

**İNSAN PRİMER ALVEOLAR EPİTEL
VE TAM KAN HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
TELLERYUM DİOKSİT'İN NANOTOKSİSİTE
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurşah AYDIN

**Yüksek Lisans Tezi
Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı
Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ
2015
Her Hakkı Saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN PRİMER ALVEOLAR EPİTEL VE TAM KAN HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE TELLERYUM DİOKSİT'İN NANOTOKSİSİTE
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurşah AYDIN

**NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**İNSAN PRİMER ALVEOLAR EPİTEL ve TAM KAN HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE TELLERYUM DİOKSİT'İN NANOTOKSİSİTE
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Nurşah AYDIN tarafından hazırlanan bu çalışma 15/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı – Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.**

Başkan : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Erdal SÖNMEZ

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Elanur AYDIN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 23/07/2015 tarih ve 29/1006 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNSAN PRİMER ALVEOLAR EPİTEL VE TAM KAN HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE TELLERYUM DİOKSİT'İN NANOTOKSİSİTE POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Nurşah AYDIN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

Nanoteknolojideki başdöndürücü ve hızlı gelişmelere bağlı olarak nanomateriyaller veya nano boyutlu partiküller son yıllarda günlük yaşamda sıklıkla kullanılan pek çok ticari ürünün muhtevasında yer almaktadır. Özellikle telleryum dioksit (TeO_2) olmak üzere çeşitli tellür nanopartiküllerinin optik kayıt sistemleri, lazer cihazları, ayarlanabilir filtreler, termoelektrik, veri depolama aygıtları, ışık yayan cihazlar, optik transformatörler, fotonik anahtarlar, fotodedektörler, teşhis uygulamaları ve nanoelektrik gibi geniş kullanım alanları mevcuttur. Bununla birlikte sözkonusu nanopartiküllerin sitotoksik ve karsinojenik etkileri hakkında literatürde kayıtlı bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, mevcut tez kapsamında TeO_2 nanopartikülünün insan primer alveolar epitel (HPAEPiC) ve kan hücreleri üzerine *in vitro* sitotoksik ve biyokimyasal etkilerinin ilk defa araştırılması amaçlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (0–1280 mg/L) kültür ortamına ilave edilen TeO_2 nanopartikülünün sitotoksisite potansiyeli 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ve laktat dehidrojenaz salınımı (LDH) yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, hücre kültürlerinde oksidatif değişimlerin incelenmesinde toplam antioksidan kapasitesi (TAK) ve toplam oksidan durum (TOD) parametreleri kullanılmıştır. MTT ve LDH analiz sonuçları TeO_2 nanopartikülünün uygulama dozuna bağlı olarak hücre canlılığını olumsuz etkilediğini göstermiştir. Bulgularımız söz konusu nanopartikülün her iki hücre tipinde antioksidan kapasiteyi desteklemediği üstelik yüksek konsantrasyonlarda (320, 640 ve 1280 mg/L) oksidatif strese yol açtığını ortaya koymuştur.

2015, 57 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nanotoksisite, Telleryum dioksit (TeO_2), Sitotoksisite, Oksidatif stres, İnsan alveolar epitel hücresi, Tam kan kültürü

ABSTRACT

Master Thesis

THE INVESTIGATION OF NANOTOXICITY POTENTIAL BY TELLURIUM DIOXIDE IN HUMAN PRIMARY ALVEOLAR EPITHELIAL AND WHOLE BLOOD CELL CULTURES

Nurşah AYDIN

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Nanoscience and Nanoengineering
Department of Nanobiotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

In recent years, depending on the vertiginous and rapid developments in nanotechnology, nano- materials or nano-sized particles is located in the content of many commercial products which are commonly used in daily life. There is a wide range of applications such as laser devices, adjustable filters, thermoelectric, data storage devices, light emitting devices, optical transformers, photonic switches, photodetectors, diagnostic applications and nanoelectronic of various tellurium nanoparticles, in particular tellurium dioxide (TeO_2). However, the recorded information in the literature about the cytotoxic and carcinogenic effects of these nanoparticles is very limited. Therefore, in scope of the present thesis it is aimed to investigate *in vitro* cytotoxic and biochemical effects of TeO_2 nanoparticle on human primary alveolar epithelial (HPAEPiC) and blood cells for the first time. The cytotoxicity potential of TeO_2 nanoparticles at different concentrations (0–1280 mg/L) was evaluated by using 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase release (LDH) assays. In addition, total antioxidant capacity (TAC) and total oxidant status (TOS) parameters were used for assessing the oxidative alterations in both cell cultures. The results of MTT and LDH analyses showed that TeO_2 nanoparticle affected the cell viability in a clear dose-dependent manner. Our findings exerted that the nanoparticles did not support the antioxidant capacity, and caused to oxidative stress formations at high concentrations (320, 640 and 1280 mg / L) in both cell types.

2015, 57 pages

Keywords: Nanotoxicity, Tellurium diokside (TeO_2), Cytotoxicity, Oxidative stres, Human primary alveolar epithelial cell, Whole blood culture

TEŞEKKÜR

Tezimin konusunun belirlenmesinde, araştırma aşamasında ve tamamlanmasında yardım ve katkılarıyla bana destek olan ve tecrübelerini benimle paylaşan saygıdeğer hocam, danışmanım Sayın Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ'e,

Deneyisel çalışmalarım sırasında yardımlarından ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Abdulgani TATAR'a,

Bu süreçte yardım ve katkılarıyla yanımda olan çok değerli arkadaşlarım Zehra YAZICI'ya, Ayşe YENİLMEZ'e, Hande YILMAZ'a,

Ayrıca, tezimin başlangıcından beri destekleriyle ve sevgileriyle yanımda olan çok sevgili babam Metin AYDIN'a, annem Keriman AYDIN'a ve kardeşim Fatih AYDIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nurşah AYDIN

Temmuz, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nanoteknoloji	1
1.2. Nanopartiküllerin Genel Özellikleri	4
1.2.1. Nanopartiküllerin fiziksel özellikleri.....	5
1.2.2. Nanopartiküllerin sentezi	5
1.2.3. Nanopartiküllerin karakterizasyonu	8
1.2.4. Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonları.....	8
1.2.5. Nanopartiküllerin toksik etkileri (Nanotoksosite).....	9
1.3. Telleryum Dioksit (TeO ₂) Nanopartikülünün Özellikleri	12
1.4. Oksidatif Stres	13
1.5. Serbest Radikaller.....	14
1.6. Antioksidanlar	15
1.7. Sitotoksosite Testleri	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	25
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	25
3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar.....	26
3.3. Kullanılan Çözelti ve Hazırlanışı	26
3.4. Kan örneklerinin alınması ve kültürlerin kurulması.....	27
3.5. Lenfosit İzolasyonu	27
3.6. TeO ₂ Nanopartikülünün Temini	28
3.7. TeO ₂ Nanopartikülünün Karakterizasyonu	29
3.8. Sitotoksosite Testleri	34

3.8.1. MTT testi	34
3.8.2. LDH Salınım testi.....	35
3.9. Biyokimyasal analizler	36
3.9.1. Toplam antioksidan kapasitesi (TAK)	36
3.9.2. Toplam oksidan durumu (TOD).....	37
3.10. İstatiksel işlemler.....	38
4. ARAŞTIRMA ve BULGULARI	39
4.1. Test Edilen TeO ₂ Nanopartikülünün <i>İn Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturduğu MTT Analiz Değerleri.....	39
4.2. Test Edilen TeO ₂ Nanopartikülünün <i>İn Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturduğu LDH Analiz Değerleri	40
4.3. Test Edilen TeO ₂ Nanopartikülünün <i>İn Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturduğu TAK Değerleri.....	41
4.4. Test Edilen TeO ₂ Nanopartikülünün <i>İn Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturduğu TOD Değerleri.....	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	43
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde konsantrasyon
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
gr	Gram
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
rpm	Devir sayısı

Kısaltmalar

ATP	Adenozin trifosfat
CAT	Katalaz
PBS	Fosfat tamponlu salin
GSH	Glutasyon
GPx	Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum hidrojen fosfat
LDH	Laktat dehidrojenaz
LPO	Lipit peroksidasyonu
MMP	Mitokondriyal membran potansiyeli

MTT	3-(4,5dimetylthiazol-2-yl)-2,5 diphenltetrazolium bromide
NaH ₂ PO ₄	Sodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür
ROS	Reaktif oksijen türleri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SOD	Süperoksit dismutaz
TeO ₂	Telleryum dioksit
TAK	Toplam antioksidan kapasite
TOD	Total oksidan durum
XRD	X-ışın kırınımı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Gaz fazı, sıvı faz ve katı faz yaklaşımının mekanizması.....	7
Şekil 1.2. Nanopartiküllerin kullanıldığı alanlar.....	9
Şekil 1.3. TeO ₂ kristalinin tetragonal yapısı	12
Şekil 3.1. TeO ₂ 'nin stok ve seyreltik sulu çözeltileri.....	28
Şekil 3.2. TeO ₂ 'ye ait XRD deseni	30
Şekil 3.3. TeO ₂ mikro-nanopartiküllerinin SEM görüntüleri (1).....	33
Şekil 3.4. TeO ₂ mikro-nanopartiküllerinin SEM görüntüleri (2).....	33
Şekil 4.1. TeO ₂ nanopartikül maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri	39
Şekil 4.2. TeO ₂ nanopartikül maruziyeti sonrası gözlenen LDH aktivitesi.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Makro boyutlu teknolojiler ile nano boyutlu teknolojilerin karşılaştırılması	2
Çizelge 1.2. Nanoteknoloji temelli tüketici ürünleri.....	3
Çizelge 1.3. Antioksidanların sınıflandırılması	16
Çizelge 3.1. Araştırmalar sırasında kullanılan kimyasallar	25
Çizelge 3.2. Araştırmalar süresince kullanılan aletler ve cihazlar.....	26
Çizelge 3.3. TeO ₂ mikro-nanopartikülüne ait XRD analizi için ölçüm parametreleri....	29
Çizelge 3.4. TeO ₂ mikro-nanopartikülüne ait XRD deseninde yansıma veren düzlemlere ait pik listesi	31
Çizelge 4.1. <i>İn Vitro</i> koşullar altında TeO ₂ nanopartikülünün oluşturduğu TAK düzeyleri.....	41
Çizelge 4.2. <i>İn Vitro</i> koşullar altında TeO ₂ nanopartikülünün oluşturduğu TOD düzeyleri.....	42

1. GİRİŞ

1.1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji 100 nm büyüklük altındaki maddelerin manipülasyon, hassas yerleştirme, ölçüm, modelleme, materyal ve araç uygulamaları, karakterizasyon ve sentezini kapsayan bilim ve mühendislik olarak tanımlanmaktadır (Emerich and Thanos 2003; Sahoo and Labhasetwar 2003; Dwivedi and Paul 2013). Nanoteknoloji kavramı 1959 yılında Nobel Fizik Ödülü almış Richard Feynman tarafından ilk kez ortaya atılmış olmasına rağmen 1974 yılına kadar kullanılmamıştır. Gerçek anlamda ilk kez 1974 yılında, Tokyo Üniversitesinde bir araştırmacı olan Nario Tanguchi tarafından nanometre seviyesinde hassas malzemelerin mühendislikte kullanılabilirliğini ortaya çıkarmak için kullanılmıştır (Feynman 1999; Sahoo *et al.* 2006).

Mühendislik, fizik, kimya ve biyoloji gibi birçok farklı alanda malzeme ve aletlerin geniş ve çok yönlü düzenlemesini içeren multidisipliner bir alan olan nanoteknoloji, mevcut maddelere nano boyutta yeni özellikler kazandırarak yeni malzemeler, aletler ve sistemleri üretmek amacıyla araştırmacılara atomik, moleküler ve süper moleküler seviyede çalışma olanağı sağlamaktadır (Roco *et al.* 2000; Sahoo *et al.* 2006). Bu da nanoteknolojinin önem kazanmasına ve gelişmesine geniş olanak sağlamıştır. Çizelge 1.1’de makro boyutlu teknolojiler ile nano boyutlu teknolojiler arasında meydana gelen değişiklikler gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Makro boyutlu teknolojiler ile nano boyutlu teknolojilerin karşılaştırılması (Bachman 1994)

Makro Boyutlu Teknolojiler	Nano Boyutlu Teknolojiler
Klasik, yukarıdan – aşağı yaklaşımı	Kendiliğinden düzenlenerek birleşme
Orta derecede alan kuvveti	Aşırı derecede yüksek alan kuvveti
Elverişli yüksek enerji aralıkları	Termal dalgalanmalı enerji aralıkları
İstatistiki Topluluklar	Tek tek parçacıklar
Klasik sürekli fizik	Kuantum fizik
Geleneksel malzemeler / karışımlar	Yeni bileşikler ve karışımlar
Katı faz özellikleri	Bağlama özellikleri

Günümüzde çok geniş bir ürün yelpazesinde kullanılmakta olan nanoteknoloji, gelecekte birçok modern toplumun gelişmesinde çok güçlü ve dayanıklı materyallerin üretimi, bilgi ve iletişim teknolojileri, su temizlemesi, ilaç gelişimi, endüstriyel biyoişlemler, moleküler tıp, yiyecek ve tarım sistemlerinin gelişmesi, hastalıkların tanı ve tedavisi gibi çeşitli alanlarda kullanılarak büyük bir etkiye sahip olacağı tahmin edilmektedir (Service 2005; Nel *et al.* 2006; Hagens *et al.* 2007; Dwivedi and Paul 2013). Çizelge 1.2’de nanoteknoloji tabanlı tüketici ürünlerine ait örnekler özet halinde sunulmuştur.

Çizelge 1.2. Nanoteknoloji temelli tüketici ürünleri (Nielsen 2008)

Gıda ve gıda modelleri	Giyim ve tekstil	Oyuncak ve çocuk malzemeleri
*Enerji içecekleri *Beslenme takviyeleri *Gıda saklama kapları *Anti bakteriyel kaplar *Kesme tahtaları	*Kırışıklık ve lekeye dayanıklı kıyafetler *Anti bakteriyel ve anti kokulu kıyafetler ve kumaşlar *Alev geciktirici kumaşlar *Ultraviyoleye dayanıklı ve koruyucu giysiler	*Lekeye dayanıklı peluş oyuncaklar *Anti bakteriyel bebek emzikleri, kupalar ve şişeler *Oyun istasyonları *Anti bakteriyel doldurulmuş oyuncaklar
Spor malzemeleri	Elektronik	Otomotiv
*Bisiklet parçaları *Kayak ve snowboardlar *Kayak batonu *Golf topları *Tenis raketleri ve topları *Hokey değnekleri *Ayakkabı tabanlıkları	*Piller *Organik ışık yayan LED'ler *Veri belleği *Anti bakteriyel ve anti statik kaplamalar *DVD kaplamalar *MP3 çalarlar *Bilgisayar işlemcileri ve çipler	*Hava ve yağ filtreleri *Mumlar ve motor yağları *Anti çizik bitirir *Araç balmumu *Yakıt tüketimini geliştirmek için katalizörler *Lastikler
Ev eşyaları	Bakım ürünleri ve kozmetik	Kişisel bakım ve sağlık
*Anti bakteriyel mobilyalar ve şilteler *Anti bakteriyel kaplamalı aletler *Filtreler *Hava temizleyiciler *Güneş pilleri *Temizlik ürünleri *Kumaş yumuşatıcıları	*Cilt kremleri ve nemlendiriciler *Cilt temizleyiciler *Güneş kremleri *Makyaj malzemeleri	*İşitme cihazları *Selülit tedavisi *Lensler *Vücut yıkama *Deodorantlar *Dış tozu *Şampuanlar *Böcek kovucular *Anti bakteriyel kremler *Ana gebelik testleri

Gelişmekte olan ülkelerin ekonomik büyümesinde nanoteknolojinin büyük bir role sahip olacağı tahmin edilmektedir (Singer and Daar 2001; Mnyusiwalla *et al.* 2003). Nanoteknoloji temelli ekonominin 2015 yılında 1 trilyon doları aşacağı belirtilirken bu beklentinin üç katından daha fazla olabileceği ifade edilmektedir (Berk ve Akkurt

2012). Son yıllarda bu ekonomik etkileri fark eden çeşitli ülkelerde nanoteknoloji araştırma programları üzerine yatırımlar çarpıcı bir şekilde artmıştır (Sahoo 2005; Moghimi 2005).

Nanoteknolojideki muhteşem gelişmeler dikkatlerin bu teknolojinin temelini oluşturan nanopartiküllere çevrilmesine neden olmuştur (Berk ve Akkurt 2012). Nitekim, son yıllarda nanoteknoloji kullanılarak üretilen nanopartiküllerin insan ve çevre sağlığı üzerine potansiyel etkileri ciddi endişe yaratmaktadır. Nanoteknolojinin insan ve çevre üzerine etkileri konusunda Amerika, Japonya, İngiltere, Almanya, Fransa gibi gelişmiş ülkeler farklı derecelerde hassasiyet göstermektedir (Service 2005; Nel *et al.* 2005; Krysanov *et al.* 2010).

1.2. Nanopartiküllerin Genel Özellikleri

0,1–100 nanometre (nm) arasında boyutlara sahip olan partiküllere "nanopartikül" adı verilmektedir. Bir başka ifade ile nanopartikül terimi, çok küçük partikül veya birim materyalin en az bir boyutunun 100 nm'den az olduğu bir formunu tanımlamak için kullanılmaktadır. Nanodotlar, nanokürecikler, nanotüpler, nanoteller gibi yapıların hepsi nanopartikül örneklerindendir (Moghimi 2005; Dikensoy and Bayram 2010; Dwivedi and Paul 2013).

"Nano" ön eki Yunancadaki cüce kelimesinden köken almaktadır. Bir nm metrenin milyarda birine eşittir. Bir başka anlatımla 6 karbonun enine ya da 10 su molekülüne eşittir. Bir insan saçı yaklaşık 80.000 nm, bir kırmızı kan hücresi ise yaklaşık olarak 7000 nm genişliğe sahiptir (Whitesides 2003).

