG) bağlanırsa kayda değer olarak sitotoksik etkinin azaldığını gözlenmiştir (128,129). Katyonik dendrimerler, membran üzerindeki porların yapısını bozarak mitokondrinin fonksiyonlarının ortadan kalkmasına neden olmaktadır. Katyonik dendrimerler aynı zamanda kırmızı kan hücrelerinin morfolojisinde hemolizis olmasına neden olurken, anyonik dendrimerler bu etkiye sahip değildir. Katyonik dendrimerler kaspaz-bağımlı apoptozu indükler (130,131). Bu dendrimerler murin makrofaj hücrelerinde proliferasyonu negatif yönde etkilerler. Ancak bu dendrimerler diğer iki murin makrofajlarında ise aynı etkiye sahip değilken, bunun nedeni ise bu makrofajların farklı özelliklere sahip olması olarak gösterilmektedir (132). Dendrimerler genel olarak endositoz yoluyla hücre içine girerken, dendrimerlerin yüzey yapısına göre de hücre içine alım mekanizmaları değişmektedir (133). Rod ile kaplanmış mesoporous silisyum nanoparçacıklar (MSN)'ın hücre içine alınımı daha kolaylaştırdığı gösterildikten sonra apoptotik etkisi, migrasyonu ve hücre iskeletinde dağılımı özelliklerine bakılmış ve materyalin kaplamadan sonraki dağılım etkisi artmıştır (134). MSN genel olarak endositoz yoluyla hücre içine alınırken bu hücre tipi, yüzey enerjisi ve parçacığının boyutu gibi birçok faktöre göre değişmektedir (135). 1.4 nm gibi çok küçük olan altın nanoparçacıklar (136) oksidatif stres aracılığıyla mitokondriye zarar vererek hücrenin nekroza gitmesine neden olurken, bu nanoparçacıklardan az daha büyük olan 3,7 nm boyutundaki altın nanoparçacıklar hücre çekirdeğine girmesine rağmen, herhangi bir toksik etkiye neden olmamaktadır (137). Boyutları 2–4 nm, 5–7 nm ve 20–40 nm olan altın np'lerin 1 ppm olan doza-bağımlı etkileri çalışıldığında mürin makrofajlarda herhangi bir toksik etki göstermezken, 10 ppm konsantrasyona sahip altın np'nin apoptozu indüklediği ve pro-inflamatuar genleri up-regüle ettiği gözlenmiştir (138). Altın nanoparçacıkların'da hücre içine alınımları da genel olarak Şekil 13'de gösterildiği gibi endositoz yoluyla olmaktadır (139).



Şekil 13. Nanoparçacıkların hücre içine alınmalarının gösterimi

GEREÇ ve YÖNTEM

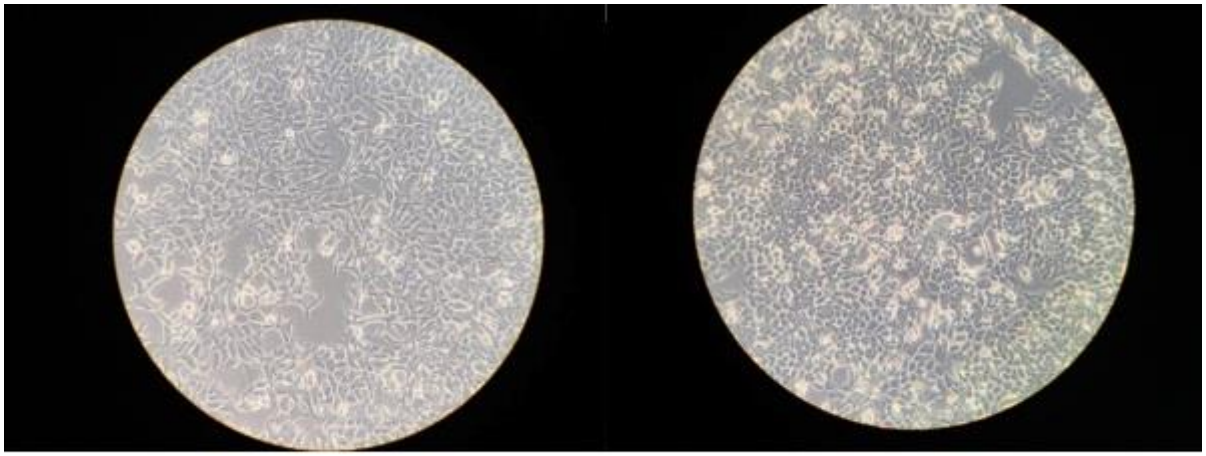
Bu çalışma; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarlarında ve Süleyman Demirel Üniversitesi Nörolojik Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinde (NÖROBAM) gerçekleştirilmiştir. Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'ndan 30.12.2015 tarihli ve TÜTF-BAEK 2015/235 sayılı 13'nolu kararı ile etik kurul izni (Ek-1) alınmıştır.

HÜCRE KÜLTÜRÜ

Çalışma boyunca iki farklı kanser türüne ait hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre hatlarından HT-29 kolon kanseri hücre hattı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalından temin edilmiştir. Çalışma da kontaminasyon riskine karşı maksimum titizlikte çalışılmıştır.

MCF-7 ve HT-29 Hücreleri

Kullanılan tripsin ve mediumlar kullanılmadan önce ısısı 37^{o}C'ye ayarlanmış su banyosunda inkübe edilmiştir. Hücreler 37^{o}C'de sıcaklıkta %5'lik CO_2 ortamına ayarlanmış inkübatörde içerisinde inkübe edilerek istenen konfluente'ye ulaşılması sağlanmıştır. Aşağıdaki Şekil 14'te %90 konfluente'ye ulaşmış MCF-7 ve HT-29 hücrelerinin mikroskop görüntüsü verilmiştir.



A B

Şekil 14. Deney sırasında kullanılan hücrelerin mikroskop görüntüsü A- MCF-7 Hücre Hattı B- HT-29 Hücre Hattı

Medyum Ortamı

Bu hücre hattında 1:1 oranında DMEM:HAM's F12 medyum ortamı hazırlandı. Medyumlara ek olarak konsantrasyonu %5 Fetal Bovine Serum(FBS) ve %1 Penisilin ve Streptomisin ilaveleriyle birlikte %95 O_2, %5 CO_2 ve 37^oC sıcaklık ortamında çoğaltıldı. Hücrelerin iki günde bir medyumları kontrol edilerek yeni medyumlarla değiştirildi ve her gün bir kez hücreler mikroskop altında kontrol edilerek konfluent artışı ve kontaminasyon risklerine karşı gözlenmiştir.

Hücreleri Pasajlanması

Bu işlem ortamda bulunan hücre popülasyonu %80'e ulaştığında yapılmıştır. Bu da yaklaşık olarak haftada bir defaya gelmektedir. Hücre pasajlamasında aşağıdaki sıralama takip edilmektedir.

1) Hücrelerin ekili olduğu T25 veya T75'lik flasklardaki bütün medyum ortamı pipet yardımıyla boşaltılır.
2) 5 ml PBS solüsyonu flaska eklenir ve yavaşça sallayarak hücrelere yıkama işlemi uygulanır.
3) Pipet yardımıyla ortamdaki PBS ortamdan uzaklaştırılır.
4) %0.05 (w/v) tripsin-EDTA solüsyon karışımı ile hücreler 5-10 dakika boyunca inkübe edilir.
5) İnkübasyondan sonra hücreler pipet yardımıyla santrifüj için falkon tüpe alınır.

6) 2000 rpm 2,5 dakika santrifüj edilir.
7) Süpernatant atık kabına atılır.
8) Tüpün içine 6 ml medyum konduktan sonra pipetaj işlemi uygulanır.
9) Hücreler yeni bir flaska tekrar ekilir.
10) 37^{o}C'de hücrelerin çoğalması için inkübatöre alınır.
11) 2-3 günde bir medyumu değiştirilerek hücrenin çoğaldığı ortam yenilenir.

Hücre Kültürü Kryo Tüplere Aktarım

Hücrelerin uzun vadede tekrar ederek kullanılması için hücreleri kryo tüplere alarak -196^{o}C'deki azot tankının içinde saklayarak, uzun süreler kullanılmak üzere kaldırıldı. Bu aktarım işlemi aşağıda anlatılan sıra ile yapılmıştır.

1) Flasklarda bulunan hücrelerin medyumu pipet yardımıyla atılır.
2) Hücrelere 4 ml %0,5'lik tripsin eklenir ve 5 dakika boyunca inkübasyonu sağlanır.
3) Tripsin inaktif hale getirmek için %5'lik FBS bir miktar eklenir ve tripsin inaktivasyonu sağlanarak hücrelerin tripsin yüzünden ölmesi engellenmiş olur.
4) Hücreler pipet yardımıyla flask'tan alınır ve falkon tüpe yerleştirilir.
5) Hücre süspansiyonları 2000 rpm'de 2,5 dakika boyunca santrifüj edilir.
6) Falkon tüpün üzerindeki süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde atılır.
7) Hücre pelletinin içine 10 ml hücre medyum eklendikten sonra pipetaj yapılarak her bir kryo tüpün içine 1 ml olacak şekilde pipet yardımı ile koyulur.
8) Kryo tüplerde bulunan hücre süspansiyonları en az 2 saat -80^{o}C'de saklanır ve sonrasında sıvı nitrojen tankına alınmıştır daha uzun vadede hücre süspansiyonun saklanması için bu iki geçişli sistemi yapmak gerekmektedir.

Kryo Tüpten Hücrelerin Çözdürülmesi

Mevcut çalışmaya başlamadan önce bu hücreler -196^{o}C'de buluna azot tankının içinden alınarak pasajlama işlemleri gerçekleştirildi. Aşağıdaki adımlar kryo tüpten hücreler hangi adımlarla falkon tüplere ve ondan sonrada flasklara nasıl ekildiğini göstermektedir.

1) Sıvı nitrojenden çıkartılan kryo tüp içindeki hücreler 37°C'deki su banyosuna alınır.
2) 5 ml medyum ortamının bulunduğu falkon tüp ortamına tam çözülmeden dökülür.
3) Pipetleme yapılır.
4) Pipetleme işlemi bittikten sonra 5 ml olacak şekilde T25'lik flasklara eklenir.
5) Flasklar inkübatöre kaldırılarak hücrelerin çoğalması beklenir.

Gümüş, Silisyum Dioksit ve Çinko Oksit Nanoparçacıkların Hazırlanışı

Bütün nanoparçacıklarımız Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. Alınan maddelerin hepsinin saflığı birbirinden farklıdır. Nanoparçacıkların hepsi deiyonize suda (Sigma-38796) belirlenen yedi konsantrasyonda (Tablo 3), oda sıcaklığında 30 dakika boyunca ultrasonik sonikatör (Bandelin Sonopuls HD 2070) aracılığıyla sonikasyon işlemi uygulanarak parçacıkların su içersinde dispers hale gelmesi sağlanmıştır. Bütün uygulamalardan önce parçacıklar vorteklenmiştir. Bu işlemler sırasında kullanılan bütün materyallerin kontaminasyon riskleri minimize edilerek çalışılmıştır. Aşağıda bulunan Tablo 3'te maddeler ve uygulanan dozlar belirtilmiştir.

Tablo 3. Uygulanan madde dozları

Gümüş Np	SiO_2 Np	ZnO Np
20 ppm	50 ppm	20 ppm
10 ppm	25 ppm	10 ppm
5 ppm	12,5 ppm	5 ppm
2,5 ppm	6,25 ppm	2,5 ppm
1,25 ppm	3,12 ppm	1,25 ppm
0,62 ppm	1,56 ppm	0,62 ppm
0,31 ppm	0,78 ppm	0,31 ppm

Deney Grupları

Nanoparçacıklar'ın uygulaması için, sekiz grup belirlendi ve bu gruplara 24 ve 48 saat np inkübasyonu yapıldı. MTT testleri için her bir gruptaki örneklem sayısı (n=6) iken, diğer yapılan testlerde bütün örnekler için örneklem sayısı (n=3) olarak alınmıştır. Oluşturulan deney gruplarına 24 ve 48 saat süre ile kontrol grupları hariç, np'lere maruz bırakıldı. Aşağıda Tablo 4'te deney gruplarının nasıl oluşturulduğu gösterilmiştir.

Tablo 4. Deney kapsamında oluşturulan deney grupları

Gruplar	Hücre Hattı + NP
Grup 1	MCF-7 (Kontrol)
Grup 2	HT-29 (Kontrol)
Grup 3	MCF-7 + Ag
Grup 4	HT-29 + Ag
Grup 5	MCF-7 + SiO_2
Grup 6	HT-29 + SiO_2
Grup 7	MCF-7 + ZnO
Grup 8	HT-29 + ZnO

RNA İzolasyonu

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda nanoparçacık uygulanan hücre hatlarından Genomik RNA'lar Purelink RNA Mini Kit (Life Technologies cat no:12183018A) ile kit protokolü kullanılarak izole edilmiştir. Bu protokole göre, hücrelerin bulunduğu platelerden (24'lük plate) medyumlar aspiratör yardımıyla alındıktan sonra, 400 µl lizis buffer tamponu ve merkaptoetanolden oluşan karışım eklendikten sonra ve 10-15 dakika inkübe edildikten sonra RNA ve DNA'ların ortama salınması sağlanır.

1) İnkübasyon süresinden sonra kuyucuklardaki örneklerden 400 µl çekilerek ependorf tüplere alınır.
2) Homojenatın üzerine 400 µl %70'lik etanol konularak vortekslenir.
3) Elde edilen karışımı kit içerisinden çıkan kolonlu tüplere direkt aktarılarak 12000xg'de 25^{o}C'de 20 saniye santrifüj edilir ve altta kalan sıvı atılmıştır.
4) Kolon üzerine 700 µl yıkama tamponu 1 eklendikten sonra 12000xg'de 25^{o}C'de 20 saniye santrifüj edilir ve alttaki sıvı boşaltılır.

5) Kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu 2 eklenerek 12000xg'de 20 saniye santrifüj edilir ve altta kalan sıvı atılmıştır.
6) Kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu 2 eklenerek 12000xg'de 20 saniye santrifüj edilir ve altta kalan sıvı atılmıştır. Altta kalan sıvıyla birlikte tüpte atılmıştır.
7) Kolonu yeni bir ependorfa aldıktan sonra filtrenin tam ortasına gelecek şekilde 50 µl RNase-Free Water eklenir, 12000xg'de 2.5 dakika santrifüj edilir, kolon atılır.

RNA Miktarının Belirlenmesi

RNA izolasyonu sonrasında elde edilen RNA miktarlarının belirlenmesi için nanodrop (Nano-Q) cihazı ile ilk önce RNase-Free Water 2 µl eklenerek 3 defa körleme işlemi yapılır. Bu işlemden sonra nanodrop cihazına 2 µl örneklerimizi okuttuktan sonra RNA miktarı ve saflığı belirlenir. Bundan sonra çıkan sonuçlara göre hesaplama yapılır ve 10 µl olacak şekilde örneklerden alınan RNA'ların üzerine 10 µl tamamlamak için su geri kalan miktar kadar kullanılır.

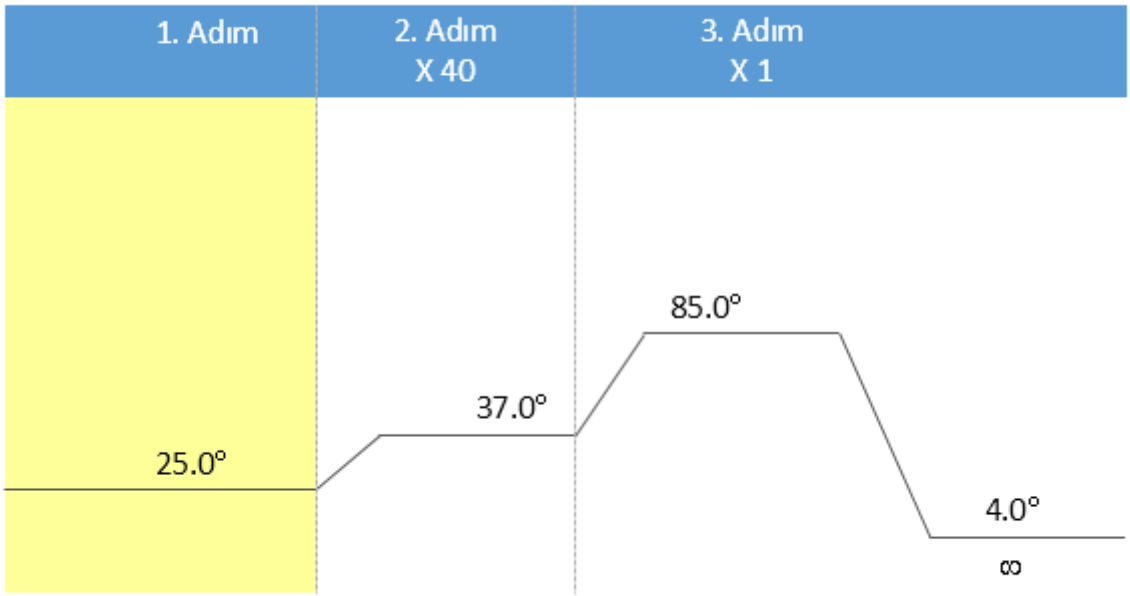
cDNA Eldesi

İzolasyon sonrası elde edilen RNA miktarları ölçülmüş ve tüm örneklerde eşitlenerek cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) ile kit protokolü uygulanarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak PCR tüplerine toplam hacim 10 µl olacak şekilde RNA eklendi ve üzerine Tablo 5'te verilen kit içeriği belirtilen miktarlarda pipet ile eklenmiştir.

Tablo 5. cDNA Reaksiyon Karışımı

Malzeme	Miktar(RNaz İnhibitörsüz)
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP mix(100mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
Multiscribe Revers Transkriptaz	1 µl
Nükleaz free su	4,2 µl
Toplam	**10 µl**

Toplam hacmi 20 µl (10 µl örnek+10 µl kit karışımı) olan her bir karışım ilk önce 10 µl RNA'lar eklendikten sonra her bir tüpe 10 µl cDNA mastermix konduktan sonra, PCR (Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler) cihazında Şekil 15'te 25^{o}C'de 10 dakika; 37^{o}C'de 40 döngü her döngü 3 dakika olacak şekilde 120 dakika ve 85^{o}C'de 5 dakika tutularak cDNA sentezlenmiştir.



Şekil 15. PCR cihazının çalıştırılma döngüsü

Kantitatif Real Time-PCR (qRT-PCR) Analizleri

PCR sonucunda çoğaltılan cDNA ölçümleri nanodrop cihazı ile yapıldıktan sonra tüm örnekler 5 kat sulandırılmıştır ve 400 ng/µl olacak şekilde cDNA sentezi yapılmıştır. Mitokondriyal apoptozise neden olan gen bölgelerine ait gen ekspresyonları qRT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar aşağıda verilmiş primerler ile SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems) kullanılarak gen ifadelerindeki değişimler belirlenmiştir. Buna göre her bir reaksiyon için toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems), F ve R primerler ve nükleaz free sudan oluşan karışım ve 2 µl cDNA ile reaksiyon başlatılarak qRT-PCR ile sonuçlar alınmıştır. Reaksiyon karışımlarınla kullanılacak ilgili genlerin F ve R primer dizileri Tablo 6'da verilmiştir;

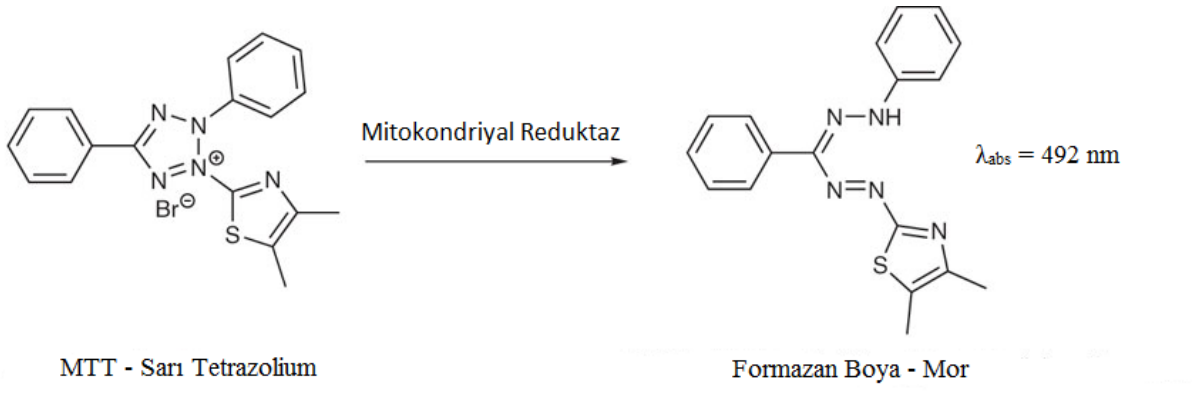
Tablo 6. RT-PCR'da kullanılan gen bölgeleri ve baz dizilişleri

Primer ismi	Baz dizisi
Bcl-2	F: 5' ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA -3' R: 5' ACAGTTCCACAAAGGCATCC -3'
p53	F: 5' CACGAGCGCTGCTCAGATAGC-3' R: 5'ACAGGCACAAACACGCACAAA-3'
Kaspaz-3	F: 5'-GGTATTGAGACAGACAGTGG-3' R: 5'- CATGGGATCTGTTTCTTTGC-3'
Bax	F: 5'-TTCATCCAGGATCGAGCAGA-3' R: 5'-GCAAAGTAGAAGGCAACG-3'
Sitokrom-c	F: 5'-AGTGGCTAGAGTGGTCATTCATTTACA-3' R: 5'-TCATGATCTGAATTCTGGTGTATGAGA-3'
Apaf-1	F: 5'-GATATGGAATGTCTCAGATGGCC-3′ R: 5'-GGTCTGTGAGGACTCCCCA-3'
GAPDH	F: 5'-TTGGTATCGTGGAAGGACTCA-3' R: 5'-TGTCATCATATTTGGCAGGTTT-3'
β-Actin	F: 5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3' R: 5'-GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA-3'

qRT-PCR program; 1 döngü 2 dakika 50ºC ve 10 dakika 95ºC, bunu takiben, 40 döngü denatürasyon (95ºC, 15 saniye), annealling (primer eşleşmesi) ve elongasyon (primer uzaması 60ºC, 1 dakika) ile çoğaltılmıştır. RT-PCR sonucu elde edilen veriler endojen kontrol olarak kullanılan GAPDH ve β-Actin'e göre normalize edilerek grafik halinde, kontrole göre oranlayarak ifade edilmiştir.