Bir madde nano boyutta farklı fiziksel ve kimyasal özellikler kazanmaktadır. Bu özellik de bilim adamlarını maddeleri nano boyutta inceleyip bulguları insanlık için kullanmaya yönlendirmiştir. Yaygın olarak kullanılan nanopartiküller; gümüş (Ag), demir (Fe), platin (Pt), kalay (Sn), alüminyum (Al), bakır (Cu), zirkon (Zr), selenyum (Se), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), titanyum (Ti), çinko (Zn), seryum (Ce), silisyum (Si),

karbon karası, karbon nanotüpleri, fullerenler, nanokil, seramik, kuantum noktaları ve organik nanopartiküllerdir (Parlak 2013).

1.2.1. Nanopartiküllerin fiziksel özellikleri

Nanopartiküller tüp, nokta, tel, lif ve kapsül gibi onların kendine has karakterlerini sergileyen her bir yapı ile olağanüstü yapısal çeşitlilik göstermektedirler. Tüm bu nanoölçek materyaller makroboyuttaki benzerlerinden farklı fiziksel, kimyasal, optik, elektriksel, katalitik ve mekanik özelliklere sahiptirler. Nanopartiküllerin benzersiz özellikleri sayesinde sahip oldukları kuantum mekanik fenomenleri onlara diğer parçacıkların nüfuz edemediği alanlara etki etme özelliği sağlar. Yapılan araştırmada nanopartiküllerin kan-beyin bariyerini geçebilecek kadar küçük oldukları gösterilmiştir. Ayrıca nanopartiküllerin, parçacık boyutu, partikül sayısı, yüzey alanı ve diğer özellikleri biyolojik özelliklerini önemli derecede etkilemektedir (Preining 1998; Ballou *et al.* 2004; Roszek *et al.* 2005; Singh *et al.* 2006; Hagens *et al.* 2007; Dwivedi and Paul 2013). Nanopartiküller, çevrelerindeki ortama göre dört alt kategoriye ayrılmaktadır; (I) bir katı maddenin yüzeyine bağlı nanopartiküller, (II) bir sıvı içinde süspansiyon haline getirilmiş nanopartiküller, (III) katı olarak süspansiyon haline getirilmiş nanopartiküller, (IV) havadaki nanopartiküller (Hansen 2009).

1.2.2. Nanopartiküllerin sentezi

Nanopartikülleri sentezlemek için farklı yaklaşımlar önerilmiştir. Bu yaklaşımlardan en sık kullanılanlar; aşağıdan-yukarı (bottom-up) ve yukarıdan-aşağı (top-down) yaklaşımlarıdır (Shenhar and Rotello 2003).

* Aşağıdan-yukarı (bottom-up) yaklaşımı: Maddelerin temel yapı birimi olan atomlar nanopartikülleri oluşturmak için birleşmektedirler. Bir başka ifadeyle atom veya moleküller seviyeden başlayarak nanoyapılara ulaşmayı amaçlayan bir yaklaşımdır. Bu yöntemde nanopartiküllerin büyümesini önlemek için ajan kullanılmaktadır. Ayrıca

ilgili yaklaşımda ucuz, sentetik bir teknik olan nanokürecikli litografi yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Diğer aşağıdan-yukarı yaklaşım teknikleri: Çiftleşmiş, kimyasal, elektrokimyasal, sonokimyasal, termal ve fotokimyasal indirgeme teknikleridir (Haes *et al.* 2004; Eustis and El-Sayed 2006).

* Yukarıdan–Aşağı (top–down) yaklaşımı: Bu yaklaşımda amaç büyük boyutlu malzemelerin küçültülmesini sağlamaktır. Bu yaklaşımın ucuz olmaması, zaman alıcı olması ve büyük üretimler için uygun olmaması gibi dezavantajlar nanopartikül sentezleyecek kişiler için çok büyük engel olarak karşılına çıkmaktadır. Bu yaklaşımda en fazla kullanılan teknikler aşağıda sıralanmıştır.

-Fotolitografi: Mevcut lazerlerin dalga boyuna dayalı bir tekniktir.

-Elektron demeti litografi: Lazer darbeleri üretmek için daha kısa dalga boyu kullanılarak çok daha küçük parçacıklar sağlayan bir tekniktir.

Diğer yukarıdan–aşağı yaklaşım teknikleri: Mekanik, yüksek enerji, termik, kimyasal ve diğer litografik teknikleridir (Eustis and El-Sayed 2006; Kayır ve Baççıl 2010).

Nanopartikülleri sentezlemek için sıklıkla kullanılan diğer yaklaşımlar ise nanopartiküllerin maddelerin içinde bulunduğu gaz, sıvı veya katı fazları kullanılarak çeşitli yöntemlerle sentez edilmesidir (Nagarajan 2008; Kayır ve Baççıl 2010). İlgili yöntemlere ait bilgiler aşağıda sunulmuştur.

a) Gaz fazı sentez yaklaşımı; yoğunlaşma, koagülasyon ve yakalama yoluyla durgun buhar oluşumu ve sonrasında parçacık büyümesinin homojen olarak çekirdeklenmesine dayanır. Bu yaklaşımın en önemli özelliği enerjiye çok az ihtiyaç duymasındır. Bu yaklaşımda sıklıkla kullanılan metodlar;

- Lazer ablasyon - Alev piroliz -Yüksek sıcaklık buharlaşması -Plazma sentezi - Mikrodalga ışınlaması -Termal ayrışma -Atom tabaka çökeltisi -Buharlaştırma

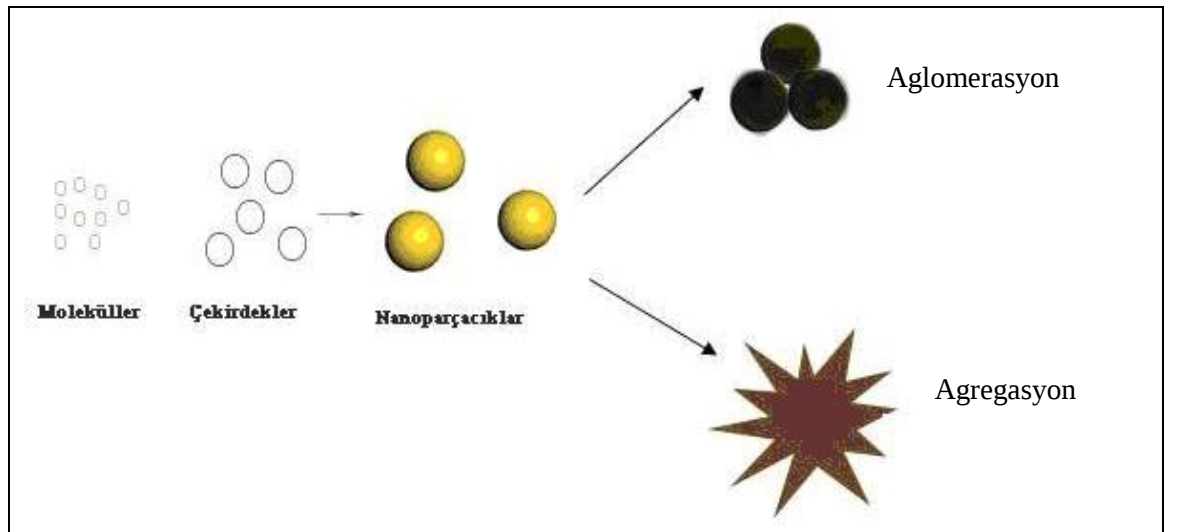
b) Sıvı faz sentez yaklaşımı; kimyasal tepkimelere uygun ortam sağladığı için sıklıkla tercih edilen bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımda kullanılan metotlar;

- Fiziksel ve kimyasal çöktürme sentezi - Solvent kimyasal reaksiyonlar - Sol-jel sentezi - Moleküler kendini yapma yöntemi

c) Katı faz sentez yaklaşımı; Bu yaklaşım sıklıkla kullanılmasına rağmen maliyet, uygulama gibi bir çok dezavantaja da sahiptir. Bu yaklaşımda kullanılan metodlar;

- Öğütme - Frezleme - Mekanik alaşımlama (Nagarajan 2008; Kayır ve Baççıl 2010).

Gaz, sıvı, katı faz yaklaşımlarının hepsi nanopartikülleri oluşturmak için moleküler seviyede başlar. Şekil 1.1’de bu yaklaşımların mekanizması gösterilmektedir. Bu yaklaşımlardaki metotlar kullanılarak kil, kömür ve metal gibi minarelerden nanopartikül elde etme olanağı sağlamaktadır (Nagarajan 2008).



Şekil 1.1. Gaz fazı, sıvı faz ve katı faz yaklaşımının mekanizması

1.2.3. Nanopartiküllerin karakterizasyonu

Karakterizasyon nanopartiküllerin sentezi, moleküller ve fiziksel özellikleri arasındaki etkileşimi kavramak için en önemli noktalardan biridir. Karakterizasyon için birçok yöntem bulunmaktadır. En önemli karakterizasyon yöntemleri;

1. X ışın kırınımı (XRD): Kristallerin atomlarının geometrik düzeni ve aralarındaki uzaklık hakkında bilgi elde etmeyi sağlayan, nano fazlı malzemelerin çalışmasında çok kullanılan bir yöntemdir.
2. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM): Nanopartikülleri doğrudan görüntülemek için kullanılan yöntemdir.
3. Taramalı uç mikroskobu (SPM): Ölçülecek olan özelliğe duyarlı bir prob yardımıyla reaksiyonları ölçmektedir.
4. Dinamik ışık saçılımı: Tek tek parçacıklar tarafından yayılan ışığa müdahale sonucu bir otokorelasyon fonksiyonun tanımlanması ile belirlenmektedir.
5. Zeta potansiyeller: Yüzey değişiklikleri için sık kullanılan bir yöntemdir
6. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM): İncelenecek materyalin elektron demeti kullanarak yüksek çözünürlüklü fotoğrafını elde etmeyi sağlamaktadır. (Smith and Oatley 1955; Maruthi *et al.* 2011).

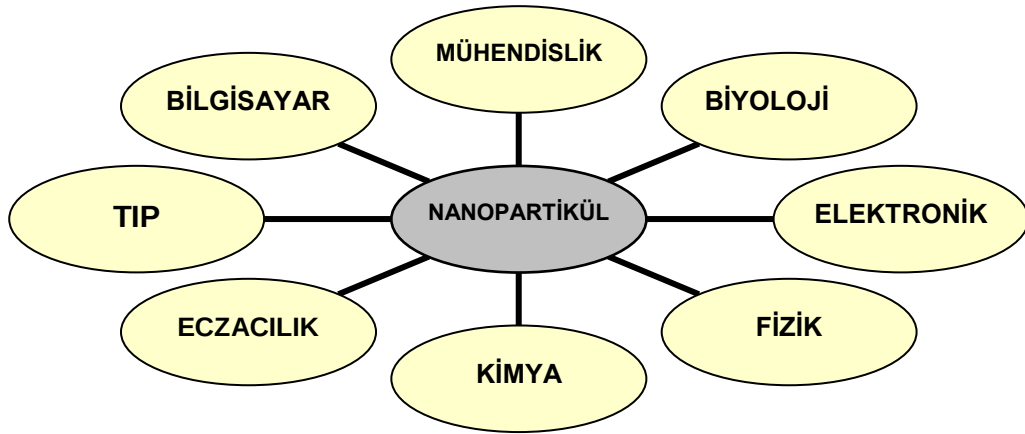
1.2.4. Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonları

Nanopartiküller tatmin edici bir seviyede üretildiği ve saflaştırıldığı zaman meydana gelen yüzey değişikliklerini belirlemek için yapılması gerekli olan bir işlemdir.

Yüzey modifikasyonunun amaçları; (I) çok reaktif molekülleri pasifleştirmek, (II) moleküller tanıma gibi uygulamalar için nanopartikülleri işlevselleştirmek, (III) nanopartiküllerin düzeneğini teşvik etmektir. Sık kullanılan yüzey değiştirme yöntemleri ise; (I) tiollanmış yüzey aktif maddeler veya polimerler aşılama, (II) yüklü yüzey aktif adsorpsiyonu, (III) biyolojik moleküllerin bağlanması, (IV) polimer fırçalar ve ligand yüklemedir (Nagarajan 2008).

1.2.5. Nanopartiküllerin toksik etkileri (Nanotoksosite)

Nanopartiküller mühendislik, çevre teknolojisi, bilgi teknolojisi, gıda, sağlık, kimyasallar, tarım ilaçları, savunma endüstrisi, uzay araştırmaları, enerji, kozmetik, sağlık gibi farklı alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Dwivedi and Paul 2013). Şekil 1.2’de nanopartiküller ile ilişkili olan alanlar gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Nanopartiküllerin kullanıldığı alanlar

Nanopartiküllerin pek çok alanda kullanılmasının bir sonucu olarak nanopartiküllere maruz kalan organizma türlerinin sayısı her geçen gün artmaktadır. Bundan dolayı nanopartiküllerin potansiyel toksisitelerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Üretimi yapılan nanopartiküllerin *in vivo* ve *in vitro* olarak toksik etki potansiyellerinin varlığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu konuda artan ilgiye bağlı olarak yüzlerce *in vitro* toksikolojik çalışma rapor edilmiştir (Ramires *et al.* 2002; Brumfiel 2003; Yoshida *et al.* 2003; Oberdorster 2004; Gurr *et al.* 2005; Soto *et al.* 2005; Donaldson *et al.* 2006; Nel *et al.* 2006; Goldston 2007; Handy *et al.* 2008; Schulze *et al.* 2008; Igarashi 2008; Lewinski *et al.* 2008; Nielsen 2008; Suh *et al.* 2009). Nanopartiküllerin biyogüvenilirlikleri hakkındaki bilinenlerin zaman içerisinde artmasına rağmen literatürde nanopartiküllerin toksik etki potansiyelleri üzerine kayıtlı yeterince bilgi mevcut değildir.

Nanotoksikoloji oldukça yeni bir disiplin olup nanomateriyallerin toksisitelerini araştırmaktadır. Bu alanın doğmasının temel sebebi nanopartiküllerin kullanımında aşırı bir artış olmasıyla birlikte bu materyallerin potansiyel toksisitesi hakkındaki artan kaygılardır. Nanotoksikoloji dozimetre, doz ölçümleri, maruziyet değerlendirmesi, tehlike tanımlama ve risk karakterizasyon kavramlarını kapsamaktadır (Buzea *et al.* 2007; Lewinski *et al.* 2008; Meng *et al.* 2009; Gil *et al.* 2010).

İnsanlar geçmişten günümüze kadar volkanik patlamalar, orman yangınları veya kapalı alandaki yangınlar gibi olaylar sonucunda havadaki ultra ince partiküllere her zaman maruz kalmıştır. Ancak sanayi devriminden bu yana ultra ince partiküllere maruziyet önemli ölçüde artmıştır. Nanoteknolojinin gelişmesi ve uygulamaları hem endüstri hem de tüketiciler açısından çok önemlidir. Nanoteknolojinin uygulama alanları arttıkça insanların ve çevrenin nanopartiküllere maruziyeti de doğru orantılı olarak artmaktadır. Nanoteknoloji ürünlerinin insan maruziyeti ve muhtemel toksisitesi üzerine bilgi sınırlıdır. Potansiyel risk değerlendirmeleri için Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risk (SCENIHR) nanoteknoloji yoluyla üretilen ürünlerin insan sağlığı risk değerlendirmesini geliştirmek için ele alınması gereken literatürdeki bazı önemli bilgi boşluklarını belirlemiştir. Bu kuruluşun önerilerinden birisi, nanoteknoloji ürünlerinin üretim süreçleri, formülasyonları, nanopartiküllerin salınımı ve kinetiğinin mekanizmalarının karakterize edilmesi gerektiğidir. Ek olarak nanopartiküllere maruz kalma seviyelerinin gerçek aralığının değerlendirilmesi için mümkün olduğu ölçekte aynı kimyasal maddelerin büyük parçacıklarının da toksikolojik verilerinin kullanılması gerektiğini önermiştir. Literatürdeki bir diğer önemli bilgi boşluğu ise insanları nanopartiküllere maruz kalma süresi, vücuttaki dağılımı ve birikimidir (Hagens *et al.* 2007).

Birçok araştırmacı nanopartiküllerin toksikolojik etkilerini yoğun bir şekilde hem *in vivo* hem de *in vitro* sistemler üzerinde araştırmaya başlamıştır. Boyut, yüzey bölgesi, fizyo-kimyasal yapısı, şekli ve yükü gibi benzersiz özelliklerinden dolayı nanopartiküller büyük partiküllerden farklı olduğu için toksisiteleride oldukça farklıdır. Çeşitli çalışmalar ile nanopartiküllerin büyük partiküllere kıyasla farklı toksik etkilere

sahip olduğu ileri sürülmektedir. Nano boyutlu partiküllerin sahip oldukları bağıl yüzey bölgesi ve onun hacmi arasındaki oranın fazla olması dolayısıyla hücrelerin biyolojik bileşenleri ile etkileşime girebildiği için büyük partiküllere kıyasla daha reaktiftirler. Nanopartiküllerin toksisitesi temel olarak onların boyutları ile ilişkili olup küçük boyutlu olması insan sağlığına zarar verebilen temel faktörlerden biridir. Bundan dolayı da nanopartiküllerin yan etkileri tahmin edilemeyebilir. Ancak makroskobik boyutlu benzerlerinden veya kimyasal bileşenlerinin bilinen toksisitesinden türetilir. Nanopartikül toksisitesinin diğer bir sebebi ise onların biyo-uyumluluğudur. Sonuç olarak bir madde makro boyutundaki toksisitesine bakılarak aynı kimyasal forma sahip nano boyutunun toksisitesi tahmin edilememektedir (Oberdorster *et al.* 1994; Brown *et al.* 2001). Bir nanopartikülün toksisitesini belirlemede partiküllerin boyut, şekil, yüzey, çekirdek kimyası gibi temel özelliklerinin yanı sıra hedef biyolojik sistemlerle nanopartiküllerin etkileşimine dayanan ikincil özellikler de gözardı edilmemelidir (Dwivedi and Paul 2013).

Kircher *et al.* (2005) nanopartikül toksisitesini üç kategoride ele almıştır;

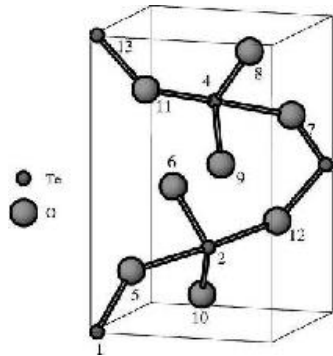
1. Kimyasal toksisitesi,
2. Nanopartiküllerin şekli,
3. Nanopartiküllerin hücre membranlarına tutunması ve hücre içine girmesidir.

Nanopartiküller dermal, oral, enjeksiyon ve inhalasyon gibi çeşitli yollar ile insan vücuduna nüfuz etmektedir. Ayrıca günlük yaşamda sıklıkla kullanılan malzemeler (hava, su, kıyafet, ilaç ve yiyecekler vb.) yoluyla da vücuda alındığı vurgulanmıştır. Vücuda alınan nanopartiküller lenf, kemik iliği, böbrek, kalp, akciğer ve karaciğer gibi hedef organlara taşınmaktadır (Oberdörster *et al.* 2005; Parlak 2013). Bulundukları ortamla çok hızlı bir şekilde etkileşime giren nanopartiküller toksisiteye sebep olmaktadır (Özkan 2014). Nanopartiküller dolaşım sistemine girdiklerinde kan bileşenleriyle etkileşime girerek hemoliz ve trombozise sebep olmaktadır. Ayrıca nanopartiküllerin bağışıklık sistemi ile etkileşimi sonucunda canlılarda immunotoksisiteyi artırdıkları rapor edilmiştir (Dobrovolskaia and McNeil 2007).

Nanopartikül maruziyeti sonrası serbest radikallerin oluşumu; lipid, protein ve DNA'nın oksidasyonuna sebep olarak biyolojik bileşenlerde ciddi hasarlar meydana gelmiştir. Ayrıca nanopartiküllere maruz kalındığında akciğer ve böbrek gibi yüksek miktarda kan akışı olan organlar da ciddi biçimde olumsuz etkilenmektedir. Uzun süre nanopartiküllere maruziyetlerin sonuçları yaşayan organizmalar ile nanopartiküller arasındaki olası etkileşimler henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Nanopartiküllerin kontrolsüz üretimi ve tüketimi sonrasında ekosistem ve doğal sular bu materyaller ile kirlenmekte ve bu materyaller sularda birikmektedir. Buna rağmen nanopartiküllerin doğal ortamlar üzerine olan olumsuz etkileri henüz yeni bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmış olup bu konuda ilk bulgular durumun çok ciddi olabileceği yönünde güçlü sinyaller vermiştir (Barker *et al.* 2006). Nanopartiküller kendilerine has özellikler taşıdıklarından dolayı *in vitro* koşullarda toksisitesi değerlendirilirken olası hataları ortadan kaldırmak için çok detaylı bir karakterizasyon çalışması yapılmalıdır. Nanospesifik özelliklerden etkilenmeyecek şekilde yapılan test metodları nanopartiküllerin toksisitesini belirlemek için kullanılmalıdır (Nel *et al.* 2006; Schulze *et al.* 2008; Özkan 2014).

1.3. Telleryum Dioksit (TeO_2) Nanopartikülünün Özellikleri

TeO_2 materyali 4 tane Te (tellür), 8 tane O (oksijen) olmak üzere 12 atomdan oluşan tetragonal yapılu bir materyaldir (Yapıörer 2010). Şekil 1.3'de TeO_2 materyalinin tetragonal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 1.3. TeO_2 kristalinin tetragonal yapısı (Yapıörer 2010)

TeO₂ materyali elastik davranışı, yüksek kırılma indeksi, doğrusal olmayan optik özellikler ve elektrik iletkenliğine sahip mükemmel bir optik kristaldir (El-Mallawany 1993; El-Mallawany *et al.* 1995; Mirgorodsky *et al.* 2006). Bu olağanüstü fiziksel özelliklerden dolayı TeO₂ nanopartikülleri son zamanlarda hem temel hem de uygulamalı araştırma alanları için ilgi çekici olup birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır (Ilchenko *et al.* 2002; El-Mallawany *et al.* 2008). Bununla birlikte TeO₂ nanopartiküllerinin biyolojik etkilerini değerlendiren çalışmalara literatürde nadiren rastlanmaktadır (Qin *et al.* 2009).

1.4. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, organizmaya zarar veren hidrojen peroksit, hidroksi radikalleri ve süperoksit anyonları gibi reaktif oksijenler ve serbest radikallerin aşırı varlığının biyokimyasal bir durumunu ifade etmektedir (Storz and Imlay 1999; Valko *et al.* 2007; Durackova 2010). Bir başka ifadeyle serbest radikal veya reaktif oksijen ürünlerinin üretimi ile koruyucu antioksidan sistem arasındaki dengenin bir bozukluğu olarak tanımlanmaktadır (Sies 1991; Dursun vd 2002; Morena *et al.* 2002).

Vücutta oksidatif stres; (I) enzimatik olan antioksidanların konsantrasyonunda veya aktivitesinde azalma, (II) enzimatik olmayan antioksidanların konsantrasyonlarında veya aktivitesinde azalma, (III) enzimatik olmayan antioksidanların oksidasyonunda artma, (IV) reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması durumunda meydana gelmektedir (Deaton and Marlin 2003).

Ayrıca antioksidan yetersizliğine veya serbest radikal oluşumundaki artışa bağlı olarak oksidatif stres meydana gelmektedir. Bu nedenle, antioksidan savunma kapasitesi ve serbest radikal üreten reaksiyonlar biyolojide önemli yer tutmaktadır (Karafakıoğlu 2010).

Oksidatif stres oluşumuna bağlı olarak; lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu, DNA mutasyon ve kırıkları, sitotoksik etkiler, sinyal iletilerinin bozulması görülmektedir (Percival 1998; Podda and Kollmann 2001; Portugal *et al.* 2007).

İnsanlarda görülen şeker hastalığı, damar sertleşmesi, hipertansiyon, inflamatuvar hastalıklar, kronik böbrek yetmezliği, Alzheimer, Parkinson, Pick hastalığı, Huntington, romatoid artirid, gibi önemli hastalıkların doğrudan oksidatif stres ile ilişkili oldukları bilinmektedir (Valko *et al.* 2007; Demir *et al.* 2007; Durackova 2010; Çaylak 2011).

Oksidatif stresin zararlı etkileri enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan etkisi ile elimine edilebilir (Valko *et al.* 2006). Bu nedenle güvenli antioksidan türlerinin ve antioksidan dozlarının bilinmesi oksidatif stresin yol açtığı zararların engellenmesi açısından da büyük önem taşımaktadır (Karafakıoğlu 2010).

1.5. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir veya daha fazla çiftlenmemiş elektrona sahip, yaşam süreleri kısa, düşük molekül ağırlıklı moleküller veya moleküler fraksiyonlar olarak tanımlanmaktadır (Karafakıoğlu 2010; Xing 2012). Azot ve oksijen kaynaklı olan serbest radikaller organik veya inorganik halde bulunmaktadırlar. Serbest radikaller kendilerini nötralize etmek için diğer maddelerden elektron almaktadırlar (Barton and Zard 2011).

Serbest radikaller ve oksijenin radikal olamayan türevleri birlikte reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılmaktadır (Asmus and Bonifacic 2000). ROS'lar fizyolojik ve patojik koşullarda oluşmaktadır (Derviş 2011). ROS'lar canlılarda hücre proliferasyonu, farklılaşma, apoptoz, immun sistem ve sinyal ileti yolları üzerine etki ederek toksisiteye sebep olmaktadır. Yapılan araştırmalarda düşük seviyedeki ROS'un çeşitli moleküllerin oksidasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Podda and Kollmann 2001; Portugal *et al.* 2007). Serbest radikallerin kaynakları; (I) küçük moleküllerin oksidasyonu, (II) enzimler ve proteinler, (III) mitokondriyal elektron transportu, (IV) endoplazmik

retikulum ve nükleer membran transport sistemleri, (V) plazma membranları, (VI) oksijen, (VII) aktive nötrofiller, (VIII) nitrik oksid, (IX) peroksizomlar, (X) fotokimyasal hava kirliliği, (XI) hiperoksi, (XII) sigara dumanı, (XIII) bazı çözücüler, (XIV) aromatik hidrokarbonlar, (XV) heksoz monofosfat yolu, (XVI) ksenobiotiklerin metebolizması, (XVII) biyosentetik ve biyokimyasal yıkımdır (Fridowich 1978; Jozwtak and Helszer 1981; Petkau and Chelack 1984; Borek 1987; Petkau 1987; Karabulut ve Kabakçı 1995; Konukoğlu 1997).

Organizmalarda serbest radikal üretimi sürekli devam ettiğinden bu serbest radikallerin olumsuz etkilerine karşı birçok savunma sistemi gelişmektedir (Lohr *et al.* 1987; Vaddadi 1991).

1.6. Antioksidanlar

Birçok mekanizma sonucu meydana gelen serbest radikallere karşı vücutta doğal bir savunma mekanizması oluşmaktadır. Bu mekanizmayı oluşturan maddelere antioksidan denmektedir. Bu maddeler düşük konsantrasyonlarda okside edilir, başka bir substratın oksidasyonunu düşürür veya engeller ve böylece oksidayona karşı mücadele etmiş olur (Gökpınar *et al.* 2006; Çaylak 2011). İyi bir antioksidan; (I) özel olarak serbest radikal söndürme, (II) redoks metalleriyle şelat yapma, (III) antioksidan ağı içindeki diğer antioksidanlar ile etkileşime girme, (IV) gen ekspresyonu üzerinde olumlu etki, (V) kolayca emilebilme, (VI) fizyolojik olarak uygun düzeyde doku ve biyolojik sıvılarında bir konsantrasyona sahip olma gibi özelliklere sahip olmalıdır (Valko *et al.* 2006; Karafakıoğlu 2010). Antioksidanlar eksojen ve endojen olarak kategorize edilmektedir (Çizelge 1. 3) (Akkuş 1995; Aslan vd 1995; Madi *et al.* 1999; Aslan ve Dünder 1999; Deaton and Marlin 2003; Bouayed and Bohn 2010).

Çizelge 1.3. Antioksidanların sınıflandırılması

Eksojen Antioksidanlar		
Vitamin A Vitamin C Vitamin E Karotonoidler Fenolik asitler Antosiyanidinler	Flavonollar Flavanollar Flavanonlar Flavonlar İzoflavonlar	
Endojen Antioksidanlar		
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz (SOD) Glutasyon peroksidaz (GPx) Glutasyon redüktaz Glutasyon-S-transferaz Katalaz (CAT) Mitokondrial sitokrom oksidaz Tioeredoksinler Glutaredoksinler Peroksiredoksinler Glukoz-6-dehidrojenaz	α - tokoferol β -karoten Albumin Bilirubin Glikoz Melatonin Seruplazmin Koenzim Q Transferin Laktoferrin	Ürik asit Askorbik asit Lipoik asit Miyogloblin Hemogloblin Ferritin Ürat Metiyonin Glutasyon (GSH) Sistein

1.7. Sitotoksisite Testleri

Sitotoksisite moleküler olaylar sonucu birçok makromoleküllerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında görünür hasarlar oluşması olarak tanımlanmaktadır (Aldridge 1993; Murray *et al.* 2007). Bir ajanın vücutta nasıl tepkiler vereceğini anlamak yolunda ilk adım genellikle hücre kültürü çalışmalarını kapsamaktadır. Hayvan çalışmalarına kıyasla hücresel testleri kontrol etmek ve tekerrürlerini sağlamak daha kolay ve ucuzdur (Lewinski 2008). Hücre kültürlerinde, sitotoksisite testleri söz konusu maddenin toksisite potansiyeli *in vitro* şartlarda değerlendirilmektedir (Tuncer ve Demirci 2011). Sitotoksisite durumunda hücre kültürleri potansiyel olarak test edilen toksik maddenin konsantrasyonuna ek olarak pH, besin ve atık konsantrasyonlarındaki değişiklikler gibi çevresel faktörleride değerlendirmek önemlidir (Lewinski 2008). Sitotoksisite testleri hücrenin organelleri,

membranları, bölünmesi, canlılığı ve ölümü ile protein veya DNA sentezi hakkında bilgi vermektedir (Nicholson 2002).

Sitotoksiteyi değerlendirmek dört şekilde yapılmaktadır;

a) Canlılık testleri: Toksisite sonucu kültürde canlı olan hücre seviyesinin belirlenmesini sağlar. Nötral kırmızı, tripan mavisi ve floresan gibi canlılık testleri kısa süreli olup hızlı ve kolay uygulanmaktadır.

b)Yaşam testleri: Uzun sürede oluşan toksisitenin etkilerini incelemek için kullanılmaktadır. Bu amaç için kullanılan metot az hücre yoğunluğunda koloni oluşturma seviyesidir.

c) Proliferasyon testleri: Kültürlerdeki hücrelerin birkaç gün sonraki sayımı ile materyalin birçok bileşeninin hücre proliferasyonuna etkisini belirlemeyi sağlamaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemlere H-timidin testi ve bromodeoksiuridin immunohistokimyasal teknikleri örnek verilmektedir (Freshney 2005)

d) Metabolizma değerlendirme testleri: Fazla yoğunluktaki hücrelerin değerlendirilmesi, hücre sayısındaki kesin artış, toplam protein miktarı veya DNA artışının belirlenmesini sağlayan testlerdir (Tuncer ve Demirci 2011). Bu testler ile uzun sürede meydana gelecek hasarı anlamak için hücrelerin metabolik seviyeleri ölçülmektedir (Jenkins 1999) Hücrelerin canlılıkları bu testlerde mikropilaka okuyucu spektrofotometre yardımı ile plakaların doğrudan ölçülmesine izin vererek belirlenmektedir (Weyermann *et al.* 2005; Tuncer ve Demirci 2011). Bu testlerden başlıcaları -(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ve laktat dehidrojenaz (LDH) salınımı'dır.

MTT testi

MTT deneyi ilk olarak 1983 yılında Mosman tarafından geliştirilen hücre kültürlerinin toksik maddelere maruz kaldıktan sonra sitotoksite proliferasyonu veya hücre canlılığını ölçmek için basit bir kolorimetrik bir yöntemdir. MTT mitokondri içinde mitokondriyal dehidrojenaz enzimi ile tetrazolyum halkasının ayrılması ile çözülmeyen

mor bir formazana dönüştürülen ve suda çözülebilen bir tetrazolyum tuzdur (Pozzolini *et al.* 2003; Fotakis and Timbrell 2006). MTT deneyi mitokondriyal dehidrojenaz faaliyetlerinin değişiklikleri ile hücre zarı üzerindeki etkilerini göstermektedir (Mosmann 1983). Eklenen materyalin sitotoksik etkisiyle hücrede dehidrojenaz aktivitesinin etkilenmesiyle mavi renkli formazan oluşmaz, formazan oluşumu sadece aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde vardır. Çünkü formazan ürünü hücre zarlarına karşı geçirgen olduğu için sadece canlı hücrede birirmektedir (Fotakis and Timbrell 2006; Tuncer ve Demirci 2011).

LDH salınımı testi

Kolorimetrik bir sitotoksosite yöntemi olan LDH salınımı testi, sağlıklı hücrelerde sitoplazmada bulunan esansiyel bir enzim olan LDH enziminin, hücre zarının hasar görmesi sonucu ortama salınan enzimin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanan bir sitotoksosite yöntemidir (Bilgin *et al.* 2002; Moharamzadeh *et al.* 2009). Salınan LDH miktarı lize edilen veya hasarlı olan hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır (Babson and Phillips 1965). Sitotoksosite çalışmalarında materyale maruz kalan hücrelerin LDH salınma yüzdesi, pozitif kontrol hücrelerin maksimum LDH salınımları ile karşılaştırılarak hesaplanmaktadır (Reichl *et al.* 2001; Quinlan *et al.* 2002; Issa *et al.* 2004). LDH salınımındaki bir artış, hücre membranlarının oksidatif hasarlı olduğunu gösteren bir işarettir. Marc ve arkadaşları (1991) belirli bir hücre tipi için verilen kültür koşulları altında hücre başına LDH içeriğinin sabit kaldığını göstermiştir. Ancak hücrelerin LDH içeriğinin karbon kaynağı türü ve pH dahil olmak üzere çeşitli kültür parametreleri tarafından etkilendiği kaydedilmiştir (Marc *et al.* 1991; Thomas *et al.* 1993; Cartwright 1994; Yıldız vd 1999).

Yukarıda verilen literatür bulguları dikkate alınarak şunlar söylenebilir:

- Nanopartiküllerin benzersiz özelliklerinden dolayı biyoloji, fizik, kimya, tıp ve daha birçok alanda çok yaygın olarak kullanılmaktadır.

- Nanopartiküllerin yaygın kullanımına rağmen biyolojik etkileri tam olarak bilinmemektedir.
- Tellür nanopartikülleri ilgi çeken özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılan bir nanomalzemedir.
- Nano boyuttaki partiküller makro boyuttaki partiküllerden farklı özelliklere sahip olduklarından dolayı farklı biyolojik etkilere neden olmaktadır.
- Tellür nanopartiküllerinin biyolojik etkileri hakkında literatürde sınırlı düzeyde bilgi mevcuttur.