MTT Canlılık Testi

MTT canlılık testi metodu ile canlı hücrelerin oranı kolorimetrik olarak kantitatif ölçülen yöntemin adıdır. Canlı hücreler mitokondrilerinde bulunan "*süksinat dehidrogenaz*" enzim aktivitesine sahipken, ölü hücreler ise bu enzim aktivitesine sahip değildir. Bu metodun geliştiricisi de olan Mosmann ve arkadaşları dehidrogenaz aktivitesi ile canlı hücre sayısı arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (140). Nanoparçacıklar ile inkübe edilen hücre hatlarında maddelerin sitotoksik etkilerine göre, enzim aktivitelerinin azaldığı veya kaybolduğu gözlenmektedir. Bunun için, Şekil 16'da hücreler bu enzimin değişime uğrattığı 3-(4,5-dimethylthiazol-2-y2,5-difeniltetrazolimbromid (MTT) maddesine maruz bırakılmaktadır. Canlı hücrelerde mitokondride bulunan bu enzimin aktivitesi ile sarı renkli MTT boyasına DMSO eklenmesi ile mor formazan kristallerine dönüşmektedir.



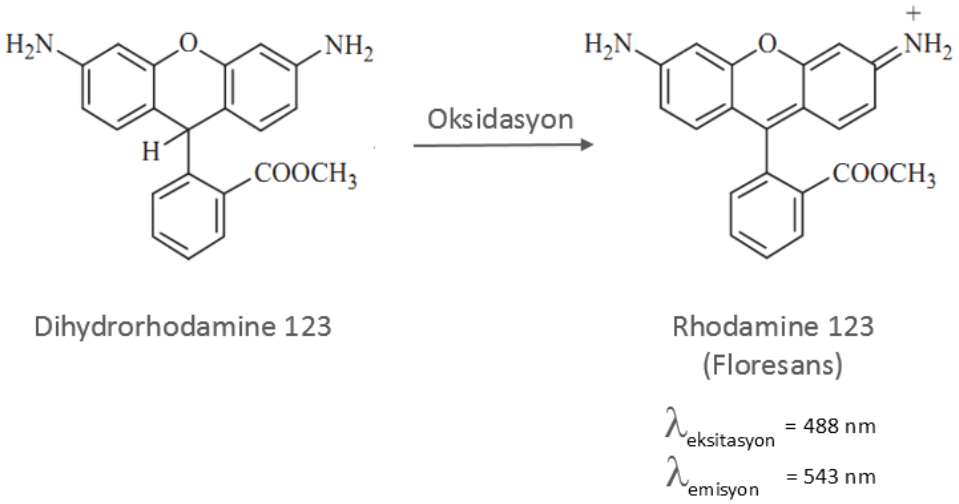
Şekil 16. MTT boyasının formazan kristallere dönüşmesinin şematik gösterimi

Her bir kuyu içerisinde 10^4 hücre/kuyu olacak şekilde hücre sayım cihazı (CASY Model TT system) ile sayılarak paylaştırıldı. Hücrelerin yeterli doluluğa ulaşmasından sonra 96'lık plate'lere kuyu başına yaklaşık olarak 10^4 hücre/kuyu başına 180 µl alınarak ekilmiştir. Hücrelerin hücre tabanına yapışması için inkübatörde 24 saat süre ile inkübasyonu sağlandıktan sonra hücrelere yukarıdaki Tablo 3'te belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan nanoparçacıkların 24 saat ve 48 saat süre ile inkübe edilmesiyle, hücre canlılıkları plate readerdan (Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN, Avusturya) okunan absorbans değerleri elde edilmiştir. Her bir kuyucuğun içerisinde bulunan hücre solüsyonu üzerine 20 µl MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) ilave edilerek bütün plateler inkübatörde 180 dakika boyunca boyanmaya bırakıldı. Boyanma sonrasında bütün platelerdeki sıvı aspiratör pompası

ile alındıktan sonra her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklendikten sonra 6'şar tekrarlı olmak üzere otomatik kuyucuk okuyucu (Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN, Avusturya) cihazında 490 nm ve 650 nm dalga boylarında okunup bu iki dalga boyunda okunan değerler birbirlerinden çıkartıldı.

Hücre içi ROT (Reaktif Oksijen Türleri) Analizi

MCF-7 ve HT-29 hücreleri MTT sonucunda her madde için IC50 değerleri belirlendi ve analizler bu konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süreyle çalışılan üç tip np'a maruz bırakıldı. Hücre içerisine Şekil 17'de görüldüğü gibi boyama süresince giren DHR-123 boyanın rhodamine-123 (Rh-123) kısmı hücre içindeki oksidasyon ile aktive edilerek floresan özellik göstermektedir.



Şekil 17. DHR-123 boyasının ROT ile tepkimeye girdiğinde Rhodamine 123 haline dönüşerek floresans özellik göstermesi.

MCF-7 ve HT-29 hücre süspansiyonları 100xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpertnatant atılır. Falkon tüpte bulunan hücre üzerine 5 ml hazırlanan Tablo 7'de Kalsiyum-Buffer hazırlandıktan sonra eklenir ve pipetaj yapılır. Her biri gruplar halinde 850 µl Kalsiyum-Buffer ve 150 µl hücre süspansiyonu olacak şekilde ependorflara alınarak üzerlerinde final konsantrasyonu 2 µM olan 3 µl Dihydrorhodamine 123 (DHR-123) olacak şekilde eklendikten sonra 45 dakika boyunca çalkamalı su banyosunda inkübe edildi (141). İnkübasyon sonrasında 400xg'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatantlar pipet yardımıyla alındıktan sonra

üzerlerine 300 µl Kalsiyum-Buffer eklenir ve her bir ependorfa ve bütün gruplarımızdaki boyanmış ve yıkama işlemi gerçekleştirilmiş hücrelerimizi 100 µl olarak 96 kuyucuklu floresans okumaları yapmak için kullanılan siyah mikro plate kuyucuklara yerleştirildi (142). Rhodamine-123 (Rh-123) maddesinin total miktar analizi ise 488 nm eksitasyon ve 543 nm emisyon dalga boylarında otomatik kuyucuk okuyucu (Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN, Avusturya) aracılığı ile yapıldı (143).

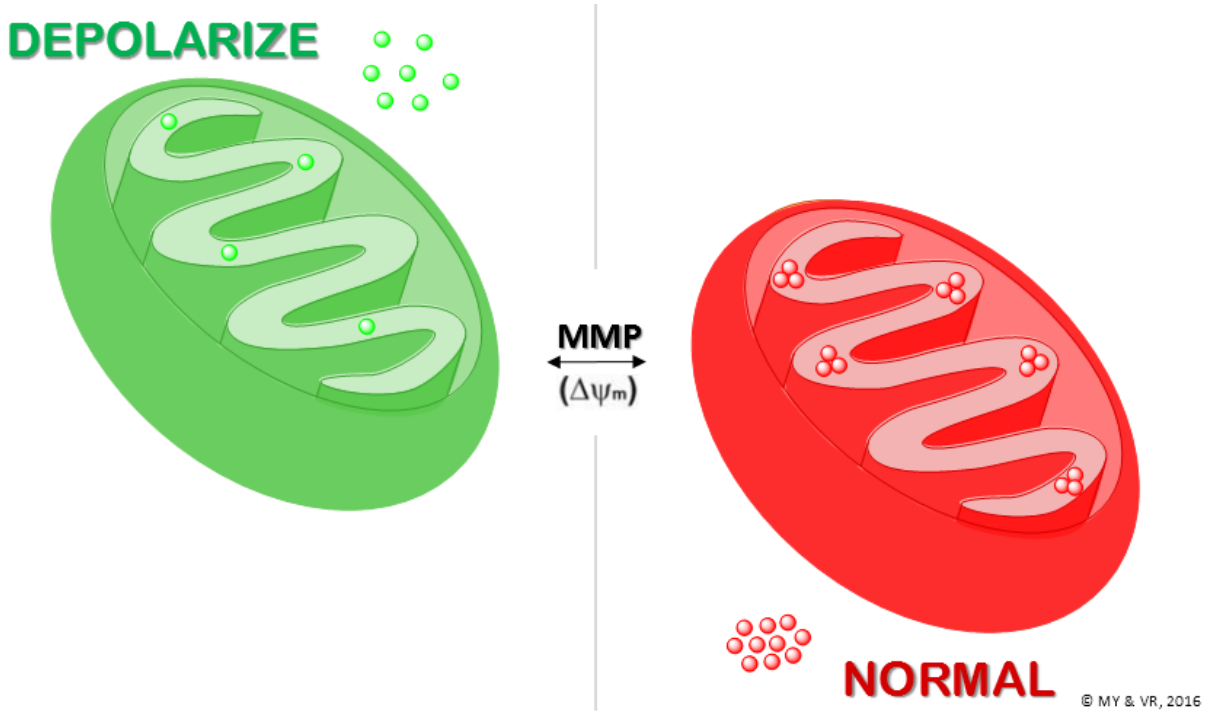
Tablo 7. Kalsiyum-Buffer Hazırlanışı (50 ml)

Malzeme	Miktar
Na-Hepes	50 ml
$CaCl_2$	50 µl
D-Glukoz	90 mg

Mitokondriyal Membran Depolarizayon Analizi

Hücre içinde $Ca2^+$ iyon akışı, mitokondrinin depolarize olması ile birlikte ROT ortaya çıkartırken katyon kapılarına zarar vererek hücre içi $Ca2^+$ miktarı artırmaktadır (144). Mitokondri içine daha fazla giren $Ca2^+$ iyonları nedeniyle mitokondrinin depolarize olmasıyla birlikte hücrenin apoptoza gitmesine neden olur. MCF-7 ve HT-29 hücreleri MTT sonucunda her madde için IC50 değerleri belirlendi, analizler belirlenen konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süreyle çalışılan üç tip np'a maruz bırakıldı. MCF-7 ve HT-29 hücre süspansiyonları 100xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpertnatant atılır. Falkon tüpte bulunan hücre üzerine 5 ml hazırlanan Kalsiyum-Buffer eklendikten sonra pipetaj yapılarak her biri gruplar halinde ependorflarına alınarak üzerlerinde 10 µl JC-1 boyası final konsantrasyonu 1 µM olacak şekilde ayarlandıktan sonra eklenerek 37^{o}C'de 45 dakika boyunca çalkamalı su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 400xg'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatantlar pipet yardımıyla alındıktan sonra üzerlerine her bir ependorfa 300 µl Kalsiyum-Buffer eklenir ve bütün gruplarımızdaki boyanmış ve yıkama işlemi gerçekleştirilmiş hücrelerimizi 100 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu floresans okumaları yapmak için kullanılan siyah mikro plate kuyucuklara yerleştirildi (145). Hücre içerisine boyama süresince giren JC-1 katyonik bir boya olup mitokondride meydana gelen potansiyel değişimlerini analiz etmemize yarayan bir boyadır. Bu boya Şekil 18'de

floresans yoğunluğun kırmızıdan yeşile dönmesi ile kırmızı/yeşil oranın azalması ile mitokondride bir depolarizasyonun oluştuğunu bize gösterir.



Şekil 18. JC-1 boyası ile mitokondrinin tepkimeye girmesi ile meydana gelen normal ve depolarize olmuş mitokondrinin gösterimi

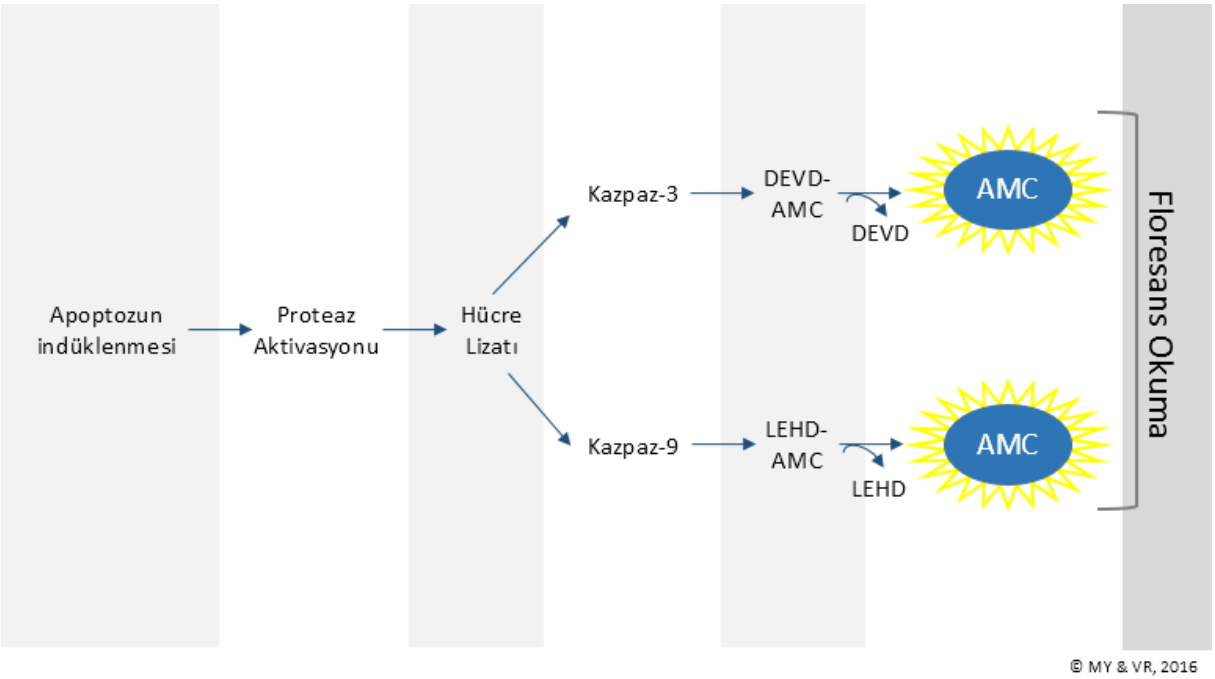
Yeşil olan floresans ışımaların analizi ise 485 nm eksitasyon ve 535 nm emisyon dalga boylarında okunurken, kırmızı ışıma yapanlar ise 540 nm eksitasyon ve 590 nm emisyon dalga boylarında okunmuştur. Floresans değişimler ise spektrofotometre (Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN, Avusturya) aracılığı ile yapıldı.

Kaspaz 3 ve 9 Enzim Aktiviteleri Tayini

Kaspazlar apoptozis sürecinde önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Öncelikli aktif olmayan proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli mekanizmalarla aktive edilirler ve hücresel hedeflerdeki tetrapeptid yapıdaki motifleri tanır ve mevcut halde olan substratı, bir karboksil aracılığıyla ayırır.

Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücresel ve fizyolojik olay, bu enzimlerin rol oynadığı süreçler neticesinde devam ettiği bilinmektedir (146,147). Kaspaz-3 ve kaspaz-9 tamponlarının hazırlanması için 2,5 ml kaspaz-3 ve kaspaz-9'un ham buffer solüsyonlarından 15 ml'lik falkon tüplerine konuldu. Her iki tampona da 2,5 µl 23ºC'de NP-40'dan ilave edildi, sonrasında vortekste karıştırıp floresan kaspaz DTT

boyasından kaspaz-3 ve kaspaz-9 bufferlar'ının üzerine sırasıyla 10 µl ve 2,5 µl konulup güzelce vortekste karıştırıldı. Şekil 19'da gösterildiği gibi Kaspaz-3 ve kaspaz-9 proteinlerinin floresans özellik göstermesi sunulmuştur (148). MCF-7 ve HT-29 hücreleri MTT sonucunda her madde için IC50 değerleri belirlendi analizler bu konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süreyle, çalışılan üç tip np'ye maruz bırakıldı.



Şekil 19. Apoptoza uğrayan hücrenin Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 proteinlerinin floresans olarak okuma şeması

Hücrelerimizi Kalsiyum-Buffer solüsyonuyla sulandırıldıktan sonra her bir plate kuyucuğu'na 15 µl olacak şekilde eşit bir şekilde konuldu. Üzerine de öncesinde hazırlamış olduğumuz kaspaz-3 ve kaspaz-9 tamponlarından 50 µl konuldu ve sonrasında açığa çıkan enzimler (Infinite 200 marka, Avusturya) cihazında 360 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boylarında okunarak kaspaz-3 ve 9 aktiviteleri değerlendirildi. Tablo 8 ve 9'da AC-DEVD-AMC kaspaz-3 ve Tablo 10 ve 11'de AC-LEHD-AMC kaspaz-9 bufferların hazırlanışı gösterilmiştir. Elde edilen veriler kontrole kıyasla misli artış olarak değerlendirildi (177).

Tablo 8. Kaspaz 3 Reaksiyon Buffer Hazırlanışı

Malzeme	Miktar
DTT (5mM)	12,5 µl
NP40	2,5 µl
Kaspaz-3 Boya	2,5 µl
Kaspaz-3 Buffer (Tablo 9)	2,5 ml

Tablo 9. Kaspaz 3 Buffer Hazırlanışı (100 ml)

Malzeme	Miktar
HEPES (0,1 M)	2,38 g
Sucrose	1 g
CHAPS	100 mg

Tablo 10. Kaspaz 9 Reaksiyon Buffer Hazırlanışı

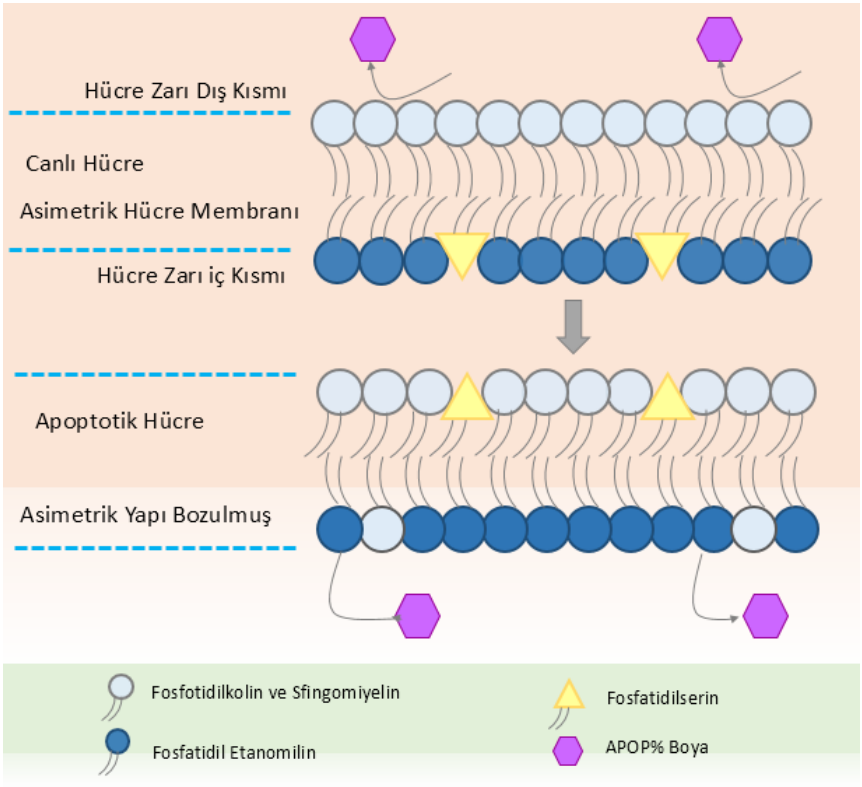
Malzeme	Miktar
DTT (5mM)	12,5 µl
NP40	2,5 µl
Kaspaz-9 Boya	2,5 µl
Kaspaz-9 Buffer (Tablo 11)	2,5 ml

Tablo 11. Kaspaz 9 Buffer Hazırlanışı (100 ml)

Malzeme	Miktar
Mes Hydrat (0,1 M)	10 ml
PEG	1 g
CHAPS	100 mg

Apoptoz Analizi

MCF-7 ve HT-29 hücreleri MTT sonucunda her madde için IC50 değerleri belirlendi ve analizler bu konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süreyle, çalışılan üç tip np'a maruz bırakıldı. Sonuçlar grupların absorbans değerlerine göre grafik olarak ifade edildi. Kitin çalışma prensibinden bahsetmek gerekirse, sadece apoptozis sürecine giden hücreler tarafından oluşturulacak olan renk değişimi prensibine dayanmaktadır (149). Apoptotik süreci başlamamış Şekil 20'de görüldüğü hücrelerin hücre zarından boya geçemezken, apoptotik süreci başlamış, diğer bir ifade ile hücre zarı asimetrisi bozulmuş hücrelerin zarından boya rahatlıkla geçebilmektedir (150). Böylece kit içerisindeki boya apoptoz süreci başlayan hücre grubunun bireylerinin sitoplazmalarının içerisinde birikir ve biriken bu boya yine kitin içerisinde diğer boyar maddenin eklenmesi ile inkübasyon ortamına geçmesi sağlanır. Hücrelere ilk önce apoptotik ajan ilave edildi (151).



Şekil 20. APOP% boyasıyla boyanan hücrenin şematik gösterimi

APO Percentage apoptozis kiti (Biocolor, Belfast, UK) tanımına göre elde ettiğimiz hücre süpernatantı otomatik kuyucuk okuyucu (Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN, Avusturya) cihazında 550 nm dalga boyunda okundu.

Kullanılan Ekipmanlar

Aşağıda belirtilen sıra ile bu çalışmada kullanılan ekipmanların listesi verilmiştir.

1) İnkübator (Shel Lab ve Panasonic)
2) Inverted Mikroskop(Nikon TS100)
3) Laminar Flow Kabin(Faster ve Jouan B4I Fransa)
4) Distile Su
5) Santrifrüj(PrO-Research)
6) Buzdolabı
7) Deepfreeze -150 ^{o}C
8) Sıvı Nitrojen Tankı
9) Su Banyosu
10) Aspirasyon Pompası
11) Vorteks(Wisemix)
12) Atık Haznesi
13) Hassas Terazi, Scaltec SPB 32 (İsviçre)
14) Soğutmalı Santrifüj, Kubota, (Japonya)
15) Derin Dondurucu, Uğur (Türkiye)
16) Inverted Floresan Mikroskop, Zeiss, Axiovert 40CFL (Almanya)
17) Otomatik Pipetler, Eppendorf (Almanya) ve Gilson (Fransa)
18) pH Metre, Hanna Instruments (Portekiz)
19) Manyetik Karıştırıcı, Nüve (Türkiye)
20) CO_2 İnkübatör, Heal Force, Smart Cell (Japonya)
21) Hücre Kültürü Flask, Cell Star, Greiner bio-one (Almanya)
22) 96 Kuyucuklu Şeffaf Mikroplate, Greiner Bio-one (Almanya)
23) 96 Kuyucuklu Siyah Mikroplate, Greiner Bio-one (Almanya)
24) Plate Reader Fluorescence, Infinite 200 PRO, TECAN (Avusturya)
25) Vorteks, Nüve NM 100 (Türkiye)

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Aşağıda belirtilen sıra ile bu çalışmada kullanılan kimyasalların listesi verilmiştir.

1) Fetal Bovine Serum, Merck (Almanya)
2) DMSO(Dimethyl Sulphoxide) Hybri-Max, Sigma (Almanya)
3) Falkon tüp (50 ml ve 15 ml, Biolab, Macaristan)
4) Penicillin Streptomisin
5) RPMI-1640
6) 25 cm^2 kültür kabı (İsviçre)
7) 75 cm^2 kültür kabı (İsviçre)
8) Penisilin-G (100 U/ml) Streptomisin (100µg/ml), (Hyclone, USA)
9) RPMI 1640 (Hyclone, USA)
10) Dihydrorhodamine-123(DHR-123), Santa Cruz
11) EGTA, Merck (Almanya)
12) Kaspaz-3, Sigma (Almanya)
13) Kaspaz-9, Bachem (İsviçre)
14) JC-1, Santa Cruz
15) ZnO Nanoparçacık, Sigma
16) SiO_2 Nanoparçacık, Sigma
17) Ag Nanoparçacık, Sigma
18) Dulbecco Modified Eagle Medium(DMEM), Gibco
19) HAM's F12, Gibco
20) ZnO nanoparçacık, Sigma
21) SiO_2 nanoparçacık, Sigma
22) Ag nanoparçacık, Sigma

İstatiksel Analiz

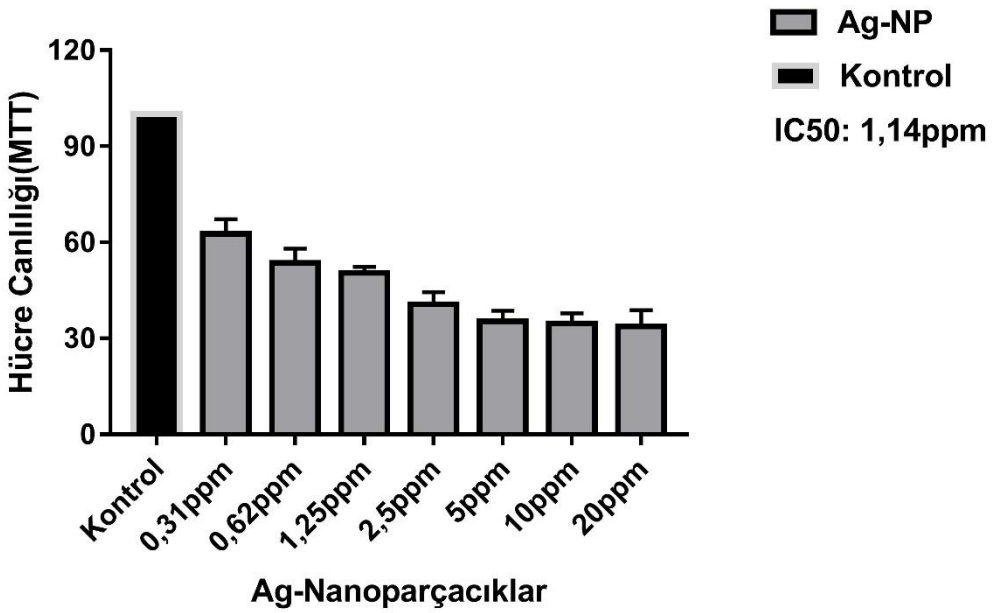
MTT testi sonuçlarında IC50 değeri verilerin özelliğine göre lineer regresyon eşitliği ya da probit analizi ile saptanmıştır ($p \leq 0.05$) Spektrofotometrik analizler ve Real Time PCR çalışmalarında gruplar arasında gen ekspresyon farklarının belirlenmesinde ΔΔCt metodu kullanılmış, kalibrasyon eğrisi ve düzeltme faktörü olarak β-Actin ve GAPDH, kontrol grubu ve deneme gruplarının karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi yapılmış ve ortalamaların girdiği gruplar Duncan Testi ($p \leq 0.05$) ile belirlenmiştir.

BULGULAR

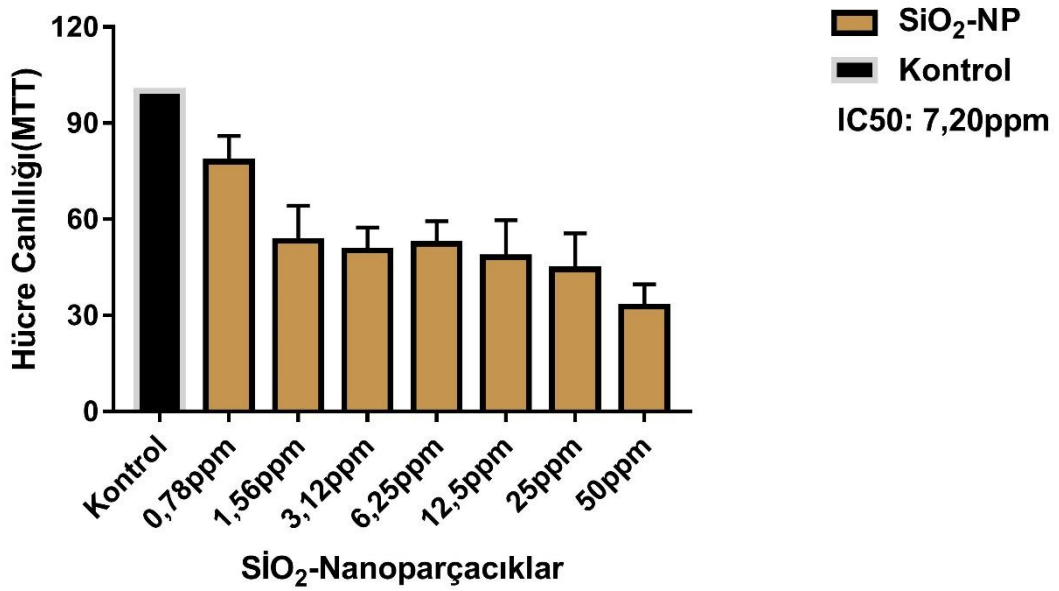
HÜCRE CANLILIĞI(MTT) TEST SONUÇLARI

HT-29 Kolon Kanseri Hücre Hattına 24 Saat Boyunca Uygulanan Nanoparçacıkların Hücre Canlılığına Etkileri

Çalışmamızda üç farklı np kullandık bunlar sırasıyla Ag, SiO_2 ve ZnO'dur. HT-29 hücrelerine 24 saatlik inkübasyon süreci sonunda uyguladığımız np'ler için hücre canlılığı sonuçları, Şekil 21 ve 22'de gösterilmiştir. 24 saat olarak verilen maddelerin sonuçlarına göre, uygulanan parçacık dozu arttıkça hücre canlılığında eksponansiyel olarak bir azalma olduğunu gözlemledik. Hücre canlılığından elde edilen verilerle IC50 değerleri her bir parçacık için hesaplanmıştır. Sonuç olarak verilen madde dozu arttıkça nano-parçacıkların toksisiteye neden olduğunu söyleyebiliriz.

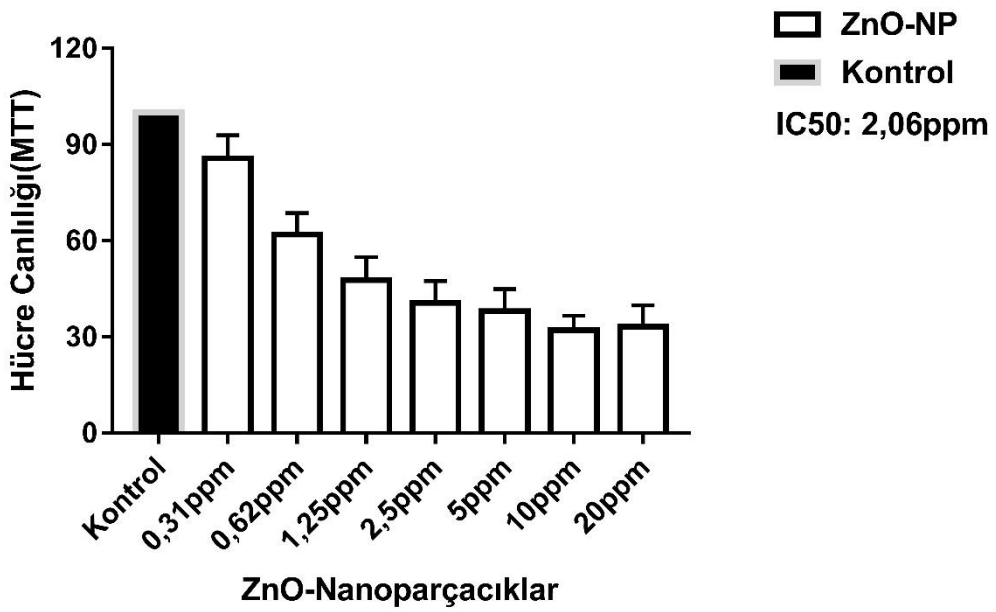


Şekil 21. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Ag nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 22. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan SiO_2 nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

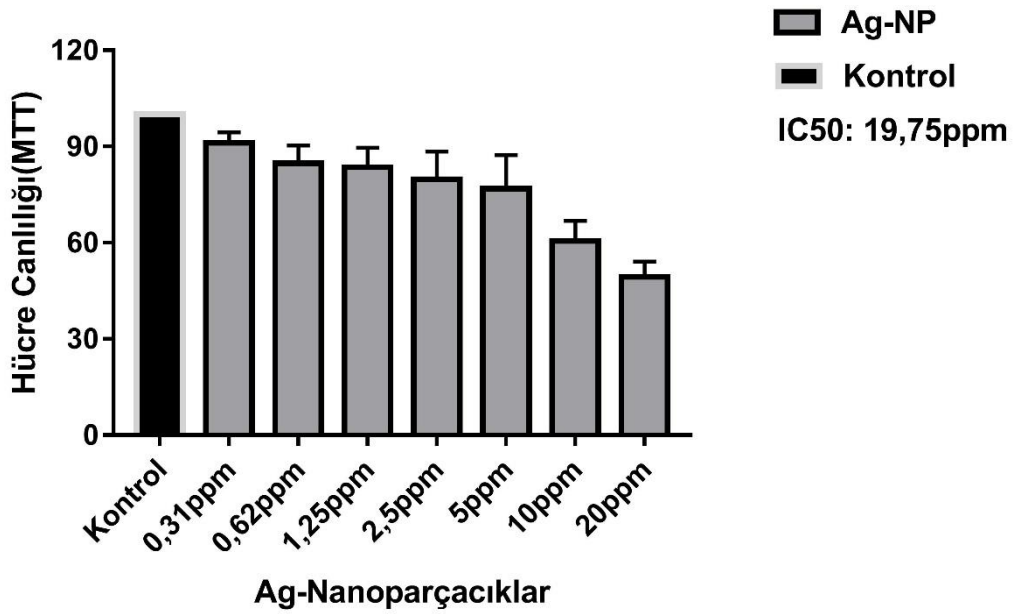
Aşağıda bulunan Şekil 23'te ZnO np'ler için 24 saatlik uygulama sonucunda elde edilen canlılık testi gösterilmiştir.



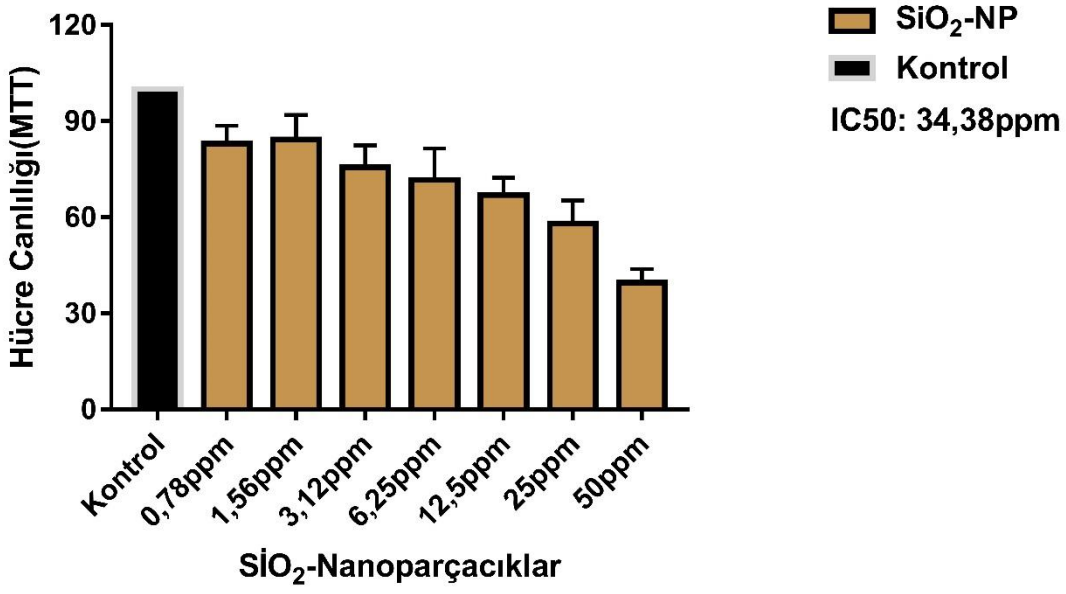
Şekil 23. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ZnO nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

HT-29 Kolon Kanseri Hücre Hattına 48 Saat Boyunca Uygulanan Nanoparçacıkların Hücre Canlılığına Etkileri

Hücre canlılığı sonuçları HT-29 hücrelerinde, uygulanan her np için 48 saat inkübasyon süresi sonunda, Şekil 24 ve 25'de gösterilmiştir. Uygulanan np doz miktarı arttıkça hücre canlılığında büyük bir azalma olurken, düşük dozlarda parçacıkların hücre canlılığına etkisi neredeyse birbiri ile aynı olduğunu gözlemledik.

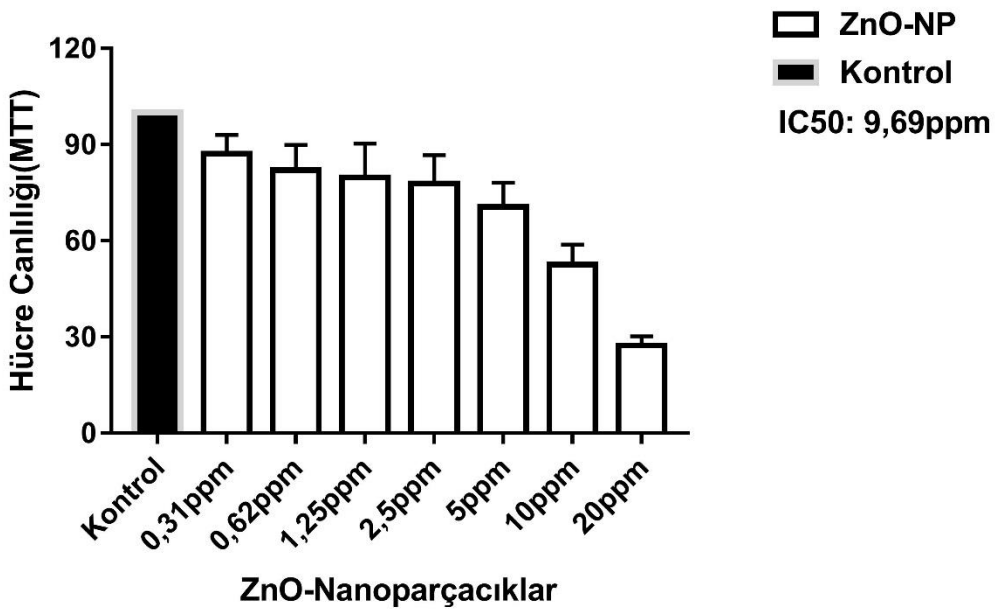


Şekil 24. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Ag nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 25. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan SiO_2 nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

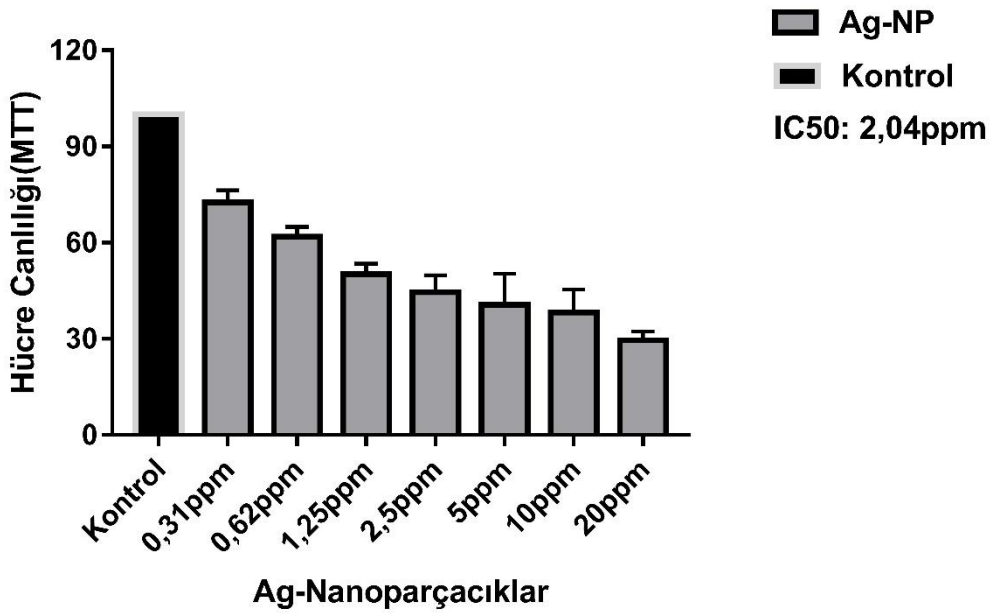
Aşağıda bulunan Şekil 26'da ZnO np'ler için 48 saatlik uygulama sonucunda elde edilen canlılık testi gösterilmiştir.



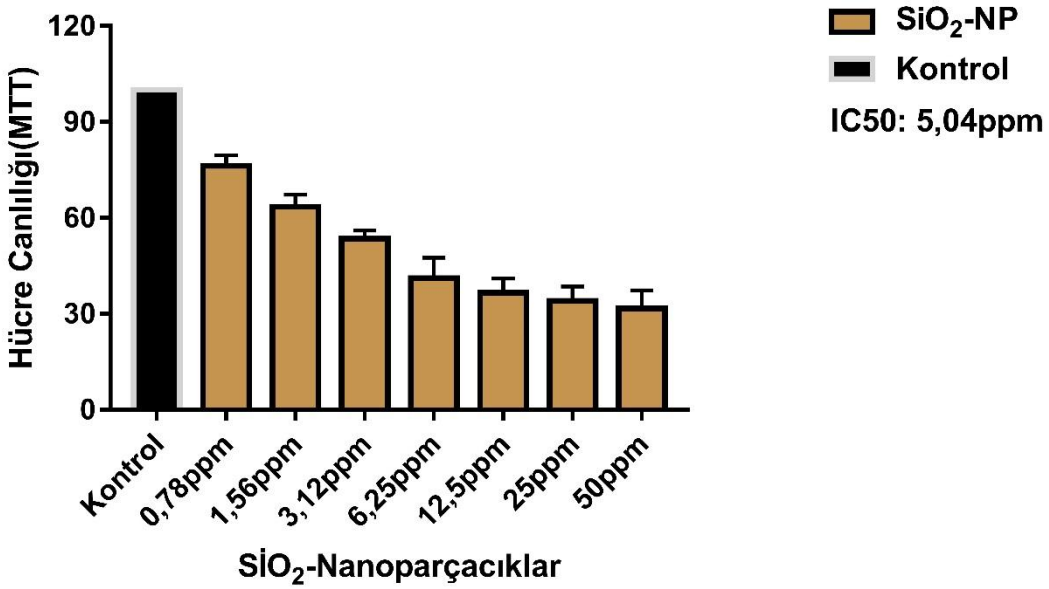
Şekil 26. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ZnO nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattına 24 Saat Boyunca Uygulanan Nanoparçacıkların Hücre Canlılığına Etkileri

Hücre canlılığı sonuçları MCF-7 hücrelerinde, uygulanan her parçacık için 24 saat inkübasyon süresi sonunda Şekil 27 ve 28'de gösterilmiştir. 24 saat olarak verilen maddelerin sonuçlarına bakıldığında, uygulanan parçacık dozu arttıkça hücre canlılığının eksponansiyel olarak bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Hücre canlılığından elde edilen verilerle IC50 değerleri her bir parçacık için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Buradan çıkan sonuçlara göre verilen madde dozu arttıkça nano-parçacıkların toksisiteye neden olduğunu gözlemledik.