Bu nedenlerle, mevcut tez çalışması kapsamında; TeO_2 nanopartikülünün nanotoksosite potansiyelinin hücre canlılığı (MTT ve LDH testleri) analizleri ve biyokimyasal parametreler (TAK ve TOD) kullanılarak ilk kez araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Hussayn *et al.* (2005) farklı boyutlardaki birçok değişik nanopartikülün (Ag, molibden trioksit (MoO_3), Al, demir(II,III)oksit (Fe_3O_4), kadmiyum oksit (CdO), mangan(IV)oksit (MnO_2), tungsten (W)) sıçan karaciğer hücre hattında (BRL3A) toksik etki potansiyelini araştırmışlardır. Toksik değerlendirmeler için hücre morfolojisi, MTT ve LDH salınım testleri, GSH, ROS ve mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) maruziyet koşulları altında değerlendirmişlerdir. Elde edile verilere göre; GSH düzeyinde ve MMP'de önemli bir azalış olurken, ROS üretiminde artış olduğunu tespit etmişlerdir. MTT analizinde Ag nanopartiküllerinin doza bağlı olarak sitotoksosite sağladığını, diğer nanopartiküllerin ise test edilen dozlarda sitotoksosite de önemli bir artış göstermediğini rapor etmişlerdir. Toksisite değerlendirmeleri sonucu Ag nanopartikülünün çok toksik olduğu, MoO_3 orta derecede bir toksik etkisinin olduğu, Fe_3O_4 , Al, MnO_2 ve W test edilen dozlarda yok denilecek kadar az toksik etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca yapılan mikroskobik çalışmalarda yüksek dozlarda nanopartiküllere maruz kalan hücrelerin düzensiz bir şekle sahip olduğu, hücresel büzülme gösterdiği ve boyutunda anormallikler meydana geldiği tespit edilmiştir.

Stolle *et al.* (2005) bu çalışmada *in vitro* germ hattında nanotoksikolojiyi incelemek için bir model olarak fare spermatogoniyal kök hücre hattının uygunluğunu değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Bu hücrelerde nanopartiküllerin farklı tiplerinin (Ag, MoO_3 , Al) etkileri ışık mikroskopu, hücre çoğalması ve standart sitotoksosite deneyleri ile değerlendirmişlerdir. Değerlendirmeler sonucunda, 15 nm boyutundaki Ag nanopartikülüne maruziyet sonucu mitokondriyal fonksiyonda ve hücre canlılığında önemli ölçüde azalma olduğu, MoO_3 nanopartikülleri 50 $\mu\text{g/mL}$ ve üzerindeki konsantrasyonlarda metabolik aktivite üzerinde toksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak test edilen parçacıkların tüm tipleri için konsantrasyona bağlı toksisisteye sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

Lin *et al.* (2006) iki farklı boyuttaki (15 nm-46 nm) silika nanopartiküllerinin sitotoksitesini kültürlenmiş insan bronkoalveol karsinom türevi olan hücreler üzerinde

pozitif kontrol olarak kristalin silika kullanılarak araştırmışlardır. ROS, glutatyon, malondialdehit ve LDH'ı içeren sitotoksikite ve oksidatif stresin göstergelerini kantitatif olarak değerlendirmişlerdir. Elde edilen verilere göre, silika nanopartiküllerine maruz kalan hücrelerde LDH salınımında, malondialdehitte, ROS üretiminde artış olurken, GSH seviyelerin de azalma olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca, silika nanopartiküllerinin doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını da tespit etmişlerdir.

Jeng and Swanson (2006) yaptıkları çalışmada farklı boyuttaki (30 nm-45 nm) metal oksit nanopartiküllerinin (titanyum oksit (TiO_2), çinko oksit (ZnO), Fe_3O_4 , alüminyum oksit (Al_2O_3) ve krom trioksidin (CrO_3)) Nöro-2A hücreleri üzerindeki doza bağlı olarak toksik etki potansiyelini araştırmışlardır. Toksik değerlendirmeler için hücre morfolojisi, MTT, LDH, plazma membranının geçirgenliği ve apoptoz maruziyet koşulları altında değerlendirilmiştir. Toksik değerlendirmeler sonucunda ZnO nanopartikülünün hücre canlılığını azaltırken, LDH salınımını artırdığını; Fe_3O_4 , Al_2O_3 , TiO_2 nanopartiküllerinin 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyona kadar hücre canlılığına ve LDH salınımına önemli bir etki etmediğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre; test edilen konsantrasyonlarda CrO_3 nanopartikülünün toksik olmadığı; ZnO nanopartikülünün çok toksik olduğu; Al_2O_3 nanopartikülünün orta derecede toksik iken Fe_3O_4 ve TiO_2 nanopartiküllerinin çok az toksik olduklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca, mikroskopik çalışmalar ile 100 $\mu\text{g/mL}$ 'den daha fazla konsantrasyonlarda nanopartiküllere maruz kalan Nöro-2A hücrelerinin boyutlarında anormallikler olduğu ortaya konmuştur.

Pan *et al.* (2007) yaptıkları bir çalışmada farklı boyutlardaki (0,8-15 nm) trifenilfosfin türevleri tarafından stabilize olan suda çözünür altın (Au) nanopartiküllerinin sıçan fibroblast (L929), epitel (HeLa), monositik/makrofaj (J774A1) ve melanom (SK-Mel-28) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini MTT analizi ile test etmişlerdir. 1,4 nm Au nanopartikülüne maruz kalan hücrelerde nekroz ile hızlı hücre ölümü gerçekleşirken; 1,2 nm Au nanopartikülüne maruz kalan hücreler ise apoptoz ile hücre ölümüne programlanmış olduğunu rapor etmişlerdir. 15 nm boyutundaki Au nanopartiküllerinin toksik olmadığını tespit etmişlerdir.

Arora *et al.* (2008) insan deris/karsinoma (HT-1080) ve fibroblast (A431) hücreleri üzerinde 7-20 nm boyutlarındaki küresel Ag nanopartiküllerinin (SNP) *in vitro* etkileşimlerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda her iki hücre hattında da GSH ve SOD enzimlerini azaltarak ve lipid peroksidasyonunda önemli artışa sebep olarak hücre canlılığını azalttığı XTT yöntemi ile belirlenmiş olup her iki hücre tipi için de sitotoksikite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca A431 hücrelerinde CAT ve GPx enzim seviyelerinde herhangi bir değişiklik olmadığını kaydetmişlerdir. 6 µg/mL'ye kadar Ag nanopartiküllerine maruz kalan her iki hücre tipinin morfolojisinde herhangi bir değişiklik yapmamıştır. Ancak yüksek konsantrasyonlarda (6-50 µg/mL) hücreler de büzülme, çok yüzlülük ve yuvarlaklaşma gibi morfolojik değişikliklerin meydana geldiğini kaydetmişlerdir.

Carlson *et al.* (2008) farklı boyutlardaki (15-30-50 nm) aktif Ag nanopartiküllerine maruz kalan alveolar makrofaj hücrelerindeki hücresel etkileşimlerini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. MTT testi sonucuna göre, Ag-15 nm ve Ag-30 nm boyutlarındaki nanopartiküllerin düşük dozlarda, Ag-50 nm boyutundaki nanopartiküllerin ise sadece en yüksek dozda hücre canlılığını azalttığını tespit etmişlerdir. Nanopartikülün 15 nm ve 30 nm'lik artan konsantrasyonlarına maruz kalan kültürlerde GSH düzeyinde azalma olurken, ROS üretiminde artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada 50 µg/mL'lik Ag-15nm nanopartiküllere maruz kalan alveolar makrofaj hücrelerinde ROS seviyelerini 10 kattan daha fazla arttırarak oksidatif strese yol açtığı da rapor edilmiştir.

Lai *et al.* (2008) TiO₂ ve diğer metal oksit (ZnO, magnezyum oksit (MgO)) nanopartiküllere maruziyetin insan astostoma (U87) ve fibroblast (HFF-1) hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. TiO₂ mikro ve nanopartiküller konsantrasyonla ilişkili bir şekilde insan hücrelerinde hücre ölümüne neden olduğunu MTT testi ile bulmuşlardır. Ayrıca U87 hücrelerinde hücre ölümünde ZnO nanopartiküllerinin en etkili olduğu, TiO₂ nanopartiküllerinin ikinci olarak etkili olduğu ve MgO nanopartiküllerinin en az etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Park (2008) farklı konsantrasyonlarda 21 nm boyutundaki titanyum dioksit (TiO_2) nanopartiküllerinin toksisitesini insan bronş epitel hücreleri (BEAS-2B) üzerinde değerlendirmişlerdir. Nanopartiküllere maruziyetin ROS artışına, GSH azalmasına, oksidatif stresle ilişkili olan genlerin (hemo oksijenaz-1, tioredoksin redüktaz, glutatyon-S-transferaz, katalaz, hipoksi) indüklenmesine yol açtığı tespit edilmiştir. Hücrelerin apoptozisinde önemli bir rol oynayan kaspaz-3 enzimi TiO_2 nanopartiküllerine maruz kaldıktan sonra artmıştır. Ayrıca MTT testi sonucunda TiO_2 nanopartiküllerinin doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını kaydetmişlerdir.

Napierska *et al.* (2009) farklı boyutlardaki monodispers amorf küresel silika nanoparçacıklarının endotel hücrelerinin (EAHY926) canlılığı üzerine etkilerini inceleyerek silika nanopartiküllerine maruz kalan EAHY926 hücrelerinde hücre yaşamında azalmaya ve sitotoksik tehlikelere neden olduğu sonucuna varmışlardır.

Wang *et al.* (2009) farklı boyutlardaki (20 ve 50 nm) silika nanopartiküllerinin sitotoksitesini insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) üzerinde çalışmışlardır. Hücre canlılığı mitokondriyal fonksiyon, hücre morfolijisi, ROS, GSH, tiyobarbitürik asit reaktif maddesi, hücre döngüsü ve apoptozu silikaya maruz kalma şartlarında değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak 20 nm veya 50 nm silika nanopartiküllere maruz kalan HEK293 hücrelerinde ROS artarken, GSH ve hücre canlılığında azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca morfolojik incelemeler sonucunda SiO_2 nanopartiküllere maruziyetten sonra hücrelerin büzüldüğünü ve nükleer yoğunlaşmanın arttığını rapor etmişlerdir.

Ahamed (2011) 24-48 saatlik insan akciğer A549 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda iyi karakterize olmuş nikel nanopartikülünün toksik etkilerini araştırmışlardır. Toksik değerlendirmeler için MTT, LDH, GSH, ROS, lipid peroksidasyon (LPO) ve kaspaz-3- aktivitesini maruz kalma şartlarında belirlemişlerdir. MTT sonuçlarına göre nikel nanopartikülünün mitokondriyal fonksiyonları azalttığını tespit etmişlerdir. A549 hücrelerinin 2, 5, 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda nikel

nanopartiküllerine maruz kalması sonucu LDH salınımının da önemli ölçüde artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca nikel nanopartiküllerinin A549 hücrelerinde LPO ve ROS üretimini artırarak ve GSH'ın azalmasına neden olarak doz ve zamana bağlı oksidatif strese yol açtığını tespit etmişlerdir.

Sun *et al.* (2011) yaptıkları bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda (0,001-100 µg/mL) demir(III)oksit (Fe_2O_3), Fe_3O_4 , Al_2O_3 , MgO, ve bakır (II) oksit (CuO) nanopartiküllerinin toksik etki potansiyelini insan kalp mikrovasküler endotel (HCMECs) hücreleri üzerinde MTT testi, LDH salınım testi ve ROS üretimini maruziyet durumları altında araştırmışlardır. MTT, LDH salınımı ve ROS üretimi sonuçlarına göre; ZnO, CuO ve MgO nanopartiküllerinin doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı, LDH salınımında ve ROS üretiminde artışa neden olduğu; Fe_2O_3 , Fe_3O_4 ve Al_2O_3 nanopartiküllerinin hücre canlılığına, LDH salınımına ve ROS üretimine önemli bir etki yapmadıklarını tespit etmişlerdir. Bu veriler ışığında; doza ve zaman bağlı olarak ZnO, MgO, CuO nanopartiküllerinin toksik olduğunu, Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , Al_2O_3 nanopartiküllerinin toksik olmadıklarını rapor etmişlerdir.

Suliman *et al.* (2013) Ag nanopartiküllerinin sitotoksik etkilerini A549 insan akciğer epitel hücreleri üzerinde MTT ve LDH yöntemlerini kullanarak araştırmışlardır. Ag nanopartiküllerinin ROS üretimini, LPO oluşumunu, SOD ve CAT sentezlenmesini arttırarak, LDH salınımını ve GSH sentezini azaltarak doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Araştırmalar esnasında kullanılan kimyasal maddeler ile ilgili bilgiler Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmalar sırasında kullanılan kimyasallar

Malzemenin Adı	Temin Edildikleri Firmalar
Penisilin-streptomisin (100 ml)	Sigma® , USA
Fetal Bovine serum (100 ml)	Sigma®
Karyotipik medyum (100 ml)	GIBCO® , USA
Fikoll	Stemcell® , USA
Fosfat tamponlu salin (PBS)	MP Biomedicals® , Almanya
LDH sitotoksisite deney kiti	Cell Biolabs®, USA
MTT hücre çoğalması deney kiti	Milipore®, Almanya
İzopropanol	Sigma-Aldrich®
Hidroklorik (HCl) asit	Sigma-Aldrich®
Triton-X-100	Sigma-Aldrich®
Sodyum klorür(NaCl)	Merck, Darmstadt®, Almanya
Total antioksidan kapasite (TAK) kiti	Rel Assay Diagnostics®, Türkiye
Total oksidan durum (TOD) kiti	Rel Assay Diagnostics®
Potasyum hidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich®
Sodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich®
Trypan Blue Solüsyonu	Sigma-Aldrich®
48 kuyucuklu plate	Costar (Sigma-Aldrich®), Almanya
RPMI-1640 medyum	Lonza®, USA

3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Araştırmalar sırasında kullanılan aletler ve cihazlar Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Araştırmalar süresince kullanılan aletler ve cihazlar

Aletler ve Cihazlar	Temin Edildikleri Firmalar
Soğutucu	Edesa, İspanya
Santrifüj	Hettich, Almanya
Işık Mikroskobu	Zeiss, Almanya
Steril Kabin	Esco, USA
Hassas Terazî	Unibloc (Shimadzu), Japonya
Karbondioksitli Etüv	Esco, USA
Mikroplayt Okuyucu	Epoch bio-tek, USA
Otomatik Pipet	Finpipette Labsystems, Finlandiya
Taramalı Elektron Mikroskobu	Jeol Jsm-6610, USA
X-Işın Difraktometresi	Rigaku SmartLAB, Japonya

3.3. Kullanılan Çözelti ve Hazırlanışı

Fosfat tamponlu salin’in (PBS) hazırlanışı (pH: 7)

8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 0,2 gr KH₂PO₄ ve 2,32 gr Na₂HPO₄ alındı ve 1 litre distile suda çözüldü. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.4. Kan örneklerinin alınması ve kültürlerin kurulması

Bu çalışmaya sigara ve alkol kullanmayan, belirli bir hastalığı ve mesleki maruziyetleri bulunmayan (fiziksel veya kimyasal ajanlara maruz kalmamış) yaş aralığı 20-25 olan gönüllü 7 erkek birey dahil edildi. Heparinize enjektöre alınan periferik kan numuneleri, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Genetik ve Doku Kültürü Araştırma Laboratuvarlarında eş zamanlı olarak yürütülen biyokimyasal ve sitotoksik araştırmalarda kullanıldı.

Yapılan ön çalışmalardan elde edilen sonuçlar ve literatür bilgileri doğrultusunda TeO_2 nanopartikülünün kültürle uygulanacak konsantrasyon miktarları tespit edildi. Test edilen TeO_2 nanopartikülünün kültürle uygulanan konsantrasyonları; 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 mg/L olarak belirlendi. Sitotoksikite ve biyokimyasal araştırmalar 72 saatlik tam kan kültürleri üzerinde yapıldı. 72 saatin sonunda kültürler sonlandırılarak uygulanacak olan test tekniklerine uygun prosedürler izlendi. Kontrol grubu olarak kurulan kültürle herhangi bir nanopartikül eklenmedi. Ayrıca MTT ve LDH salınım testleri için pozitif kontrol olarak Triton X-100 solüsyon; toplam antioksidan kapasitesi analizlerinde pozitif kontrol olarak askorbik asit ($10\mu\text{M}$); toplam oksidan durum analizlerinde pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) ($25\mu\text{M}$) kullanıldı.

3.5. Lenfosit İzolasyonu

Kan heparinize şırınga içine alındı. Santrifüj tüpüne 12 mL kan hücresi, 12 mL PBS eklenerek 1000 rpm'de 20°C 'de 10 dakika santrifüj edildi. Bir başka steril tüpe 8 mL ficol konuldu. PBS ekli kan yavaşça ficolün üzerine tüpün kenarından ilave edilerek 400 rpm'de 20°C 'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra dört farklı katman oluştuğu gözlemlendi. En üstteki katman uzaklaştırıldı. Kalan tabakalar boş falkon tüpüne alındı ve 10 mL PBS ile karıştırıldı. Tüpler 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı. Tüp RPMI-1640 medyum ile dolduruldu. 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak toplam hacim RPMI ve %10'luk

PBS ile 5 mL'ye tamamlandı. Tüp karıştırıldı 10 μ L örnek bir tüpe alındı. Bu tüpe 90 μ L trypon blue solüsyonu eklenerek ışık mikroskobu vasıtasıyla thoma lamıyla hücre sayımı yapıldı. Daha sonra 48'lik plakanın her bir kuyucuğuna 20 μ L hücre aktarıldı. Aktarılan bu hücreler üzerine penisilin streptomisin ve fetal bovin serum (330 μ L) ile belirlenen miktarlarda TeO_2 nanopartikülü ilave edilerek 37°C %5'lik CO_2 'li etüvde karanlık ortamda 72 saat süre ile kültürü yapıldı.