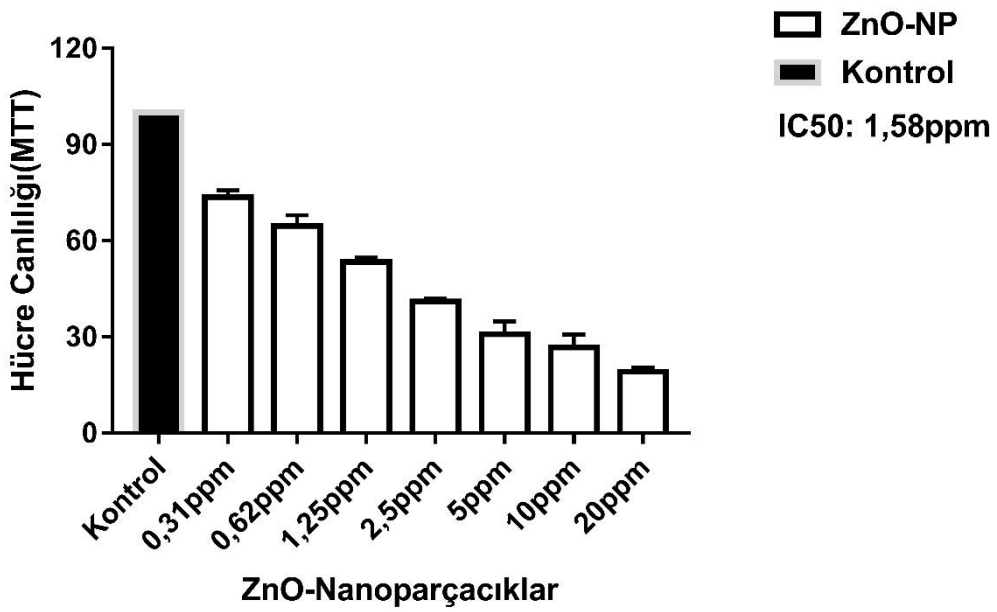


Şekil 27. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Ag nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 28. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan SiO_2 nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

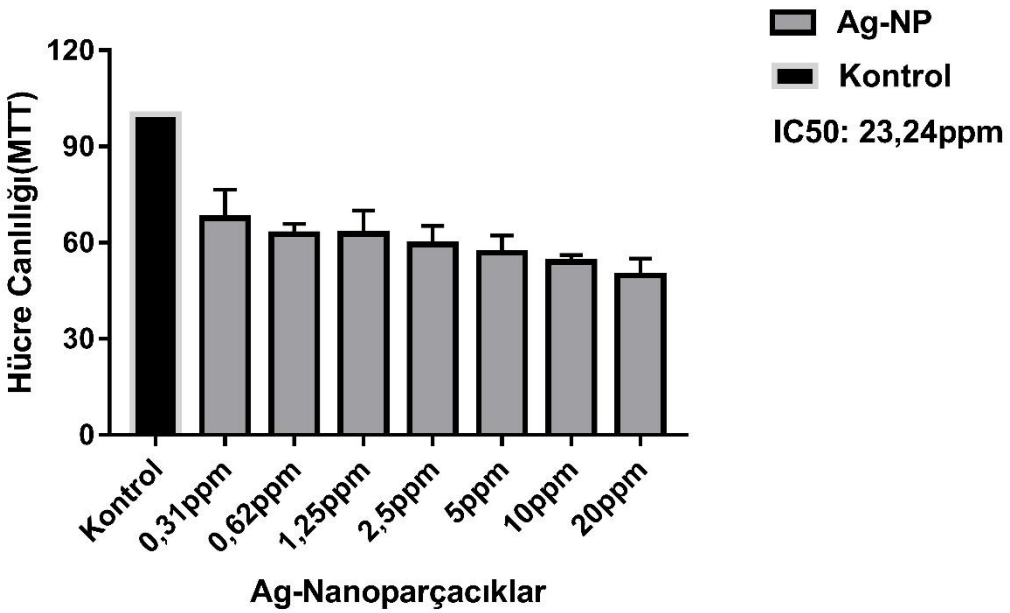
Aşağıda bulunan Şekil 29'da ZnO np'ler için 24 saatlik uygulama sonucunda elde edilen canlılık testi gösterilmiştir.



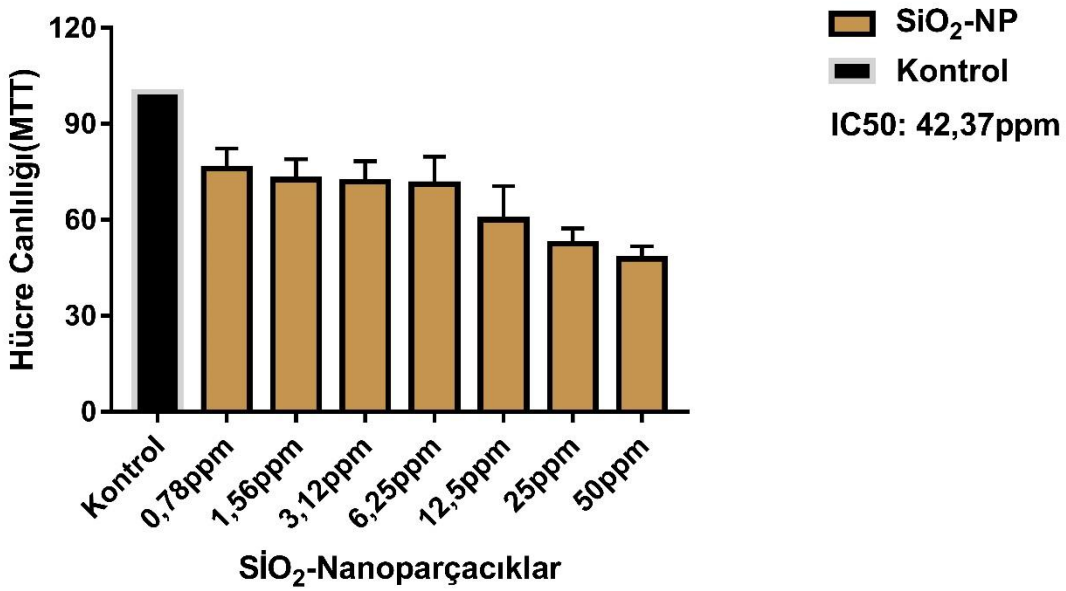
Şekil 29. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ZnO nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattına 48 Saat Boyunca Uygulanan Nanoparçacıkların Hücre Canlılığına Etkileri

Hücre canlılığı sonuçları MCF-7 hücrelerinde, uygulanan her parçacık için 48 saat inkübasyon süresi sonunda Şekil 30 ve 31'de gösterilmiştir. Gümüş np uygulamasında neredeyse bütün dozların hücre canlılığına etkisi aynı iken, diğer iki parçacıkta ise son iki yüksek dozun hücre canlılığına olan etkisi diğer dozlardan farklı olduğu gözlemlenmiştir.

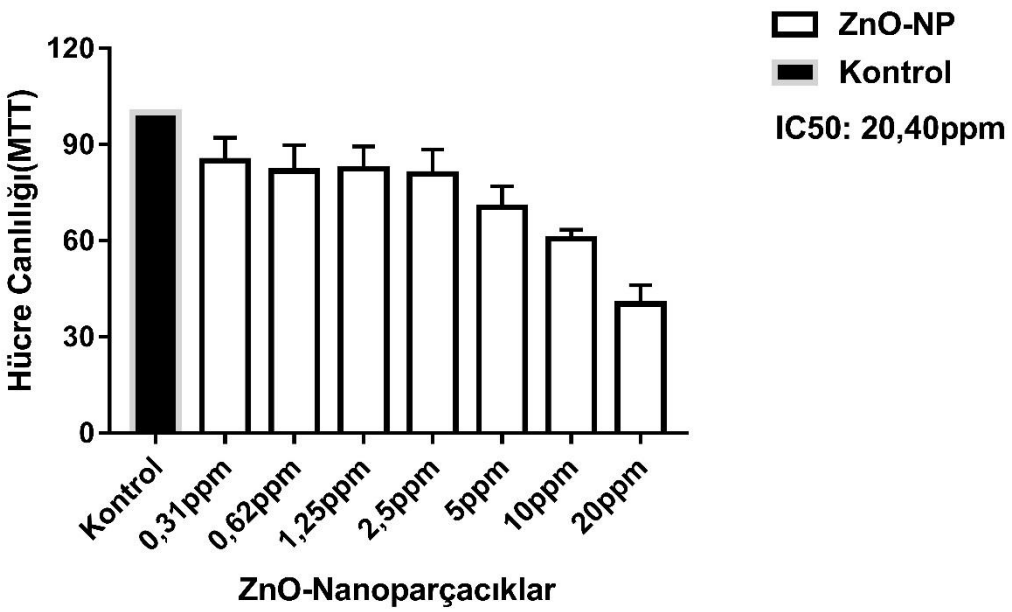


Şekil 30. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Ag nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 31. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan SiO_2 nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

Aşağıda bulunan Şekil 32'de ZnO np'ler için 48 saatlik uygulama sonucunda elde edilen canlılık testi gösterilmiştir.



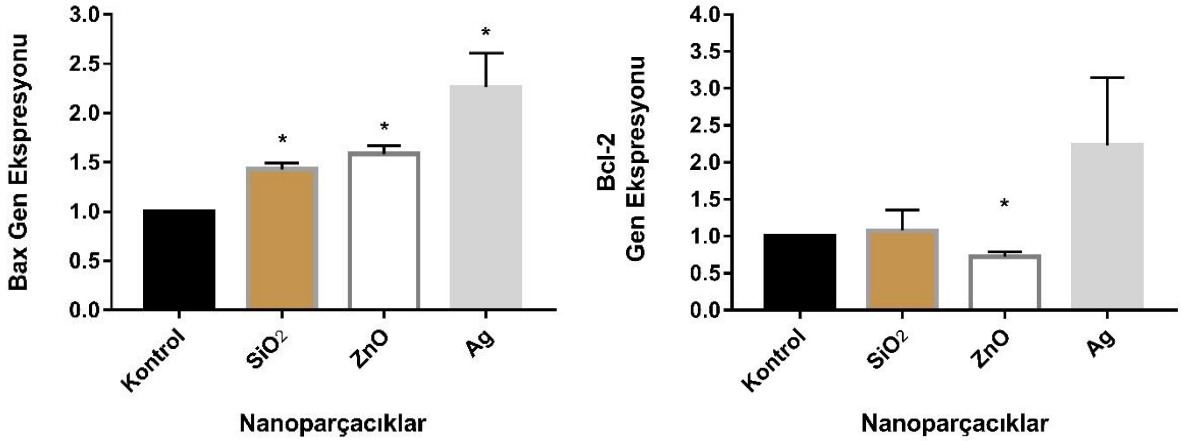
Şekil 32. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ZnO nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD)

GEN EKSPRESYON SONUÇLARI

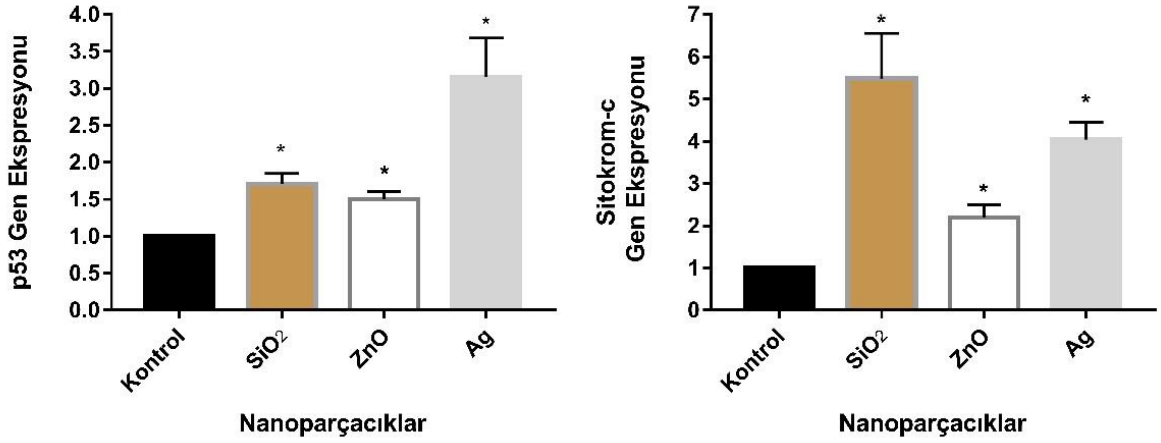
Nanoparçacık uygulamasının yapıldığı HT-29 hücre hatlarında Bax, Bcl-2, p53, Sitokrom-c, Apaf-1 ve Kaspaz-3 genlerin ekspresyonuna kontrol ve deneme grupları olmak üzere MTT testlerinden belirlen IC50 dozlarının uygulandığı hücrelerde ekspresyon analizleri yapılmıştır. Yapılan ekspresyon analizleri ΔΔCt metodu ile hesaplanarak fold-change değerleri bulunmuştur. Ekspresyon sonuçları GAPDH referans geni kullanılarak normalize edilerek belirlenmiştir.

HT-29 Kolon Kanseri Hücre Hattına 24 Saat Boyunca Uygulanan Nanoparçacıkların 6 Bölgedeki Gen Ekspresyonları

Uygulanan maddelerin HT-29 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonlarında (Ag: 1,14 ppm, SiO_2: 7,20 ppm ve ZnO: 2,06 ppm) 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra, gen ekspresyon değerleri Şekil 33, 34 ve 35'de gösterilmiştir. Gen ekspresyon değerleri nanoparçacıkların türüne göre birbirinden farklı sonuçlar vermektedir. Uygulanan nanoparçacıkların hücreleri ($p<0,05$) apoptoza götürdüğü görülmektedir.

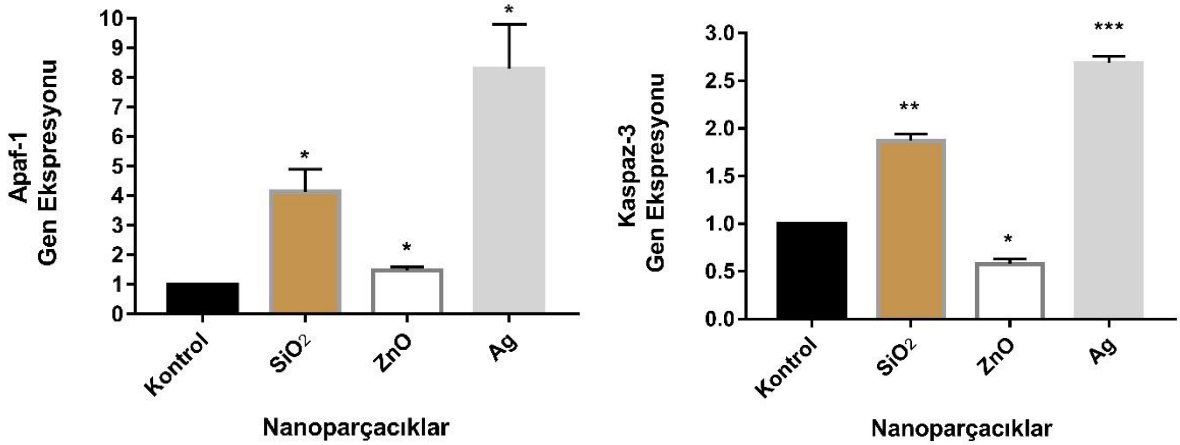


Şekil 33. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Bax ve Bcl-2 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 34. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların p53 ve Sitokrom-c ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

*p<0,05 ve kontrol grubuna göre

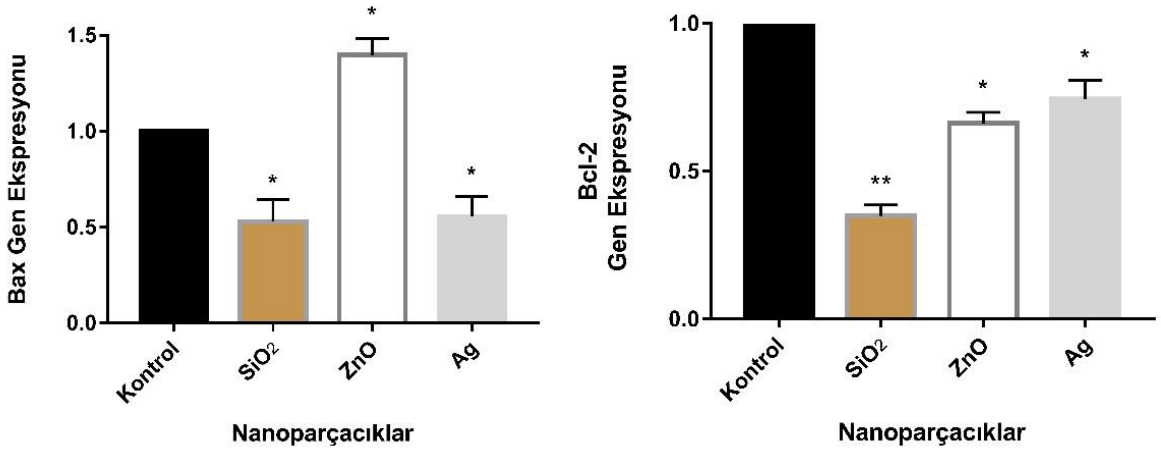


Şekil 35. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apaf-1 ve Kaspaz-3 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

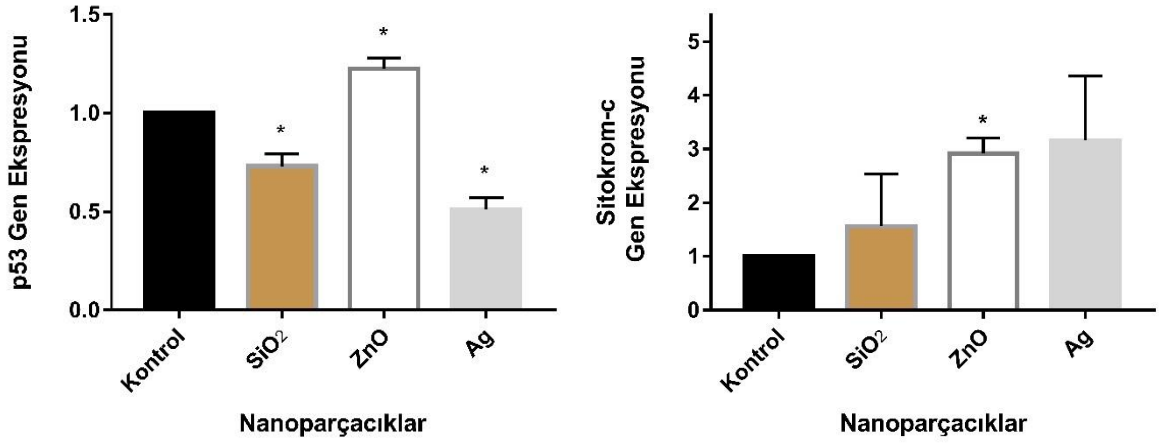
*p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001 kontrol grubuna göre, bütün deneyler 3 tekrarlı

HT-29 Kolon Kanseri Hücre Hattına 48 Saat Boyunca Uygulanan Nanoparçacıkların 6 Bölgedeki Gen Ekspresyonları

Uygulanan maddelerin HT-29 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonlarında (Ag: 19,75ppm, SiO_2: 34,38ppm ve ZnO: 9,69ppm) 48 saat süre ile inkübe edildikten sonra, gen ekspresyon değerleri Şekil 36, Şekil 37 ve Şekil 38'de gösterilmiştir. Gen ekspresyon değerleri nanoparçacıkların türüne göre birbirinden farklı sonuçlar vermektedir. Uygulanan ZnO nanoparçacıklarının hücreleri ($p<0,05$) apoptoza götürdüğü görülmektedir. Buna karşın diğer iki parçacığın uygulandığı hücrelerde mitokondriyal apoptotik yolağı kullanmadığı izlenimi vermektedir.

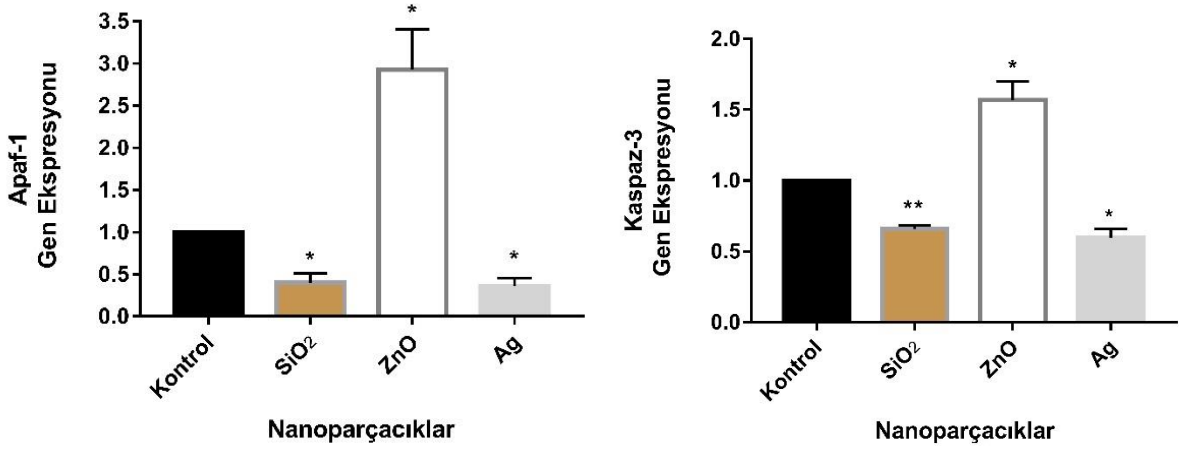


Şekil 36. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Bax ve Bcl-2 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)



Şekil 37. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların p53 ve Sitokrom-c ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

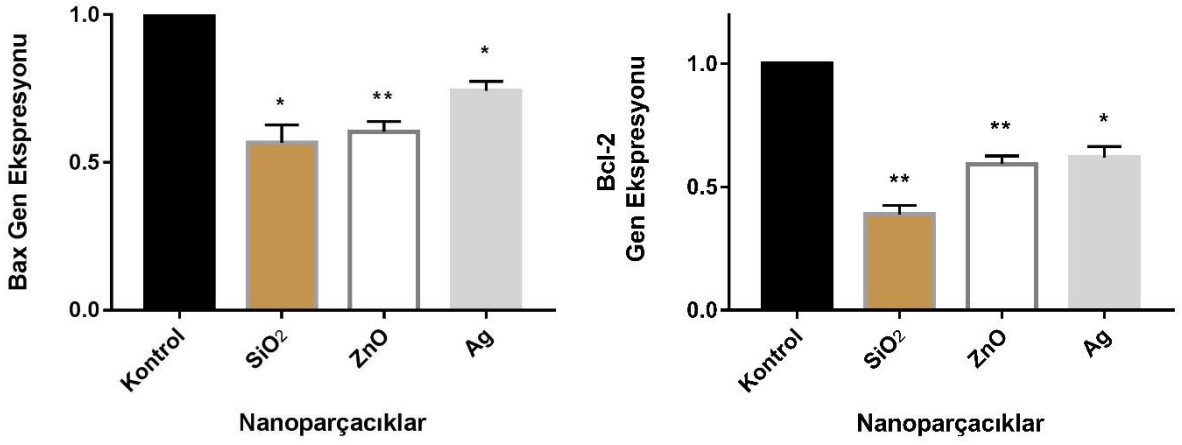
*p<0,05 kontrol grubuna göre



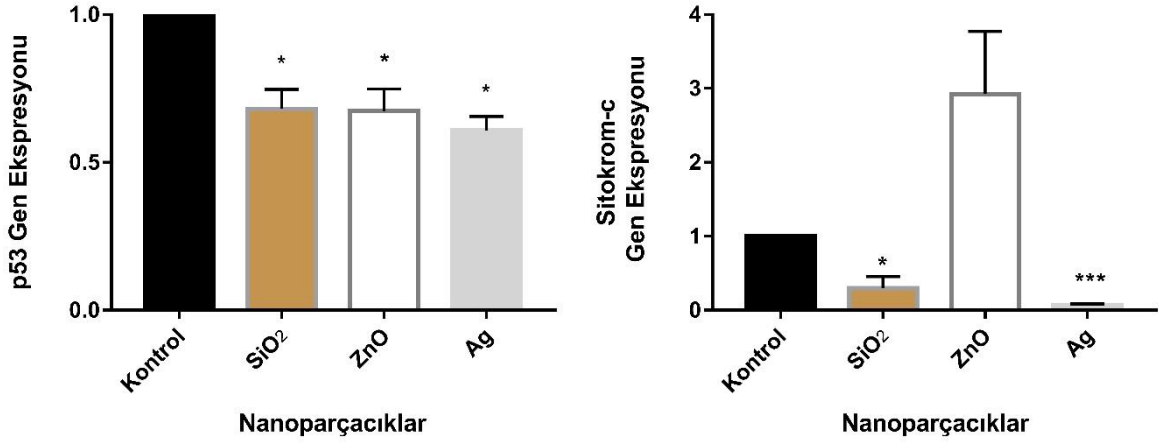
Şekil 38. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apaf-1 ve Kaspaz-3 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattına 24 Saat Boyunca Uygulanan Nanoparçacıkların 6 Bölgedeki Gen Ekspresyonları

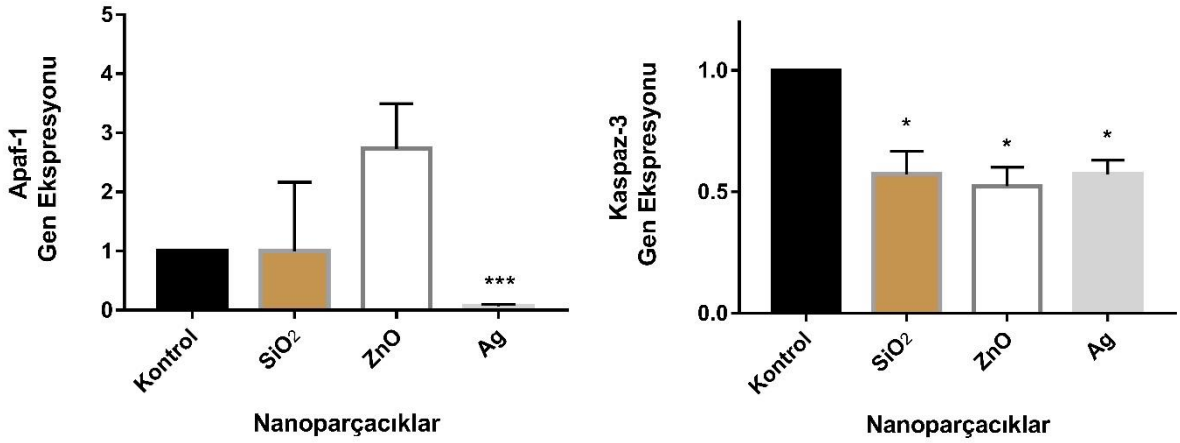
Uygulanan maddelerin MCF-7 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonlarında (Ag: 2,04 ppm, SiO_2: 5,04 ppm ve ZnO: 1,58 ppm) 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra, gen ekspresyon değerleri Şekil 39, 40 ve 41'de gösterilmiştir. Verilen nanoparçacıkların, hücreleri ($p<0,05$) apoptoza götürdüğü görülmektedir. Ancak testleri yapılan ekspresyonlardan, verilen parçacıkların türü ile ilişkili olarak, kontrol grubuna göre sitokrom-c ve apaf-1 SiO_2 ve Ag np için artarken diğer ekspresyonlar kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 39. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Bax ve Bcl-2 ekspresyonu üzerine etkileri(ortalama±SD)



Şekil 40. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların p53 ve Sitokrom-c ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

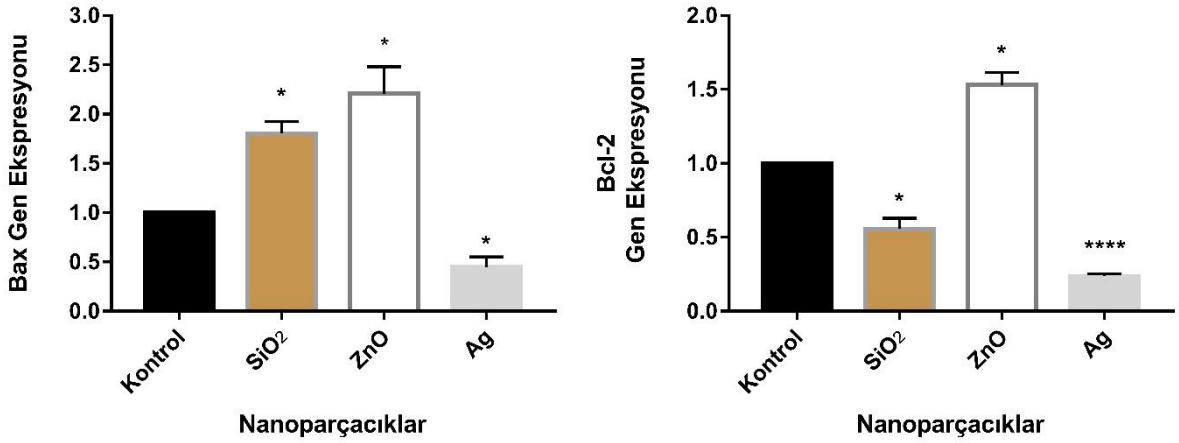


Şekil 41. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apaf-1 ve Kaspaz-3 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

*p<0,05 ve ***p<0,01 kontrol grubuna göre

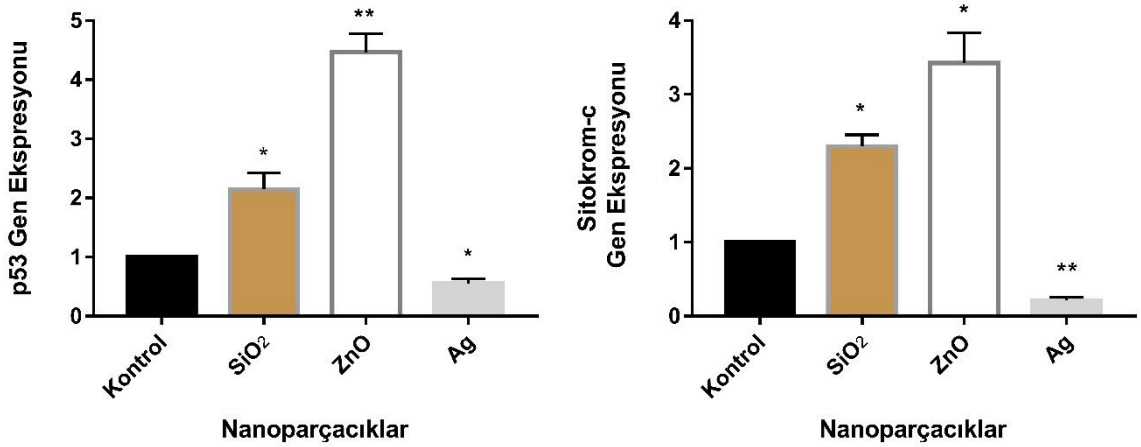
MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattına 48 Saat Boyunca Uygulanan Nanoparçacıkların 6 Bölgedeki Gen Ekspresyonları

Uygulanan maddelerin MCF-7 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonlarında (Ag: 23,24 ppm, SiO_2: 42,37 ppm ve ZnO: 20,40 ppm) 48 saat süre ile inkübe edildikten sonra, gen ekspresyon değerleri Şekil 42, 43 ve 44'de gösterilmiştir. Uygulanan nanoparçacıkların tümünün hücreleri ($p<0,05$) apoptoza götürdüğü görülmektedir. Ancak çalışmamızda bütün nanoparçacıkların IC50 değerleri ile ilişkili olarak inkübasyon süreleri uzadıkça madde konsantrasyonlarında artışa yol açtığı gözlenmiştir. Çalışmamızın 48 saatlik inkübasyon sonuçlarında SiO_2 ve ZnO nanoparçacıkların hücreleri apoptoza indüklediğini gözlemledik. Tam tersine Ag nanoparçacığın uygulandığı hücrelerde ise hücrelerin apoptoz yerine şaşırtıcı bir şekilde hücre proliferasyonunu artırdığını gözlemledik.

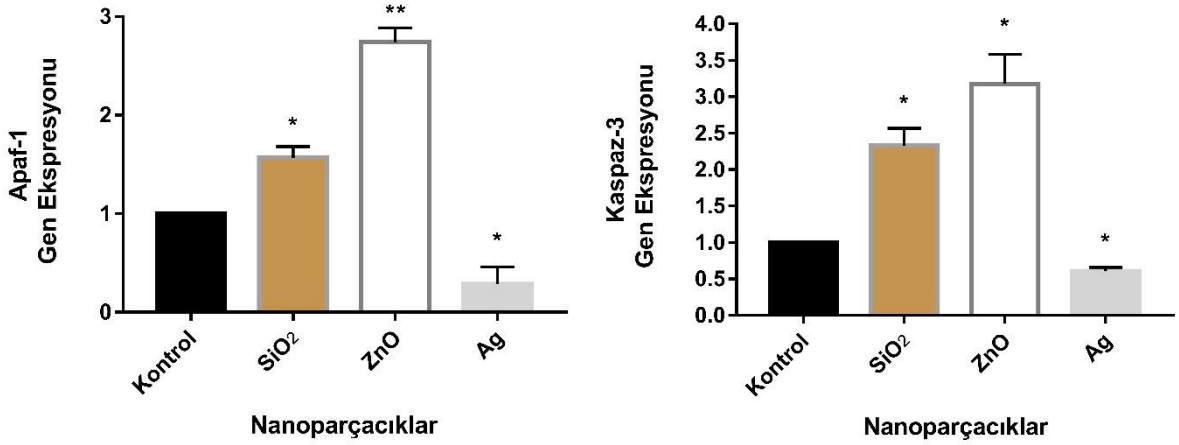


Şekil 42. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Bax ve Bcl-2 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

*$p<0,05$ ve ****$p<0,0001$ kontrol grubuna göre



Şekil 43. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların p53 ve Sitokrom-c ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

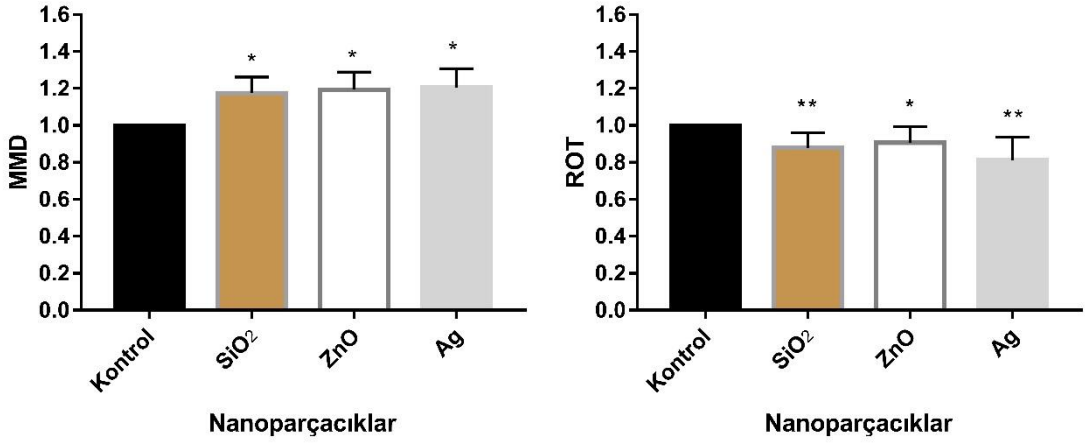


Şekil 44. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların p53 ve Sitokrom-c ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)

*p<0,05 ve **p<0,01 kontrol grubuna göre

HT-29 Hücrelerinde 24 Saat Sonucunda Mitokondriyal Depolarizasyon ve Hücre İçi ROT Değerleri Üzerinde Nanoparçacıkların Etkileri

Uygulanan maddelerin HT-29 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonlarında (Ag: 1,14 ppm, SiO_2: 7,20 ppm ve ZnO: 2,06 ppm) 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra, elde edilen MMD ve ROT değerleri Şekil 45'te gösterilmiştir. Kontrol gruplarına göre MMD oranları bütün parçacıklarda önemli düzeyde ($p<0,05$) artarken, ROT türlerinin ise önemli ölçüde azaldığı gözlenmektedir. Uygulanan nanoparçacıkların ROT ile tepkimeye girerek onların aktivitelerini azalttığı izlenimini vermektedir.

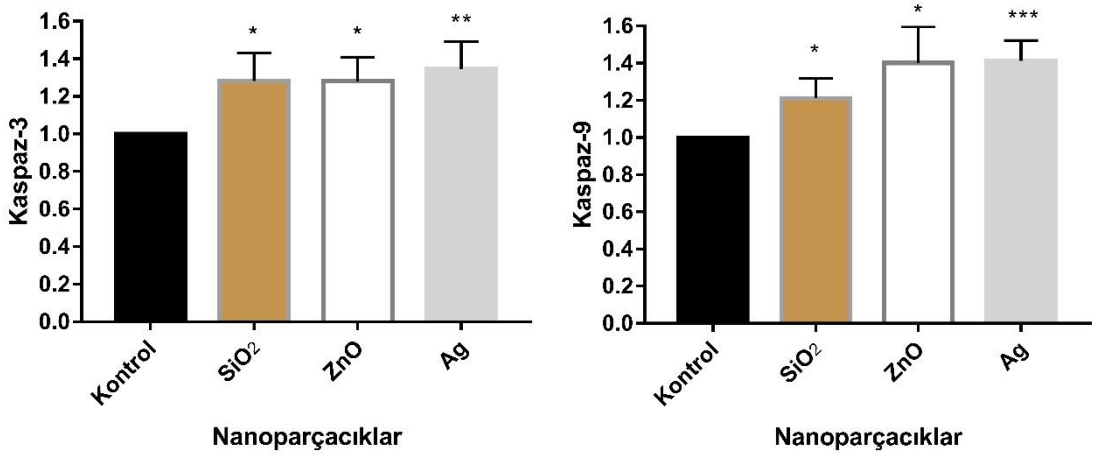


Şekil 45. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların MMD ve ROT üzerine etkileri (ortalama±SD)

*$p<0,05$ ve **$p<0,01$ kontrol grubuna göre

HT-29 Hücrelerinde 24 Saat Sonucunda Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Aktivitesine Nanoparçacıkların Etkileri

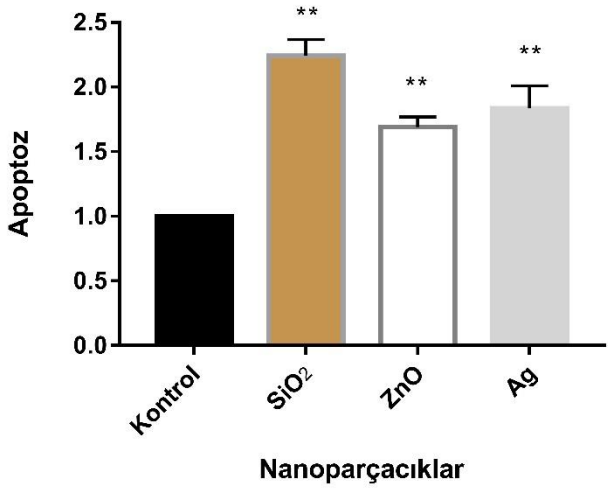
IC50 konsantrasyonlarında 24 saat boyunca inkübe edilen HT-29 hücrelerinde kaspaz-3 ve kaspaz-9 düzeylerinde Şekil 46'da önemli oranda bir artışa yol açtığını gözlemledik. Kaspaz-3 ve kaspaz-9 apoptozda çok önemli rol oynayan iki protein olup ve apoptozun son halkasını oluştururlar. Parçacık türlerine göre aktivite oranlarının da değiştiği bulunmuştur.



Şekil 46. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkileri (ortalama±SD)

HT-29 Hücrelerinde 24 Saat Sonucunda Nanoparçacıkların Apoptozis Üzerine Etkileri

Madde uygulaması sonucu 24 saat süre sonunda apoptozis değerleri Şekil 47'de her bir parçacık için gösterilmiştir. Uygulanan maddelerin tümünün hücreleri apoptoza uğrattığı ($p<0,01$) gözlenmiştir. SiO_2 uyguladığımız hücreleri diğer iki maddeye göre karşılaştırdığımızda ise daha fazla hücrenin apoptoza uğradığını gözlemledik. Karşılaştırmaların tümü kontrol grubuna göre yapılmıştır.

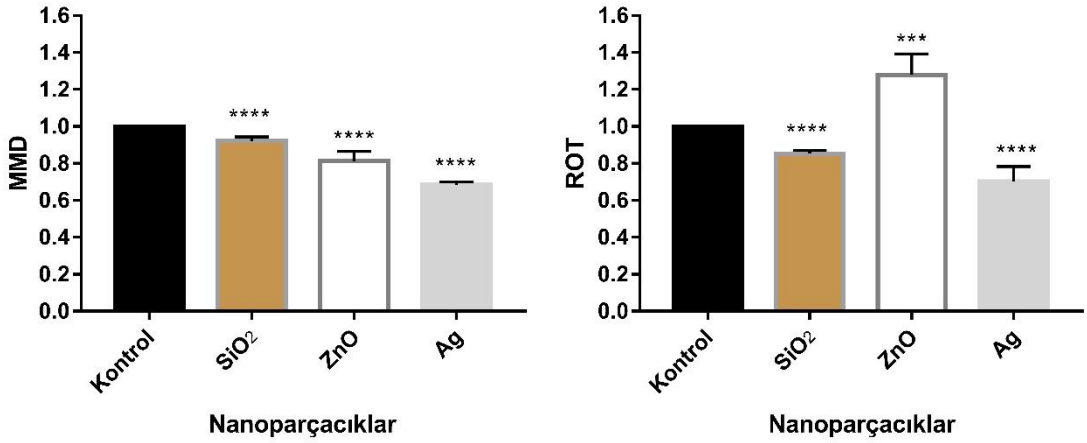


Şekil 47. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apoptozis üzerine etkileri (ortalama±SD)

*p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001 kontrol grubuna göre

HT-29 Hücrelerinde 48 Saat Sonucunda Mitokondriyal Depolarizasyon ve Hücre İçi ROT Değerleri Üzerinde Nanoparçacıkların Etkileri

Uygulanan maddelerin HT-29 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonlarında (Ag: 19,75 ppm, SiO_2: 34,38 ppm ve ZnO: 9,69 ppm) 48 saat süre inkübe edildikten sonra, MMD ve ROT değerleri Şekil 48'de gösterilmiştir. Kontrol gruplarına göre MMD ve ROT türleri oranlarının verilen bütün parçacıklarda önemli düzeyde ($p<0,0001$) azaldığını gözlemledik. Uygulanan nanoparçacıkların ROT ile tepkimeye girerek aktivitelerinin azaldığını ve inkübasyon süresinin artması ile maddelerin mitokondri depolarizasyonunu da önemli ölçüde azalttığını gözlemledik.

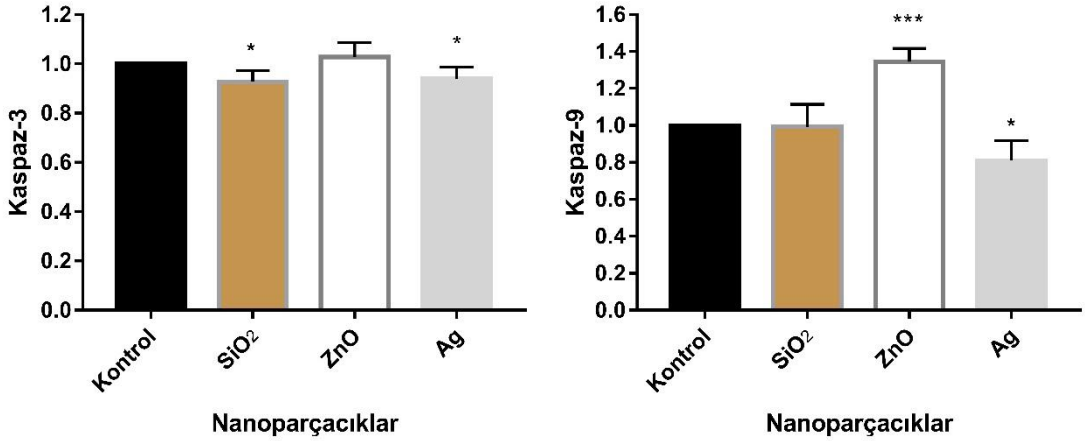


Şekil 48. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların MMD ve ROT üzerine etkileri (ortalama±SD)

****p<0,0001 kontrol grubuna göre

HT-29 Hücrelerinde 48 Saat Sonucunda Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Aktivitesine Nanoparçacıkların Etkileri

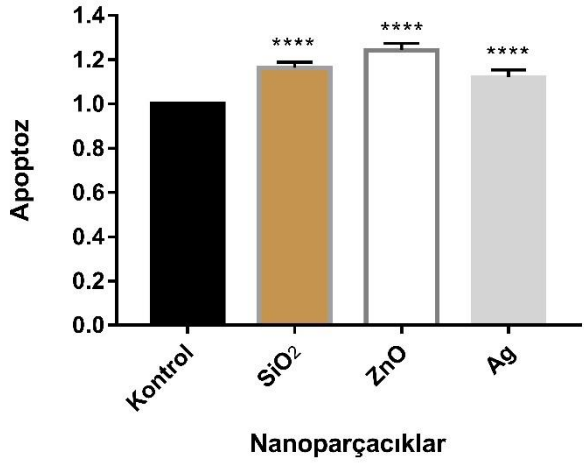
IC50 konsantrasyonlarında 48 saat boyunca inkübe edilen HT-29 hücrelerinde kaspaz-3 düzeyleri ($p<0,05$) kontrol grubuna yakın değerlerdeyken, kaspaz-9 düzeylerinde ($p<0,001$) ise Şekil 49'da önemli oranda gümüş np haricinde bir artış olduğu gözlenmektedir. Parçacık türlerine göre aktivite oranlarının da değiştiği bulunmuştur.