3.6. TeO_2 Nanopartikülünün Temini

Çalışmada kullanılan TeO_2 mikro-nanopartikülü Sigma Aldrich (USA) firmasından ticari olarak satın alınmıştır. (CaS NO:7446-07-3)



Şekil 3.1. TeO_2 'nin stok ve seyreltik sulu çözeltileri

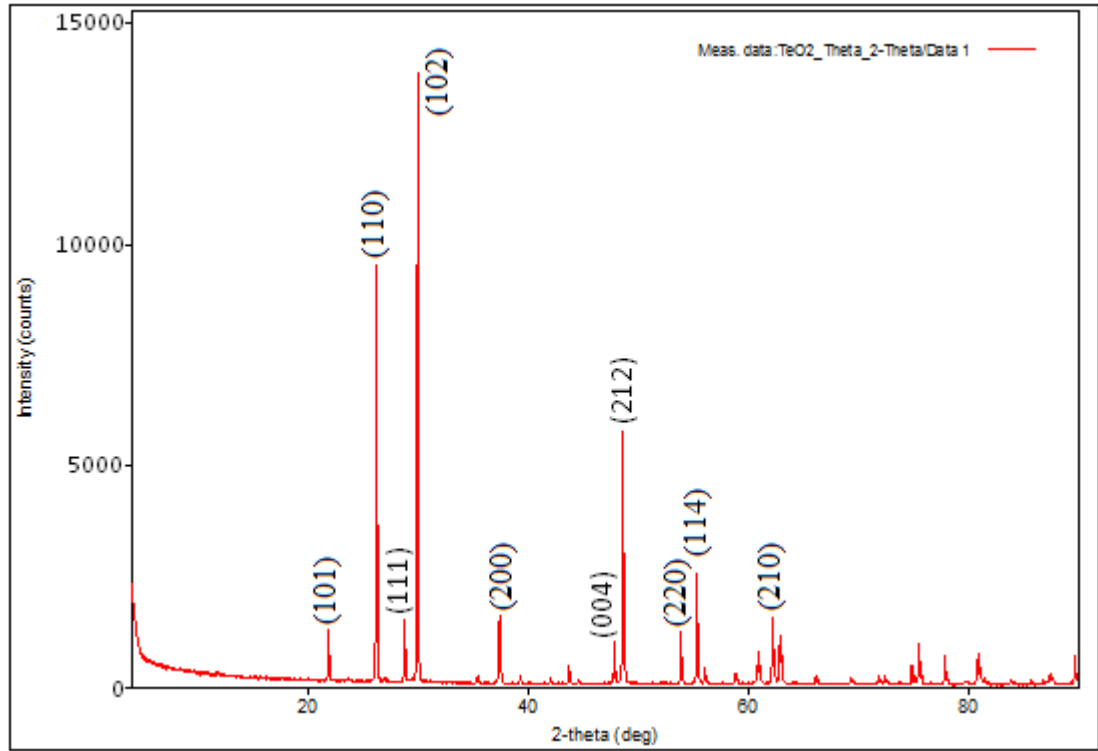
Molekül ağırlığı 159,60 gr olan malzemenin safsızlığı %99,995'tir. Partikül büyüklükleri 150 nm ile 1 mikron arasında değişmektedir.

3.7. TeO₂ Nanopartikülünün Karakterizasyonu

Temin edilen TeO₂ nanopartikülün morfolojisini tayin etmek için XRD ve SEM analizleri yapılmıştır. Bu tez çalışmasında, TeO₂ mikro-nanopartikül XRD analizlerinde Rigaku SmartLab X ışın difraktometresi kullanılmış ve XRD analiz ölçüm parametreleri Çizelge 3.3’de, analiz sonuçları Şekil 3.2 ve Çizelge 3.4’de gösterilmiştir. Örneklerin SEM görüntüleri Jeo Jsm-6610 marka SEM cihazında ile elde edilmiştir. Analiz sonuçları Şekil 3.3 ve 3.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. TeO₂ mikro-nanopartikülüne ait XRD analizi için ölçüm parametreleri

X-Ray	40 kV , 30 mA	Scan speed / Duration time	5.0985 deg./min.
Goniometer		Step width	0.0200 deg.
Attachment	-	Scan axis	2Theta/Theta
Filter	Cu_K-beta	Scan range	4.0000 - 90.0000 deg.
CBO selection slit	-	Incident slit	0.500mm
Diffrected beam mono	None	Length limiting slit	-
Detector	D/teX Ultra 250	Receiving slit #1	20.000mm
Scan mode	CONTINUOUS	Receiving slit #2	20.000mm



Şekil 3.2. TeO_2 'ye ait XRD deseni

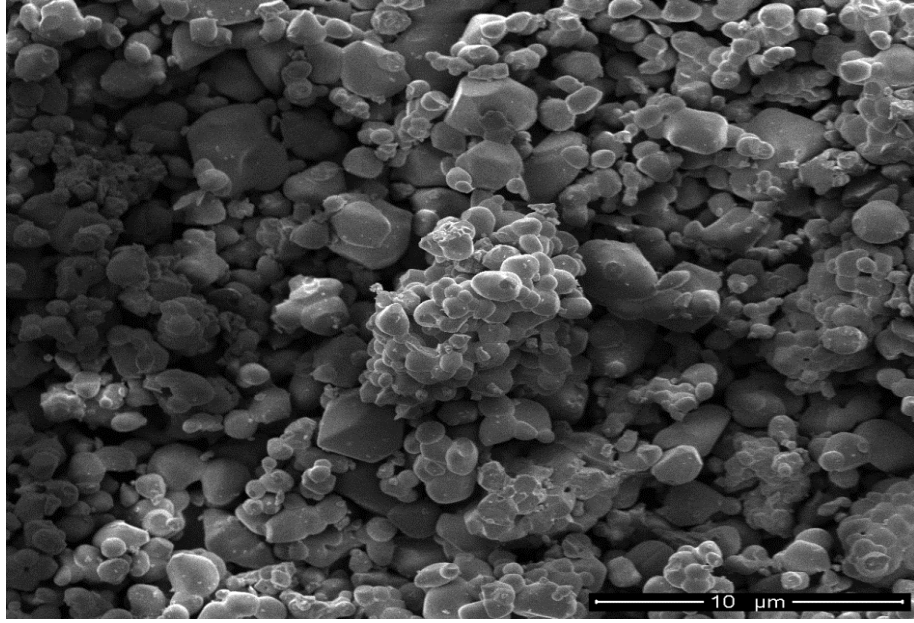
Şekil 3.2'de TeO_2 mikro-nanopartiküle ait XRD analiz sonuçları görülmektedir. Şekilden en şiddetli piklerin, (110) düzleminde $2\theta=26,198^\circ$ 'de, (102) düzleminde $29,9368^\circ$ 'de, (201) düzleminde $48,6004^\circ$ 'de olduğu görülmektedir. Açılar, ICDD tarafından oluşturulan JCPDS standartlarına göre 21-1272 JCPDS kart numarası uyumluluk göstermektedir.

Çizelge 3.4. TeO₂ mikro-nanopartikülüne ait XRD deseninde yansıma veren düzlemlere ait pik listesi

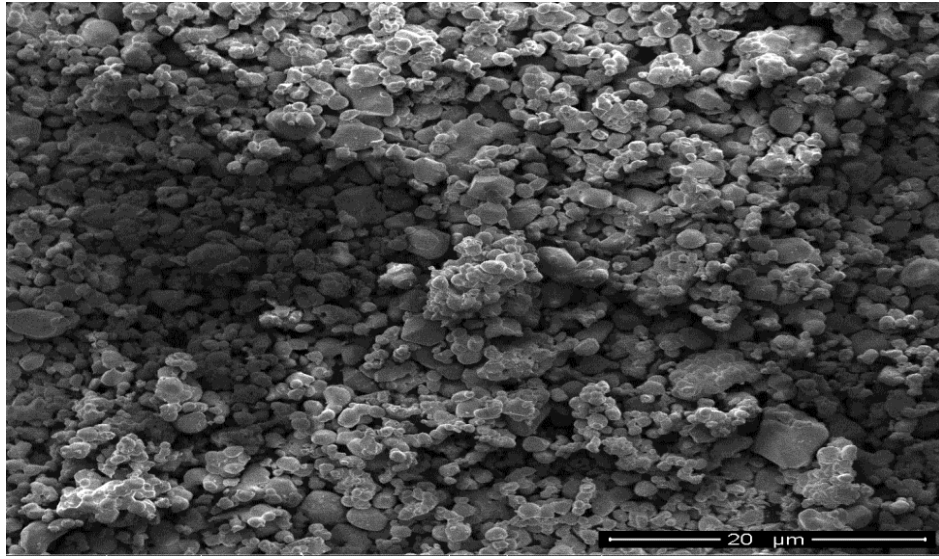
No.	2theta(deg)	d(ang.)	Height (counts)	FWHM (deg)	Int. I (countsdeg)	Int.W(deg)
1	21.867(5)	4.0613(9)	906(30)	0.077(5)	93(2)	0.102(6)
2	26.198(3)	3.3989(4)	8823(94)	0.050(3)	636(13)	0.072(2)
3	26.995(19)	3.300(2)	77(9)	0.08(3)	8.5(16)	0.11(3)
4	28.751(3)	3.1026(3)	1407(38)	0.054(3)	107(3)	0.076(4)
5	29.9368(18)	2.98234(17)	12763(113)	0.0632(16)	1068(14)	0.0837(19)
6	35.382(8)	2.5349(6)	159(13)	0.055(7)	11.6(9)	0.073(12)
7	37.391(3)	2.40313(18)	1394(37)	0.098(4)	191(3)	0.137(6)
8	39.272(16)	2.2923(9)	127(11)	0.141(16)	20.8(14)	0.16(3)
9	41.986(7)	2.1502(3)	123(11)	0.059(9)	11.4(10)	0.093(16)
10	43.712(4)	2.06918(19)	413(20)	0.084(4)	49.4(13)	0.120(9)
11	44.536(4)	2.03277(18)	101(10)	0.060(10)	9.0(10)	0.089(18)
12	47.777(2)	1.90216(9)	975(31)	0.049(3)	73.2(15)	0.075(4)
13	48.6004(18)	1.87184(6)	5341(73)	0.0805(15)	593(5)	0.111(3)
14	53.8857(19)	1.70005(5)	1179(34)	0.056(2)	91.5(14)	0.078(3)
15	55.2833(19)	1.66034(5)	2457(50)	0.0681(18)	228(3)	0.093(3)
16	56.027(4)	1.64005(10)	343(19)	0.075(5)	38.7(11)	0.113(9)
17	58.825(9)	1.5685(2)	234(15)	0.115(9)	39.2(15)	0.168(18)
18	60.880(5)	1.52042(10)	700(26)	0.116(5)	121(2)	0.173(9)
19	62.166(3)	1.49201(6)	1404(37)	0.101(2)	187(3)	0.133(5)

Çizelge 3.4. (devam)

No.	2theta(deg)	d(ang.)	Height (counts)	FWHM (deg)	Int. I (countsdeg)	Int. W(deg)
20	62.864(4)	1.47711(8)	1051(32)	0.133(3)	190(3)	0.181(8)
21	64.126(13)	1.4511(3)	75(9)	0.069(13)	6.0(10)	0.08(2)
22	66.107(6)	1.41229(11)	225(15)	0.058(8)	21.0(10)	0.093(11)
23	69.278(12)	1.3552(2)	130(11)	0.136(11)	23.0(13)	0.18(3)
24	71.784(8)	1.31391(13)	212(15)	0.099(8)	29.0(13)	0.137(16)
25	72.380(10)	1.30457(15)	168(13)	0.105(13)	29.4(12)	0.18(2)
26	73.604(10)	1.28586(14)	71(8)	0.062(15)	6.7(9)	0.09(2)
27	74.830(4)	1.26781(5)	457(21)	0.073(4)	47.5(13)	0.104(8)
28	75.458(3)	1.25881(4)	941(31)	0.077(3)	112.0(17)	0.119(6)
29	76.618(10)	1.24261(13)	69(8)	0.070(15)	6.7(9)	0.10(3)
30	77.807(3)	1.22657(4)	650(25)	0.073(4)	71.3(14)	0.110(6)
31	79.72(3)	1.2018(4)	50(7)	0.28(4)	14.9(17)	0.30(8)
32	80.838(4)	1.18804(5)	679(26)	0.126(5)	129(2)	0.190(10)
33	81.480(16)	1.18029(19)	155(12)	0.096(13)	20.5(14)	0.133(19)
34	83.841(17)	1.15297(19)	111(11)	0.183(17)	29.0(14)	0.26(4)
35	85.599(11)	1.13373(12)	123(11)	0.098(11)	15.3(11)	0.12(2)
36	86.778(7)	1.12133(7)	116(11)	0.078(9)	11.7(12)	0.101(19)
37	87.354(12)	1.11541(12)	202(14)	0.218(14)	59(2)	0.29(3)
38	89.666(5)	1.09255(5)	608(25)	0.102(6)	83(2)	0.137(10)



Şekil 3.3. TeO₂ mikro-nanopartiküllerinin SEM görüntüleri (1)



Şekil 3.4. TeO₂ mikro-nanopartiküllerinin SEM görüntüleri (2)

Şekil 3.3 ve 3.4’de TeO₂’ye ait SEM analiz sonuçları görülmektedir. Tüm yüzeyin TeO₂ ile kaplanmış olduğu ve homojen bir şekilde yüzeye dağıldığı gözlenmiştir.

3.8. Sitotoksisite Testleri

3.8.1. MTT testi

Kolorimetrik bir sitotoksisite tayin yöntemi olan MTT testi hücre canlılığını ölçmektedir. MTT sarı renkli suda çözünebilen tetrazolyum tuzdur (Pozzolini *et al.* 2003). Tetrazolyum tuzları memlilerden mikrobiyal orjinlere kadar çeşitlilik gösteren hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmek için hücre biyolojisinde çok yaygın olarak kullanılan araçlardır (Berridge *et al.* 2005). MTT metabolik olarak aktif hücrelerin tetrazolyum tuzu indirgeyerek çözünmeyen mavi MTT formazan ürününe dönüştürerek mitokondriyal dehidrojenaz tarafından alınımına ve azaltılmasına dayanan bir yöntemdir (Stockert *et al.* 2012). Bu deneyde hücre canlılığını ölçmek için kullanılan MTT kitinin bileşenleri;

- Reaktif A: 50 mg/ vial.
- Çözelti B: PBS pH 7.4, 15 mL
- Diğer malzemeler: 0,004 N HCL ile izopropanol

Hücreler 48'lik plakanın her bir kuyucuğuna 100 μ L kültür medyumunu içerisinde 10^5 hücre bulunacak şekilde, test bileşiği ile birlikte ve test bileşiği olmadan ekildi. Hücrelerin 37°C'de, %5'lik CO₂'li etüvde 72 saat süre ile kültürü yapıldı. 72 saatin sonunda plakanın her bir kuyucuğuna pipet yardımıyla 10 μ l reaktif A ve B karıştırılarak oluşturulan solüsyondan ilave edildi. Hücreler etüvde (37°C, %5 CO₂) 4 saat inkübe edildi. İnkübe edildikten sonra oluşan formazan kuyucukların dibinde siyah kristaller halinde görüldü. Daha sonra 14,95 mL izopropanol alkol ile 50 μ l HCl ilave edilerek oluşturulan karışımdan 100 μ l alınarak plakanın her bir kuyucuğuna ilave edildi. Her bir numunenin absorbansı mikroparka okuyucu kullanılarak 570 nm'de okundu.

3.8.2. LDH Salınım testi

Bu kolorimetrik sitotoksisite testi laktat dehidrojenaz enzim miktarını ölçmektedir. Hücre sitotoksitesinin ölçümü ve izlenmesi hücre tabanlı araştırma odaklı herhangi bir laboratuarda kullanılan önemli bir yöntemdir (Moharamzadeh *et al.* 2009). Hücre ölümü için bir parametre hasarlı hücreler tarafından serbest bırakılmış sitoplazmik bir enzim olan LDH ile ölçülebilen hücre zarı bütünlüğüdür. Plazma zarının hasarı üzerine hücre kültürü süpernatant içine hızlı bir şekilde LDH salınır ve LDH sitotoksisite maddesi ile tespit edilmektedir (Korzeniewski and Callerwaert 1983). Bu çalışmada LDH aktivitesini değerlendirmek için kullanılan LDH kitinin bileşenleri;

- LDH reaktifi=10 mL
- Triton X-100 solüsyon=10 mL

0,1-20x10⁶ kan ve HPAEpiC hücre/mL içeren bir hücre süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 48 kuyucuklu hücre kültür plakasının her kuyucuğuna 150 µl ilave edildikten sonra 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde karanlık ortamda 72 saat bekletildi. 72 saat sonunda farklı konsantrasyonlardaki TeO₂ nanopartiküllerin ve negatif kontrolün bulunduğu kuyucuklara 15 µl steril su, pozitif kontrolün bulunduğu kuyucuğa is 15 µl triton X-100 solüsyonu ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 15-20 dk bekletildi. Bir plaka okuyucu için yeni 48'lik plakanın her kuyucuğuna 90 µl aktarıldı. Aktardığımız bu karışıma LDH reaktifinden 10 µl ekledikten sonra etüvde 3 saat inkübe edildi. İnkübe edildikten sonra mikropilaka okuyucuda 450 nm'de her bir numunenin absorbansı okundu. Bu okuma sonucunda elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

LDH (%Relatif Sitotoksisite)=[ΔÖrneğin Abs. Değeri-ΔNegatif Kontrol Abs. Değeri]/[ΔPozitif Kontrol Abs Değeri-ΔNegatif Kontrol Abs. Değeri]x100

3.9. Biyokimyasal analizler

TeO₂ nanopartiküllerinin doza bağlı olarak insan akciğer ve tam kan hücre kültürleri üzerine biyokimyasal etkilerini değerlendirmek için total antioksidan kapasitesi ve toplam oksidan durumu ölçüldü.

3.9.1. Toplam antioksidan kapasitesi (TAK)

TAK serbest radikallere karşı vücudun genel antioksidan durumu hakkında bilgi vermeye dayanan bir yöntemdir. Çeşitli yöntemler TAK ölçmek için geliştirilmiştir. Çok yaygın bir şekilde kullanılan kolorimetrik metodlar 2,2-azinobis (3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonate) ABTS⁺ temelli metodlardır (Erel 2004).

Bu deneyde TAK, Erel (2004) tarafından geliştirilen ticari kitler kullanılarak ölçüldü.

Kit Bileşenleri;

- Reaktif 1 solüsyonu = 50 ml
- Reaktif 2 solüsyonu = 10 ml
- Standart 1 solüsyonu = 10 ml
- Standart 1 solüsyonu = 10 ml

30 µl TeO₂ nanopartikülünün farklı konsantrasyonlarının bulunduğu 48'lik plakanın her kuyucuğuna 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek mikropilaka okuyucuda 660 nm'de ilk absorbansı okundu. Sonra aynı kuyucuklara Reaktif 2 solüsyonundan 75 µl eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. 10 dakika sonunda mikropilaka okuyucuda 660 nm'de ikinci kez absorbansı okundu. Bu iki okuma sonucunda elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formül kullanılarak TAK düzeyleri mmol Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi.

TAK (mmol Trolox Equiv./L)=[(ΔStandart 1'in değeri)-(ΔÖrneğin değeri)]/[(ΔStandart 1'in değeri)-(ΔStandart 2'nin absorbansı)]x20

3.9.2. Toplam oksidan durumu (TOD)

Bu yöntem asidik ortam içinde çeşitli oksitleyici türlerin varlığında ferrik iyonuna ferroz iyonunun oksidasyonu ve Xylenol orange tarafından demir iyonu ölçümü temeline dayanmaktadır. Bu yöntemde oksitleyiciler ferroz iyon-0-dianisidin kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Üretilen ferrik iyonlar Xylenol orange ile beraber renkli bir kompleks oluştururlar. Renk yoğunluğu oksidan miktarı ile ilişkili olup spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirme yapılır (Herken *et al.* 2009).

Bu deneyde TOD, Erel (2005) tarafından geliştirilen ticari kitler kullanılarak ölçüldü.

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 2 Solüsyonu: 10 ml

75 µl TeO₂ nanopartikülünün farklı konsantrasyonlarının bulunduğu 48'lik plakanın her kuyucuğuna 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek mikrolaka okuyucuda 530 nm'de ilk absorbansı okundu. Sonra aynı kuyucuklara Reaktif 2 solüsyonundan 25 µl eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. 10 dakikanın sonunda 530 nm'de ikinci kez absorbansı okundu. Bu iki okuma sonucunda elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formül kullanılarak mmol TOD düzeyleri Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi.

TOD (µmol H₂O₂Equiv./L) = (ΔÖrneğin değeri/ΔStandart 2'nin değeri) x (Standart 2 değeri)

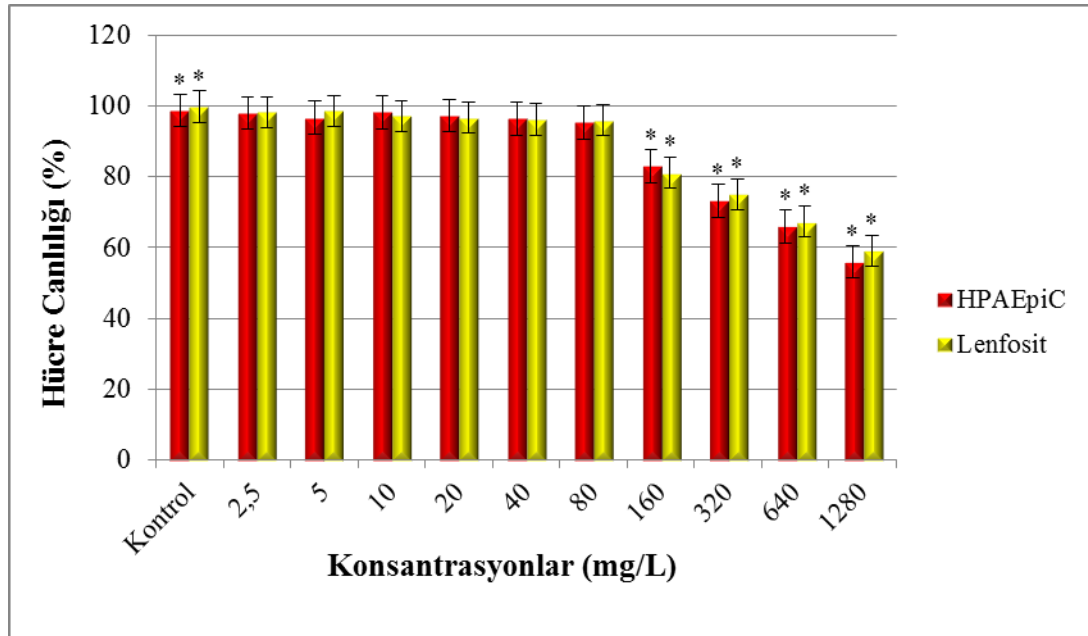
3.10. İstatiksel işlemler

Çalışmadan elde edilen bulguların istatiksel yönden değerlendirilmesinde S.P.S.S 18 programı kullanıldı. Tespit edilen MTT ve LDH analizlerinde belirlenen ortalamalar ile TAK ve TOD düzeylerinin kontrol ve deney grupları arasında değişiklik gösterip göstermediği varyans analizi kullanılarak belirlendi (Seymen vd 2000; Bukowska and Kowalska 2004). Varyans analizi için one way Anova testlerinden Duncan testi kullanıldı. Elde edilen veriler 0,05 anlam seviyesi göz önünde bulundurularak yorumlandı.

4. ARAŞTIRMA ve BULGULARI

4.1. Test Edilen TeO₂ Nanopartikülünün *In Vitro* Koşullar Altında Oluşturduğu MTT Analiz Değerleri

In vitro koşullarda kontrol grubu için MTT analiz değeri HPAEpiC hücre kültürleri için $98,7 \pm 3,5$ ve tam kandan elde edilen lenfosit hücre kültürleri için $99,8 \pm 5,7$ olarak bulunmuştur. HPAEpiC ve lenfosit hücre kültürlerinde 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 mg/L konsantrasyonlarındaki TeO₂ nanopartikülünün hücre çoğalmasını baskılayıcı bir etki göstermediği tespit edilmiştir. Ancak 160, 320, 640, 1280 mg/L konsantrasyonlarındaki TeO₂ nanopartikülünün hücre canlılık oranını kontrole göre önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. TeO₂ nanopartikülünün HPAEpiC ve lenfosit hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak oluşan MTT analiz değerleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

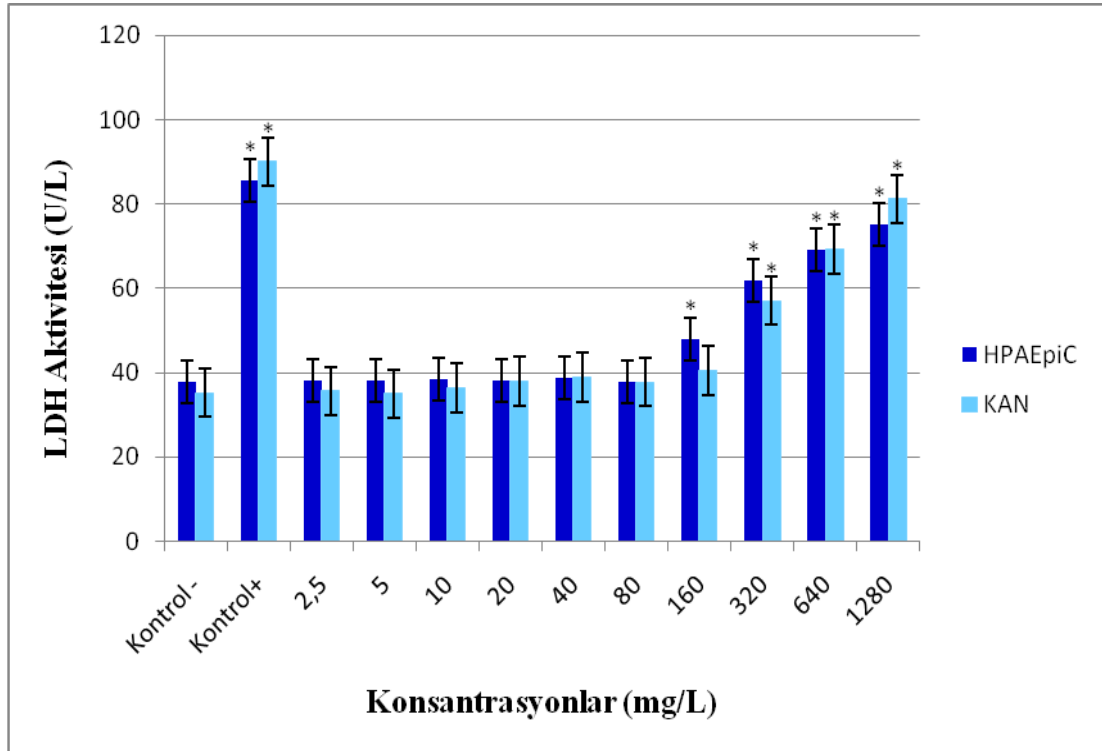


Şekil 4.1. TeO₂ nanopartikül maruziyeti sonrası gözlenen hücre canlılık yüzdeleri

Değerler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur ($p < 0.05$, $n=7$)

4.2. Test Edilen TeO₂ Nanopartikülünün *In Vitro* Koşullar Altında Oluşturduğu LDH Analiz Değerleri

Kontrol grubu LDH salınım değeri HPAEpiC hücre kültürleri için $37,9 \pm 0,7$ ve tam kan hücre kültürleri için $35,2 \pm 0,4$ olarak bulunmuştur. 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 mg/L konsantrasyonlarındaki TeO₂ nanopartikülleri HPAEpiC hücre kültürlerinde LDH salınım düzeyini değiştirmemiştir. Ancak 160, 320, 640, 1280 mg/L konsantrasyonlarındaki TeO₂ nanopartikülünün LDH salınım düzeyini kontrole oranla önemli derecede arttırmıştır. Diğer taraftan tam kan hücre kültürlerinde 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 mg/L konsantrasyonları LDH salınım düzeyini değiştirmemiştir. Ancak 320, 640, 1280 mg/L konsantrasyonlarındaki TeO₂ nanopartikülünün LDH salınım düzeyini kontrole oranla önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. TeO₂ nanopartikülünün maruziyeti sonrasında HPAEpiC ve tam kan hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak oluşan LDH aktivite değerleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. TeO₂ nanopartikül maruziyeti sonrası gözlenen LDH aktivitesi

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur ($p < 0.05$, $n=7$)

4.3. Test Edilen TeO₂ Nanopartikülünün *İn Vitro* Koşullar Altında Oluşturduğu TAK Değerleri

Kontrol grubu TAK değeri, HPAEpiC hücre kültürleri için $8,3 \pm 5,0$, tam kan hücre kültürleri için $4,0 \pm 0,8$ olarak bulunmuştur. Sonuçlarımız HPAEpiC ve tam kan hücre kültürlerinde TeO₂ nanopartiküllerinin test edilen tüm konsantrasyonlarında TAK düzeyinde istatistiksel olarak önemli düzeyde bir değişiklik yapmadığını göstermiştir. TeO₂ nanopartikülünün farklı konsantrasyonları için gözlenen TAK düzeyleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. *İn Vitro* koşullar altında TeO₂ nanopartikülünün oluşturduğu TAK düzeyleri

Gruplar	HPAEpiC (mmol Trolox Equiv./L)	Tam Kan (mmol Trolox Equiv./L)
Kontrol ⁻	$8,3 \pm 0,5$	$4,0 \pm 0,8$
Kontrol ⁺	$12,4 \pm 1,5^*$	$6,0 \pm 1,2^*$
2,5 mg/L	$8,7 \pm 1,2$	$4,8 \pm 1,1$
5 mg/L	$8,4 \pm 0,8$	$4,3 \pm 0,9$
10 mg/L	$9,0 \pm 1,4$	$4,6 \pm 1,0$
20 mg/L	$8,6 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,8$
40 mg/L	$8,9 \pm 1,2$	$4,4 \pm 0,9$
80 mg/L	$8,2 \pm 0,7$	$4,9 \pm 1,2$
160 mg/L	$8,4 \pm 0,4$	$4,3 \pm 1,1$
320 mg/L	$8,5 \pm 1,0$	$4,5 \pm 1,2$
640 mg/L	$8,7 \pm 0,9$	$4,8 \pm 0,8$
1280 mg/L	$8,9 \pm 0,6$	$4,4 \pm 0,9$

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur ($p < 0.05$, n=7)

4.4. Test Edilen TeO₂ Nanopartikülünün *İn Vitro* Koşullar Altında Oluşturduğu TOD Değerleri

Kontrol grubu TOD değeri HPAEpiC hücre kültürleri için $2,9 \pm 0,9$ tam kan hücre kültürleri için $10,2 \pm 0,4$ olarak bulunmuştur. HPAEpiC hücre kültürlerinde 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 mg/L konsantrasyonlarındaki TeO₂ nanopartiküllerinin TOD düzeyini değiştirmedeği gözlenmiştir. Ancak 160, 320, 640, 1280 mg/L konsantrasyonları TOD düzeyini kontrole oranla önemli derecede arttırmıştır. Diğer taraftan tam kan hücre kültürlerinde test edilen nanopartiküllerin 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 mg/L konsantrasyonları TOD düzeyini değiştirmemiştir. Fakat 320, 640, 1280 mg/L konsantrasyonlarındaki TeO₂ nanopartikülünün TOD düzeyini kontrole oranla önemli derecede arttırmıştır. TeO₂ nanopartikülünün farklı konsantrasyonları için gözlenen TOD düzeyleri Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. *İn Vitro* koşullar altında TeO₂ nanopartikülünün oluşturduğu TOD düzeyleri

Gruplar	HPAEpiC ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Equiv./L}$)	Tam Kan ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Equiv./L}$)
Kontrol ⁻	$2,9 \pm 0,9$	$10,2 \pm 0,4$
Kontrol ⁺	$6,8 \pm 1,5^*$	$24,8 \pm 1,1^*$
2,5 mg/L	$2,9 \pm 0,8$	$10,5 \pm 0,6$
5 mg/L	$3,1 \pm 1,0$	$10,8 \pm 1,0$
10 mg/L	$2,8 \pm 1,4$	$10,7 \pm 0,5$
20 mg/L	$3,3 \pm 0,9$	$10,9 \pm 0,9$
40 mg/L	$2,9 \pm 1,1$	$11,4 \pm 1,1$
80 mg/L	$3,0 \pm 1,5$	$11,7 \pm 0,6$
160 mg/L	$4,5 \pm 1,2^*$	$11,6 \pm 0,4$
320 mg/L	$5,3 \pm 0,9^*$	$15,3 \pm 1,0^*$
640 mg/L	$5,7 \pm 1,0^*$	$18,7 \pm 0,8^*$
1280 mg/L	$5,9 \pm 1,4^*$	$19,2 \pm 0,7^*$

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur ($p < 0.05$, n=7)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Nanoteknolojideki karşı konulmaz gelişmeler ile birlikte bu uygulamaların vazgeçilmez materyali olan nanölçekli parçacıkların biyolojik sistemler üzerindeki ciddi etkilerinin varlığı güvenli kullanımlar açısından çözülmesi gereken en kritik problem olarak değerlendirilmektedir (Laserra *et al.* 2015). Bu nanopartiküllerden tellür ve bileşenlerinin günümüzde çeşitli endüstri alanlarında alanlarda yaygın olarak kullanılmasının bir sonucu olarak özellikle endüstri işçileri, tüketiciler ve çevre TeO_2 nanopartiküllerine maruz kalmaktadır (Jiang *et al.* 2004; Siciliano *et al.* 2010; Samal and Pradeep 2010; Abd El-Sadek *et al.* 2010). Yapılan bir araştırmada solunum yoluyla alınan nanopartiküllerin akciğerlerden kana, kandan da ikincil hedef organlara taşındığı ve toksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Kreyling *et al.* 2009). Bu nedenle, insanların nanopartiküllere daha çok inhalasyonla maruz kaldıkları bilindiğinden mevcut tez çalışmasında insan alveolar epitel hücre (HPAEpiC) ve periferik insan kan hücre kültür modelleri tercih edilmiştir.