Şekil 49. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkileri (ortalama±SD)

HT-29 Hücrelerinde 48 Saat Sonucunda Nanoparçacıkların Apoptozis Üzerine Etkileri

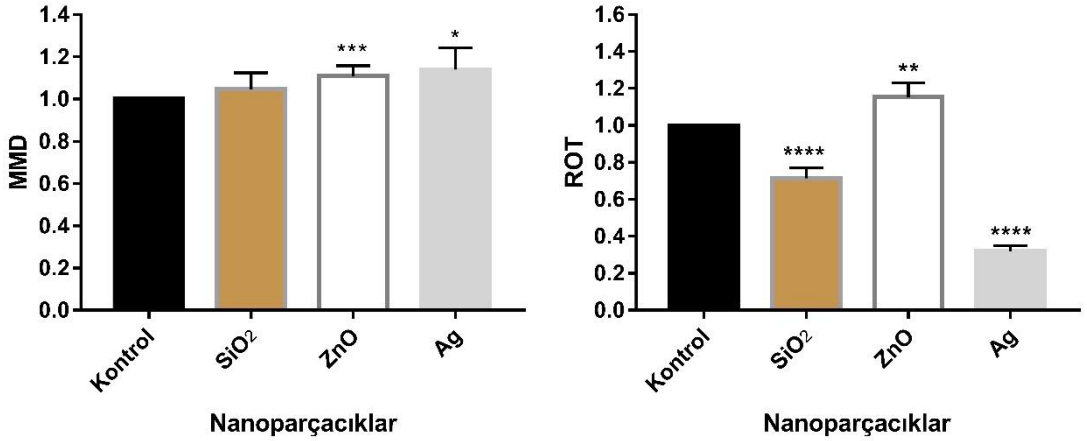
Madde uygulamamızın sonuçları 48 saatlik inkübasyon süreleri için apoptozis değerleri Şekil 50'de her bir parçacık için gösterilmiştir. Uygulanan maddelerin hepsinde hücrelerin apoptoza gittiği ($p<0,0001$) gözlenmiştir. ZnO uygulanan hücrelerde diğer iki maddenin uygulandığı hücrelere göre daha fazla hücrenin apoptoza uğradığı gözlenmiştir. Karşılaştırmaların tümü kontrol grubuna göre yapılmıştır.



Şekil 50. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apoptozis üzerine etkileri (ortalama±SD)

MCF-7 Hücrelerinde 24 Saat Sonucunda Mitokondriyal Depolarizasyon ve Hücre İçi ROT Değerleri Üzerinde Nanoparçacıkların Etkileri

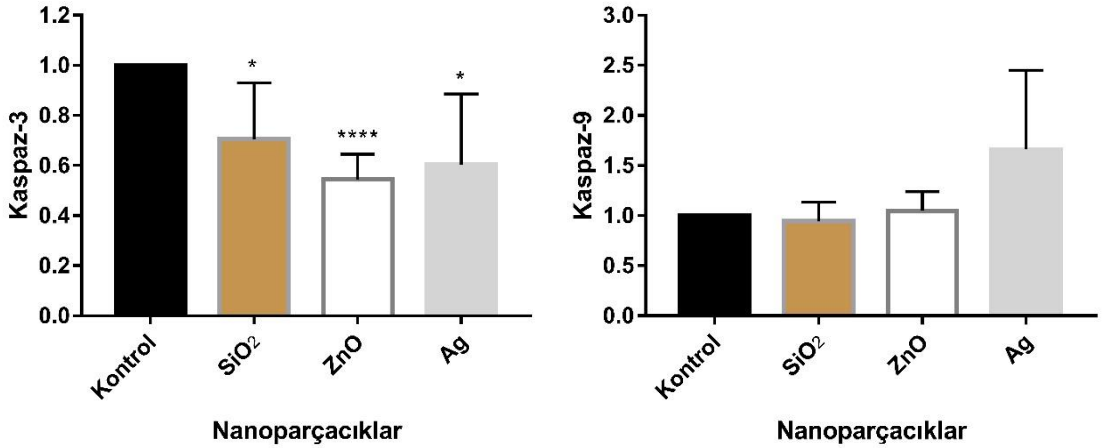
Uygulanan maddelerin MCF-7 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonlarında (Ag: 2,04 ppm, SiO_2: 5,04 ppm ve ZnO: 1,58 ppm) 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra, MMD ve ROT değerleri Şekil 51'de gösterilmiştir. Kontrol gruplarına göre MMD oranları bütün parçacıklarda önemli düzeyde ($p<0,01$ ve $p<0,001$) artarken, ROT türleri ise ZnO hariç diğerleri önemli ölçüde azaldığı gözlenmektedir. Uygulanan nanoparçacıklar ROT ile tepkimeye girerek aktiviteleri azaltmaktadır.



Şekil 51. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların MMD ve ROT üzerine etkileri (ortalama±SD)

MCF-7 Hücrelerinde 24 Saat Sonucunda Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Aktivitesine Nanoparçacıkların Etkileri

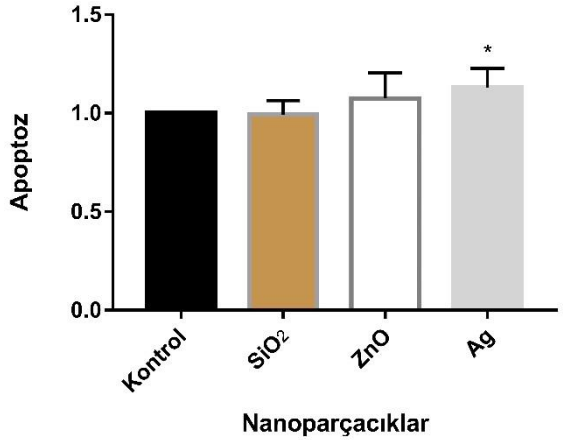
IC50 konsantrasyonlarında uygulanan np'ler ile 24 saat boyunca inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin önemli oranda azaldığı gözlemlenirken kaspaz-9 aktivite düzeylerinde ise Şekil 52'de önemli oranda bir artış olduğu gözlenmiştir. Parçacık türlerine göre aktivite oranlarının da farklılık gösterdiği saptanmıştır. MCF-7 hücre hatlarında HT-29'un tersine 24 saat sonunda kaspaz-3 aktivitesi ciddi oranda düşmektedir.



Şekil 52. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkileri (ortalama±SD)

MCF-7 Hücrelerinde 24 Saat Sonucunda Nanoparçacıkların Apoptozis Üzerine Etkileri

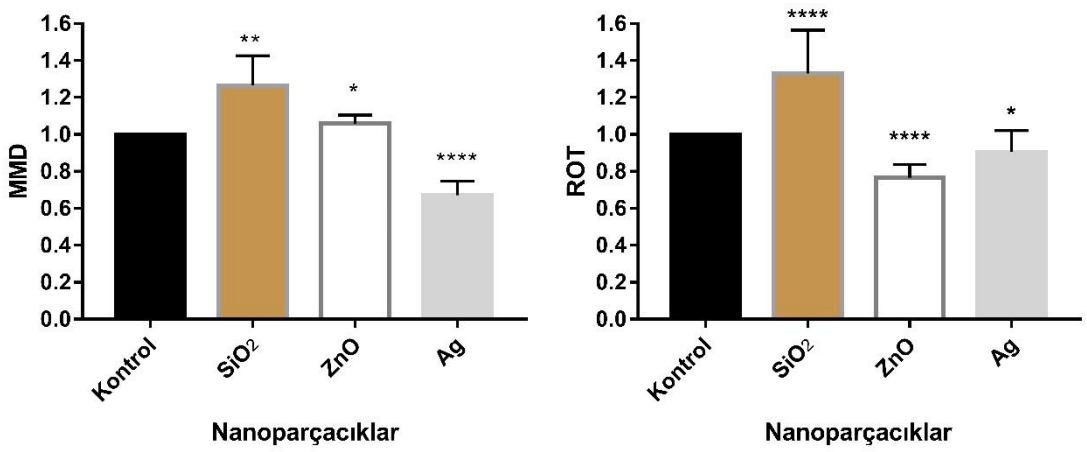
Madde uygulaması sonucu 24 saat süre sonunda apoptozis değerleri Şekil 53'te her bir parçacık için gösterilmiştir. Uygulanan maddelerin ZnO ve Ag parçacıklarda hücrelerin apoptozise gittiği gözlenmiştir. Gümüş ve ZnO uygulanan hücrelerde SiO_2 maddesinden uygulandığı hücrelere göre daha fazla hücrenin apoptoza uğradığı gözlenmiştir. Karşılaştırmaların tümü kontrol grubuna göre yapılmıştır.



Şekil 53. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apoptozis üzerine etkileri (ortalama±SD)

MCF-7 Hücrelerinde 48 Saat Sonucunda Mitokondriyal Depolarizasyon ve Hücre İçi ROT Değerleri Üzerinde Nanoparçacıkların Etkileri

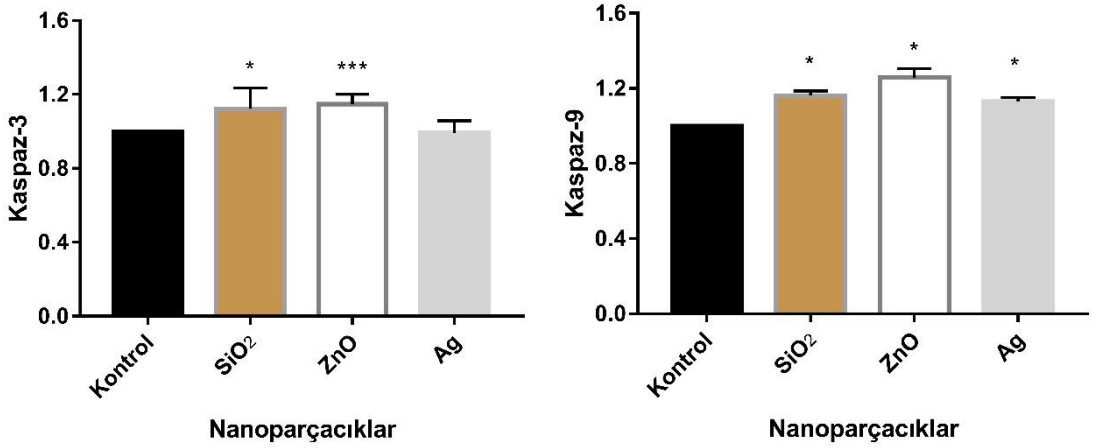
Uygulanan maddelerin MCF-7 hattına belirlediğimiz IC50 konsantrasyonlarında (Ag: 23,24 ppm, SiO_2: 42,37 ppm ve ZnO: 20,40 ppm) 48 saat süre ile inkübe edildikten sonra, MMD ve ROT değerleri Şekil 54'de gösterilmiştir. Kontrol gruplarına göre MMD oranları SiO_2 ve ZnO parçacıklarında önemli düzeyde ($p<0,05$ ve $p<0,001$) artarken, gümüş nano-parçacıkta ise azalmaktadır. ROT türleri ise SiO_2 np hariç, diğerlerinde önemli ölçüde azaldığı gözlenmektedir. Elde ettiğimiz verilere göre uygulanan nanoparçacıkların ROT ile reaksiyonu sonucu bunların aktivitelerinde bir azalma oluşturmaktadır.



Şekil 54. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların MMD ve ROT üzerine etkileri (ortalama±SD)

MCF-7 Hücrelerinde 48 Saat Sonucunda Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 Aktivitesine Nanoparçacıkların Etkileri

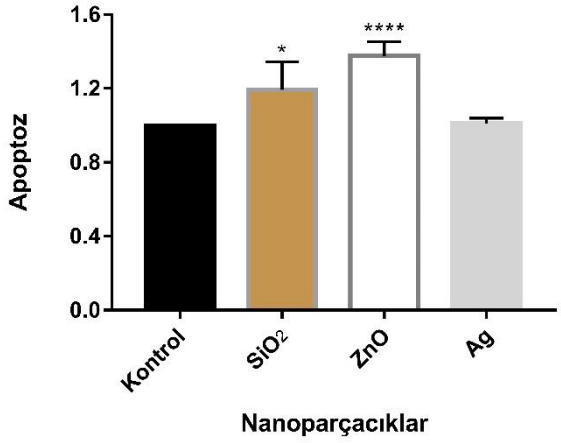
IC50 konsantrasyonlarında 48 saat boyunca inkübe edilen MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivite düzeylerinde ise Şekil 55'de bir artış olduğu gözlenmektedir. Parçacık türlerine göre aktivite oranlarının da değiştiği bulunmuştur.



Şekil 55. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkileri (ortalama±SD)

MCF-7 Hücrelerinde 48 Saat Sonucunda Nanoparçacıkların Apoptozis Üzerine Etkileri

Madde uygulaması sonucu 48 saat süre sonunda apoptozis değerleri Şekil 56'da her bir parçacık için gösterilmiştir. Uygulanan maddelerin hepsinde hücrelerin apoptoza gittiği gözlenmiştir. ZnO uygulanan hücrelerde SiO_2 ve Ag maddelerinin uygulandığı hücrelere göre daha fazla hücrenin apoptoza uğradığını belirledik. Karşılaştırmalar kontrol grubuna göre yapılmıştır.



Şekil 56. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apoptozis üzerine etkileri (ortalama±SD)

*p<0,05, ***p<0,001 ve ****p<0,0001 kontrol grubuna göre

TARTIŞMA

Nanoparçacıkların günümüzde belirlenen hedef bölgeye etkili olacak ilaçların iletilmesi için taşıyıcı sistem olarak kullanılması düşüncesi tüm dünyada ilgi duyulan bir konudur. Nanoparçacıklar kendine özgü elektronik ve optik özelliklerinden dolayı analitik araçlar arasında yer almaya başlamıştır. Nanoparçacıkların biyolojik sistemlerle olan etkileşimi de diğer dikkat çeken konulardan biridir. Nanoparçacıklar genel olarak hücreye endositoz, reseptör-aracılığıyla ya da doğrudan alınır (152). Nano boyuta sahip analitik araçların kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde kullanılması için nanoparçacıkların üretim gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu nanoparçacıklar ile hedeflenen bölgeye, ilaç ile yüklenen nanoparçacığın taşınması sağlanabilir. Nanoparçacıklar ile hedefe iletilebilecek ilaçların sağlıklı organ ve dokularda oluşturabileceği toksik ve yan etkilerinin de önüne geçilebileceği öngörülmüştür (153). Yapılan bazı çalışmalarda kanser ajanı olarak kullanılan birçok ilacın, nanoparçacıklar ile taşınmasının daha etkin sonuçlara yol açtığı gözlenmiştir. Kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde etkili bir yöntem olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir (154-156). Nanoparçacıklara son yıllarda artan ilgiyle beraber bu maddelerin neden olabileceği risklerde tartışılmaya başlanmıştır. Nanoteknolojinin kullanım alanın genişliği nedeniyle bu maddelerden oluşabilecek risk faktörleri de her geçen gün artmakta ve buna karşı bazı önlemlerinde belirlenmesi gerekmektedir. Nanoparçacık uygulamalarında birçok laboratuvar birbirinden farklı sonuçlar verdiği için bu sistemin şu anda herhangi bir standartizasyonu yoktur (157).

Nanoparçacıkların kütlelerine, komponentlerine, yüzey alanlarına ve kimyasal özelliklerine göre bir doz tanımı yapılmamıştır. Bunun sonucu olarak da nanoparçacık uygulamalarındaki kesin veri karşılaştırmalarında objektiflik sorunları oluşabilmektedir(158).

Mesleki Sağlık ve Güvenlik Enstitüsü (NIOSH) <100 nm daha küçük olan TiO_2 nanoparçacıkların daha büyük parçacık yapısına sahip olanlara göre daha toksik olduğu belirtmiş ve TiO_2 maruziyetine yaptığı düzenleme ile <100 nm küçük parçacıklar için 0,3 mg/cm^3 olarak bildirmiştir. Nanoparçacıkların uygulamada kullanımı genel olarak deiyonize suda dispers hale getirerek kullanılması toksisite testleri yapılmaktadır. Suda dispers hale gelmesi ile bu maddelerin fiziksel ve kimyasal bazı özellikleri değişmektedir (159). GAPDH nanoparçacıkların gen ekspresyonu analizlerinde referans gen olarak seçilmiştir.

MCF-7 hücre hatlarında yapılan “Laha D ve ark.” yaptıkları bir çalışmada (0-50 µg/ml) konsantrasyon aralığında bakır iyodür ve bakır fosfat türevli nanoparçacıklara maruz bırakılmış ve sitotoksisite testleri yapılmıştır. Toksisite sonuçlarına göre her iki nanoparçacığında toksik olduğu vurgulanmıştır (160). Çinko oksit nanoparçacıkları genotoksisitesini ve sitotoksisitesini belirlemek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. “Osman IF ve ark.” bunlardan bazılarında düşük doz uygulanan ZnO nanoparçacıkların oksidatif strese yol açarak insan epidermal hücrelerinde genotoksisiteye neden olduğu gösterilmiştir (161). “Otero-González L ve ark.” yaptıkları başka bir çalışmada ZnO nanoparçacıklara maruz bırakılan insan bronşiyal epitel hücrelerinde sitotoksisiteye yol açtığı ortaya konmuştur (162).

Yaptığımız çalışmadaki canlılık ve sitotoksik etkiler üzerine elde ettiğimiz bulgularımız yukarıda verdiğimiz literatürler ile uyumluluk göstermektedir. HT-29 hatlarına 24 saat uyguladığımız, SiO_2 (0-50 µg/ml), Ag ve ZnO (0-20 µg/ml) np’leri için doz miktarı arttıkça hücre canlılığında eksponansiyel olarak bir azalma olduğunu gözlemledik. HT-29 hatlarına 48 saat uyguladığımız aynı np’ler için doz miktarı arttıkça hücre canlılığında büyük bir azalma olurken, düşük dozlarda parçacıkların hücre canlılığına etkisi neredeyse birbiri ile aynı olduğunu gözlemledik. MCF-7 hücre hatlarına 24 saat uyguladığımız Ag, SiO_2 ve ZnO np’leri için doz miktarı arttıkça yine hücre canlılığının eksponansiyel olarak bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Bulgularımıza göre verilen madde dozu arttıkça nanoparçacıkların toksisiteye neden

olduklarını gözlemledik. Yine MCF-7 hücre hatlarına 48 saat uyguladığımız np'ler için Gümüş np uygulamasında neredeyse bütün dozların hücre canlılığına etkisine olan değişimler aynı iken, diğer iki parçacıkta ise son iki dozun (SiO_2: 25-50 ppm, ZnO:10-20 ppm) hücre canlılığına olan etkisinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir.

20nm boyutunda olan ZnO parçacıklar ile "Huang C-C ve ark." tarafından yapılan başka çalışmada parçacığın toksisitesinin zamana ve uygulanan konsantrasyonla doğrudan bir bağımlılığı olduğunu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada insan bronşiyal epitel hücrelerinde (BEAS-2B) apoptoz ve oksidatif streste yol açan BNIP, PRDX3, PRNP ve TXRND1 dört gen bölgesinin ekspresyonlarının 2.5 kat arttığını göstermişlerdir (163). "Tuomela S ve ark." tarafından, Jurkat T hücreleri, insan monosit-türevli makrofajları (HMDM) ve monosit-türevli dendritik hücrelerde (MDDC) yapılan kapsamlı bir çalışmada TiO_2 ve ZnO ile 6 ve 24 saat süresince maruz bırakılan hücrelerde TiO_2 parçacıkları toksik olmazken, ZnO nanoparçacıkların ise toksisitesinin doz bağımlı olduğunu belirtmişlerdir (164). "Lee SH ve ark." yapılan bir başka çalışmada ZnO nanoparçacıklara maruz bırakılan insan keratinositlerinde, bu hücrelerin oksidatif strese uğradığı gözlenmiştir. Yine aynı çalışmanın maruziyet sonucunda antioksidan enzim olan SOD seviyesi yüksek ve GSH seviyesinin düşük olduğu gösterilmiştir (165). "Aktar MJ ve ark" ZnO nanoparçacıklarının maruz bırakılan karaciğer kanser hücresi (HepG2) p53 yolağı aracılığıyla oksidatif strese yol açarak, hücreleri apoptoza indüklediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada anti kanser ilaçların apoptozu indüklemek için kullandığı etki mekanizmalarıyla benzerlik gösterdiği için, bu kanser türünün tedavisinde ZnO np'lerin kullanılabileceğini önermişlerdir (166). "Setyawati MI ve ark." Çok düşük konsantrasyonda kullanılan ZnO nanoparçacıklarda bile ROT'u indüklediğini ve p53 ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında ise antioksidan gen bölgelerinden SOD2, GPX1, SESN1, SESN2 ve ALDH4A1 gibi enzimlerin oksidatif homeostazisi dengelemek amacıyla ekspresyonlarının artırdığı gözlenmiştir (167).

HT-29 hücrelerinde 24 saatlik ZnO np'lerle inkübasyonun sonucunda, Bax, p53, Sitokrom-c, Apaf-1 ve Kaspaz-3 ekspresyonlarında artışlar gözlenmiştir. MMD, Apoptoz, Kaspaz-9 değerlerinde artış gözlemlemize karşın, Bcl-2 ve ROT değerlerinin azaldığını bulduk. 48 saat inkübasyon sonucunda, bu hücrelerde gen ekspresyonlar değerleri 24 saatlik uygulama ile aynı paralelde bulunmuştur. Spektrofotometrik

yöntem ile tespit ettiğimiz Kaspaz-9, ROT ve Apoptoz değerleri artarken, MMD değeri azalmıştır. MCF-7 hücrelerinde ise 24 saatlik np uygulaması sonucunda gen ekspresyonlarının azaldığı gözlenmiştir. Buna karşın, 48 saatlik uygulamamızda ise gen ekspresyonlarının artış gösterdiği bulundu. 24 saatlik uygulama sonunda MMD ve ROT'larında bir artış gözlenmiş ve Apoptoz sonuçlarındaki artış, anlamlılık göstermemiştir. MCF-7 hücrelerine 48 saatlik np uygulamamız sonucunda ise Kaspaz-9, MMD ve Apoptoz önemli ölçüde artarken, ROT'larda ise istatiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir.