Mevcut tez çalışmasında, TeO_2 nanopartikülünün HPAEpiC ve insan kan hücreleri üzerindeki sitotoksikite potansiyelinin MTT ve LDH analizleri kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bulgularımız, HPAEpiC kültürlerinde TeO_2 'nin yüksek konsantrasyonlarda (160 mg/L ve üzeri) hücre canlılığını azaltırken, LDH salınımını arttırdığı; insan kan hücrelerinde ise TeO_2 'nin 160 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığını, 320 ve üzeri konsantrasyonlarda ise LDH salınımını arttırdığını ortaya koymuştur. Bulgularımız bu konuda literatürde kayıtlı olan sınırlı sayıdaki araştırmalara ait bulgularla paralellik göstermektedir. Nitekim, HeLa hücreleri üzerinde yapılan bir araştırmada tellür nanopartiküllerinin ve mikropartiküllerinin yüksek dozlarda ROS'un oluşumuna neden olarak sitotoksikiteye yol açtığı (MTT yöntemi ile) gösterilmiştir (Forootanfar *et al.* 2005; Wen *et al.* 2013). Tellür nanopartiküllerinin insan meme kanseri, insan fibrosarkoma, insan hepatosit karsinoma ve insan adenokarsinomik epitel hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin varlığı rapor edilmiştir. Değerlendirme bulgularına göre tellür nanopartikülleri artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını belirgin olarak ($p < 0.05$) azaltmıştır. *In*

vitro olarak yürütülen bir başka çalışmada ise tellür nanotellerinin sitotoksik potansiyelleri fare embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Araştırma sonucunda 48 saatlik kültürlerde tellür nanotellerinin artan konsantrasyona bağlı olarak ROS üretimini indüklediği ve hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Mahto *et al.* 2011). Benzer şekilde Sönmez *et al.* 2015 yılında itriyum oksit nanopartikülünün sitotoksik etkilerini sıçan hepatosit hücreleri üzerinde araştırmışlardır. Araştırmacılar itriyum oksit nanopartikülünün 200, 400 ve 500 mg/L konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığını MTT, LDH ve Nötral kırmızı yöntemlerini kullanarak tespit etmişlerdir. Günümüze kadar yürütülmüş çeşitli araştırmalara ait bulgularla uyumlu olarak mevcut araştırmada ele alınan toksisiteninde doza bağlı olarak otaya çıktığı gösterilmiştir (Turkez 2011; Turkez *et al.* 2014; Akbaba *et al.* 2015; Turkez *et al.* 2015).

Nanopartiküllerin özellikle de TeO₂ nanopartikülünün kan hücreleri ve alveolar hücreler ile nasıl etkileşime geçtiği henüz belirsiz olmakla birlikte TAK, TOD ve ROS gibi parametreler bu konuya biraz da olsa ışık tutmaktadır. Mevcut tez kapsamında yürütülen biyokimyasal araştırmalar sonucunda uygulanan tüm TeO₂ konsantrasyonlarının ilave edildiği HPAEpiC ve tam kan hücre kültürlerinde gözlenen TAK değerleri ile kontrol grubunda gözlenen düzeyler arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Diğer taraftan TeO₂'nin 160 mg/L ve üzeri konsantrasyonları HPAEpiC hücrelerinde TOD düzeylerini arttırırken, tam kan hücrelerinde ise TeO₂'nin 320 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarının TOD düzeylerini arttırdığı gözlenmiştir. Bulgularımıza paralel olarak, endüstride yaygın olarak kullanılan seryum oksit nanopartikülünün 24 saatlik sıçan alveolar epitel ve alveolar makrofaj hücre kültürlerinde antioksidan potansiyeli değiştirmedeği rapor edilmiştir (Dunnick *et al.* 2015). Turkez *et al.* (2015) tarafından yürütülmüş olan bir çalışmada lityum titanat nanopartikülünün yüksek konsantrasyonlarının (300, 500 ve 1000 ppm) primer rat hepatosit hücrelerinde TOD düzeylerini arttırdığı kaydedilmiştir. Yine son yıllarda yapılan bir başka araştırmada tungsten oksit nanopartikülünün 150, 300, 500 ve 1000 ppm'lik konsantrasyonlarının sıçan karaciğer hücrelerinde TOD düzeylerini arttırdığı rapor edilmiştir (Turkez *et al.* 2014). Yapılan araştırmalarda çeşitli endüstrilerde kullanılmak üzere üretilmiş TeO₂'nin

yanı sıra metal (karbon, gümüş, vb.) ya da metal oksit (ZnO, MgO, TiO₂ vb.) nanopartiküllerinin serbest radikaller üreterek oksidatif stres ve toksisiteye neden olduğu rapor edilmiştir (Turkez and Geyikoglu 2007; Mahto *et al.* 2011; Anreddy *et al.* 2013).

Nanopartiküllerin muhtemel sitotoksik etkileri için önemli mekanizmalardan birisi oksidatif streştir (Boczkowski and Hoet 2010). Nanopartiküllerin ROS oluşturma eğilimi, nanopartiküllerin toksik ve sitotoksik etkilerini araştırmak ve açıklamak için en önemli parametredir (Xia *et al.* 2006). Oksidatif stres, mitokondriyalde ağır fonksiyon değişikliklerine yol açarak lipid ve protein oksidasyonuna sebep olmaktadır (Pan *et al.* 2009). Mitokondriyal membran geçirgenliğindeki herhangi bir hasar sonucu hücre apoptoza ve nekroza sürüklenebilmektedir (Liu and Sun 2010). Nitekim Mahto *et al.* (2011) yaptıkları araştırmalarında tellür nanopartiküllerine maruz kalan fare embriyonik fibroblast hücrelerinde mitokondriyal hasarın meydana geldiğini, hücrelerin nekroza sürüklendiğini ve hücre canlılığının azaldığını tespit etmişlerdir. Moleküler düzeyde ROS'u protein kinaz ailesi (MAPK) ve p53 ekspresyon gibi birden fazla sinyal iletim yolunu aktive ettiği bilinmektedir (Simbula *et al.* 2007). p53, Bax ve Bel-2 genlerinin genellikle mitokondriyal hasar sonucu meydana gelen apoptoz ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Liu and Sun 2010). Son yıllarda yapılan bir araştırmada silisyum nanopartiküllerine maruz bırakılan insan göbek kordonu damarı endotel hücrelerinde (HUVEC'ler) p-JNK, p-c-Jun, p-53, Bax ve kopaz-3 genlerinin ekspresyonu artarken; Bcl-2'nin ekspresyonunun baskılandığı kaydedilmiştir (Liu and Sun 2010). Hsin *et al.* (2008) gümüş nanopartiküllerinin fare embriyonik fibroblast hücrelerinde JNK ve p53'ü aktive etmesi sonucu ROS üreterek apoptozise neden olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca literatürde kayıtlı pek çok *in vivo* araştırma sonucunda nanopartikül maruziyetine bağlı olarak deney hayvanlarında nefrotoksiste, akciğer toksisitesi, hepatotoksiste ve nörotoksiste rapor edilmiştir (Warheit *et al.* 2004; Lei *et al.* 2008; Rahman *et al.* 2009; Goff *et al.* 2011; Hasezaki *et al.* 2011).

Mevcut tezde TeO₂ nanopartikülünün sitotoksiste, pro-oksidan ve antioksidan potansiyelleri sırasıyla MTT, LDH, TAK ve TOD testleri ile değerlendirilmiş ve elde

edilen bulgular doğrultusunda TeO_2 nanopartikülünün antioksidan aktiviteye sahip olmadığını, yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik ve pro-oksidan etkili olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; bilhassa tıbbi ve farmakoloji uygulamalarını içeren çeşitli endüstriyel proseslerde TeO_2 nanopartikülünün kullanımı esnasında doza bağlı gelişen potansiyel nanotoksiteden dolayı muhtemel sağlık ve güvenlik risklerinin göz ardı edilmemesi gerektiği önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abd El-Sadek, M.S., Kumar R.J., Babu S.M., 2010. The role of potassium tellurite as tellurium source in mercaptoacetic acid-capped CdTe nanoparticles. *Current Applie Physics* 10 (1), 317-322.
- Ahamed, M., 2011. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology in Vitro* 25 (4), 930-936.
- Akbaba, G.B, Turkez H., Sönmez E., Tatar A., Yilmaz M., 2015. Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to lithium titanate nanoparticles in vitro. *Toxicol Ind Health*. (in press).
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, Türkiye.
- Aldridge, W.N., 1993 The biochemical principles of toxicology. *Exp. Toxicol*, 5, 56-78.
- Anreddy, R.N., Yellu N. R., Devarakonda K.R., 2013. Oxidative biomarkers to assess the nanoparticle-induced oxidative stress. *Methods Molecular Biology* 1028, 205-219.
- Arora, S., Jain J., Rajwade J.M., Paknikar K.M., 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *in vitro* studies. *Toxicology Letters*, 179 (2), 93–100.
- Aslan, R., Dündar Y., 1999. Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller, antioksidanlar. *İnsizyon Cerrahi Tıp Bilimleri Dergisi*, 2 (2), 134-142.
- Aslan, R., Şekeroğlu MR., Bayiroğlu F., 1995. Serbest radikal türlerinin membran lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücresel antioksidan savunma. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2, 137-42.
- Asmus, K.D., Bonifacic M., 2000. Free radical chemistry. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Sen CK, Packer L, Hanninen O (eds). Amsterdam, 3-54.
- Babson, A.L., Phillips G.E., 1965. A rapid colorimetric assay for serum lactic dehydrogenase. *Clinica Chimica Acta*, 12 (2), 210-215.
- Bachmann, G., 1994. Nanotechnology, technology analysis. *Technologiezentrum Physicalische Technologien*, 5 (1), 65-78.
- Ballou, B., Lagerholm B.C., Ernst L.A., Bruchez M.P., Waggoner A.S., 2004. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjugate Chemistry*, 15 (1), 79-86.
- Barker, P.E., Butler T., Dawley J.M., Herran P., King B., Nathanson K.L., Patel K., Wedeking J., Weiss H., Wubinger J. And Ziesmann S., 2006. Nanotechnology briefing paper: clean water act, in section of environment, energy and resources. *American Bar Association*, Chicago, IL, 13.
- Barton, D.H.R. and Zard S.Z., 2011. Radicals: Their importance in synthetic chemistry and their relevance to biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society Lond*, 1085, 311-805.
- Berk, S. ve Akkurt İ., 2012. Nanopartikül: geleceğin korkulu rüyası, *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 60(2), 180-184 .

- Berridge, M.V., Herst P.M. and Tan A.S., 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152.
- Bilgin, G., Alpar S., Kılınç C., Güler M., Altuğ N., 2002. Plevral sıvılarda LDH izoenzimlerinin ayırıcı tanındaki değeri. *Tüberküloz ve tereks dergisi* 50 (1), 19-23.
- Boczkowski, J., and Hoet P., 2010. What's new in nanotoxicology? Implications for public health from a brief review of the 2008 literature. *Nanotoxicology* 4 (1), 1-14.
- Borek, C., 1987. Radiation and chemically induced transformation: Free radicals, antioxidants and cancer. *British Journal of Cancer*, 55 (4), 74-86.
- Bouayed, J. and Bohn T., 2010. Exogenous antioxidants-double-edged swords in cellular redox state. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3 (4), 228-237.
- Brown, D.M., Wilson M.R., MacNee W., Stone V., Donaldson K., 2001. Size dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 175 (3), 191-199.
- Brumfiel, G., 2003. Nanotechnology: A little knowledge. *Nature*, 424 (6946), 246-248.
- Bukowska, B. and Kowalska, S., 2004. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters (Amsterdam)*, 152 (1), 73-84.
- Buzea, C., Paccheco I., Robbie K., 2007. Nanomaterial and nanoparticle source and toxicity. *Biointerphases*, 2 (4), 26-65.
- Carlson, C., Hussain S.M., Schrand A.M., Stolle B.L.K., . Hess K.L, Jones R.L. and Schlager J.J., 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry*, 112 (43), 13608-13619.
- Cartwright, T., 1994. Generation of biomass. Animal cells as bioreactors. In: Baddiley J., Carey N.H., Higgins I.J., Potter W.G., editors. *New York: Press Syndicate of the University of Cambridge*, 43-95.
- Çaylak, E., 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*: 9 (1), 73-83.
- Deaton, C. and Marlin D., 2003. Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2 (3), 278-291.
- Demir, M., Vural C., Yılmaz N., Vural H., Sezer T., 2007. Tek seans hemodiyalizinde çeşitli oksidatif stres markerları üzerine etkisi. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 5 (2), 74-77.
- Derviş, E., 2011. Oral antioksidanlar. *Dermatoz dergisi*, 2(1), 263-267.
- Dikensoy, Ö., Bayram H., 2010. The current data on nanoparticles and pleura. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 58 (4), 455-458.
- Dobrovolskaia, M.A., McNeil S.E., 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, 2, 469-478.
- Donaldson, K., Aitken R., Tran L., Stone V., Duffin R., Forrest G. ve Alexander A. 2006. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicological Sciences*, 92 (1), 5-22.

- Dunnick, K.M., Pillai R., Pisane K.L., Stefaniak A.B., Sabolsky E.M., Leonard S.S., 2015. The effect of cerium oxide nanoparticle valence state on reactive oxygen species and toxicity. *Biological Trace Element Research*, 166(1), 96-107.
- Durackova, Z., 2010. Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*, 59, 459-469.
- Dursun, E., Ozben T., Süleymanlar G., Dursun B., Yakupoğlu G., 2002. Effect of hemodialysis on the oxidative stress and antioxidants. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 40 (10), 1009-1013.
- Dwivedi, C. and Paul S.D., 2013. Nanotechnology to nanotoxicology. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 2 (2), 458-469.
- El-Mallawany, R.J., 1993. Longitudinal elastic constants of tellurite glasses. *Applied Physics*, 73 (10), 4878-4780.
- El-Mallawany, R., Abdalla M.D., Ahmed A., 2008. New tellurite glass: Optical properties. *Materials Chemistry and Physics*, 109 (2), 291-296.
- El-Mallawany, R., El-Sayed A.H., El-Gawad M.M.H.A., 1995. ESR and electrical conductivity studies $(\text{TeO}_2)_{0.95}(\text{CeO}_2)_{0.05}$ semiconducting glasses. *Materials Chemistry and Physics*, 41 (2), 87-91.
- Emerich, D.F., Thanos C. G., 2003. Nanotechnology and medicine. *Expert Opinion Biological Therapy*, 3 (4), 655-663.
- Erel, O., 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry (Toronto)*, 37 (2), 112-119.
- Erel, O., 2005. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry (Toronto)*, 37 (4), 277-285.
- Eustis, S. and El-Sayed M., 2006. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes *Chemical Society. Reviews*, 35, 209-217.
- Feynman, R.P., 1999. The pleasure of finding things out. *Helix Books Perseus Publishing*. Robins J., Feynman C. Cambridge, Massachusetts 151-170.
- Forootanfar, H., Rostami S.A., Jafari M., Forootanfar A., Yousefzadeh Z., Shakibaie M., 2014. Microbial-assisted synthesis and evaluation the cytotoxic effect of tellurium nanorods. *Materials Science and Engineering C Materials Biological Applied*, 49, 183-189.
- Fotakis, G., Timbrell J.A., 2006. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160 (2), 171-177.
- Foucaud, L., Wilson M.R., Brown D.M., and Stone V., 2007. Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicological Letters*, 174 (1-3), 1-9.
- Freshney, R.I., 2005. Cytotoxicity. *Culture of animal cells: a manual 148 of basic technique*, Wiley J., Sons I. USA. 359-373.
- Fridowich, I., 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*, 201 (4559), 875-877.
- Gil, P.R., Oberdörster G., Elder A., Puentes V., and Parak W.J., 2010. Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future. *American Chemical Society*, 4(10), 5527-5531.

- Goff, A.L., Holzinger M., Cosnier S., 2011. Enzymatic biosensors based on SWCNT-conducting polymer electrodes. *Analyst*, 136 (7), 1279-1287.
- Goldston, D., 2007. Small advances. *Nature*, 450 (7173), 1141.
- Gökpınar, Ş., Koray T., Akçiçek E., Göksan T., Durmaz Y., 2006. Algal antioksidanlar. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23(1), 85-89.
- Gurr, J.R., Wang A.S.S., Chen C.H. ve Jan K.Y., 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213(1-2), 66-73.
- Haes, A.J., Hall W.P., Chang L., Klein W.L. and Van Duyne R.P., 2004. A Localized surface plasmon resonance biosensor: First steps toward an assay for Alzheimer's disease *Nano Letters*, 4 (6), 1029-1034.
- Hagens, W.I., Oomen A.G., de Jong W.H., Cassee F.R., Sips A.J.A. M., 2007. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 49 (3), 217-229.
- Handy, R.D., Owen R. ve Valsami-Jones E., 2008. The Ecotoxicology of Nanoparticles and Nanomaterials: Current Status, Knowledge Gaps, Challenges, and Future Needs. *Ecotoxicology*, 17 (5), 315-325.
- Hansen, S.F., 2009. Regulation and risk assessment of nanomaterials– too little, too late? *PhD Thesis*, Department of Environmental Engineering, Technical University of Denmark.
- Hasezaki, T., Isoda K., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K., 2011. Hepatotoxicity of silica nanoparticles with a diameter of 100 nm. *Pharmazie*. 66(9), 698-703.
- Herken, E.N., Erel O., Guzel S., Celik H., Ibanoglu S., 2009. Total antioxidant, phenolic compounds, and total oxidant status of certified and uncertified Turkey's honeys. *International Journal of Food Properties*, 12 (3), 461-468.
- Hsin, Y.H., Chen C.F., Huang S., Shih T.S., Lai P.S., Chueh P.J., 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicological Letters*, 179 (3), 130-139.
- Hussain, S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J., 2005. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*, 19 (7), 975–983.
- Igarashi, E., 2008. Factors affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines, *Toxicological Applied Pharmacol.* 229 (1), 121-134.
- Ilchenko, L., Grimalsky V., Koshevaya S., Burlak G., 2002. Dynamic regimes of three-wave interaction of ultrasonic beams in TeO₂. *Physics Letters*, 303(2-3), 169-178.
- Issa, Y., Watts D.C., Brunton P.A., Waters C.M., Duxbury A.J., 2004. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts *in vitro*. *Dental Materials*, 20 (1), 12-20.
- Jeng, H.A. and Swanson J., 2006. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 41 (12), 2699-2711.
- Jenkins, N., 1999. *Methods in Biotechnology*, Volume 8: Animal cell biotechnology Totawa N.J, Humana Pres, 239-252.
- Jiang, Z.Y., Xie Z.X., Zhang X.H., Xie S. Y., Huang R.B., Zheng L.S., 2004. Synthesis of a-tellurium dioxide nanorods from elemental tellurium by laser ablation. *Inorganic Chemistry Communications*, 7, 179-181.