"Rahman M ve ark." gümüş nanoparçacıklarda yapılan bir *in vivo* çalışmada, 24 saat boyunca 25nm boyutundaki nanoparçacıkların oksidatif stres aracılığıyla nörotoksisiteye neden olabileceği bildirilmiştir (168). "Asharani P ve ark." Ag-np uygulamasında iki farklı hücre tipinde(IMR-90 ve U251) bu parçacıkların mitokondriye zararlı olabilecek fazla ATP ve ROT üretiminin doza bağımlı olarak arttığını göstermişlerdir. Ag-np yapılan TEM ile yapılan incelemelerde genel olarak mitokondri ve nükleusun içinde bulunduğu için, mitokondriyal apoptoz ve DNA hasarı ile doğrudan ilişkili olduğu belirlenmiştir. DNA hasarının oluşmasındaki en önemli nedenin ise mitokondriden ATP sentezinin aksaması ve Ag np'lerin ROT üretimini artırması gösterilmiştir (169). "Miura N ve ark." apoptozisin en önemli göstergesi olan HO-1 ve MT-2A iki gen bölgesinin up-regüle olduğu bulunmuştur (170). "Piao ve ark." Ag-np uygulanan insan chang karaciğer hücresinin maruz bırakılması ile mitokondriyal apoptotik yolak üzerinden hücrelerin apoptoza gitmesi, Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarının modülasyonları aracılığıyla olmaktadır (171). "Kim TH ve ark." Parçacıkların boyutlarının farklı olduğu bir başka çalışmada ise, 10nm, 50nm ve 100nm boyutlarındaki Ag np'lere maruz bırakılan MC3T3-E1 ve PC12 hücrelerinde meydana gelen sitotoksisitenin boyut ve doz bağımlı olduğu ortaya konmuştur. Ag-np MC3T3-E1 hücrelerinde apoptozu indüklerken, PC12 hücrelerinde ise nekroza neden olduğu bildirilmiştir (172).

Yaptığımız çalışmada ise Ag np'lerin HT-29 hücre hattında 24 saatlik inkübasyon sonucunda, hücrelerin apoptozise gitmesi kaspaz bağımlı olduğunu belirledik. Buna karşın HT-29 hücrelerinde 48 saatlik uygulamamız sonucunda apoptozu indüklediği bilenen ve ölçümlerini yaptığımız gen bölgelerinin ekspresyonlarının azaldığı bulunmuştur. HT-29 hücrelerinde MMD, Kaspaz-9 ve

Apoptoz istatiksel olarak artarken, ROT ise önemli oranda azalmıştır. 48 saat uygulama süresi sonucunda Ag-np apoptozu indüklediği gözlenirken, MMD, ROT ve Kaspaz-9 değerlerinin azaldığını belirledik. Ag np'leri MCF-7 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik uygulaması sonucunda mitokondriyal apoptotik yolakta bulunan genlerin ekspresyonlarının her iki uygulama süresince azaldığı bulunmuştur. 24 saatlik uygulama sonucunda MCF-7 hücrelerinde MMD ve Apoptoz değerlerinde bir artış varken, ROT ve Kaspaz-3 değerlerinde önemli ölçüde bir azalma olduğu gözlenmiştir. Yine aynı hücre hattında 48 saatlik uygulamada ise MMD ve ROT anlamlı oranda azalmışken, Apoptoz ve Kaspaz-9 değerlerinde olan azalmanın istatiksel olarak bir anlam ifade etmediğini bulduk.

"Wang F ve ark." SiO_2 nanoparçacıkların uygulandığı HEK293 insan embriyonik böbrek hücrelerinde yapılan çalışmada 20 nm ve 50 nm boyutlarında uygulanan parçacıkların hücrelerin doza bağımlı olarak toksik etki gösterdiği bulunmuştur (173). "Ahmad J ve ark." 14 nm boyutunda SiO_2 nanoparçacıklara maruz kalan HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde meydana gelen apoptozda p53, Bax ve kaspaz-3 ekspresyonunun up-regüle olduğu gözlenmiş ve ROT aracılığıyla olduğunu belirtmişlerdir (174). "Liu X ve Sun J" tarafından yapılan bir çalışmada ise 50, 100 ve 200 µg/ml SiO_2 nanoparçacıklara maruz bırakılan HUVEC hücre hattında, ROT ve mitokondriyal membran depolarizasyonu aracılığıyla apoptozun indüklendiği gösterilmiş, 25 µg/ml konsantrasyonunda ise apoptozun indüklenmediğini göstermişlerdir (175). Mitokondri, yağ, karbonhidrat ve proteinlerin değerlendirilmesinde rol oynayan bir hücre içi organeldir. Hücrenin bu fizyolojik aktiviteleri tamamladıktan sonra artık ürün ROT oluşmaktadır. Mitokondrinin çeşitli nanoparçacıklar ile depolarize olmasıyla hücre içinde ortaya çıkan ROT'ların üretimi artmaktadır. Mitokondrinin depolarize olması ile ROT artması veya hücrenin kaspaz bağımlı olarak apoptozise gitmektedir. "Sun L ve ark." 0, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml dozlarında uygulanan SiO_2 nanoparçacıklar DMEM içinde dispers edildikten sonra 3 ve 24 saat inkübasyon sürelerinin sonunda bu parçacıkların ROT ortaya çıkardığı rapor edilmiştir (176).

Bizim yaptığımız çalışma da HT-29 hücrelerinde SiO_2 np 24 saatlik uygulamasında altı gen bölgesinin ekspresyonlarında önemli ölçüde bir artış gözlendiği bulunmuştur. Ancak, aynı np'lerin 48 saatlik HT-29 hücrelerinde oluşan ekspresyon

değerleri 24 saatlik uygulamanın tersine azalmıştır. 24 saatlik uygulama sonucunda ROT anlamlı oranda azalırken, MMD, Kaspaz-9 ve Apoptoz değerlerinde anlamlı bir fark gözlemleyemedik. Aynı parçacığın 48 saatlik uygulamasında ise ROT, MMD ve Apoptoz değerlerinde önemli bir artış bulunmuştur.

SONUÇLAR

Bu çalışma, nanoparçacıkların *in vitro* olarak uygulanması ile toksisitesi arasındaki ilişkiyi irdelemek için düşünülmüştür.

Yaptığımız bu çalışmada öne çıkan verileri aşağıdaki şekilde ifade edebiliriz.

- HT-29 hatlarına 24 saat uyguladığımız), SiO_2 (0-50 µg/ml), Ag ve ZnO (0-20 µg/ml) np'leri için doz miktarı arttıkça hücre canlılığında eksponansiyel olarak bir azalma olduğunu gözlemledik.
- Canlılık testlerinde inkübasyon süreleri arttıkça (48 saat) IC50 değerlerinde artış gözlemledik.
- MCF-7 hücre hatlarına 48 saat uyguladığımız np'ler için Gümüş np uygulamasında neredeyse bütün dozların hücre canlılığına etkisindeki değişimler aynı iken, diğer iki parçacıkta ise son iki yüksek dozun (SiO_2: 50 ppm, ZnO: 20 ppm) hücre canlılığına olan etkisinde belirgin azalmalar gözlemlenmiştir.
- HT-29 hücrelerinde 24 saatlik ZnO, SiO_2 ve Ag np'lerle inkübasyonun sonucunda, nanoparçacıkların apoptozu indüklediği bulunmuştur. Bu indükleme mekanizmasının çalışması mitokondriyal apoptotik yolak üzerinden gerçekleşmiştir.
- HT-29 48 saatlik inkübasyonunda ise sadece ZnO np'lerin mitokondriyal apoptotik yolağı kullanarak apoptozu indüklediği belirlenirken, diğer iki parçacığında, hücrelerde apoptozu indüklediği bulunmuştur. Ancak bu indüklemenin nedeninin mitokondriyal apoptotik yolak üzerinden olmadığını söyleyebiliriz.
- MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonun sonunda Ag np uygulamasında mitokondriyal apoptotik yolak kullanılmadan apoptoz indüklenirken, diğer iki parçacıkta ise apoptoz indüklenmesi oluşmamıştır. Canlılık testi sonuçlarımıza göre bu iki parçacığın uygulandığı MCF-7 hücrelerinin nekroza uğradığını düşünmekteyiz.
- MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon sonucunda SiO_2 ve ZnO parçacıkların uygulamasında bu parçacıklar hücrelerde apoptozu indüklemesi mitokondriyal apoptotik yolak üzerinden gerçeklemiştir. Ancak, Ag np'ler

herhangi bir indüklenme gözlenmemiştir. Ag np'lere uygulanan MCF-7 hücrelerinde, canlılık testlerinde oluşan hücre kayıplarının nedenin de yine nekroz sonucu olduğu düşünülmektedir.

- Hücre içi ROT hücre hatlarında ve inkübasyon sürelerine göre bazı parçacık uygulamalarında azalırken, diğerlerinde ise artmıştır.
- 24 ve 48 saatlik np inkübasyonları sonucunda meydana gelen ekspresyonlar, kaspaz-3 ve kaspaz-9, apoptozis testleri, ROT ve mitokondriyal membran depolarizasyonu gibi sonuçlarımız artarken, diğer np'ler için bu değerlerde azalmalar belirledik.
- Nanomateryallerin kullanımında objektif bir risk değerlendirme sisteminin ortaya konması da önemlidir.
- Hücre canlılığında ise inkübasyon süresi uzadıkça hücrelerin proliferasyonu azalmak yerine hücrelerin canlılığı arttığı gözlemlendi.

Genel olarak hücrelerin canlılığın 24 ve 48 saatte azalmasına rağmen, çalışmamızda hücrelerin azalması nedeni olarak, ROT ile arasında bir ilişki kurulamamıştır. ROT genel olarak düşük çıkmasının nedeni, süreye bağlı olarak antioksidan defans sisteminin olan tamir mekanizmalarının devreye girmiş olabileceklerini düşündürmektedir.

Yaptığımız çalışmada kullandığımız materyallerin kendine özgü olması bu parçacıkların uygulamalarında bazı literatür bilgilerinden farklı olduğu ortaya konmuştur.

Çalışmamızda kullandığımız np'ler birbiri ile karşılaştırıldığında, inkübasyon süresi, ve neden olduğu toksisite ve apoptozun, gen ekspresyonu ve spektrofotometrik ölçümlerle bu iki kanser hücre hatlarında daha önce yapılan bir çalışma olmadığı için bu alanda özgün bir çalışma olduğunu düşünmekteyiz.

Yaptığımız bu çalışmaya ilave olarak apoptoz'un nedenlerini açıklayabilmek için Ca^{2+} akışının hesaplanması, antioksidan enzimlerden bazılarının ekspresyonu ya da diğer apoptotik yolakların irdelenmesinin de bu konuya katkı sağlayabileceğini önerebiliriz.

ÖZET

Dünya genelinde, insanlar yanan materyallerin oluşturduğu veya volkanik küller, toz fırtınaları ve diğer doğal prosesler sonucu ortaya çıkan parçacık şeklinde olan maddelere her zaman maruz kalır. Vücut bağışıklık sistemimiz birçok zararlı etkilerden vücudumuzu koruyan ve savunan bir sürveyans sistemdir. Son zamanlarda nanoteknoloji alanının oldukça gelişmiş olması ve bu materyallerin sentezi ve karakterizasyonundaki gelişmelerin sonucu olarak, ilaç taşıyıcı, terapötik ajan ve medikal teşhis koyma aracı olarak kullanılmaktadır. Teknoloji çağının da ilerlemesiyle birlikte, nanoparçacıkların insan sağlığı üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar, bunların zararlı etkiler oluşturabileceğini bildirmiştir. Titizlikle yapılan çalışmalara rağmen, hücrelerin kompleks olması ve nano-ölçekte makro moleküler komponentler yüzünden hücrelerin nanomateryallere olan yanıtlarını anlamak karmaşık bir durum oluşturabilmektedir. Çalışmamızda üç farklı tipte nanoparçacığın biyolojik toksisitesi ve aktiviteleri üzerine elde ettiğimiz sonuçların nanoteknoloji alanına katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Bu çalışmada kullanılan iki hücre hattı üzerine, nanomateryal kompozisyon türlerinin oluşturduğu toksisiteye neden olan yolakların ve etkilerinin araştırılması amaçlandı. İn vitro analizlerde, nanomateryallerin farklı kompozisyonda olması MCF-7 ve HT-29 hücrelerinde toksik etkileri incelenmiştir. Çalışmanın ilk kısmında, nanoparçacıkların hücre canlılığına olan sitotoksik etkisi test edildi ve apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi için plate reader kullanıldı. Çalışmanın ikinci kısmında ise, nanoparçacıkların indüklediği apoptozu, gen ekspresyonu ile belirledik. Sonuç olarak, nanopartiküllerin her iki kanser hücresinde de apoptotik ve sitotoksik etkiye sahip olduklarını belirledik.

Anahtar Kelimeler: Nanomateryaller, Sitotoksisite, Apoptoz, Gen Ekspresyonu ve Kanser Hücreleri

BIOPHYSICAL METHODS INVESTIGATION ON CYTOXICITY OF NANOMATERIALS USING MITOCHONDRIAL APOPTOTIC PATHWAYS

SUMMARY

Across the globe, humans are exposed to particulate matters which originates from any activity involving burning of materials or any dust generating activities such as volcanic ashes, dust storms and other natural processes. The body immune system is a surveillance system to protect and defend itself from any harmful attack. Recent advances and breakthroughs in Nanotechnology involves synthesis, physical and chemical characterization and device development of nanomaterials, which are widely used in medical diagnostic and therapeutic process and drug development. With the continuous reign of nanotechnology, research shows that nanoparticles may have adverse effect and potentially negative impacts on human health. Despite rigorous study, due to the complexity of cells and nano-scale macromolecular components, cellular responses to nanomaterials will be complicated to unravel. This study is presented to provide common foundation to scientists and researchers the origin, activity and biological toxicity of three types of nanoparticles. Used two cell lines, this study aimed to investigate the influence of nanomaterial composition on the degrees and pathways of cytotoxicity. In the first stage study, we were utilized cell viability test to measure the cytotoxic effects of nanoparticles on cells and used plate reader to measure the apoptotic effects. In the second stage of study we unraveled fundamental mechanism of nanoparticle-induced cell death with gene expression.

Keywords: Nanomaterials, Cytotoxicity, Apoptosis, Gene Expression and Cancer Cells

KAYNAKLAR

1. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science. 2006;311(5761):622-7.

2. Oberdörster G, Stone V, Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. Nanotoxicology. 2007;1(1):2-25.

3. Schmid G. Nanoparticles: from theory to application: John Wiley & Sons; 2011.

4. Rahaei MB, Kazemzadeh A, Ebadzadeh T. Mechanochemical synthesis of nano TiC powder by mechanical milling of titanium and graphite powders. Powder technology. 2012;217:369-76.

5. Pratsinis SE. Flame aerosol synthesis of ceramic powders. Progress in Energy and Combustion Science. 1998;24(3):197-219.

6. Macwan D, Dave PN, Chaturvedi S. A review on nano-TiO_2 sol–gel type syntheses and its applications. Journal of Materials Science. 2011;46(11):3669-86.

7. Zhang XQ, Yin LH, Meng T, Pu YP. ZnO, TiO_2, SiO_2, and Al_2O_3 nanoparticles-induced toxic effects on human fetal lung fibroblasts. Biomedical and Environmental Sciences. 2011;24(6):661-9.

8. Baughman RH, Zakhidov AA, de Heer WA. Carbon nanotubes--the route toward applications. science. 2002;297(5582):787-92.

9. Bodapati S. Mechanisms of yttrium oxide toxicity in HEK293 cells (Dissertation). West Virginia: Marshall University; 2011.

10. Shi M. Surface modification of copper nanoparticles and their toxicity studies (Dissertation). New York: University Of Rochester; 2013.

11. Hood E. Nanotechnology: looking as we leap. Environmental Health Perspectives. 2004;112(13):A740.

12. Dunnick K. Metal Oxide Nanoparticles: The Importance of Size, Shape, Chemical Composition, and Valence State in Determining Toxicity (Dissertation). Ann Arbor: West Virginia University; 2015.

13. Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam CW, Warheit DB, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: Risk assessment of nanoparticles. Toxicological Sciences. 2006;89(1):42-50.

14. Lin W. In vitro toxicity and oxidative stress induced by silica, cerium oxide, and zinc oxide nanoparticles in human lung epithelial cells (Dissertation). Missouri: Missouri University of Science and Technology; 2007.

15. Win KY, Feng S-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. Biomaterials. 2005;26(15):2713-22.

16. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010;75(1):1-18.

17. Zhang Z, Feng S-S. The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly (lactide)–tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. Biomaterials. 2006;27(21):4025-33.

18. Gref R, Domb A, Quellec P, Blunk T, Müller R, Verbavatz J, et al. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. Advanced drug delivery reviews. 2012;64:316-26.

19. Gupta AK, Gupta M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. Biomaterials. 2005;26(13):1565-73.

20. Zhang Y, Kohler N, Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. Biomaterials. 2002;23(7):1553-61.

21. MuÈller RH, MaÈder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery–a review of the state of the art. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. 2000;50(1):161-77.

22. Mcgibbon AJ, Brown LM, Bleloch AL, Browning ND, Aires FCS, Fallon PJ, et al. Microscopy in Solid-State Science. Microsc Res Techniq. 1993;24(4):299-315.

23. Maynard AD, Brown LM. The Collection of Ultrafine Aerosol-Particles for Analysis by Transmission Electron-Microscopy, Using a New Thermophoretic Precipitator. J Aerosol Sci. 1991;22:S379-S82.

24. Vollath D, KGaA W-VVG, Co. An Introduction to Synthesis, Properties and Application. and Management. 2008;7(6):865-70.

25. Brock SL. Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications By Guozhang Cao (University of Washington). Imperial College Press (distributed by World Scientific): London. 2004. xiv+ 434 pp. ISBN 1-86094-415-9. Journal of the American Chemical Society. 2004;126(44):14679-.

26. Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdorster G, et al. Safe handling of nanotechnology. Nature. 2006;444(7117):267-9.

27. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. The FASEB journal. 2005;19(3):311-30.

28. Hoet PH, Brüske-Hohlfeld I, Salata OV. Nanoparticles–known and unknown health risks. Journal of nanobiotechnology. 2004;2(1):12.

29. Gwinn MR, Vallyathan V. Nanoparticles: health effects: pros and cons. Environmental health perspectives. 2006:1818-25.

30. Palazuelos Jorganes M. In vitro toxicity analysis of nanoscale aluminum: Particle size and shape effects (Dissertation). Florida: University of Florida; 2007.

31. Weinberg R. The biology of cancer: Garland science; 2013.

32. Guney G. Askorbik Asit Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin Kanser Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkileri (Tez). Eskişehir: Anadolu Üniversitesi; 2011.

33. Pecorino L. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics: Oxford university press; 2012.

34. Özkan İ. Nanoteknolojik yöntemler ile malzemenin yüzey özelliklerinin iyileştirilmesi (Tez). İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi; 2006.

35. Gürmen S, Ebin B, İTÜ M. Nanopartiküller ve üretim yöntemleri-1. Metalurji Dergisi. 2008;150:31-8.

36. Liveri VT. Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems: Springer Science & Business Media; 2006.

37. Capek I. Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions. Advances in colloid and interface science. 2004;110(1):49-74.

38. Lee MS, Park SS, Lee G-D, Ju C-S, Hong S-S. Synthesis of TiO_2 particles by reverse microemulsion method using nonionic surfactants with different hydrophilic and hydrophobic group and their photocatalytic activity. Catalysis Today. 2005;101(3):283-90.

39. Fu X, Qutubuddin S. Synthesis of titania-coated silica nanoparticles using a nonionic water-in-oil microemulsion. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2001;179(1):65-70.

40. Krauel K, Davies N, Hook S, Rades T. Using different structure types of microemulsions for the preparation of poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles by interfacial polymerization. Journal of Controlled Release. 2005;106(1):76-87.

41. Pinna N, Weiss K, Sack-Kongehl H, Vogel W, Urban J, Pileni MP. Triangular CdS nanocrystals: synthesis, characterization, and stability. Langmuir. 2001;17(26):7982-7.

42. Castillo N, Barriga LD, Pérez R, Martínez-Ortiz M, Gallardo AC. Structural And Chemical Characterization Of Pt. Rev Adv Mater Sci. 2008;18:720-4.

43. Pal A, Shah S, Devi S. Preparation of silver, gold and silver–gold bimetallic nanoparticles in w/o microemulsion containing TritonX-100. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2007;302(1):483-7.

44. Zielińska-Jurek A, Reszczyńska J, Grabowska E, Zaleska A. Nanoparticles preparation using microemulsion systems. Microemulsions—an introduction to properties and applications InTech Publisher, Rijeka, Croatia. 2012.

45. Edelstein AS, Cammaratra R. Nanomaterials: synthesis, properties and applications: CRC Press; 1998.

46. Bang JH, Suslick KS. Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials. Advanced materials. 2010;22(10):1039-59.

47. Schodek DL, Ferreira P, Ashby MF. Nanomaterials, nanotechnologies and design: an introduction for engineers and architects: Butterworth-Heinemann; 2009.

48. Gedanken A. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. Ultrasonics sonochemistry. 2004;11(2):47-55.

49. McNamara ND. Sonochemical synthesis and characterization of metal nanoparticle-decorated carbon supports (Dissertation). Ohio: University of Dayton; 2011.

50. Rao C, Muller A, Cheetham A. Nanomaterials–An Introduction. The Chemistry of Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications. 2006:1715.

51. Sergeev GB. Nanochemistry: Elsevier; 2006.

52. Hu Y, Li C, Gu F, Zhao Y. Facile flame synthesis and photoluminescent properties of core/shell TiO_2/SiO_2 nanoparticles. Journal of alloys and compounds. 2007;432(1):L5-L9.

53. Schrand AM, Dai L, Schlager JJ, Hussain SM. Toxicity testing of nanomaterials. New Technologies for Toxicity Testing: Springer; 2012. p. 58-75.

54. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. small. 2008;4(1):26-49.

55. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann M-C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. Toxicological sciences. 2005;88(2):412-9.

56. Jandhyam S. Cytotoxicity Studies of Metallic Oxide Nanoparticles in Different Human Cell Types (Dissertation). Idaho: Idaho State University; 2008.

57. Rees S, Cragg B. Is silica involved in neuritic (senile) plaque formation? Acta neuropathologica. 1983;59(1):31-40.

58. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. International journal of nanomedicine. 2008;3(2):133.

59. Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. Molecular pharmaceutics. 2008;5(4):487-95.

60. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Particle and fibre toxicology. 2006;3(1):11.

61. Conner MW, Flood WH, Rogers AE, Amdur MO. Lung injury in guinea pigs caused by multiple exposures to ultrafine zinc oxide: changes in pulmonary lavage fluid. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues. 1988;25(1):57-69.

62. Lam H, Chen L, Ainsworth D, Peoples S, Amdur M. Pulmonary function of guinea pigs exposed to freshly generated ultrafine zinc oxide with and without spike concentrations. The American Industrial Hygiene Association Journal. 1988;49(7):333-41.

63. Beckett WS, Chalupa DF, Pauly-Brown A, Speers DM, Stewart JC, Frampton MW, et al. Comparing inhaled ultrafine versus fine zinc oxide particles in healthy adults: a human inhalation study. American journal of respiratory and critical care medicine. 2005;171(10):1129-35.

64. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. Nano letters. 2006;6(8):1794-807.

65. Sohaebuddin SK. Mechanism of nanoparticle and nanotube-induced cell death (Dissertation). Texas: The University Of Texas; 2008.

66. Gilmour AD. Investigation of carboxylated multi-walled carbon nanotube cytotoxicity in vitro (Dissertation). Palmerston North: Massey University; 2010.

67. Shvedova AA, Pietroiusti A, Fadeel B, Kagan VE. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. Toxicology and applied pharmacology. 2012;261(2):121-33.

68. Lee H-M, Shin D-M, Song H-M, Yuk J-M, Lee Z-W, Lee S-H, et al. Nanoparticles up-regulate tumor necrosis factor-α and CXCL8 via reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation. Toxicology and applied pharmacology. 2009;238(2):160-9.

69. Zhang Z, Berg A, Levanon H, Fessenden RW, Meisel D. On the interactions of free radicals with gold nanoparticles. Journal of the American Chemical Society. 2003;125(26):7959-63.

70. Wang L, Mercer RR, Rojanasakul Y, Qiu A, Lu Y, Scabilloni JF, et al. Direct fibrogenic effects of dispersed single-walled carbon nanotubes on human lung fibroblasts. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 2010;73(5-6):410-22.

71. Shvedova A, Castranova V, Kisin E, Schwegler-Berry D, Murray A, Gandelsman V, et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. Journal of toxicology and environmental health Part A. 2003;66(20):1909-26.

72. Kakkar P, Singh BK. Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. Molecular and Cellular Biochemistry. 2007;305(1):235-53.

73. Hsin Y-H, Chen C-F, Huang S, Shih T-S, Lai P-S, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. Toxicology Letters. 2008;179(3):130-9.

74. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell. 1996;86(1):147-57.

75. Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. Cell Death Differ. 1999;6(6):516-24.

76. Chai J, Du C, Wu J-W, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. Nature. 2000;406(6798):855-62.

77. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature. 2001;412(6842):95-9.

78. Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, et al. Identification of Omi/Htra2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. J Biol Chem. 2002;277(1):432-8.

79. Green DR, Evan GI. A matter of life and death. Cancer cell. 2002;1(1):19-30.

80. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c–dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell. 2000;102(1):33-42.

81. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science. 1998;281(5381):1312-6.

82. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer. 1972;26(4):239.

83. Bellamy CO, Malcolmson RD, Harrison DJ, Wyllie AH, editors. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. Seminars in cancer biology; 1995: Elsevier.

84. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. Annual review of cell biology. 1991;7(1):663-98.

85. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2011;20(3).

86. Rice CED. Vascular endothelial cells and pulmonary epithelial cells: Uptake and response to metal oxide nanoparticles (Dissertation). Utah: The University of Utah; 2009.

87. Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? Tıp Araştırmaları Dergisi. 2008;6(2).

88. Toubi E, Shoenfeld Y. Protective autoimmunity in cancer (review). Oncology reports. 2007;17(1):245-52.

89. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. Annals of hematology. 2005;84(10):627-39.

90. Thompson C. Apotosis in the pathogenesis of autoimmune disease. Clin İmmunol İmmunopathol. 1995;267:1456-62.

91. Bowen I. Apoptosis: A Practical Approach. published by Elsevier; 2000.

92. Studzinski G. Overview of apoptosis. Apoptosis: A Practical Approach. 1999:8.

93. Green DR, Martin SJ. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. Current opinion in immunology. 1995;7(5):694-703.

94. Shibata S, Kyuwa S, Lee S-K, Toyoda Y, Goto N. Apoptosis induced in mouse hepatitis virus-infected cells by a virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte clone. Journal of virology. 1994;68(11):7540-5.

95. Yurdakul T, Güven S. Benign prostat hiperplazisi (BPH) ve apopitozis Benign prostatic hyperplasia (BPH) and apoptosis. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2006;59(03).

96. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. Nat Med. 2000;6(5).

97. Letai A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. The Journal of clinical investigation. 2005;115(10):2648-55.

98. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007;47:143-83.

99. Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer DD. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. The Journal of clinical investigation. 2005;115(10):2640-7.

100. Kumar S. Apoptosis: mechanisms and role in disease: Springer Science & Business Media; 2013.

101. Garewal H. Antioxidants and disease prevention: CRC Press; 1997.

102. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008;19(1):55-63.

103. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell. 1993;75(2):241-51.

104. Degli Esposti M. The roles of Bid. Apoptosis. 2002;7(5):433-40.

105. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. Science. 2000;288(5468):1053-8.

106. Meijerink JP, Mensink EJ, Wang K, Sedlak TW, Slöetjes AW, de Witte T, et al. Hematopoietic Malignancies Demonstrate Loss-of-Function Mutations ofBAX. Blood. 1998;91(8):2991-7.

107. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the Bax gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. Science. 1997;275(5302):967-9.

108. Vimala K, Sundarraj S, Paulpandi M, Vengatesan S, Kannan S. Green synthesized doxorubicin loaded zinc oxide nanoparticles regulates the Bax and Bcl-2 expression in breast and colon carcinoma. Process Biochemistry. 2014;49(1):160-72.

109. Hengartner MO, Ellis R, Horvitz R. Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. 1992.

110. Hussain SP, Harris CC. p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. Journal-Nippon Medical School. 2006;73(2):54.

111. Engin K, Özyardımcı N. Akciğer Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar. Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul. 2001.

112. Ng KW, Khoo SP, Heng BC, Setyawati MI, Tan EC, Zhao X, et al. The role of the tumor suppressor p53 pathway in the cellular DNA damage response to zinc oxide nanoparticles. Biomaterials. 2011;32(32):8218-25.

113. Ahamed M, Akhtar MJ, Raja M, Ahmad I, Siddiqui MKJ, AlSalhi MS, et al. ZnO nanorod-induced apoptosis in human alveolar adenocarcinoma cells via p53, survivin and Bax/Bcl-2 pathways: role of oxidative stress. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2011;7(6):904-13.

114. Meyer K, Rajanahalli P, Ahamed M, Rowe JJ, Hong Y. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. Toxicology in vitro. 2011;25(8):1721-6.

115. Meena R, Rani M, Pal R, Rajamani P. Nano-TiO_2-induced apoptosis by oxidative stress-mediated DNA damage and activation of p53 in human embryonic kidney cells. Applied biochemistry and biotechnology. 2012;167(4):791-808.

116. Sung JH, Ji JH, Yoon JU, Kim DS, Song MY, Jeong J, et al. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. Inhalation toxicology. 2008;20(6):567-74.

117. Howes MT, Mayor S, Parton RG. Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. Current opinion in cell biology. 2010;22(4):519-27.

118. McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. Nature reviews Molecular cell biology. 2011;12(8):517-33.

119. Yarden Y, Tarcic G. Vesicle Trafficking in Cancer: Springer; 2013.

120. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. ACS nano. 2009;3(1):16-20.

121. Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H. Nanomedicine-challenge and perspectives. Angewandte Chemie International Edition. 2009;48(5):872-97.

122. 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 (BBA)-General Subjects. 2011;1810(3):361-73.

123. Singh N, Jenkins GJ, Asadi R, Doak SH. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). Nano Reviews & Experiments. 2010;1.

124. Schulze K, Koch A, Petri-Fink A, Steitz B, Kamau S, Hottiger M, et al. Uptake and biocompatibility of functionalized poly (vinylalcohol) coated superparamagnetic maghemite nanoparticles by synoviocytes in vitro. Journal of nanoscience and nanotechnology. 2006;6(9-10):2829-40.

125. Müller K, Skepper JN, Posfai M, Trivedi R, Howarth S, Corot C, et al. Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro. Biomaterials. 2007;28(9):1629-42.

126. Siglienti I, Bendszus M, Kleinschnitz C, Stoll G. Cytokine profile of iron-laden macrophages: implications for cellular magnetic resonance imaging. Journal of neuroimmunology. 2006;173(1):166-73.

127. Raynal I, Prigent P, Peyramaure S, Najid A, Rebuzzi C, Corot C. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. Investigative radiology. 2004;39(1):56-63.

128. Roberts JC, Bhalgat MK, Zera RT. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) StarburstTM dendrimers. Journal of biomedical materials research. 1996;30(1):53-65.

129. Jevprasesphant R, Penny J, Jalal R, Attwood D, McKeown N, D'emanuele A. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. International journal of pharmaceutics. 2003;252(1):263-6.

130. Leroueil PR, Berry SA, Duthie K, Han G, Rotello VM, McNerny DQ, et al. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. Nano letters. 2008;8(2):420-4.

131. Lee J-H, Cha KE, Kim MS, Hong HW, Chung DJ, Ryu G, et al. Nanosized polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-induced apoptosis mediated by mitochondrial dysfunction. Toxicology letters. 2009;190(2):202-7.

132. Li X, Wang L, Fan Y, Feng Q, Cui F-z. Biocompatibility and toxicity of nanoparticles and nanotubes. Journal of Nanomaterials. 2012;2012:6.

133. Labieniec M, Gabryelak T. Preliminary biological evaluation of poli (amidoamine)(PAMAM) dendrimer G3. 5 on selected parameters of rat liver mitochondria. Mitochondrion. 2008;8(4):305-12.

134. Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. Biomaterials. 2010;31(3):438-48.

135. Hudson SP, Padera RF, Langer R, Kohane DS. The biocompatibility of mesoporous silicates. Biomaterials. 2008;29(30):4045-55.

136. Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. Small. 2009;5(18):2067-76.

137. Gu Y-J, Cheng J, Lin C-C, Lam YW, Cheng SH, Wong W-T. Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. Toxicology and applied Pharmacology. 2009;237(2):196-204.

138. Yen HJ, Hsu Sh, Tsai CL. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. Small. 2009;5(13):1553-61.

139. Malugin A, Ghandehari H. Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. Journal of Applied Toxicology. 2010;30(3):212-7.

140. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods. 1983;65(1-2):55-63.

141. Leutner S, Eckert A, Müller W. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. Journal of neural transmission. 2001;108(8-9):955-67.

142. Qin Y, Lu M, Gong X. Dihydrorhodamine 123 is superior to 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. Cell biology international. 2008;32(2):224-8.

143. Uguz AC, Cig B, Espino J, Bejarano I, Naziroglu M, Rodríguez AB, et al. Melatonin potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. Journal of pineal research. 2012;53(1):91-8.

144. Çiğ B, Nazıroğlu M. Investigation of the effects of distance from sources on apoptosis, oxidative stress and cytosolic calcium accumulation via TRPV1 channels induced by mobile phones and Wi-Fi in breast cancer cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2015;1848(10):2756-65.

145. Övey I, Naziroğlu M. Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in the hippocampus of aged mice: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. Neuroscience. 2015;284:225-33.

146. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma V-M, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. European Journal of Cancer. 1994;30(14):2068-73.

147. Wyllie AH, Kerr JR, Currie A. Cell death: the significance of apoptosis. International review of cytology. 1980;68:251-306.

148. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. Molecular cell. 2002;9(3):459-70.

149. Uğuz AC, Nazıroğlu M. Effects of selenium on calcium signaling and apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons induced by oxidative stress. Neurochem Res. 2012;37(8):1631-8.

150. Sagar S, Green IR. Pro-apoptotic activities of novel synthetic quinones in human cancer cell lines. Cancer letters. 2009;285(1):23-7.

,

151. Venza M, Visalli M, Catalano T, Fortunato C, Oteri R, Teti D, et al. Impact of DNA methyltransferases on the epigenetic regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in malignant melanoma. Biochemical and biophysical research communications. 2013;441(4):743-50.

152. Kafka E, Braden A, Vishwanatha J. Characterization of nanoparticle-mediated drug delivery to NB4: Feasibility of nanoparticle use for cells in suspension and blood diseases. Journal of Biomedical Nanotechnology. 2008;4(2):196-202.

153. Cho K, Wang X, Nie S, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. Clinical cancer research. 2008;14(5):1310-6.

154. Miglietta A, Cavalli R, Bocca C, Gabriel L, Gasco MR. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. International journal of pharmaceutics. 2000;210(1):61-7.

155. Lu B, Xiong S-B, Yang H, Yin X-D, Chao R-B. Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. European journal of pharmaceutical sciences. 2006;28(1):86-95.

156. Li L, Chen D, Zhang Y, Deng Z, Ren X, Meng X, et al. Magnetic and fluorescent multifunctional chitosan nanoparticles as a smart drug delivery system. Nanotechnology. 2007;18(40):405102.

157. Lilienblum W, Dekant W, Foth H, Gebel T, Hengstler J, Kahl R, et al. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). Archives of toxicology. 2008;82(4):211-36.

158. Ahlbom A, Bridges J, De Jong W, Jung T, Mattsson O, Pagès J-m, et al. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks SCENIHR Risk Assessment of Products of Nanotechnologies.

159. Jiang J, Oberdörster G, Biswas P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. Journal of Nanoparticle Research. 2009;11(1):77-89.

160. Laha D, Bhattacharya D, Pramanik A, Santra CR, Pramanik P, Karmakar P. Evaluation of copper iodide and copper phosphate nanoparticles for their potential cytotoxic effect. Toxicology Research. 2012;1(2):131-6.

161. Osman IF, Baumgartner A, Cemeli E, Fletcher JN, Anderson D. Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEp-2 cells. Nanomedicine. 2010;5(8):1193-203.

162. Otero-González L, Sierra-Alvarez R, Boitano S, Field JA. Application and validation of an impedance-based real time cell analyzer to measure the toxicity of nanoparticles impacting human bronchial epithelial cells. Environmental science & technology. 2012;46(18):10271-8.

163. Huang C-C, Aronstam RS, Chen D-R, Huang Y-W. Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. Toxicology in vitro. 2010;24(1):45-55.

164. Tuomela S, Autio R, Buerki-Thurnherr T, Arslan O, Kunzmann A, Andersson-Willman B, et al. Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles. Plos One. 2013;8(7):e68415.

165. Lee SH, Pie J-E, Kim Y-R, Lee HR, Son SW, Kim M-K. Effects of zinc oxide nanoparticles on gene expression profile in human keratinocytes. Molecular & Cellular Toxicology. 2012;8(2):113-8.

166. Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan M, Ahmad J, Alrokayan SA. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. Int J Nanomedicine. 2012;7:845-57.

167.Setyawati MI, Tay CY, Leong DT. Effect of zinc oxide nanomaterials-induced oxidative stress on the p53 pathway. Biomaterials. 2013;34(38):10133-42.

168. Rahman M, Wang J, Patterson T, Saini U, Robinson B, Newport G, et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. Toxicology letters. 2009;187(1):15-21.

169. AshaRani P, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveettil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACS nano. 2008;3(2):279-90.

170. Miura N, Shinohara Y. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. Biochemical and biophysical research communications. 2009;390(3):733-7.

171. Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, et al. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. Toxicology letters. 2011;201(1):92-100.

172. Kim TH, Kim M, Park HS, Shin US, Gong MS, Kim HW. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2012;100(4):1033-43.

173. Wang F, Gao F, Lan M, Yuan H, Huang Y, Liu J. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. Toxicology in vitro. 2009;23(5):808-15.

174. Ahmad J, Ahamed M, Akhtar MJ, Alrokayan SA, Siddiqui MA, Musarrat J, et al. Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. Toxicology and applied pharmacology. 2012;259(2):160-8.

175. Liu X, Sun J. Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF-κB pathways. Biomaterials. 2010;31(32):8198-209.

176. Sun L, Li Y, Liu X, Jin M, Zhang L, Du Z, et al. Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. Toxicology in vitro. 2011;25(8):1619-29.

177. Uğuz AC, Nazıroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and-9 activities. Journal of Membrane Biology. 2009;232(1-3):15-23.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller Listesi

Şekil 1. Nanomateryal çeşitleri 4
Şekil 2. Nanoparçacık sentezleme metodu 8
Şekil 3. Nanoparçacık sentezleme yöntemleri yüzde olarak göstergesi 9
Şekil 4. Mikroheterojen sistemlerden nanopartikül üretimi 11
Şekil 5. Sonokimyasal proses yöntemi şematik gösterimi 13
Şekil 6. Sol-Jel yöntemi 14
Şekil 7. Asal gaz yoğunlaştırma yöntemi şematik gösterimi 15
Şekil 8. Alev sentezi ile sentezlenen nanoparçacıkların şematik sentez aşamaları...16
Şekil 9. Nanoparçacıkların apoptozisi indükleme aşamaları 19
Şekil 10. Kaspaz bağımlı ve bağımsız apoptozis mekanizması 21
Şekil 11. Bcl-2 ailesi üyeleri....24
Şekil 12. Kaspaz ailesinin genel gösterimi 25
Şekil 13. Nanoparçacıkların hücre içine alınmalarının gösterimi 30
Şekil 14. Deney sırasında kullanılan hücrelerin mikroskop görüntüsü....32
Şekil 15. PCR cihazının çalıştırılma döngüsü....38
Şekil 16. MTT boyasının formazan kristallere dönüşmesinin şematik gösterimi....40
Şekil 17. DHR-123 boyasının ROT ile tepkimeye girdiğinde Rhodamine 123 haline dönüşerek floresans özellik göstermesi....41
Şekil 18. JC-1 boyası ile mitokondrinin tepkimeye girmesi ile meydana gelen normal ve depolarize olmuş mitokondrinin gösterimi....43
Şekil 19. Apoptoza uğrayan hücrenin Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 proteinlerinin floresans olarak okuma şeması 44
Şekil 20. APOP% boyasıyla boyanan hücrenin şematik gösterimi 46
Şekil 21. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Ag nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 51
Şekil 22. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan SiO_2 nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 51
Şekil 23. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ZnO nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 52
Şekil 24. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Ag nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 53
Şekil 25. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan SiO_2 nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 53
Şekil 26. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ZnO nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 54
Şekil 27. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Ag nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 55

Şekil 28. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan SiO_2 nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 55
Şekil 29. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ZnO nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 56
Şekil 30. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan Ag nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 57
Şekil 31. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan SiO_2 nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 57
Şekil 32. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca farklı dozlarda uygulanan ZnO nanoparçacıkların hücre canlılığı üzerine etkileri (ortalama±SD) 58
Şekil 33. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Bax ve Bcl-2 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD) 59
Şekil 34. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların p53 ve Sitokrom-c ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)...59
Şekil 35. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apaf-1 ve Kaspaz-3 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD) 60
Şekil 36. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Bax ve Bcl-2 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD) 61
Şekil 37. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların p53 ve Sitokrom-c ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)...61
Şekil 38. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apaf-1 ve Kaspaz-3 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD) 62
Şekil 39. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Bax ve Bcl-2 ekspresyonu üzerine etkileri(ortalama±SD) 62
Şekil 40. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların p53 ve Sitokrom-c ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)...63
Şekil 41. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apaf-1 ve Kaspaz-3 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD) 63
Şekil 42. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Bax ve Bcl-2 ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD) 64
Şekil 43. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların p53 ve Sitokrom-c ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)...65
Şekil 44. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların p53 ve Sitokrom-c ekspresyonu üzerine etkileri (ortalama±SD)...65
Şekil 45. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların MMD ve ROT üzerine etkileri (ortalama±SD).....66
Şekil 46. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkileri (ortalama±SD)..67
Şekil 47. HT-29 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apoptozis üzerine etkileri (ortalama±SD).....67
Şekil 48. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların MMD ve ROT üzerine etkileri (ortalama±SD).....68

Şekil 49. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkileri (ortalama±SD) ..69
Şekil 50. HT-29 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apoptozis üzerine etkileri (ortalama±SD) 69
Şekil 51. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların MMD ve ROT üzerine etkileri (ortalama±SD) 70
Şekil 52. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkileri (ortalama±SD) ..71
Şekil 53. MCF-7 hücrelerinde, 24 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apoptozis üzerine etkileri (ortalama±SD) 71
Şekil 54. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların MMD ve ROT üzerine etkileri (ortalama±SD) 72
Şekil 55. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivitesi üzerine etkileri (ortalama±SD) ..73
Şekil 56. MCF-7 hücrelerinde, 48 saat boyunca IC50 dozlarında uygulanan nanoparçacıkların Apoptozis üzerine etkileri (ortalama±SD) 73

Tablolar Listesi

Tablo 1. Normal hücreler ile kanser hücrelerinin bazı özelliklerinin karşılaştırılması ...6
Tablo 2. Nanomateryallerin üretim ve sentez yöntemleri 7
Tablo 3. Uygulanan madde dozları 34
Tablo 4. Deney kapsamında oluşturulan deney grupları 35
Tablo 5. cDNA Reaksiyon Karışımı 37
Tablo 6. RT-PCR'da kullanılan gen bölgeleri ve baz dizilişleri 39
Tablo 7. Kalsiyum-Buffer Hazırlanışı 42
Tablo 8. Kaspaz 3 Reaksiyon Buffer Hazırlanışı 45
Tablo 9. Kaspaz 3 Buffer Hazırlanışı 45
Tablo 10. Kaspaz 9 Reaksiyon Buffer Hazırlanışı 45
Tablo 11. Kaspaz 9 Buffer Hazırlanışı 45

ÖZGEÇMİŞ

Mustafa YILDIZ

Doğum Tarihi: 12.10.1988

Eğitim:

2002-2005: Ümraniye Atakent Lisesi

2005-2009: Sakarya, Sakarya Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü

2014-2016: Edirne, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik AD YL

EKLER

Ek-1

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY/BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2015/235	
	PROTOKOL ADI	Mitokondriyal Apoptotik Yolakları Kullanan Nanomateryallerin Sitotoksisitesinin Biyofiziksel Yöntemlerle İncelenmesi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVANI / ADI	Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 24/13**		**Tarih:30.12.2015**
	Fakültemiz Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Mustafa YILDIZ'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, hücre kültürü çalışması olduğu için Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu kapsamında olmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER OZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Başkan Yardımcısı	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E☐ H☐	E☐ H☐	İzinli
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Üye	Tıbbi Farmakoloji	T.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Prof. Dr. Selma Arzu VARDAR Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	E☐ H☐	E☐ H☐	Mazeretli
Doç. Dr. Salim DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Prof. Dr. Koray ELTER Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E☐ H☐	E☐ H☐	Mazeretli
Yrd. Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ ve Has A.D.	K	E☐ H☒	E☒ H☐	
Doç. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E☐ H☐	E☐ H☐	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E☐ H☒	E☒ H☐	
Prof. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	E☐ H☐	E☐ H☐	Mazeretli
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E☐ H☒	E☒ H☐	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU
Dekan a.
Dekan Yrd.