- Jozwtak, Z., Helszer Z., 1981. Participation of free oxygen radicals in damage of porcine erythrocytes. *Radiat Research*, 88 (1), 11-19.
- Karabulut, B. Ve Kabakçı T., 1995. Serbest radikaller. *Akademi* 1, 28-35.
- Karafakıoğlu, Y., 2010 Antioksidanlar ve bir antioksidan olarak taurin. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 3 (1), 55-61.
- Kayır, Y.Z. ve Baççıl E.G., 2010. Nanoteknoloji nedir? 15. Uluslararası metalurji ve malzeme kongresi, İzmir
- Kirchner, C., Liedl T., Kudera S., Pellegrino T., Javier A.M., Gaub H.E., Stolzle S., Fertig N., Parak W.J., 2005. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Letters*, 5 (2), 331-338.
- Konukoğlu, D., 1997. Serbest radikaller ve önemleri. *Aile Hekimliği Dergisi*, 1(4), 197-200.
- Korzeniewski, C., Callewaert D.M., 1983. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 64 (3), 313-320.
- Kreyling, W. G., Semmler-Behnke M., Seitz J., Scymczak W., Wenk A., Mayer P., Takenaka S., Oberdörster G., 2009. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhalation Toxicology*, 21 (1), 55-60.
- Krysanov, E.Y., Pavlov D.S., Demidova T.B., Dgebuadze Y.Y., 2010. Effects of Nanoparticles on Aquatic Organisms. *Biology Bulletin*, 37 (4), 406-412.
- Lai, J.C.K., Lai M.B., Jandhyam S., Dukhande V.V., Bhushan A., Daniels C.K., Leung S.W., 2008. Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *International Journal of Nanomedicine*, 3(4), 533-545.
- Laserra, S., Basit A., Sozio P., Marinelli L., Fornasari E., Cacciatore I., Ciulla M., Turkez H., Geyikoglu F., Di Stefano A., 2015. Solid lipid nanoparticles loaded with lipoyl-memantine codrug: preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 485(1-2), 183-191.
- Le Goff, M., Holzinger M. and Cosnier S., 2011. Enzymatic biosensors based on SWCNT-conducting polymer electrodes. *Analyst*, 136 (7), 1279-1287.
- Lei, R., Wu C., Yang B., Ma H., Shi C., Wang Q, Yuan. Y, Liao M., 2008. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid in vivo screening method for nanotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232(2), 292-301.
- Lewinski, N., Colvin V., Drezek R., 2008. Cytotoxicity of nanoparticles, *Small*, 4 (1), 26-49.
- Lin, W., Huang Y., Zhou X. D., Ma Y., 2006. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217 (3), 252-259.
- Liu, X. and Sun J., 2010. Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF-kB pathways. *Biomater*, 31 (32), 8198-8209.
- Lohr, B.J., Cadet J.L., Lohr M., 1987. Alpha tocopherol in tardive dyskinesia. *The Lancet*, 329 (8538), 913-914.
- Lohr, J.B., Cadet J.L., Lohr M.A., 1988. Vitamin E in the treatment of tardive dyskinesia: the possible involvement of free radicals mechanisms. *Schizophrenia Bulletin*, 14 (2), 291-296.

- Madi, B.C., Sandal J., Bannett R., 1999. Effects of female relative in labor. *Birth*, 26 (1), 9-10.
- Mahto, S.K., Vinod T.P, Kim J.K, and Rhee S.W., 2011. Cytotoxic potentials of tellurium nanowires in BALB/3T3 fibroblast cells bull. *Korean Chemical Society*, 32 (9), 3405-3410.
- Marc, A., Wanger A., Martial A., Goergen J.L., Engasser J.M., Geaugey Y., Pinton H., 1991. Potential and pitfalls of using LDH release for the evaluation of animal cell death kinetics. In: Spier RE, Griffiths JB, Meignier B, editors. *Production of biologicals from animal cells in culture*. London: Butterworth-Heinemann, 569-74.
- Maruthi, G., Smith A.A., Manavalan R., 2011. Nanoparticles. *Journal of Advanced Scientific Research*, 2(4), 12-19.
- Meng, H., Xia T., George S., and Nel A.E., 2009. A predictive toxicological paradigm for the safety assessment of nanomaterials. *ACS Nano*, 3, 1620-1627.
- Meng, H., Xia T., George S., Nel A. E., 2009. A predictive toxicological paradigm for the safety assessment of nanomaterials. *ACS Nano*, 3 (7), 1620-1627.
- Mirgorodsky, A.P., Soulis M., Thomas P., Merle-Méjean T., 2006. Ab initio study of the nanlinear optical suseptcible TeO₂ based glasses. *Physical Review B*, 73,134-206.
- Mnyusiwalla, A., Daar A. S., Singer P.A., 2003. Mind the gap: science and ethics in nanotechnology. *Institute of Physics Publishing Nanotechnology*, 14 (3), 9-13.
- Moghim, S.M., 2005. Nanomedicine prospective diagnostic and therapeutic potentials. *Asia Pacific Biotech News*, 9 (20), 1072- 1077.
- Moharamzadeh, K., Brook I. M., Noort R.V., 2009. Biocompatibility of resin-based .*Dental Materials*, 2 (2), 514-548.
- Morena, M., Cristol J.P., Bose J.Y., 2002. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session a contributive factor to oxidative stres in haemodialysis patients.*Nephrol Dial Transplant*, 17 (3), 422-427.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55-63.
- Murray, P.E., García Godoy C., García Godoy F., 2007. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medicina Oral Patologia Oral Cirugia Bucal*, 12 (3), 258-266.
- Nagarajan, R., 2008. Nanoparticles: Building blocks for nanotechnology. *ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC*.
- Napierska, D., Thomassen L.C.J., Rabolli V., Lison D., Gonzalez L., Kirsch-Volders M., Martens J.A. and Hoet P.H., 2009. Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small*, 5 (7), 846-853.
- Nasrallah, H.A., 1987. Neurochemistry and neuropharmacology of schizophrenia. *Neurochemistry and Neuropharmacology*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Nel, A., Xia T., Madler L., Li N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311 (5761), 622–627.

- Nicholson, J.W., 2002. Biological interactions with materials. The Chemistry of Medical and Dental Materials. Connor J.W. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 186-195.
- Nielsen, E., 2008. Nanotechnology and consumer products. Nanotechnology and Its Impact on Consumers. Canada, 18-31.
- Nielsen, G.D., Roursgaard M., Jensen K.A., Poulsen S.S., ve Larsen S.T., 2008. *In vivo* biology and toxicology of fullerenes and their derivatives, Basic and Clinical Pharmacology Toxicology, 103 (3), 197–208.
- Oberdorster, E., 2004. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass, Environmental Health Perspectives, 112 (10), 1058–1062.
- Oberdorster, G., Ferin J., Lehnert B.E., 1994. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. Environmental Health Perspectives, 112 (5), 173-179.
- Oberdörster, G., Oberdörster E., Oberdörster J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environmental Health Perspectives, 113 (7), 823-839.
- Özdoğan, E., Demir A., 2006. Seventekin N., Lotus etkili yüzeyler. Tekstil Ve Konfeksiyon Dergisi, 16 (1): 287-290.
- Özkan, Y., 2014. *Artemia salina*'da TiO₂, AgTiO₂ve ZnOTiO₂ nanopartiküllerinin sulu süspansiyonlarının toksisitesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Pan, Y., Leifert A., Ruau D., Neuss S., Bornemann J., Schmid G., 2009. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. Small, 5 (18), 2067-2076
- Pan, Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., Dechent W.J., 2007. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. Small, 3 (11), 1941–1949.
- Park, E.J., Yi J., Chung K.H., Ryu D.Y., Choi J., Park K., 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. Toxicology Letters, 180 (3), 222–229.
- Parlak, E.B., 2013. Gümüş (Ag0) ve alüminyum (Al0) nanoparçacıklarının aktif çamurdaki mikrobiyal yapıya olan nanotoksikolojik etkileri.Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Percival, M., 1998. Antioxidants. Clinical Nutrition Insights, 10, 1-4.
- Petkau, A. and Chelack W.S., 1984. Radioprotection by superoxide dismutase of macrophage progenitor cells from mouse bone marrow. Biochem Biophys Research Communication, 119 (3), 1089-1095
- Petkau, A., 1987. Role of superoxide dismutase in modification of radiation injury. British Journal of Cancer, 55 (8), 87-95.
- Podda, M. and Kollmann M.G., 2001. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. Clinical and Experimental Dermatology, 26 (7), 578-582.
- Portugal, M., Barak V., Ginsburg I., Kohen R., 2007. Interplay among oxidants, antioxidants and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. Biomedicine and Pharmacotherapy, 61(7), 412-22.
- Pozzolini, M., Scarfi S., Benatti U., and Giovine M., 2003. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. Analytical Biochemistry, 313 (2), 338–341.

- Preining, O., 1998. The physical nature of very, very small particles and its impact on their behaviour. *Journal of Aerosol Science* 5 (6), 481–495.
- Qin, B., Bai Y., Zhou Y., Liu J., Xie X., Zheng W., 2009. Structure and characterization of TeO₂ nanoparticles prepared in acid medium. *Materials Letters*, 63, 1949–1951.
- Quinlan, C.A., Zisterer D.M., Tipton K.F., O'Sullivan M.I., 2002. *In vitro* cytotoxicity of a composite resin and compomer. *International Endodontic Journal*, 35 (1), 47-55.
- Rahman M.F., Wang J., Patterson T.A., 2009. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol Letters*, 187 (1), 15–21.
- Ramires, P.A., Cosentino F., Milella E., Torricelli P., Giavaresi G., ve Giardino R., 2002. *In vitro* response of primary rat osteoblasts to titania/hydroxyapatite coatings compared with transformed human osteoblast-like cells. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 13 (8), 797–801.
- Reichl, F.X., Walther U.I., Durner J., Kehe K., Hickel R., Kunzelmann K.H., Forth W., 2001. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in lung cells. *Dental Material*, 17 (2), 95-101.
- Roco, MC., Williams R. S., Alivisatos P., 2000. (Eds): *Biological, medical and health applications. In Nanotechnology Research Directions*, Boston: Kluwer Academic Publishers, USA.
- Roszek, B., Jong W.H., Geertsma R.E., 2005. *Nanotechnology in medical applications: state-of-the-art in materials and devices*. National Institute for Public Health and Environment, 65-72.
- Sahoo, S.K., 2005. Applications of nanomedicine. *Asia Pacific Biotech News*, 9 (20), 1048- 50.
- Sahoo, S.K., Labhasetwar V., 2003. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*, 8 (24), 1112- 1120.
- Sahoo, S.K., Parveen S., MS., Panda J.J., MS., 2007. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3 (1), 20–31.
- Samal, A.K. and Pradeep T., 2010. Pt₃Te₄ Nanoparticles from tellurium nanowires. *Langmuir*, 26 (24), 19136–19141.
- Schulze, C., Kroll A., Lehr C.M., Schäfer U.F., Becker K., Schnekenburger J., Schulze Isfort C., Landsiedel R. ve Wohleben W., 2008. Not ready to use-overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology*, 2 (2), 51-61.
- Service, R.F., 2005. Nanotechnology. Calls rise for more research on toxicology of nanomaterials. *Science*, 310 (5754), 1609.
- Seymen, P., Seymen H.O., Özdemir A., Belce A., Gümüştas K., Türkmen F ve Barut Y. Ö., 2000. Cuprophane ve polisülfon dializörlerinin oksidan /antioksidan dengesi üzerine etkileri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 31 (2), 74-81.
- Shenhar, R. And Rotello V.M., 2003. Nanoparticles: scaffolds and building blocks. *Accounts of Chemical Research*, 36 (7), 549–561.
- Siciliano, T., Di Giulio M., Tepore M., Filippo E., Micocci G., Tepore A. 2010. Effect of thermal annealing time on optical and structural properties of TeO thin films. *Vacuum*, 84 (2010), 935–939.

- Sies, H., 1991. Oxidative stress: introduction, oxidative stress, oxidants and antioxidants. Sies H (ed), San Diego, CA, Academic Press.
- Simbula, G., Columbano A., Columbano G.M.L., Sana L., Diedda M., Diana A., Pibiri M., 2007. Increased ROS generation and p53 activation in α -lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells. *Apoptosis*, 12 (1), 113–123.
- Singer, P.A. and Daar A. S., 2001. Harnessing genomics and biotechnology to improve global health equity. *Science* 294, (5590), 87-89.
- Singh, R., Pantarotto D., Lacerda L., Pastorin G., Klumpp C., Prato M., Bianco A., Kostarelos K., 2006. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 103 (9), 3357–3362.
- Smith, K.C.A. and Oatley C.W., 1955. The scanning electron microscope and its fields of application. *Journal Applied Physics*, 6, 391
- Soto, K.F., Carrasco A., Powell T.G., Garza K.M. ve Murr L.E. (2005), Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy, *Journal of Nanoparticle Research*, 7 (2-3), 145– 169.
- Sönmez, E., Türkez H., Aydın E., Özgeriş F.B., Öztetik E., Kerli S., Cacciatore I., Di Stefano A., 2015. Hepatic effects of yttrium oxide nanoflowers: in vitro risk evaluation. *Toxicological and Environmental Chemistry*
- Stockert, J.C., Blázquez-Castro A., Canete M., Horobin R.W., 2012. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 114 (8), 785–796.
- Stolle, L.B., Hussain S., Schlager J.J., Hofmann M.C., 2005. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences*, 88(2), 412–419
- Storz, G. and Imlay J., 1999. Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2 (2), 188-194.
- Suh, W.H., Suh Y.H., Stucky G.D. ve Suslick K.S., 2009. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiology*, 87 (3), 133–170
- Suliman, A.O., Alwasel S.H., Ali D., Alarifi S., Harrath A.H., Mansour L., 2013. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress, proinflammatory and genotoxic effect of silver nanoparticles in human lung epithelial cells. *Environmental Toxicology*, 30 (2), 149-160.
- Sun, J., Wang S., Zhao D., Hun F. H., Weng L., Liu H., 2011. Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles in human cardiac microvascular endothelial cells. *Cell Biological Toxicology*, 27 (5), 333–342
- Tarper, M.N., Wink D.A. and Grisham M.B., 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *American Journal of Physiology (Bethesda, MD)*, Regul Integr Comp Physiol, 286 (3), 431-444.
- Thomas, J. P., Geiger P. G., Girotti A. W., 1993. Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein: role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid hydroperoxide- and iron-mediated reactions. *Journal Lipid Research*, 34: 479—90.

- Tuncer, S. ve Demirci M., 2011. Dental materyallerde biyoyumluluk değerlendirmeleri. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 21 (2), 141-149
- Turkez, H. and Geyikoglu F., 2007. An in vitro blood culture for evaluating the genotoxicity of titanium dioxide: the responses of antioxidant enzymes. Toxicology and Industrial Health, 23 (1), 19–23
- Turkez, H., Sönmez E., Di Stefano A., Mokhtar Y. I., 2015. Health risk assessments of lithium titanate nanoparticles in rat liver cell model for its safe applications in nanopharmacology and nanomedicine. Cytotechnology.
- Turkez, H., Yousef M.I., Sönmez E., Togar B., Bakan F., Sozio P., Di Stefano A., 2014. Evaluation of cytotoxic, oxidative stress and genotoxic responses of hydroxyapatite nanoparticles on human blood cells. Journal of Applied Toxicology, 34(4), 373-390.
- Turkez, H., 2011. The role of ascorbic acid on titanium dioxide-induced genetic damage assessed by the comet assay and cytogenetic tests. Experiment and Toxicology Pathology, 63(5), 453-457.
- Turkez, H., Geyikoglu F., Keles M. S., 2005. Biochemical response to colloidal bismuth subcitrate: dose-time effect. Biological Trace Element Research, 105 (1-3), 151-158.
- Turkez, T., Sonmez E., Turkez Ö., Mokhtar Y.I., Di Stefano A., Turgut G., 2014. The risk evaluation of tungsten oxide nanoparticles in cultured rat liver cells for its safe applications in nanotechnology. Brazilian Archives of Biology and Technology, 57 (4), 532-541.
- Vaddadi, K.S., 1991. Essential fatty acids and alpha-tocopherol supplementation in tardive dyskinesia. Biological Psychiatry, 1 (2), 618-620.
- Valko, M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 39 (1), 44–84.
- Valko, M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions, 160 (1), 1–40.
- Wang, F., Gao F., Lan M., Yuan H., Huang Y., Liu J., 2009. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. Toxicology in Vitro, 23 (5), 808–815
- Warheit, D.B., Laurence B.R., Reed K.L., Roach D.H., Reynolds G.A.M., and Webb T. R., 2004. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. Toxicological Sciences, 77 (1), 117–125.
- Wen, H., Zhong J., Shen B., Gan T., Fu C., Zhu Z., Li R., Yang X., 2013. Comparative study of the cytotoxicity of the nanosized and micro-sized tellurium powders on HeLa cells. Frontiers in Biology, 8 (4), 444-450
- Weyermann, J., Lochmann D., Zimmer A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. International Journal of Pharmaceutics, 288 (2), 369–376.
- Whitesides, G.M., 2003. The right size in nanobiotechnology. Nature Biotechnology, 21, 1161- 1165.

- Xia, T., Kovochich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T., Sioutas C., Yeh J.I., Wiesner M.R., and Nel A.E., 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters*, 6 (8), 1794-1807.
- Xing, M., 2012. Oxidative stress: a new risk factor for thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 19, 7–11.
- Yapıörer, E., 2010. TeO₂ kristelinin lineer ve lineer olmayan optik özelliklerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Yıldız, D., Liu Y.S., Ercal N., Armstrong D.W., 1999. Comparison of pure nicotine- and smokeless tobacco extract-induced toxicities and oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol*, 37 (4), 434-9.
- Yoshida, K., Morita M., Mishina H., 2003. Cytotoxicity of metal and ceramic particles in different sizes. *JSME International Journal C Mechanic Systems*, 46 (4), 1284–1289.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2007 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Biyoloji bölümünden 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2012-2015 yılları arasında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.